



DISTRIBUIÇÃO ELEMENTAR QUÍMICA EM ESFEROIDES CELULARES DE
PROSTATA USANDO MICROFLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

Roberta Gama Leitão

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

Orientador: Ricardo Tadeu Lopes

Marcelino José dos Anjos

Rio de Janeiro

Março de 2013

DISTRIBUIÇÃO ELEMENTAR QUÍMICA EM ESFEROIDES CELULARES DE
PRÓSTATA USANDO MICROFLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

Roberta Gama Leitão

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

Examinada por:

Prof. Ricardo Tadeu Lopes, D.Sc.

Prof. Marcelino José dos Anjos, D.Sc.

Prof. Alfredo Victor Bellido Bernedo, Ph.D.

Prof. Inayá Corrêa Barbosa Lima, D.Sc.

Prof. Luiz Eurico Nasciutti, D.Sc.

Prof. Roberto Cesareo, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

MARÇO DE 2013

Leitão, Roberta Gama

Distribuição Elementar Química em Esferoides Celulares de Próstata usando Microfluorescência de Raios X/Roberta Gama Leitão. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2013.

XI, 105 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: Ricardo Tadeu Lopes

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Nuclear, 2013.

Referencias Bibliográficas: p. 73-84.

1. Fluorescência de Raios X. 2. Próstata. 3. Radiação Síncrotron. I. Lopes, Ricardo Tadeu. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Nuclear. III. Título.

Aos meus pais Maria Teresa e Evandro

Ao meu irmão Evandro Jr.

E ao meu namorado Eduardo

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois sem o consentimento dele eu não teria conseguido.

A minha mãe por estar comigo em todas as horas, seu amor e carinho e ao meu pai pelo amor e carinho.

Ao meu namorado Eduardo, pela compreensão, amor e companheirismo em todos os momentos.

A todos meus familiares pelo apoio, paciência e carinho ao longo do doutorado.

Ao Prof. Ricardo Tadeu Lopes (PEN/COPPE/UFRJ) por sua orientação, pelo auxílio e atenção durante a elaboração deste trabalho e por permitir o desenvolvimento desta tese.

Ao Prof. Marcelino (Instituto de Física/UERJ) por sua orientação, disponibilidade, pelos conhecimentos transmitidos, pelas críticas construtivas, pelo incentivo, dedicação, paciência para com as minhas dificuldades, sempre me ajudando a crescer como pesquisadora e como pessoa e por sua amizade.

Ao Prof. Luiz Eurico Nasciutti, chefe do Laboratório de Interações Celulares Labic/ICB/CCS/UFRJ, pelo fornecimento das amostras, pela disponibilidade das instalações de seu laboratório, pelo incentivo no aprendizado de cultura celular e pelo comprometimento e responsabilidade durante a elaboração deste trabalho.

Ao Dr. Pedro Souza (Hospital do Andaraí), pelo fornecimento das amostras e comprometimento durante a elaboração deste trabalho.

Ao Dr. Carlos Antônio, (LABIO/DIPRO/INMETRO) pela introdução ao cultivo de esferoides celulares, paciência, incentivo e comprometimento durante a elaboração deste trabalho.

A Dra. Catarine Canellas, amiga e colaboradora neste estudo, pela ajuda na preparação das amostras e aquisição dos dados, pela dedicação, paciência, incentivo e amizade.

A Prof. Gabriela Pereira (LNDC/COPPE/UFRJ), pela cooperação ao longo de todo trabalho.

Ao Dr. Carlos Peres, LNLS/CNPq. pelo suporte e orientação oferecidos nas medidas no LNLS.

Ao Mrs. Antônio Palumbo Jr., (Labic/ICB/CCS/UFRJ) pela disponibilidade e ajuda na elaboração deste trabalho.

Agradeço a todos os amigos pelo apoio e incentivo nas horas difíceis e pelo carinho e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Instrumentação Nuclear, pelo incentivo, apoio, amizade, pela troca de conhecimento e pelos momentos de descontração essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a todos os funcionários do laboratório de Instrumentação Nuclear.

A todos do Labic (ICB/CCS/UFRJ) em especial a Técnica Maria Aparecida por terem me recebido, me iniciado na técnica de cultura celular com paciência e carinho.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNLS, pela oportunidade de trabalhar com equipamentos de alta tecnologia para a obtenção dos resultados essenciais à este trabalho.

Ao Centro Nacional de pesquisas (CNPq), pelo apoio financeiro essencial no decorrer do estudo.

A tantos outros que direta e indiretamente ajudaram, ocasionalmente com dicas e conselhos, permitindo que este trabalho pudesse ser concluído.

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

DISTRIBUIÇÃO ELEMENTAR QUÍMICA EM ESFERÓIDES CELULARES DE PRÓSTATA USANDO MICROFLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

Roberta Gama Leitão

Março/2013

Orientadores: Ricardo Tadeu Lopes

Marcelino José dos Anjos

Programa: Engenharia Nuclear

Doenças da próstata, tais como câncer de próstata (CaP) e hiperplasia benigna da próstata (HPB) são os problemas de saúde mais frequentes em homens que passaram da meia-idade. Muitos elementos químicos desempenham um papel fundamental em diversos processos biológicos como ativadores ou inibidores da atividade celular e enzimática. O objetivo deste trabalho foi estudar a distribuição química elementar em tecidos de próstata normais e em esferóides derivados de células de próstata humana com CaP e HPB e analisar as diferenças na resposta ao tratamento com zinco em esferóides celulares de CaP e HPB. As medidas foram realizadas utilizando a técnica de microfluorescência de raios X (μ XRF) na linha de luz XRF do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas, Brasil, utilizando um feixe branco com energia máxima de 20 keV para excitação e um detector Si (Li). O experimento foi realizado em geometria padrão ($45^\circ \times 45^\circ$), usando um sistema convencional de colimação por fendas ortogonais para análise do tecido e ótica capilar para análise dos esferóide. Os resultados da análise de tecido mostraram que a maioria dos elementos analisados apresentou distribuição não uniforme para as diferentes áreas da próstata examinadas. Os resultados dos esferóides analisados mostraram que todos os elementos analisados apresentaram distribuição não uniforme em áreas diferentes dos esferóides analisados.

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

CHEMICAL ELEMENTAL DISTRIBUTION IN PROSTATE CELL
SPHEROIDS USING X RAY MICROFLUORESCÊNCIA

Roberta Gama Leitão

March/2013

Advisors: Ricardo Tadeu Lopes

Marcelino José dos Anjos

Department: Nuclear Engineering

Prostate gland diseases such as Prostate cancer (PCa) and Benign prostate hyperplasia (BPH) are the most frequently health problems in men past middle age. Many chemical elements play an essential role in a number of biological processes as activators or inhibitors of cellular and enzymatic activity. The aims of this work was to study the chemical elemental distribution in normal prostate tissues and in spheroid derived human prostate cells with cancer and BPH and analyze the differences in the response to treatment with Zinc in PCa and HPB cell spheroids. The measurements were carried out using X-ray microfluorescence (μ XRF) technique in the XRF beam line at the Synchrotron Light National Laboratory (LNLS), in Campinas, Brazil, using a white beam with maximum energy of 20 keV for excitation and a Si(Li) detector. The experiment was performed in standard geometry ($45^\circ \times 45^\circ$), using a conventional system collimation orthogonal slits to tissue analysis and optical capillary to spheroid analysis. The results of the tissue analysis showed that most elements analyzed presented non-uniform distribution for the different areas of the prostate examined. The results of the spheroids analyzed showed that all the elements analyzed presented non-uniform distribution in different areas of the spheroids analyzed.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO I.....	01
I - INTRODUÇÃO.....	01
CAPÍTULO II.....	04
II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
II. 1 - Determinação de elementos traços em amostras biológicas.....	04
CAPÍTULO III.....	11
III - FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	11
III. 1 – A próstata.....	11
III. 1. 1 - Hiperplasia Prostática Benigna (HPB).....	14
III. 1. 2 - Câncer e Câncer de Próstata.....	15
III. 2 - Cultura de células.....	17
III. 2. 1 - Cultura em três dimensões (3D) e Esferoides celulares.....	18
III. 3 – Interação da radiação com a matéria.....	20
III. 3.1 – Efeito fotoelétrico.....	20
III. 4 - A Fluorescência de Raios X (XRF).....	21

III. 4 1 - Microfluorescência de Raios X (μ XRF).....	25
III. 5. - Radiação Síncrotron.....	26
CAPÍTULO IV.....	31
IV - MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
IV.1 – Obtenção e preparação do tecido prostático.....	31
IV.2 – Obtenção e preparação dos esferoides celulares.....	31
IV. 3 – Tratamentos com zinco.....	33
IV. 4 –Experimental - Análise por μ XRF.....	34
IV.4.1 - Análise de tecido prostático.....	34
IV.4.2 - Análise de esferoides celulares.....	36
IV. 5 - Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).....	37
IV. 6 – PyMca.....	39
CAPÍTULO V.....	40
V - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
V. 1. – Resultados.....	40
V.1.1. – Análise de tecidos de próstata.....	40
V. 1. 2 – Análise de esferóides celulares de próstata.....	51

V. 1. 2. 1 – Tratamentos com zinco.....	58
V. 2. – Discussão geral dos resultados dos principais elementos envolvidos nas funções da próstata e em processos patológicos.....	65
CAPÍTULO VI.....	71
CONCLUSÃO.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
APÊNDICE A.....	85
Trabalhos publicados em periódicos com os resultados obtidos no trabalho de Doutorado.....	85

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Este trabalho de tese visa fornecer informações para um melhor entendimento sobre as patologias ocorridas na próstata, como o Câncer prostático (CaP) e a Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) através da investigação da distribuição de elementos traços em tecido de próstata e *in vitro*.

Em termos de valores absolutos, o câncer de próstata é o sexto tipo de câncer mais comum no mundo e o mais prevalente em homens, representando cerca de 10% do total de câncer. As taxas de incidência desse tipo de câncer são cerca de seis vezes maiores nos países desenvolvidos, comparados aos países em desenvolvimento. No Brasil, o câncer de próstata é a segunda neoplasia mais freqüente nos homens, ficando atrás dos tumores de pele não melanoma (INCA, 2009). O número de casos novos de câncer de próstata estimado para o Brasil no ano de 2012 é de 60.180. Estes valores correspondem a um risco estimado de 62 casos novos a cada 100 mil homens (INCA, 2011). No Estados Unidos, este tipo de câncer é responsável por cerca de 28.170 das mortes e estima-se que em 2012 foram diagnosticados 241.740 novos casos (CANCER FACTS & FIGURES 2012, 2012). Em geral, a sobrevida média mundial estimada em cinco anos é de 58%. Nos países desenvolvidos, essa sobrevida passa para 76% e nos países em desenvolvimento 45% (INCA, 2009).

A HPB é a doença urológica de maior prevalência em homens com idade superior a 50 anos, alcançando 90% de incidência depois da nona década de vida. A HPB é caracterizada por um crescimento tumoral benigno que resulta na hiperplasia do estroma e do tecido glandular, causando entre outros sintomas, fluxo urinário fraco, nocturia, infecção urinária, retenção urinária e conseqüentemente limitações em atividades sociais (LEE e BUSHMAN, 1995).

A análise através da distribuição bidimensional e da estrutura eletrônica de determinados elementos traços em tecidos biológicos é muito importante e foi tema de estudos recentes (KWIATEK *et al.*, 2004a, 2008b, IDE-EKTESSABI *et al.*, 2004, FARQUHARSON *et al.*, 2007). Os mapas de elementos (mapeamento químico) são muito úteis para compreender certos processos que ocorrem em amostras heterogêneas de origem industrial, geológicas, arqueológicas, biológicas e ambientais. A análise da

estrutura eletrônica de certos elementos pode prover informações sobre os fenômenos químicos associados a processos carcinogênicos.

A participação do zinco em processos biológicos da próstata já foi descrita em diversos trabalhos (COSTELLO *et al.*, 2006, FRANKLIN *et al.*, 2005, MILACIC *et al.*, 2008, SLIWINSKI *et al.*, 2009, SONG *et al.*, 2010). Estudos mostraram que a distribuição de zinco na próstata não é uniforme e que sua concentração diminui em tecidos com CaP e aumenta em tecidos prostáticos com HPB (ZAICHICK *et al.*, 1997, VARTSKY *et al.*, 2003). Vários estudos mostraram que o ferro pode ter algum papel no desenvolvimento de tumores cancerígenos. O ferro é integrante de diversas proteínas e enzimas e participa do crescimento e desenvolvimento da célula (MAJEWSKA, *et al.*, 2007). Outro elemento fundamental no funcionamento das células da próstata é o enxofre. O enxofre e seus ligantes estão envolvidos em muitos processos importantes como replicação, transcrição e tradução do material genético (KWIATEK *et al.*, 2008).

Este trabalho tem como objetivo principal analisar a distribuição bidimensional elementar de certos elementos em tecido prostático de indivíduos sem patologias prostáticas e em esferóides celulares estabelecidos a partir de biópsias prostáticas de portadores de câncer de próstata e de hiperplasia prostática benigna (HPB). A μ XRF vem sendo utilizada pelo fato de ser uma ferramenta poderosa na análise de elementos traços em tecidos biológicos. Os mapas elementares obtidos através da μ XRF podem ser utilizados para identificar células, tecidos, ou inclusões que têm concentrações de metais distintas em amostras biológicas. As principais vantagens da utilização da μ XRF são: baixa energia de dissipação e praticamente nenhum dano térmico na amostra a ser analisada, não existe perda de elementos voláteis, logo não há necessidade de vácuo e baixo *background*, resultando em melhores limites de detecção (SERPA 2007).

Os objetivos específicos são:

1. Analisar tecidos prostáticos de indivíduos normais (grupo controle) através da técnica de μ XRF para obter quantitativamente e qualitativamente o mapa bidimensional da distribuição elementar química,
2. Analisar esferóides celulares derivados de células prostáticas obtidas de biópsias de portadores de CaP e HPB através da técnica de μ XRF para obter qualitativamente o mapa bidimensional da distribuição elementar, de modo a analisar a interação dos diferentes tipos celulares presentes e a distribuição dos elementos químicos.

3. Analisar as diferenças na resposta ao tratamento de Zinco em esferóides celulares de CaP e controle através da técnica de microfluorescência de Raios X (μ XRF).

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II. 1 – Determinação de elementos traços em amostras biológicas.

Durante as últimas décadas, a análise de elementos em campos tão diferentes como a medicina, biologia e ciências ambientais tem sido bem estabelecida (EKINCI e INGEÇ 2008). Elementos traço (Oligoelementos) desempenham um papel significativo nos processos biológicos. Eles são capazes de afetar a saúde humana, competindo com elementos essenciais para sítios de ligação disponíveis e pela ativação ou inibição de reações entre enzimas metabólicas (AL-EBRAHEEM *et al.*, 2009).

Atualmente, existem várias técnicas bem estabelecidas para determinar as concentrações de elementos-traço em tecidos humanos, tais como fluorescência de raios X induzida por próton (PIXE) (KUBALA – KUKUS *et al.*, 1999, RAJU *et al.*, 2006) análise por ativação neutrônica instrumental (INAA) (NG *et al.*, 1997, ZAICHICK *et al.*, 2004, EBRAHIM *et al.*, 2007), espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (MILLOS *et al.*, 2008) Atomização por Forno de grafite e Atomização por Chama (GFAAS e FFAAS respectivamente) (SIDDIQUI *et al.*, 2006), fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF) (GERAKI *et al.*, 2002, 2004, POLETTI *et al.*, 2004, SILVA *et al.*, 2008) e Fluorescência de Raios X por reflexão Total (TXRF) (BENNINGHOFF *et al.*, 1997, MAJEWSKA *et al.*, 1997, 1999, 2007, KUBALA – KUKUS *et al.*, 2007, SILVA *et al.*, 2009).

A XRF é um método analítico que tem sido muito utilizado, pois se trata de uma técnica não destrutiva que possibilita a análise multielementar em uma única medida e permite uma avaliação qualiquantitativa da composição química de vários tipos de amostras biológicas. A análise através da técnica XRF tem sido descrita por muitos autores na análise de amostras de tecidos biológicos para investigar a influência de elementos traços no desenvolvimento de neoplasias, principalmente em processos carcinogênicos (KUBALA – KUKUS *et al.*, 1999, 2007, CHWIEJ *et al.*, 2005). Usando EDXRF, os níveis de Pb, K, Ca, Cu Fe, Zn, Br, Rb, Sr, e As foram determinados na urina de 937 trabalhadores expostos a altos níveis de ingestão de Pb em seis diferentes situações de trabalho (THI HONG *et al.*, 1996). Usaram a XRF para determinar a concentração de Zinco em amostras de tecido de próstata com HPB e com câncer

prostático (ZAICHICK *et al.*, 1997, 2004, VARTSKY *et al.*, 2003, SHILSTEIN *et al.*, 2006). Amostras de tecido de pulmão humano maligno e benigno foram analisadas por dois métodos complementares, ou seja, PIXE e TXRF (KUBALA KUKUS *et al.*, 1999). A possibilidade de utilizar EDXRF e a análise por Fluorescência de Raios X com Radiação Síncrotron (SRXRF) para a medição do teor de elementos traço no cabelo das mulheres com hiperplasia mamária e câncer foi demonstrada (KOLMOGOROV *et al.*, 2000). Amostras de tecido de mama normais e com câncer foram analisadas utilizando um sistema de XRF (GERAKI e FARQUHARSON, 2001, GERAKI *et al.*, 2004). Técnicas de EDXRF foram usados para analisar pedras da vesícula biliar (EKINCI e AHIN, 2002).. Concentrações dos elementos presentes no câncer de pulmão esquizofrênico, e sangue de pacientes leucêmicas foram determinados utilizando o método de EDXRF (EKINCI e EKINCI, 2004). Utilizaram a TXRF para determinar as concentrações de Fe, Cu, Zn e Se em amostras de tecidos malignos e benignos de mama, pulmão e cólon (MAJEWSKA *et al.*, 2007). A TXRF foi utilizada para estudar as concentrações elementares em tecidos de mama humana (tecidos normais, tecidos benigno, tecidos malignos e tecidos normais adjacentes a tecidos malignos) e realizaram um estudo comparativo (KUBALA – KUKUS *et al.*, 2007, SILVA *et al.*, 2009). MAGALHÃES *et al.*, (2010) utilizou TXRF para analisar os tecidos saudáveis e cancerígenos de um mesmo indivíduo ao longo de várias seções contíguas fina de cada tecido: mamário, intestino e estômago. CANELLAS *et al.*, (2012), utilizou TXRF para analisar o soro de pacientes com anemia falciforme (AF) e de indivíduos saudáveis. Foram identificados os elementos P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn, Br e Rb. Foi encontrado um aumento de Fe e na relação Cu/Zn em amostras de soro de pacientes com AF. Eles concluíram que a investigação das concentrações dos elementos Fe, Cu, Zn e Cu/Zn podem ser capazes de ajudar em estudos sobre o desenvolvimento de AF.

A distribuição e ambiente químico local de metais e não-metais em tecidos e células fornecem informações importantes para o conhecimento estrutural e funcional de qualquer tipo de organismo. Para obter informações sobre as espécies químicas, bem como as suas concentrações e locais é crucial para a compreensão de suas funções biológicas e processos metabólicos (WU e BECKER, 2011). O emprego da microfluorescência de raios X possibilita a determinação de uma variedade de elementos químicos em amostras de dimensões diminutas, inclusive permitindo a verificação da distribuição espacial dos mesmos. Entretanto, a determinação de elementos em níveis diminutos (ng/g), empregando suas radiações características,

requer uma fonte e raios X muito intensos. Este requerimento tem como finalidade evitar problemas severos de correção de fundo, principalmente aqueles gerados a partir da emissão de elétrons secundários. Tal problema pode ser evitado ao se empregar uma fonte de raios X extremamente intensa, como as encontradas em laboratórios de luz síncrotron (JANSSENS *et al.*, 2000).

Mais recentemente, radiação síncrotron com base em microscopia fluorescência de raios X (μ XRF) tem demonstrado ser uma porta promissora para a obtenção de imagens elementares a nível celular (DILLON *et al.*, 2003, KEMNER *et al.*, 2004, PAUNESKU *et al.*, 2003, TWINING *et al.*, 2003). Neste sentido, o emprego de radiação síncrotron e microfluorescência de raios X (μ SRXRF) abre inúmeras oportunidades para determinação e/ou mapeamento de elementos químicos em amostras com diferentes propriedades físicas (ADAMS *et al.*, 1998). A primeira micro sonda de fluorescência de raios X acoplada à radiação síncrotron foi proposta em 1972 por Horowitz e Howell, e atualmente diversas aplicações de micro sondas são encontradas na literatura (AL-EBRAHEEM *et al.*, 2009a e 2010b, GUERRA *et al.*, 2010, KASTYAK *et al.*, 2010, ZIMMER *et al.*, 2011).

Desde então, varias aplicações envolvendo μ SRXRF tem sido realizadas, dentre elas destacam se as aplicações em pesquisa médica. Isto é resultado do fato que este método possibilita a investigação das mudanças da composição elementar a nível celular (BOHIC *et al.*, 2001, SUGIMOTO *et al.*, 2004, SZCZERBOWSKA-BORUCHOWSKA *et al.*, 2004), o que é particularmente importante, pois os processos bioquímicos patológicos ocorrem a um nível de escala micro e submicro. Adicionalmente, há evidências fortes que metais ou íons de metais estão diretamente associados com a etiologia ou manifestação de muitas patologias (BUSH *et al.*, 2000, CAMPBELL *et al.*, 2001, TAKEDA *et al.*, 2003, KAUR *et al.*, 2004). FLINN *et al.*, (2005), examinaram através da técnica μ SRXRF a influencia na memória de ratos do uso de suplementos de zinco em água durante os períodos de 3 ou 9 meses. A μ SRXRF foi utilizada para analisar as diferenças na distribuição elementar de certos elementos em fatias de cérebro de ratos Wistar normais com o objetivo de ajudar a elucidar os mecanismos e os efeitos dos oligoelementos nas funções cerebrais. μ SRXRF pode determinar as alterações nas concentrações desses elementos sob condições normais e patológicas, que fornece informação útil sobre a fisiologia e patologia do cérebro (FENG *et al.*, 2005).

CHWIEJ *et al.*, (2005). Estudaram os resultados obtidos por μ SRXRF utilizando diferentes métodos de preparação de amostra, para analisar a influência do processo de fixação e do processo de emblocamento em parafina. Para estes estudos foram utilizadas amostras de cérebro de rato. Foi observada a diminuição de massa por unidade de área de K, Br e o aumento de P, S, Fe, Cu e Zn no tecido como resultado do processo de fixação. Para as amostras embutidas em parafina, foi observado um nível mais baixo da maioria dos elementos.

TOMIK *et al.* (2006), realizaram uma investigação utilizando μ SRXRF para a determinação da composição elementar de tecido cerebral (massa cerebral), células nervosas e tecidos da espinha que representam três casos de ALS (esclerose lateral amiotrófica) e cinco controles (não-ALS). Na análise das seções dos tecidos foram encontrados os seguintes elementos P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn e Br. Foi achada uma alta concentração dos elementos Cl, K, Ca, Zn e Br em células nervosas comparando com o tecido vizinho. Os resultados de análise quantitativa mostraram que não havia nenhuma anormalidade geral na acumulação elementar entre o ALS e o grupo de controle. Porém, para casos de ALS individuais foram observadas tais anormalidades para as células de nervosa. Também demonstraram diferenças na acumulação elementar entre os casos de ALS analisados.

FARQUHARSON *et al.*, (2007), descreveram um estudo sobre a distribuição espacial dos elementos Cl, Ca, K, P, S, Ti, Fe, Cu e Zn em tecido de mama com câncer com foco principal no cobre e foco secundário no ferro e zinco utilizando μ SRXRF. Através dos resultados obtidos, a μ SRXRF mostrou-se satisfatória, pois apresentou mapas elementares com boa resolução na distribuição elementar.

AL-EBRAHEEM *et al.*, (2009), Mediram os níveis relativos de K, Fe, Cu e Zn, em condições normais e malignas no fígado e no tecido renal, bem como o mapeamento de micro-elementos-traço em carcinoma ductal invasivo de tecido de mama, com objetivo de identificar as diferenças em níveis de traço entre o tecido normal e cancerígeno e correlacionar a deficiência ou excesso observado na carcinogênese. Os resultados para a distribuição de elementos em tecidos de mama, indicaram uma forte correlação entre a localização dos pólos da célula cancerosa e as áreas de elevado teor de metais de Zn, Fe, Ca e Cu. No entanto, os mapas das distribuições elementar de Fe em amostras de outras manifestações mostraram comportamento inverso. O cobre tem sido de particular interesse no estudo do tecido mamário devido à sua contribuição para a angiogênese.

KASTYAK *et al.*, (2010), Estudaram alterações bioquímicas por Síncrotron espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (sFTIR) e μ XRF nas regiões do sistema nervoso central (SNC) de seis portadores de esclerose lateral amiotrófica (ALS) e três não-degenerado (controle) com o objetivo de avaliar a ocorrência e distribuição de cristais de creatina. Foi encontrado depósitos heterogêneo na medula espinhal, tronco cerebral e no córtex do neurônio motor em dois casos ALS. A assinatura FTIR de creatina foi identificada nesses depósitos e em grande depósitos não pigmentados em quatro dos casos de ALS. Os elementos Ca, K, Fe, Cu e Zn, conforme determinado por μ XRF, não foram correlacionados com os depósitos pigmentados, no entanto, houve uma maior incidência de hot spots (Ca, Zn, Fe e Cu) nos casos de ALS. A identidade dos depósitos pigmentada permanece desconhecida, embora a ausência de Fe argumenta contra os eritrócitos e neuromelanin. Eles concluíram que os depósitos de elevação da creatina podem ser indicadores de processos oxidativos disfuncionais, em alguns casos ALS.

BRADLEY *et al.*, (2010), realizaram um estado-da-arte de técnicas de radiação ionizante, incluindo micro fluorescência de raios X com radiação síncrotron (μ -SRXRF) mapeamento de retroespalhamento Rutherford (μ -PIXE/RBS), baixo ângulo de espalhamento coerente de raios X (cSAXS) e de imagem de raios X de contraste de fase, disponibilizando informações elementares sobre make-up, a organização em grande escala de colágeno e características anatômicas de moderada e baixo número atômico. Analisaram a correspondência entre a absorção de elementos e dos tecidos afetados e a progressão da doença.

GUERRA *et al.*, (2010), determinaram por μ SRXRF a distribuição espacial de chumbo e de cálcio no esmalte e na dentina de dentes primários doados por crianças que vivem em uma área sabidamente contaminada por chumbo. Foi observado que o nível de significância de Pb foi alto na superfície do esmalte. Além disso, Pb / Ca diminui de intensidade a partir da superfície do esmalte à dentina circumpulpar. Esses resultados podem ajudar esclarecer como os níveis de chumbo na superfície do esmalte estão relacionados com o contexto ambiental.

O Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN/COPPE/UFRJ) tem realizado estudos utilizando SRXRF para a determinação da distribuição elementar em amostras biológicas.

ANJOS *et al.* (2004), utilizaram a μ SRXRF para estudar a distribuição elementar de Ca, Zn e Sr ao longo das regiões, esmalte, dentina e polpa de dentes humanos. Os

resultados mostraram que a verificação do mapa de distribuição de Ca, Zn e Sr em todas as amostras analisadas eram muito semelhantes.

PEREIRA et al (2007a, 2007b, 2007c) desenvolveram um sistema de microtomografia por fluorescência de raios X (XRFCT) no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) e analisaram amostras de tecido humano com câncer de intestino e de mama. Foi possível ver a distribuição elementar de cobre, ferro e zinco nas amostras analisadas.

ROCHA et al., 2007 analisaram amostras de tecido da mama através das técnicas de Imagem Melhorada por Difração (DEI) e XRFCT. A análise por XRFCT mostrou a distribuição elementar de cobre, ferro e zinco.

PEREIRA et al (2008, 2009a, 2009b, 2010) usaram XRFCT para estudar a distribuição elementar em diferentes amostras de tecido humano com e sem malignidade. Eles utilizaram dois diferentes algoritmos para reconstrução de imagens: um algoritmo comum usado em CT, e o algoritmo MKCORR para correções de absorção. Utilizaram diferentes tipos de feixe quasemonocromático. A comparação das imagens de XRF reconstruídas com algoritmos diferentes apresentaram as mesmas características. Mas, na análise dos perfis, foi observada uma grande diferença na intensidade entre o algoritmo sem correções de absorção e o algoritmo com correção de absorção. Concluíram que utilizando um feixe quasemonocromático de 12 keV, obtém-se uma imagem com valor estatístico superior, com menos defeitos radiais, e dentro de um tempo mais curto de medição, em comparação com o uso do feixe monocromático de 9,8 keV. Eles mostraram que a concentração de Fe, Cu e Zn é maior em amostras com tumor do que em amostras saudáveis.

SERPA *et al.* (2008) determinaram através da técnica μ SRXRF as distribuições de Zn, Fe e Cu em secções coronais de cérebros de ratas Wistar de diferentes idades e realizaram um estudo para associar as distribuições destes elementos e os mecanismos químicos do cérebro que induzem algumas doenças neurológicas.

LIMA *et al.* (2008a, 2010) empregaram as técnicas μ SRXRF e micro tomografia computadorizada 3D (micro-CT) para caracterização de estruturas ósseas da cabeça femoral e as regiões corticais e trabecular de ratas wistar controle e submetidas a ovariectomia. Os resultados por μ SRXRF mostraram a distribuição bidimensional elementar do enxofre, fósforo e cálcio para região trabecular e cortical. Em outro trabalho Lima *et al.*, (2008b) utilizaram a técnica μ SRXRF para investigar a alteração da composição mineral óssea em ratos sadios e em ratos com hipertireoidismo induzido.

Apresentaram a distribuição de P, S, K, Ca, Zn e Sr para os dois grupos controle e hipertiroidismo. Mostraram também que houve uma redução na espessura cortical e trabecular.

Em estudos recentes (PEREIRA et al., 2011, 2012) utilizaram a microtomografia por fluorescência de raios X (XRF μ CT) para determinar a distribuição elementar de ferro, cobre e zinco em amostras biológicas. A técnica XRF μ CT permitiu a visualização tridimensional da distribuição elementar, sem danificar o material e forneceu uma análise qualitativa e quantitativa dos tecidos biológicos analisados.

SALES *et al.*, (2012) combinou as técnicas de microtomografia de raios X (μ CT) e μ XRF para avaliar a qualidade da micro arquitetura interna de tecidos ósseos. Os resultados por μ XRF mostraram as distribuições de que o cálcio, zinco e estrôncio. Os resultados mostraram que μ CT e μ XRF provaram serem técnicas alternativas e complementares para estudar a qualidade das estruturas ósseas.

CAPÍTULO III

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

III. 1 – A Próstata

A próstata é a maior glândula acessória do sistema reprodutor masculino. Ela produz parte do fluido seminal. Durante a ejaculação, o fluido seminal, como parte do sêmen, ajuda no transporte dos espermatozoides. A próstata é um órgão sólido, com massa em torno de 20 gramas, encontra-se ao redor da uretra masculina, entre a bexiga e o diafragma vesical. Uma camada fina de tecido conjuntivo envolve a próstata. A glândula prostática se liga à sínfise púbica pelo ligamento puboprostático e é separada do reto, posteriormente, pelo septo retrovesical (ou fásia de Denovillier) o qual se une, acima pelo peritônio e abaixo, pelo diafragma urogenital. Na extensão póstero-superior da próstata localizam-se as vesículas seminais e os vasos deferentes, enquanto que na face anterior, encontram-se o complexo venoso dorsal. Delineadas pelos músculos levantadores do ânus estão às margens laterais da glândula, formando o sulco lateral prostático (MCNEAL,1972a, 1988b, SALVAJOLI *et al.*, 1999, NICKEL 1999). A Figura 3. 1. ilustra a localização da próstata e suas relações com outros órgãos.

Histologicamente, a próstata é constituída de músculo liso, tecido glandular e tecido conjuntivo. A próstata é composta de estroma fibromuscular e 30-50 glândulas que se abrem na uretra, lateralmente ao verum montanum, através de 15 a 30 ductos excretores. A glândula normal apresenta variações na quantidade de estroma e epitélio nas diferentes zonas ou regiões: a chamada próstata interna é composta pelas zonas de transição e pelas glândulas periuretrais, rica em estroma, enquanto que a chamada próstata externa é composta pela zona periférica, rica em tecido epitelial (LEE *et al.*, 1995, MCNEAL, 1990).

A próstata foi dividida por MCNEAL (1988) em quatro áreas morfológicas, denominadas zonas, são elas: zona periférica (70% da glândula), zona de transição (2%), zona central (20%), e zona fibromuscular anterior (8 a 30%).

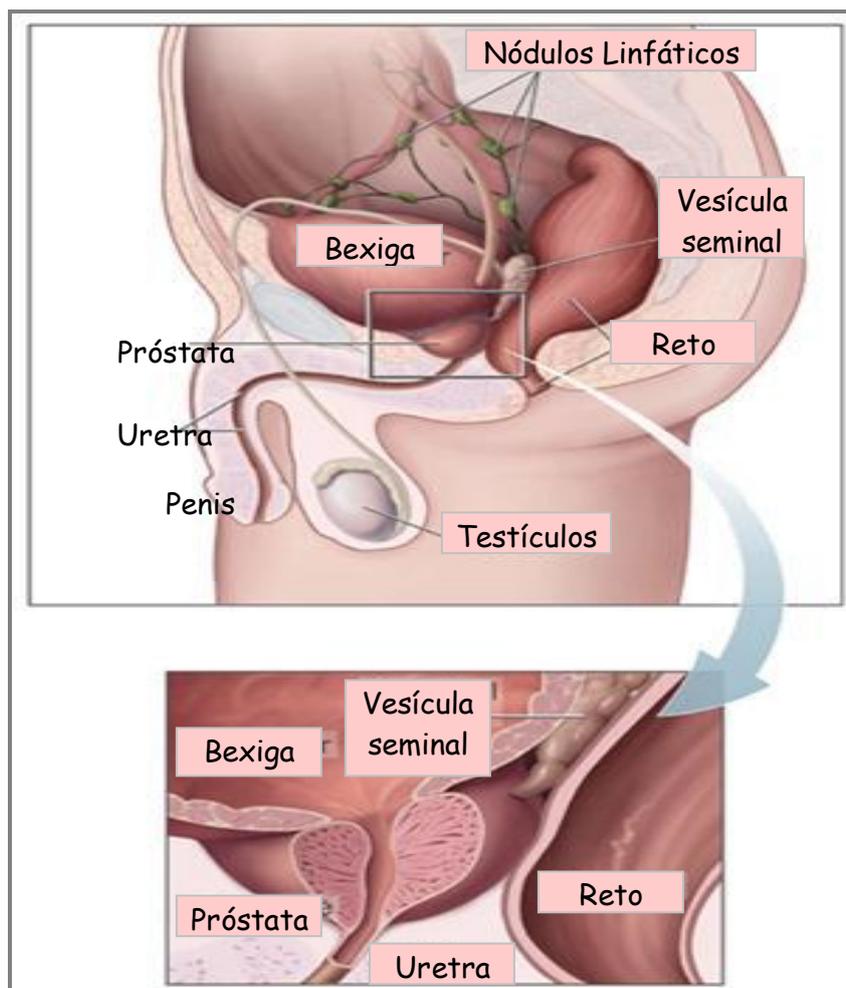


Figura 3.1. Ilustração da localização da próstata e de suas relações com outros órgãos (NCI, 2011).

A principal função da próstata é a produção do líquido prostático; este fluido, como parte do sêmen, facilita o transporte, ajuda nutrir e proteger os espermatozoides durante a ejaculação. É levemente ácido (pH 6.5) e contém várias substâncias biológicas importantes como: frutose, ácido cítrico, espermina, prostaglandinas, zinco, proteínas e enzimas específicas, como as imunoglobulinas, proteases, estearases e fosfatases (FAIR e CORDONNIER, 1978, WEIDNER *et al.*, 1991, ZAICHICK *et al.*, 1996, WALSH *et al.*, 2002). Entre elas o PSA (Antígeno Prostático Específico) que provou ser de grande importância para o diagnóstico do Câncer de Próstata. O PSA é uma glicoproteína, que atua como uma protease serina, contém 7% de carboidratos e é achado quase que exclusivamente nas células epiteliais prostáticas. Seu papel principal é manter o sêmen líquido (NEAL *et al.*, 1992, NICKEL 1999, WATT *et al.*, 1986).

O tamanho e função da próstata são regulados por hormônios. Um dos principais hormônios é a testosterona (T), que deve ser convertida no interior da próstata no androgênio ativo di-hidrotestosterona (DHT). Estes são de grande importância no crescimento e funcionamento da glândula prostática (CARLSON e KATZENELLENBOGEN, 1990, DESLYPERE *et al.*, 1992).

A próstata é sede de várias patologias. Entre elas, destacam-se os processos inflamatórios, infecciosos ou não, denominados de prostatites, o aumento benigno da zona de transição da glândula, chamado de Hiperplasia Prostática Benigna e o Câncer de Próstata (TORRES *et al.*, 2003). A figura 3.2 mostra a ilustração anatômica da próstata dividida em zonas e a disposição das doenças da próstata por zona.

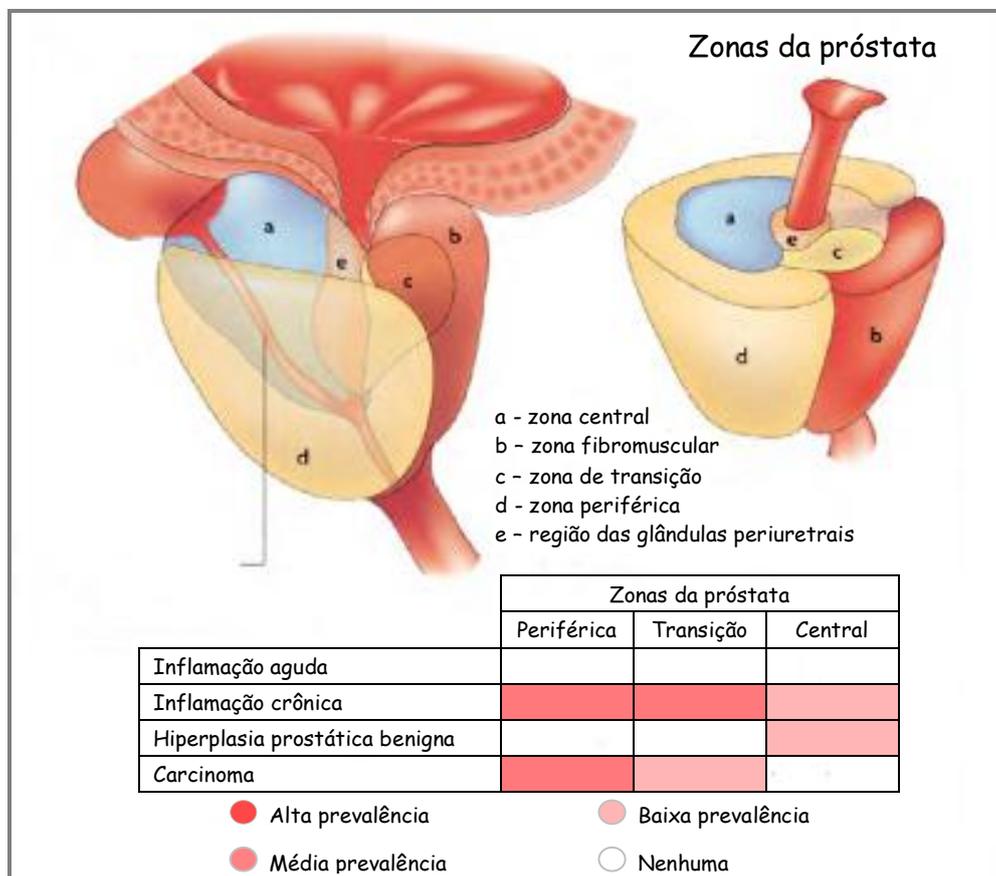


Figura 3.2. Esquema geral da distribuição das zonas do tecido prostático e suas relações com as patologias da glândula (GLAESSGEN, 2008).

III. 1. 1 - Hiperplasia Prostática Benigna (HPB)

A HPB é a doença urológica de maior prevalência em homens com idade superior a 50 anos (BENDHACK e DAMIÃO, 1999). Resultados advindos de necropsias demonstram que a prevalência da HPB, com base no diagnóstico histológico, aumenta progressivamente com a idade. A HPB já está presente em indivíduos a partir dos 30-40 anos, sendo que na quinta década é demonstrável em cerca de 30% dos homens e atinge cifras de 90% na nona década de vida (BERRY *et al.*, 1984).

A HPB caracteriza-se por um crescimento tumoral que resulta na hiperplasia do estroma e do tecido glandular (BILLIS, 1997). Ocorre obstrução intravesical provocada pelo aumento do tecido prostático periuretral correspondente a zona de transição. Na hiperplasia, ocorre um aumento da proliferação celular, tanto no componente estromal (muscular liso e conjuntivo) quanto no epitélio glandular da zona de transição (OLIVEIRA, 2005). Alguns mecanismos interativos como a testosterona, a diidrotestosterona (DHT) e alguns fatores de crescimento são provavelmente responsáveis pelo desenvolvimento da HPB (WALSH, 1992, SROUGI e CURY, 1998, WALSH e WORTHINGTON, 1998).

Os sinais e sintomas decorrentes da HPB têm sido classificados para efeitos didáticos em obstrutivos (comprometimento do volume e da força do jato urinário, interrupção do fluxo, gotejamento terminal e hesitação) e irritativos (noctúria, frequência diurna, urgência, disúria). Atribuem-se os sintomas urinários obstrutivos a obstrução mecânica ao fluxo urinário decorrente do aumento da glândula, enquanto os sintomas urinários irritativos vêm sendo correlacionados com a obstrução funcional decorrente do aumento do tônus das fibras musculares presentes na próstata, especialmente em sua cápsula (BENDHACK e DAMIÃO, 1999). Além dos sintomas obstrutivos e irritativos há também sangue na urina e no sêmen; forte dor nas costas, na pelve, nos quadris ou nas coxas; ereções menos firmes ou impotência, como também diminuição da quantidade de fluido seminal ejaculado (WALSH, 1992, SROUGI e CURY, 1998, WALSH e WORTHINGTON, 1998). Embora a evidência clínica da doença seja menos comum, os sintomas de obstrução também estão relacionados à idade. Aos 55 anos de idade, em torno de 25% dos homens terão sintomas miccionais obstrutivos, e aos 75 anos, 50% dos homens relatam diminuição da força e calibre do jato urinário. Aproximadamente 50% dos homens com menos de 60 anos que são submetidos à cirurgia para HPB podem ter uma forma hereditária da doença. Esta forma

parece ser uma herança autossômica dominante e os parentes em primeiro grau destes pacientes possuem um risco 4 vezes maior (BERRY *et al.*, 1984, SANDA *et al.*, 1994).

III. 1. 2 - Câncer e Câncer de Próstata

O câncer é definido como um tumor maligno, mas não é uma doença única e sim um conjunto de mais de 200 patologias. Uma célula normal pode sofrer alterações no DNA. É o que se chama de mutação genética. As células cujo material genético foi alterado passam a receber instruções erradas para as suas atividades. As alterações podem ocorrer em genes especiais, denominados protooncogenes, que a princípio são inativos em células normais. Quando ativados, os protooncogenes transformam-se em oncogenes, transformando as células normais em células malignas, dando início ao câncer (ABRALE, 2008).

As mutações vão se acumulando no genoma da célula, determinando novas alterações em seu comportamento (ABCANCER, 2008). As células malignas geralmente têm capacidade para formar novos vasos sanguíneos que as nutrirão e manterão as atividades de crescimento descontroladas. O acúmulo dessas células forma os tumores malignos. Estes invadem inicialmente os tecidos vizinhos, podendo chegar ao interior de um vaso sanguíneo ou linfático e, por meio desses, disseminar-se, chegando a órgãos distantes do local onde o tumor se iniciou, formando as metástases.

As células cancerosas são, geralmente, menos especializadas nas suas funções do que as suas correspondentes normais. Conforme as células cancerosas vão substituindo as normais, os tecidos invadidos vão perdendo suas funções (ABRALE, 2008).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2013, apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma. Sem os casos de câncer da pele não melanoma, estima-se um total de 385 mil casos novos. É esperado um total de 257.870 casos novos para o sexo masculino e 260.640 para o sexo feminino. Os tipos mais incidentes serão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireoide para o sexo feminino (INCA 2011).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixa e média renda (INCA 2011).

O câncer de próstata (CaP) é a neoplasia mais freqüentemente diagnosticada desde 1984 e a segunda principal causa de morte masculina. Representa o sexto tipo de câncer mais comum em todo o mundo, sendo o mais prevalente em homens, correspondendo cerca de 10% do total de casos de câncer (SALIDO *et al.*, 2001, JEMAL *et al.*, 2004, INCA, 2009). Aproximadamente 680.000 novos casos são diagnosticados por ano no mundo (PARKIN *et al.*, 2005). No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) previu 60.180 novos casos para 2012, este número corresponde um risco estimado de 62 novos casos a cada 100 mil homens, ficando atrás apenas do tumor de pele não melanona, o mais freqüente em todas as regiões do País (INCA, 2011). Nos EUA foram previstos para 2012, 241.740 novos casos e 28.170 mortes, assim nos EUA o câncer de próstata é a segunda principal causa de morte por câncer em homens (CANCER FACTS & FIGURES 2012, 2012).

Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento dessa neoplasia, o principal é a idade, pois o CaP é raro em homens com idade inferior a 45 anos e a partir desta idade a incidência sobe exponencialmente. A herança genética é um fator de risco, pois a probabilidade aumenta em homens que possuem parentesco com pessoas que apresentam / apresentaram a doença. A raça também é outro fator de risco, pois o câncer de próstata é mais comum em homens negros do que em homens brancos e é menos comum em amarelos. O risco de desenvolver a doença ao longo de toda a vida é de 17,6% para homens brancos e de 20,6% para homens negros (NCI, 2011). Outros fatores são processos inflamatórios infecciosos como prostatite, sífilis, papilomavírus e herpes (DE MARZO *et al.*, 1999), e ainda fatores hormonais, dieta e fatores ambientais (MCCULLOUGH 1988, SHAND e GELMANN, 2006).

Há uma grande quantidade de estudos novos no campo de fatores de prognóstico em CaP. Atualmente, não existe um marcador que seja capaz de predizer a terapia específica para o CaP. Vários sistemas de classificação são disponíveis, possuindo variável aceitação (BILLIS 2008, DÍAZ *et al.*, 2000), sendo a de Gleason a mais aceita. Em 1966, Donald F. Gleason publicou sua classificação que diferia de outras por se basear nas características arquitetônicas da neoplasia e não na morfologia celular (GLEASON 1966, MCLEAN *et al.*, 1997). O sistema baseia-se em padrões histológicos da neoplasia conforme a diferenciação glandular (formação ou não de ácinos) e a presença ou não de fusão de ácinos neoplásicos. Dessa forma Gleason definiu 5 padrões histológicos básicos distintos, onde o denominado 1 contém glândulas com melhor diferenciação e o 5 neoplasia indiferenciada. A classificação final é obtida através da

soma dos dois padrões mais frequentes (predominante e secundário) e vai de 2 a 10, sendo chamada de escore de Gleason. Quando a neoplasia apresenta padrão único soma-se novamente o valor do mesmo padrão. Eventualmente pode aparecer um terceiro padrão histológico que deve ser citado quando for mais alto que os dois predominantes (PAN *et al.*, 2000, STAMEY *et al.*, 1999). Neoplasias com escore baixo são ditas bem diferenciadas e têm longa sobrevida. Já naquelas com escore alto, indiferenciadas, apresentam maior recorrência e mortalidade (LEITE *et al.*, 2005, RIOUX *et al.*, 2002).

Vários estudos têm demonstrado correlação entre o escore de Gleason e o prognóstico da doença. A presença de padrão de Gleason 4 ou 5 é praticamente preditivo de pior evolução (MELLINGER 1977, SOGANI *et al.*, 1985, EPSTEIN *et al.*, 1994). O escore de Gleason é um parâmetro de referência para todos os antigos e novos indicadores de prognóstico em câncer de próstata (EPSTEIN, 1993a e 1994b).

III. 2 – Cultura de células

O cultivo de células se iniciou no princípio do século XX com HARRISON (1907), e CARREL (1912). Essa técnica foi desenvolvida como um método para estudar o comportamento de células animais fora do organismo, em um meio ambiente controlado. Essa técnica ainda é uma importante ferramenta de pesquisa nos laboratórios do mundo inteiro (MOLINARO *et al.*, 2010). O cultivo celular é considerado como um conjunto de técnicas que mantêm conservado algumas das propriedades fisiológicas, bioquímicas e genéticas preservadas em um sistema *in vitro* (FRESHNEY 2005). O controle do ambiente, a homogeneidade da amostra, quando comparada ao uso de animais em experimentos, e a economia são as principais vantagens dessa técnica. Atualmente, com a implementação das Comissões de Ética de Uso de Animais em Pesquisa (CEUA), a cultura de células é o principal modelo alternativo para a substituição dos animais em experimentos de pesquisa (MOLINARO *et al.*, 2010). Dependendo do grau de preservação da estrutura do tecido, do órgão de origem e da sua duração, os cultivos são classificados em diferentes tipos, tais como de órgãos, de tecido, primário e linhagem celular (PERES e CURI, 2005).

Uma cultura primária é estabelecida a partir do crescimento de células oriundas de um fragmento de tecido obtido por desagregação mecânica ou enzimática. Essas células possuem as características do tecido de origem, podem crescer em cultura por um determinado período de tempo e são denominadas células primárias. Essa forma de cultivo é a mais utilizada para estudar o comportamento de determinada célula *in vitro*

devido à presença de suas características genotípicas e fenotípicas (MOLINARO *et al.*, 2010). As células primárias que conseguem manter suas características originais possuem um tempo de vida curto.

A linhagem celular é formada à medida que a cultura primária é repicada e as células com uma maior capacidade de proliferação predominam na garrafa de cultivo (MOLINARO *et al.*, 2010). Essas células ainda não perderam as características do tecido de origem, mas possuem alta proliferação. A linhagem celular é muito utilizada em pesquisa, pois pode ser mantida em cultura por um grande período de tempo (quando comparado às células primárias) e ainda guarda grande parte das características do tecido original. Muitas linhagens celulares podem ser propagadas sem perder suas características por até oitenta passagens, além de serem euploides, ou seja, possuem um número de cromossomos múltiplo do número original da espécie (MOLINARO *et al.*, 2010).

Tem sido desenvolvidos métodos para estabelecer e investigar as propriedades de culturas de epitélio prostático e de células estromais. O uso destes nas culturas de células *in vitro* tem proporcionado grande parte da informação que orienta ideias atuais sobre prevenção e tratamento de câncer de próstata (SGOUROS *et al.*, 2003).

III. 2.1 – Cultura em três dimensões (3D) e Esferoides celulares

Leighton em 1951 já percebia as limitações do cultivo em monocamadas, pois este sistema de cultivo não reproduz a arquitetura do tecido *in vivo* e não prevê a toxicidade órgão-específica e, além disso, não prevê a sinalização mecânica e bioquímica e a comunicação célula-célula são perdidas (MAZZOLENI *et al.*, 2009, PAMPALONI e STELZER, 2009). Tais limitações podem ser atribuídas ao fato do cultivo em monocamadas oferecer às células um ambiente não fisiológico, forçando-as a se adaptarem em um meio artificial, plano e rígido (MAZZOLENI *et al.*, 2009). Isto fez com que Leighton retomasse a ideia original de CARREL'S (1912) acerca de células em 3D e desenvolvesse melhorias (HOFFMAN, 1994).

A preocupação com a manutenção da arquitetura tecidual fez com que LEIGHTON (1954), descrevesse pela primeira vez alguns aspectos importantes da cultura em 3D, são eles:

- a) O arranjo tridimensional possibilita que células migrem para todas as direções.
- b) O sistema 3D permite um aumento da superfície celular.

c) A difusão presente no interior dos agregados pode reter fatores secretados pelas células.

d) O modelo pode permitir um gradiente de difusão capaz de gerar uma alteração na morfologia celular, podendo iniciar processos relacionados à diferenciação tecidual.

A criação de modelos que permitissem testes de efeito e de intensidade de radiação direcionou Robert M. Sutherland e outros pesquisadores à utilização de cultura de células em 3D. Trabalhando inicialmente com linhagens derivadas de pulmão de Hamster, esse grupo desenvolveu uma técnica que utilizava frascos que permitiam um fluxo do meio de cultura no seu interior (spinner flasks), impedindo assim adesão das células com o substrato. Como consequência, os agregados de células assumiram uma morfologia esférica a qual fez com que esses autores os denominassem de esferóides multicelulares (INCH *et al.*, 1970; SUTHERLAND *et al.*, 1971).

Esferóides são colônias de células em forma de esfera formada por automontagem que permitem o crescimento e vários estudos funcionais de diversos tecidos (INGRAM *et al.*, 1997). A formação de esferóides ocorre de forma espontânea, em ambientes onde a interação célula-célula domina sobre a interação célula-substrato. Métodos típicos para formação de esferóide incluem gotas de suspensão, cultura de células em superfícies não-aderente, culturas em frascos spinner e sistema de Cultura Rotary Cell NASA (FRIEDRICH *et al.*, 2007, LIN e CHANG *et al.*, 2008).

A cultura de esferóides também se destaca por conseguir restabelecer características morfológicas e funcionais de seu equivalente tecido *in vivo*. Um dos fatores responsáveis por isto é a crescente produção de componentes de matriz extracelular o qual permite a criação de uma complexa rede tridimensional onde protagoniza um grande número de interações célula-célula bem como célula-matriz. A descrição e localização de fatores (pato)fisiológicos, bem como penetração, ligação e bioatividade de drogas podem ser então simulados nestes modelos que exploram esse arranjo 3D (CUKIERMAN e PANKOV *et al.*, 2001; ELLIOTT e YUAN, 2011).

O modelo de esferóide contém muito dos elementos de um xenoinxerto de tumor, incluindo uma matriz extracelular e interações célula-célula / célula-matriz (NEDERMAN *et al.*, 1984, DAVIES *et al.*, 1997, BALLANGRUD *et al.*, 1999, BATES *et al.*, 2000). Estas semelhanças com um xenoinxerto de tumor são acopladas com muitas das vantagens experimentais de uma cultura em monocamada, incluindo a capacidade de controlar rigorosamente as condições experimentais e de tratamento, a

capacidade de resposta de investigação e um mecanismo de estudo, e também a capacidade para investigar um grande número de agentes e combinações de forma rápida e com baixo custo (SGOUROS *et al.*, 2003).

A diferenciação da cultura em esferoide inclui não somente a conservação da capacidade morfogênica e reorganização histotípica, mas também a manutenção das funções e padrões de expressão gênica (KELM *et al.*, 2003)

III. 3 – Interação da radiação com a matéria

Quando a amostra é excitada, o campo eletromagnético da radiação interage com os elétrons dos átomos do material no qual ele incide. A excitação pode ser feita de várias maneiras: excitação por partículas aceleradas como elétrons, prótons ou íons, partículas alfa, partículas beta ou raios gama emitidos por radionuclídeos, além do processo mais utilizado, que é através de raios X (MANICA, 2006). Devido à interação ocorrem vários fenômenos de atenuação e espalhamento. A interação pode ocorrer de diferentes formas, cada processo dependerá da energia de excitação e das características da amostra, como composição química, densidade ou espessura. Os três principais processos de interação são:

Efeito fotoelétrico: ocorre quando a radiação incidente é completamente absorvida por um elétron de uma camada interna de um átomo, dando origem a um fotoelétron. Tem predominância para baixas energias (< 100 keV) e a probabilidade aumenta para elementos de número atômico (Z) elevado.

Espalhamento de raios X: acontece quando parte da radiação incidente interage com os átomos e sofre modificação de direção, ou seja, modificação de momento linear. Podendo ser Incoerente (Efeito Compton), quando a energia é modificada ou Coerente (Rayleigh) quando a energia incidente não é alterada, apenas muda de direção. Ocorre com maior probabilidade para energias entre 1 e 5 MeV.

Produção de pares: ocorre quando a radiação incidente interage com os átomos do material e é completamente transformada em duas partículas, o par elétron-pósitron. Este tipo de interação não existe para energias de excitação menores que 1,02 MeV.

A produção de raios X característicos é consequência do efeito fotoelétrico.

III. 3.1 – Efeito fotoelétrico

O efeito fotoelétrico ocorre quando um feixe de fótons de energia abaixo de 100 keV interage com um átomo do material e ocorre transferência total da energia a um

elétron de um orbital e este é ejetado (fotoelétron), este fenômeno recebe o nome de absorção fotoelétrica.

O fotoelétron é ejetado com energia cinética (K) igual à diferença entre a energia do fóton incidente ($h\nu$) e a energia de ligação do elétron orbital B_e .

$$K = h\nu - B_e$$

Onde:

h = contante de Planck;

ν = frequência da radiação.

A produção de raios X característicos é consequência do efeito fotoelétrico.

III. 4 – A Fluorescência de Raios X (XRF)

A análise por fluorescência de raios X é um método quali-quantitativo baseado na medida de comprimentos de ondas ou nas energias e nas intensidades (número de raios X detectados por unidade de tempo) dos raios X característicos emitidos pelos elementos que constituem a amostra (BOUMANS e KLOCKENKÄMPER, 1989).

Quando ocorre a absorção do fóton por níveis internos, o átomo fica em um estado excitado e tende a ejetar os elétrons do interior dos níveis dos átomos, e como consequência realizam um salto quântico para preencher a vacância. Há dois processos de decaimento que seguem a criação da vacância: a emissão de fótons fluorescentes (raios X característico) e de elétrons Auger, como é mostrado esquematicamente na figura 3.4 (MANICA, 2006).

A energia emitida na forma de raios X característico emitem linhas espectrais cujas intensidades estão relacionadas com concentração dos elementos na amostra. Para a produção de raios X característico é necessário retirar elétrons das camadas mais internas dos átomos, por exemplo, camada K, para isto a energia mínima deve ser superior a energia de ligação do elétron nessa camada, denominada energia de ligação eletrônica ou também de corte de absorção E_k .

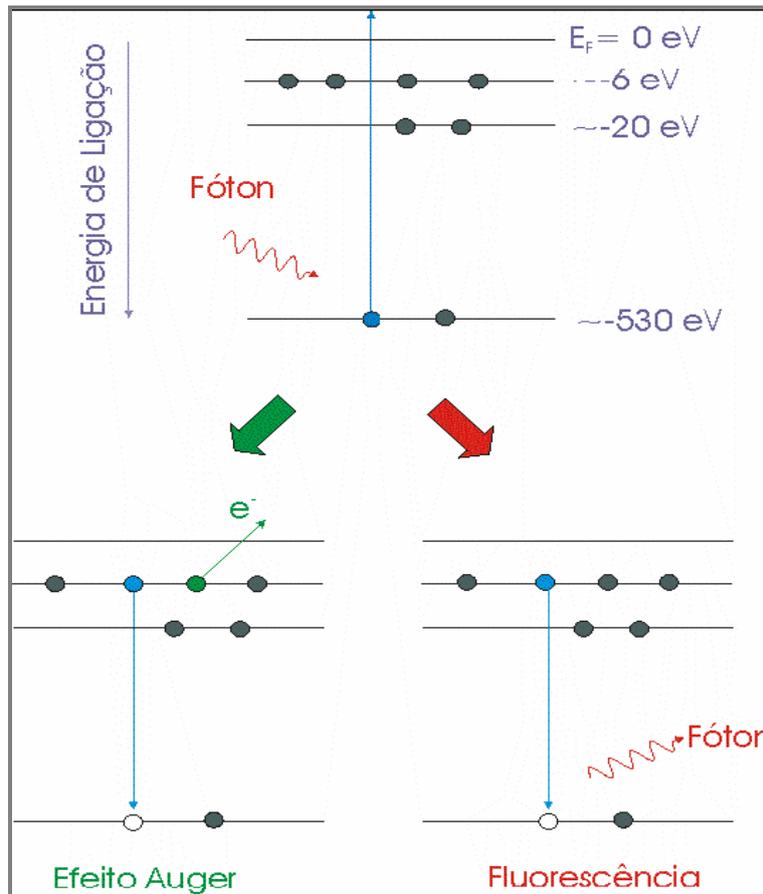


Figura 3.4. Diagrama esquemático mostrando os processos de absorção e de decaimento para o Oxigênio (MANICA, 2006).

As energias de ligação são chamadas de energia crítica de excitação. Elas representam a energia mínima que deve ser igualada ou excedida para ejetar elétrons de um átomo, deixando assim, o átomo instável ou ionizado necessário para iniciar o processo de emissão dos raios X característico.

Quando amostras são irradiadas com feixe de fótons de energia E_0 , e esta excede à energia crítica de excitação dos elétrons em um dado átomo, alguns elétrons são ejetados do átomo, determinando que o átomo esteja em um estado excitado ou ionizado.

O átomo estando em estado ionizado torna-se instável e quase instantaneamente ocorre um processo de transição eletrônica a fim de preencher as vacâncias deixadas pelos elétrons ejetados. Se um elétron de um nível K é ejetado, a vacância pode ser preenchida por elétrons dos níveis L, M, N. Então, cada transição eletrônica constitui uma perda de energia para o elétron, resultando na emissão de um fóton de raios X, com

energia igual à diferença entre os dois níveis de energia envolvidos e bem definidos para cada elemento.

Os raios X emitidos por um elemento são reunidos sob a denominação K_α e K_β , 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_α e L_β , etc.

A energia de ligação eletrônica pode ser calculada de modo aproximado, aplicando-se a teoria atômica de Bohr para o átomo de hidrogênio e átomos de hidrogênoides, e posteriormente, fazendo-se algumas considerações sobre a experiência de Moseley.

Desse modo à equação 3.1 permite o cálculo aproximado dessa energia para os elétrons das camadas K e L dos átomos de um elemento:

$$E = 13,65(Z - b)^2 \left(\frac{1}{n_f^2} - \frac{1}{n_i^2} \right) \quad (3.1)$$

onde:

E = energia dos raios X (eV);

n_i, n_f = número quântico principal do nível inicial e final do salto quântico;

Z = número atômico do elemento emissor dos raios X;

b = constante de Moseley, com valores iguais a 1 e 7,4 para saltos quânticos para a camada K e L, respectivamente.

Pode ser observado nesta equação 3.1 que a energia de ligação para uma dada camada é diretamente proporcional ao quadrado do número atômico Z do elemento excitado. Assim, para "retirar" elétrons do nível K dos elementos Al, Fe e Te, de números atômicos 13, 26 e 52, respectivamente, são necessários 1,560, 7,114 e 31,814 keV para o nível K e 0,074, 0,723 e 4,612 keV para o nível L.

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):

$$P_{E_i} = P_{\text{nível}} \cdot P_{\text{linha}} \cdot P_{\text{fluorescência}} \quad (3.2)$$

onde:

$P_{\text{nível}}$ é a probabilidade que a radiação incidente retire elétrons de um dado nível quântico. Pode ser o nível K, L, M, N, O, ... , etc;

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- L_2 e K- L_3 ;

$P_{\text{fluorescência}}$ é a probabilidade de ocorrer emissão de fluorescência de raios X ao invés de elétron Auger, a partir de uma transição realizada entre dois estados quânticos.

O átomo fica excitado quando libera um elétron orbital. Os elétrons de níveis mais energéticos vão preenchendo as vacâncias produzidas. A energia na transição é liberada de duas formas:

- 1) como um fóton na forma de fluorescência de raios X;
- 2) como um elétron na forma de elétron Auger.

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

$$\omega = \frac{n_s}{n_p} \quad (3.3)$$

$$n_p = n_s + n_A \quad (3.4)$$

onde:

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

n_p é o número de fótons que são produzidos devido as vacância nos níveis e sub-níveis atômicos;

n_A é o número de fóton que são reabsorvidos dentro do átomo, produzindo elétrons Auger.

O rendimento de fluorescência para linha K é dado pelo número de fótons n_K emitidos como fluorescência de raios X, para todas as linhas K, dividido pelo número de fótons criados N_K devido as transições entre os estados quânticos. Assim, tem-se:

$$\omega_K = \frac{n_{K-L_3} + n_{K-L_2} + n_{K-M_3} + \dots}{N_K} = \frac{\sum n_K}{N_K} \quad (3.5)$$

É possível obter o rendimento de fluorescência ω_L para as linhas L tendo três diferentes valores: ω_{L_1} , ω_{L_2} e ω_{L_3} .

Pode-se definir o rendimento de fluorescência de um modo geral como o número de raios X efetivamente emitidos em relação ao número de vacâncias produzidas em um dado nível.

III. 4. 1 – Microfluorescência de Raios X (μ XRF)

A μ XRF é uma técnica bastante atrativa para análise local e para o mapeamento elementar em vários tipos de materiais (BERNASCONI *et al.*, 1994). Sendo uma variação da XRF convencional a principal característica da μ XRF é sua capacidade de análise espacial, ou seja, ela é capaz de produzir mapas elementares bidimensionais e as dimensões do feixe são bastante reduzidas (da ordem de μm).

As informações por μ XRF são obtidas dividindo-se a superfície a ser analisada em pixels (áreas), onde a dimensão desses pixels (área) é determinada pela dimensão do feixe. O feixe de radiação incide em cada pixel e induz a emissão de fótons de fluorescência de raios X. Um sistema apropriado de detecção coleta estes fótons de fluorescência que contém a composição química desta área da amostra (Figura 3.5). A amostra é então movida por motores controlados através de um computador e assim se obtém informações de outras áreas da amostra.

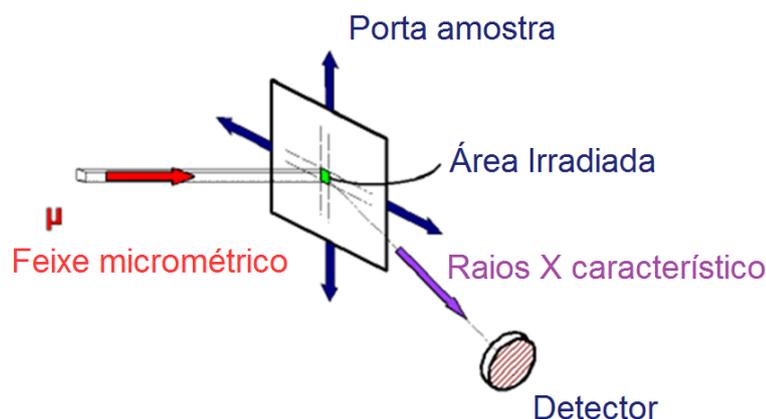


Figura 3.5. Desenho esquemático da montagem experimental para medições de μ XRF.

Três tipos de informações podem ser obtidas através da aplicação da μ XRF:

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

mostram as diferentes intensidades relativas do elemento químico presente da amostra. Um esquema da obtenção de uma imagem é representado na figura 3.6.

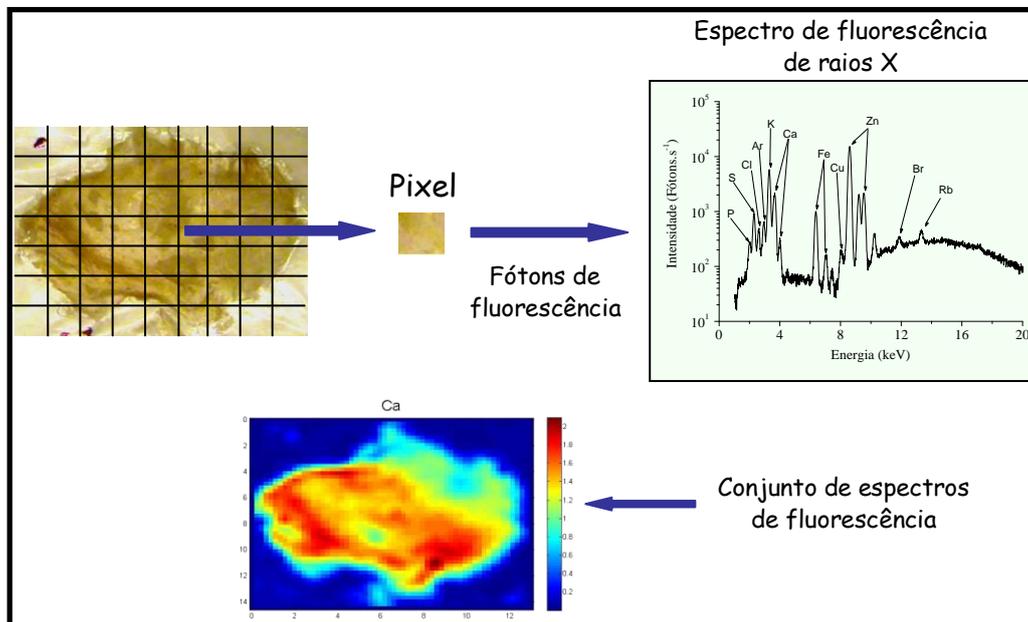


Figura 3.6. Representação esquemática da obtenção de uma imagem

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

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

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

III. 5. - Radiação Síncrotron - LNLS

A radiação síncrotron (RS) é a radiação eletromagnética emitida quando partículas carregadas com velocidade relativística são submetidas à aceleração radial. Elas são produzidas por feixes de elétrons/pósitrons que circulam em uma câmara de vácuo,

mantidas em uma órbita fechada curva por ímãs, focalizadas por magnetos quadripolares/sextupolares e aceleradas por campos de RF de cavidades ressonantes (ROCHA, 2007). A RS abrange uma ampla faixa do espectro eletromagnético: luz infravermelha (10^3 a 10^5 nm), luz visível (10^2 nm), luz ultravioleta (10 a 10^{-1} nm) e raios X ($<10^{-1}$ nm).

A base teórica para a produção de RS está relacionada à descobertas do elétron por Thomson. Em 1897, Larmor derivou uma expressão da eletrodinâmica clássica para a potência total instantânea irradiada por uma partícula acelerada carregada. No ano seguinte, Liénard estendeu este resultado ao caso de uma partícula relativística submetida a aceleração centrípeta numa trajetória circular. A fórmula de Liénard mostrou que a potência da radiação é proporcional a $(E/mc^2)^4/R^2$, onde E é a energia da partícula, m é massa de repouso do elétron, e R é o raio da trajetória e c é a velocidade da luz no vácuo. A primeira observação visual da radiação síncrotron ocorreu em 1947 por Frank Elder, Robert Langmuir, Anatole Gurewitsch e Herb Pollock, no General Electric's Research Laboratory, em Schenectady (Nova York/US) (STRELI *et al.*, 1997).

O processo de produção é iniciado por um canhão de elétrons de um acelerador linear. Os aceleradores lineares são aceleradores de partículas carregadas, como elétrons, prótons ou íons pesados. As partículas carregadas entram em um tubo onde existem campos elétricos alternados. Estas partículas são aceleradas primeiramente por um campo elétrico e entram em um tubo de corrente ou “*drift tube*” onde são protegidas do campo elétrico e o atravessam com velocidade constante até a próxima abertura. Neste ponto as partículas são novamente aceleradas e a cada abertura entre os tubos “*drifts*” as partículas recebem mais e mais energia. Esse processo é capaz de acelerar as partículas carregadas com energias muito grandes (NOGUEIRA, 2011).

O feixe de elétrons gerado pelo acelerador linear é injetado em um anel de armazenamento, onde há três dispositivos básicos: os dipolos magnéticos, formados por ímãs dipolares que produzem um campo magnético homogêneo no sentido vertical que são responsáveis pela deflexão do feixe e consequentemente produção de luz síncrotron; os quadripolos ou sextupolos que estão situados nos trechos retos do anel e servem para focalizar os elétrons e reduzir as aberrações cromáticas; e a cavidade de rádio frequência que está situada em um ou mais dos trechos retos e é responsável por acelerar os elétrons injetados a baixa energia final e por fornecer aos elétrons, em cada passagem pelo interior da mesma, a energia perdida em cada volta devido à radiação

produzida nas partes curvas de suas trajetórias para aumentar o tempo de vida do feixe (MARGARITONDO, 1995).

Num anel de armazenamento típico, os elétrons possuem uma meia vida entre 4-12h. A corrente máxima depende da energia armazenada, mas tipicamente está entre 100 a 1.000 mA, para energias típicas compreendidas entre 3 MeV e 1 GeV (BICHINHO, 2008).

Os feixes de raios X que se podem obter em uma máquina de luz síncrotron são extremamente intensos, colimados e dotados de um elevado grau de coerência longitudinal. Além disso, com a utilização de cristais monocromadores é possível obter feixes praticamente monocromáticos com energia selecionável dentro de um amplo espectro de energia. O feixe é, por sua natureza, laminar com altura de alguns milímetros e com largura de algumas dezenas de centímetros no plano do objeto, o que o torna ideal para sistemas de imagens. As características geométricas do feixe podem também ser modificadas mediante o uso de cristais assimétricos ou de outras óticas, de modo a adaptar-se à exigências específicas (LEWIS, 1997; ARFELLI, 2000; THOMLINSON, 2002).

No mundo inteiro existem 60 fontes de luz síncrotron distribuídas em 17 países. As aplicações incluem níveis de valência espectroscópicas em átomos e moléculas (com energias acima de 20 eV), estudos estruturais (estruturas cristalinas, transição de fase, natureza de compostos químico, formas de nanopartículas, etc.), estudos biológicos e microfabricação (CASTRO, 2001).

O Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) foi desenvolvido para colocar o Brasil num seleto grupo de países capazes de produzir luz síncrotron, com objetivo de levar o desenvolvimento de novos materiais de alto desempenho, mais econômicos e menos nocivos ao ambiente e a novos conhecimentos sobre materiais biológicos, como as proteínas, que irão propiciar mais adiante o surgimento de soluções para problemas de saúde.

A primeira fonte de Luz Síncrotron brasileira foi projetada em 1983, mas tornou-se operacional apenas 14 anos depois, em 1997, é o primeiro laboratório do hemisfério sul capaz de produzir Luz Síncrotron. Está situado em Campinas cidade do estado de São Paulo (Brasil). Foi desenvolvido e construído no Brasil com financiamento do CNPq e do Ministério da Ciência e Tecnologia.

Atualmente o LNLS faz parte do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), junto com outros três Laboratórios Nacional: de Biociências

(LNBio), Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) e de Nanotecnologia (LNNano). CNPEM é uma instituição privada de pesquisa e desenvolvimento (R & D), fundada principalmente pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) (LNLS, 2013).

Atualmente, as condições do feixe na fonte de Luz Síncrotron do LNLS são: energia de 1,37 GeV, corrente máxima de 250 mA e tempo de vida em torno de 20 h. A figura 3.7 mostra uma vista geral do anel de armazenamento.



Figura 3.7. Vista geral do anel de armazenamento.

As linhas de luz são constituídas por uma instrumentação complexa que transporta condições e detecta os feixes de radiação síncrotron produzidos por uma fonte de radiação, que pode ser um ímã defletor ou um dispositivo de inserção instalado no interior do anel de armazenamento. Cada linha de luz é especializada em um conjunto de técnicas, otimizada para campos específicos de pesquisa.

O LNLS tem atualmente 15 linhas de luz em operação (Figura 3.8), abrangendo energias que variam de eV a algumas dezenas de keV. Metade das suas linhas de luz são principalmente destinadas a estudos estruturais dos materiais, ou seja, a forma como os átomos e as moléculas se organizam no espaço. Essas linhas de luz são organizadas em três grupos, difração de raios X (linhas de luz XRD1, XRD2 e XPD), Cristalografia de Macromoléculas (linhas de luz MX1 e MX2) e espalhamento de raios X a baixo ângulo (linhas de luz SAXS e SAXS 1 2). A outra metade das linhas de luz é dedicada

principalmente para espectroscopia de materiais, ou seja, a forma como os seus elétrons reagem à irradiação de energia eletromagnética. Existem dois grupos nesta categoria de linhas de luz, Absorção de raios X e espectrometria de fluorescência (linhas de luz XRF, XAFS1, XAFS2 e DXAS) e UV e Espectroscopia de raios X mole (linhas de luz PGM, SXS, TGM e SGM) (LNLS, 2013).

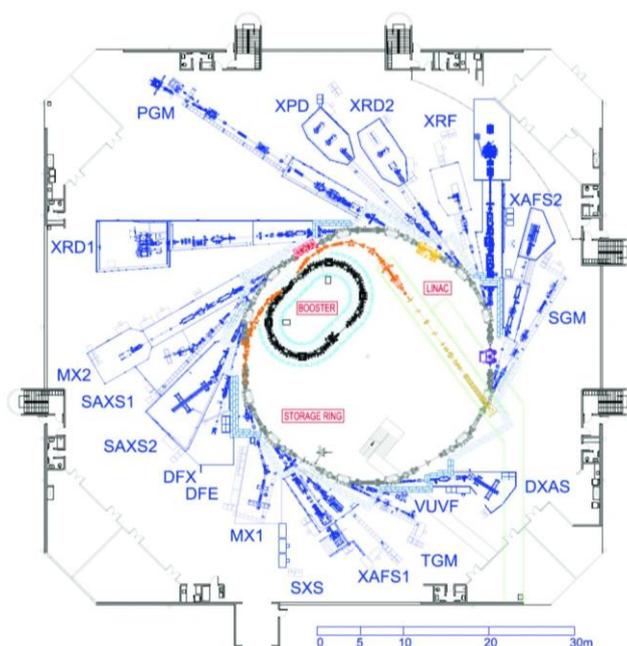


Figura 3.8. Layout das linhas de luz do LNLS (LNLS, 2013).

CAPÍTULO IV

MATERIAIS E MÉTODOS

IV.1 – Obtenção e preparação do tecido prostático

As amostras de próstata utilizadas neste estudo foram cedidas pelo Laboratório de Interações Celulares do ICB/CCS/UFRJ proveniente de indivíduos com idade de 30 anos que sofreram morte inesperada com ausência de HPB e CaP.

Foram utilizadas duas (N = 2) próstatas inteiras divididas em duas zonas: de transição (ZT) e periférica (ZP). Cada zona foi dividida em dois lados: 1 e 2. Cada fragmento foi emblocado em OCT (Tissue-Tek OCT Compound - é uma formulação de resinas e glicóis solúveis em água, que provê uma matriz conveniente para corte em criostato a temperaturas abaixo de -10°C.) e congelado em seguida foram feitas secções com espessura de 500 µm utilizando um micrótomo no interior de um criostato a -25^o C. Estas secções foram depositadas em filme plástico ultralene (membrana ultra-limpa sem qualquer tipo de contaminação ferromagnética) de 4 µm de espessura e em seguida postas para secar a temperatura ambiente (figura 4.1).



Figura 4.1. Amostra ZP 1 do controle 1.

IV.2 – Obtenção e preparação dos esferoides celulares.

Os esferoides celulares foram estabelecidos a partir de células primárias e linhagem tumoral prostática humana Du145.

As células primárias foram obtidas através de biópsias prostática transversal de pacientes do Hospital Municipal do Andaraí (Rio de Janeiro) com idades acima de 40 anos portadores de HPB ou Câncer prostático. O Projeto passou pelo Comitê de Ética em Pesquisa- CONED e tem número de cadastro CAAE-0029.0.197.000-05.

O material biopsiado da próstata do paciente submetidos a biópsias prostática transversal foi coletado em tubos plásticos com solução tamponada estéril, tampão fosfato de sódio (PBS) 0,01 M e pH 7,45, contendo dois antibióticos e um antifúngico (penicilina 10.000UI e estreptomicina 10 mg e anfotericina “B” 25), e em seguida processado em câmara de fluxo laminar (área destinada a manipulações de células e soluções estéreis, preferencialmente fechada e muito limpa) segundo o seguinte protocolo:

1. Lavagem das biópsias, 3 vezes com solução BSS-CMF pH = 7,4;
2. Dissociação mecânica com tesoura de aço e a enzimática com solução de colagenase 1A (1mg/mL) (SIGMA, St Louis, MO, USA), preparada em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma - mistura de sais enriquecidos com aminoácidos e outros componentes essenciais para o crescimento de células humanas e de outros animais), sem soro e mantida em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂, durante 1 hora;
3. Ao final da dissociação, o homogenado celular foi centrifugado, o pellet das células foi ressuspensão em 1mL de meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO);
4. As células foram plaqueadas em garrafas de 25 cm² de área (Figura 4.2 (a)), em 4mL de meio DMEM suplementado com 10% SFB, e mantidas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂;
5. Após serem cultivadas durante 14 dias, as células foram tripsinizadas a 0,3% em meio DMEM, centrifugadas, ressuspensas e contadas em câmara de *Neubauer* (lâmina de vidro com divisões que auxiliam na contagem de células) (Figura 4.2 (b));
6. Os mesmos procedimentos de tripsinização e replaqueamento das células foram periodicamente repetidos até a 4^o passagem, onde foram feito os esferóides celulares.

A linhagem de células Du145 é caracterizada como uma linhagem tumoral humana de câncer de Próstata andrógeno independente com baixo potencial metastático (VAN LEENDERS, *et.al.*, 2001; YIN, *et. al.*, 2007). A linhagem celular será mantida rotineiramente em meio de cultura RPMI (Gibco, Invitrogen Corporation, mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular) suplementado com 10% SFB. A cultura será mantida em estufa, à 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO₂.

A co-cultura dos esferoides foi estabelecida a partir de 2×10^4 células. Estas células foram cultivadas em placas contendo 96 poços com fundo em U, de diâmetro 0,5 cm, previamente recobertos por uma película de gel agarose 1% (utilizado para evitar a aderência das células no fundo do poço) em meio de cultura DMEM suplementado com 10% SFB (células primárias) e RPMI suplementado com 10% SFB (linhagem Du145). As células foram mantidas em estufa, à 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO₂. O tempo suficiente para formação das estruturas tridimensionais (estruturas conhecidas como esferóides) foi de dois a quatro dias de cultivo.

Para a análise por μ XRF, após 10 dias de cultura os esferoides foram fixados em paraformaldeído 4,0% por 30 minutos, em seguida lavados 3 vezes com solução tampão fosfato (PBS) 0,1M, pH 7,4 a 4°C e ao final colocados em PBS até o momento da análise. Na hora da análise os esferóides foram lavados com Milli-Q e depositados em filme ultralene de 4 μ m de espessura e em seguida postos para secar a temperatura ambiente.

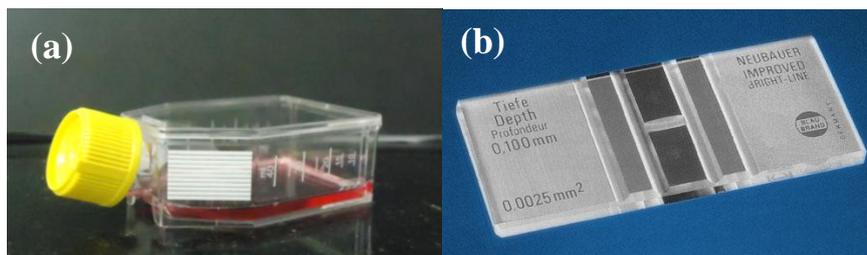


Figura 4.2. (a) garrafas de 25 cm² de área, (b) câmara de *Neubauer*.

IV. 3 – Tratamentos com zinco

As soluções para o tratamento foram obtidas utilizando os meios de cultura DMEM 10% SFB (células primárias) e RPMI 10% SFB (linhagem Du145) suplementados com soluções de cloreto de zinco (ZnCl₂).

As soluções foram suplementadas com 4 diferentes concentrações de zinco: 0, 75 μ M, 100 μ M e 150 μ M.

Os esferoides foram obtidos seguindo o mesmo protocolo do item IV. 2. Após 10 dias em cultura os esferoides receberam os tratamentos com cloreto de zinco durante um período de 24 horas.

As concentrações de Zn e o tempo de tratamento foram escolhidos tendo como referência estudos realizados por YAN (2010).

IV. 4 – Experimental - Análise por μ XRF

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

Para a detecção dos raios X característicos emitidos por cada pixel foi utilizado um detector de Si(Li) com resolução de 165 eV em 5,9 keV posicionado a 90° com relação ao feixe incidente.

Os espectros obtidos foram gravados utilizando um sistema Multicanal-Camberra e analisados por meio do programa computacional AXIL que faz parte do pacote QXAS (BERNASCONI e TAJANI, 1996), o mais utilizado na área de fluorescência de raios X, distribuído pela Agência Nacional de Energia Atômica. As intensidades dos raios X característico de cada elemento foram normalizadas pelo valor da câmara de ionização (detector A) que mede o fluxo de fótons do feixe incidente na amostra. As imagem de μ XRF foram obtidas a partir do software PyMCA versão 4.4.1.

IV.4.1 - Análise de tecido prostático

As amostras foram excitadas utilizando um feixe logrado por um sistema convencional de colimação de fendas. A tabela 4.1 mostra as condições experimentais nas duas etapas de medidas. O arranjo experimental é mostrado na figura 4.3. As tabelas 4.2 e 4.3 mostram a dimensão, matriz e o número de espectros de cada amostra dos controles 1 e 2 respectivamente.

Tabela 4.1. Condições experimentais

Condições experimentais	
Feixe:	Branco ($E_{\max.} = 20 \text{ keV}$)
Geometria:	$45^{\circ}/45^{\circ}$
Câmara 1:	2x1
Detector de raios X:	Si(Li) com resolução de 165 eV em 5,9 keV
Detector A	Câmara de ionização
Colimação do feixe com fendas:	$500 \times 500 \mu\text{m}$
Absorvedor	$150 \mu\text{m}$ Al no feixe incidente
Colimador de Tântalo:	Diâmetro de 2,0 mm no detector
Tempo	5s/pixel
Pixel	$500 \times 500 \mu\text{m}$

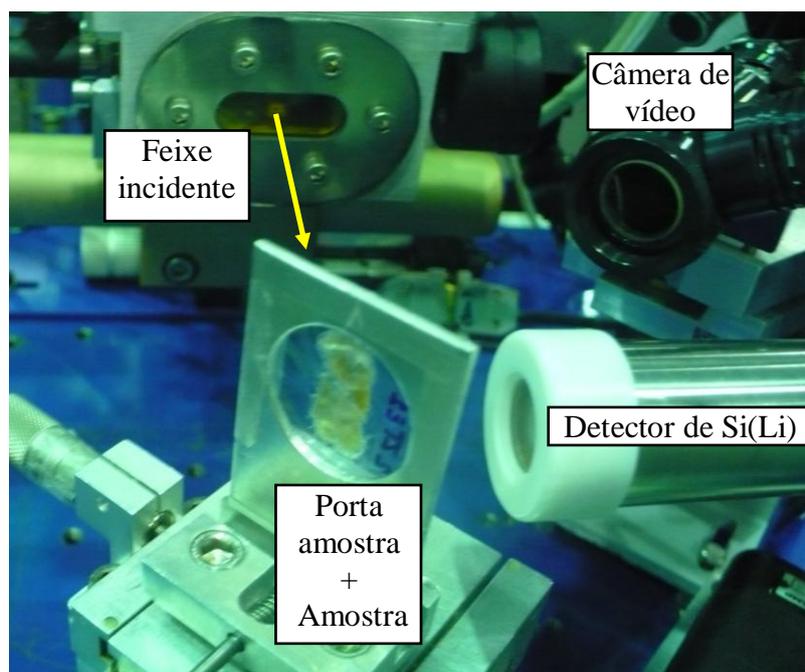


Figura 4.3. Esquema experimental (sistema com fendas).

Tabela 4.2. Dimensão, matriz e número de espectros de cada amostra do controle 1.

Amostra	Dimensão (mm)	Matriz	Espectros
ZP 1	15,5 x 11,5	32 x 24	768
ZP 2	17,5 x 11,5	36 x 24	864
ZT 1	13 x 10	27 x 21	567
ZT 2	14,5 x 13	30 x 27	810

Tabela 4.3. Dimensão, matriz e número de espectros de cada amostra do controle 2.

Amostra	Dimensão (mm)	Matriz	Espectros
ZP1	17 x 9	35 x 19	665
ZP2	15 x 13	31 x 27	837
ZT1	20 X 10	41 X 21	861
ZT2	14 x 11	29 x 23	667

IV.4.2 - Análise de esferoides celulares

As amostras foram excitadas utilizando um feixe branco com 20 μm de extensão na vertical e na horizontal logrado por um sistema convencional de colimação por capilares. Foram realizados passos de 20 μm na horizontal e na vertical, correspondendo a um pixel de 20 μm x 20 μm . O arranjo experimental é mostrado na figura 4.4. A tabela 4.4 mostra as condições experimentais. As tabelas 4.5 e 4.6 mostram a dimensão, matriz e o número de espectros de cada amostra de CaP e HPB, respectivamente.

Tabela 4.4. Condições experimentais

Condições experimentais	
Feixe:	BRANCO
Geometria:	45 ⁰ /45 ⁰
Câmara 1:	2x1
Distância amostra - detector:	25 mm
Distância fonte- amostra:	650 mm
Detector de raios X:	Si(Li) com resolução de 165 eV em 5,9 keV
Detector A	Câmara de ionização
Tempo	10 s/pixel
Colimação do feixe com CAPILAR:	20 x 20 μm

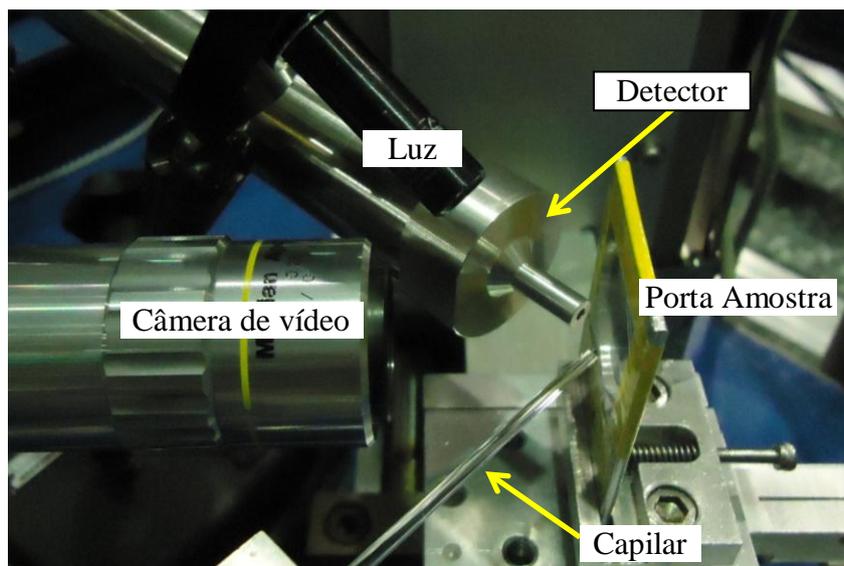


Figura 4.4. Esquema experimental (sistema com capilar)

Tabela 4.5. Dimensão, matriz e número de espectros de cada amostra de CaP.

Amostra	Dimensão (μm)	Matriz	Espectros
CaP 1	240 x 240	13 x 13	169
CaP 2	260 x 340	14 x 18	252
CaP 3	320 x 320	17 x 17	289

Tabela 4.5. Dimensão, matriz e número de espectros de cada amostra de HPB.

Amostra	Dimensão (μm)	Matriz	Espectros
HPB 1	260 x 280	14 x 15	210
HPB 2	480 x 460	25 x 24	600
HPB 3	320 x 300	17 x 16	272

IV. 5 - Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS)

A linha de Fluorescência de Raios X é a linha de luz D09B da fonte de luz síncrotron do LNLS (Figura 4.5). A linha XRF D09B é destinada a análise da composição química multi – elementar. As principais áreas de aplicação são: física atômica e molecular, química analítica, ciências da vida e geociências ambientais. As principais características desta linha são:

- Fonte: Ímã defletor D09B (15°);
- Modo de operação: Feixe branco ou monocromático;

- Monocromador: *Channel-cut* pode ser deslocada lateralmente, permitindo excitar as amostras com todo o espectro do síncrotron;
- Cristais: Si (111), Si (220)
- Óptica: Capilar com 20 μm de resolução espacial;
- Faixa de energia: 5 keV a 24 keV;
- Resolução ($\Delta E/E$): Si (111) – $3,57 \times 10^{-4}$, Si (220) – $6,67 \times 10^{-5}$;
- Fluxo de fótons: 4×10^9 fótons/s a 8 keV – 102 mA;
- Tamanho de fonte: $\text{FWHM}_x = 0,73 \text{ mm}$ - $\text{FWHM}_y = 0,17 \text{ mm}$;
- Detectores: Semicondutor de Si(Li) (resolução de 165 eV a 5,9 keV) e de HPGe (resolução de 150 eV a 5,9 keV), fotodiodos e câmaras de ionização;
- Manuseio de amostras: Sistema semiautomático de posicionamento com movimentos tridimensionais;
- Técnicas oferecidas: Mapeamento por XRF, Transmissão de Raios X, Tomografia por fluorescência, Informações locais em 3D com arranjo confocal, Fluorescência de raios-X Reflexão Total (TXRF), Fluorescência de raios X por incidência em baixo ângulo (GI-XRF e GI-XANES), Fluorescência de raios X por emissão em baixo ângulo (GE-XRF), Produção total de elétrons (TEY).

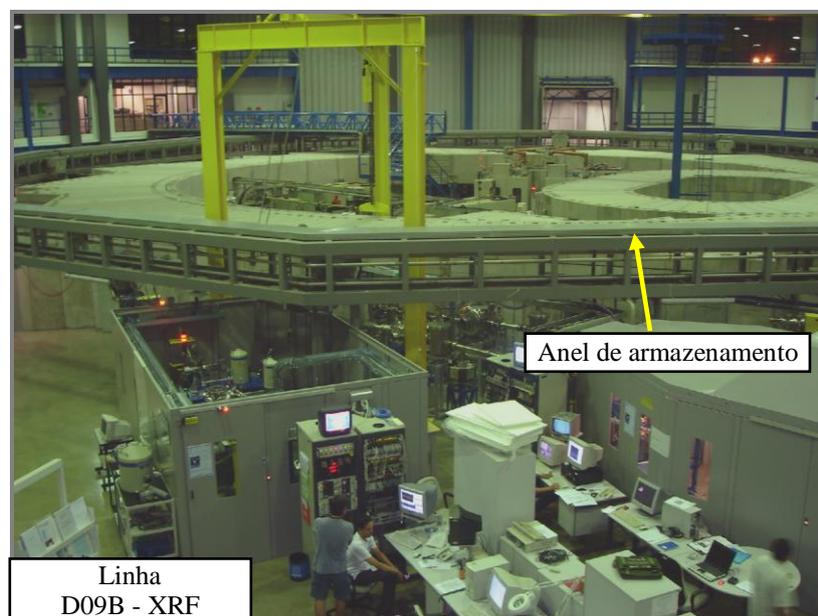


Figura 4.5. Vista geral da Linha D09B-XRF.

IV. 6 – PyMca

PyMCA é um software baixado gratuitamente originalmente desenvolvido para processar dados de fluorescência de raios X, em particular para se decompor sinais de fluorescência em várias contribuições de várias linhas de emissão de vários elementos (SOLÉ *et al.*, 2007). Foi dada atenção especial para reduzir o tempo solicitado para cada ajuste, a fim de gerenciar o acesso de milhares de espectros em um tempo razoável. Um processo em lote é oferecido para gerar mapeamentos de elementos. Em paralelo a este modo dedicado para o tratamento de fluorescência, um modo mais básico foi desenvolvido para o fácil manuseio de mapas 2D-1D de dados (ROI imagem). Ele fornece as duas opções anteriores descritos anteriormente (geração de mapeamentos de ROI, soma / média espectros), e oferece também uma visualização RGB útil que permite uma fácil sobreposição de imagens. Seguindo o crescente número de experimentos combinando com μ XRF μ XRD ou μ FTIR, as implementações foram feitas para lidar com dados e μ XRD μ FTIR. Somente proprietários do formato μ FTIR atualmente suportados como entrada é o Nicolet. Dados MAP gerado com Omnic 7,3, mas outros formatos podem ser implementadas se forem devidamente descritos e / ou o software necessário prestados. PyMCA atual (versão 4.3.0) também implementa análise de componentes principais (PCA) como uma técnica de imagem complementares (COTTE *et al.*, 2008).

CAPÍTULO V

RESULTADOS E DISCUSSÃO

V. 1. – Resultados

V.1.1. – Análise de tecidos de próstata.

A figura 5.1 ilustra o espectro de XRF de uma amostra de tecido de próstata controle. Foi possível detectar segundo as condições experimentais descritas no CAPÍTULO IV, os elementos: P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu e Zn.

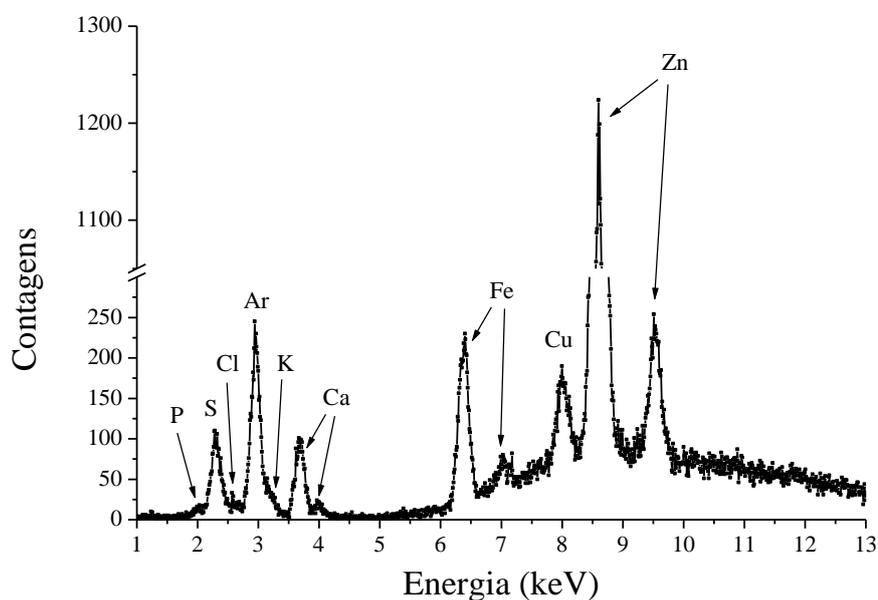


Figura 5.1. Espectro de XRF 251 da amostra ZP1 do controle 1.

As fotos das zonas periférica e de transição do controle 1 estão ilustradas na figura 5.2. As figuras 5.3 e 5.10 mostram os mapas bidimensionais da intensidade normalizada em tecidos de próstata das zonas periférica e transversal do controle 1 dos elementos: P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu e Zn. As intensidades relativas de fluorescência foram normalizadas utilizando o valor máximo encontrado para cada amostra.

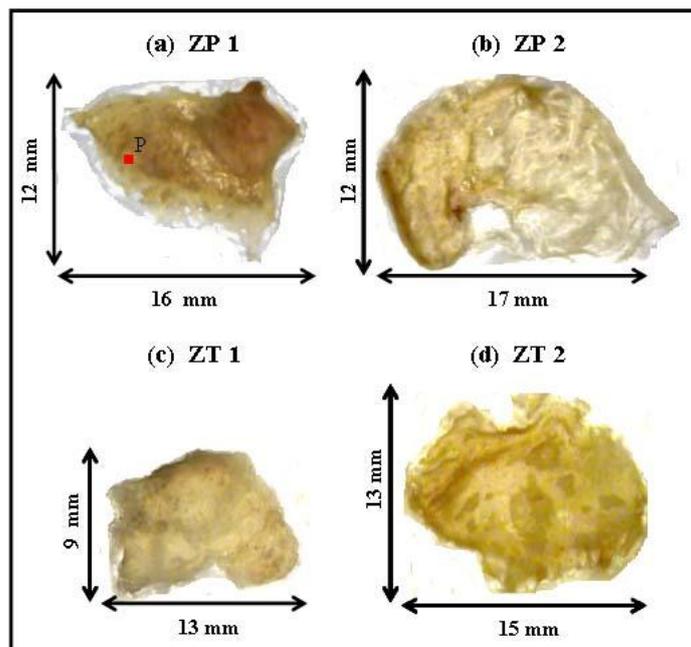


Figura 5.2. Fotos dos cortes do controle 1:

Zonas periférica 1 e 2 (a e b) e Zonas de transição 1 e 2 (c e d)

Ponto P na figura 5.(a) representa um pixel na imagem.

O espectro de XRF mostrado na figura 5.1 foi obtido exatamente neste ponto.

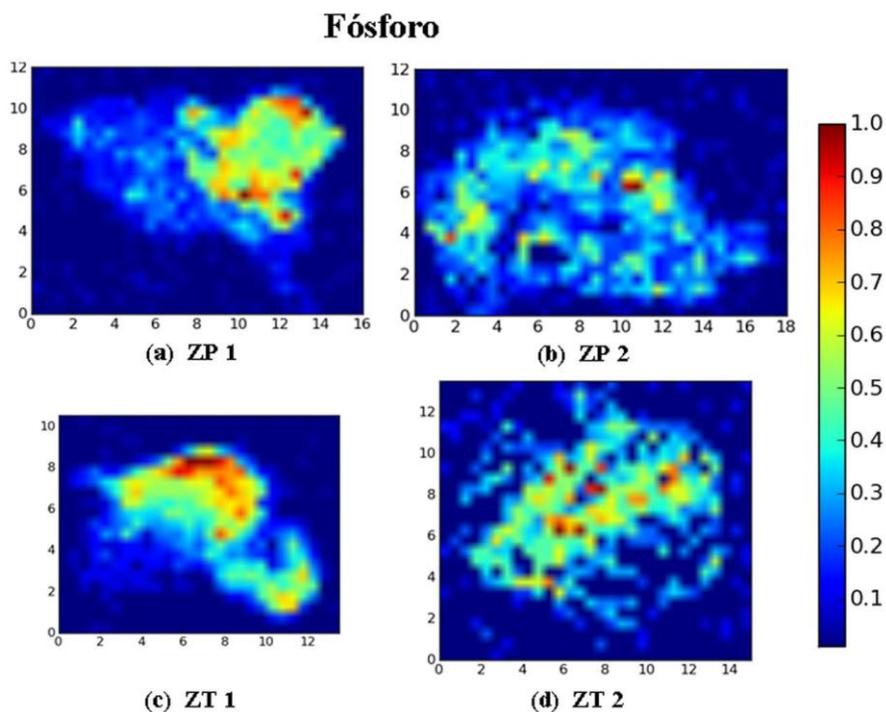


Figura 5.3. Mapa bidimensional da intensidade normalizada de fósforo zonas periférica 1 e 2 (a e b) e zonas de transição 1 e 2 (c e d) do controle 1.

Os eixos mostram a dimensão das amostras em mm.

Enxofre

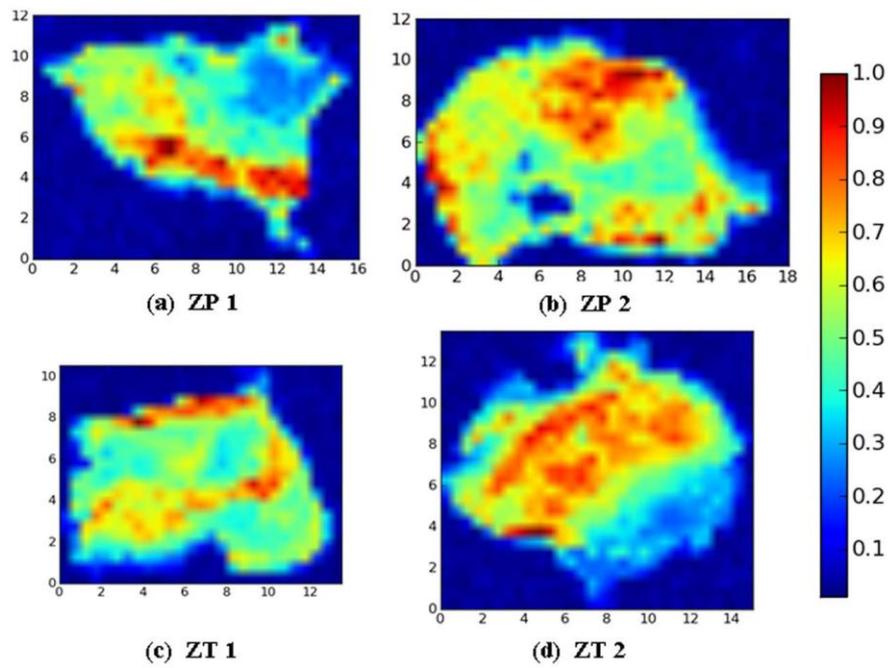


Figura 5.4. Mapa bidimensional da intensidade normalizada de enxofre zonas periférica 1 e 2 (a e b) e zonas de transição 1 e 2 (c e d) do controle 1.

Os eixos mostram a dimensão das amostras em mm.

Cloro

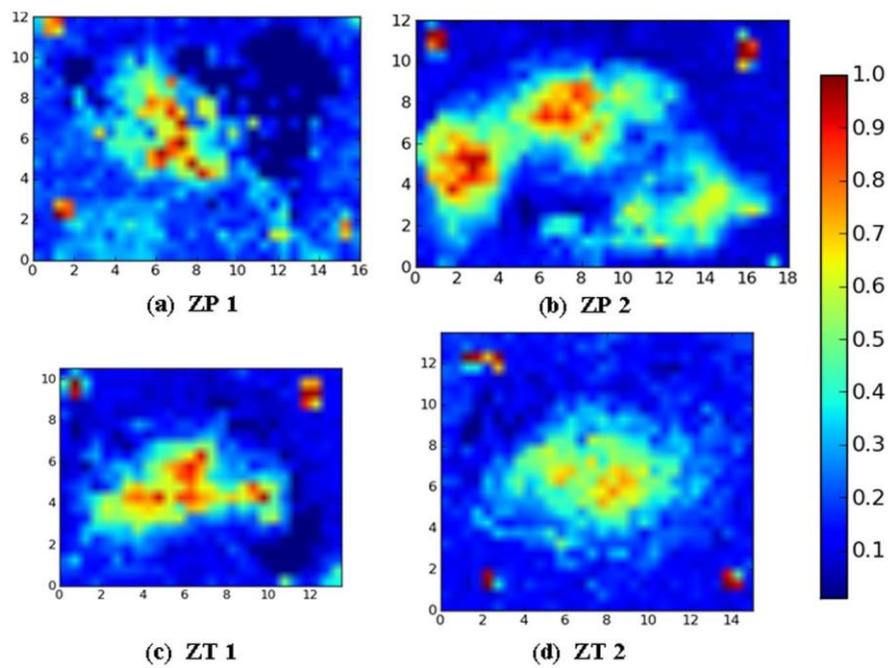


Figura 5.5. Mapa bidimensional da intensidade normalizada de cloro zonas periférica 1 e 2 (a e b) e zonas de transição 1 e 2 (c e d) do controle 1.

Os eixos mostram a dimensão das amostras em mm.

Através da figura 5.3 observamos que o fósforo está distribuído de forma heterogênea e não está presente em toda extensão das amostras analisadas. Analisando a figura 5.4 verificamos que o enxofre está distribuído por toda extensão das amostras de tecido de próstata de forma heterogênea.

A figura 5.5 mostra que o cloro não está distribuído por toda extensão das amostras. Através da figura 5.6 pode-se observar que o K assim como o P e Cl não está presente por toda extensão das amostras analisadas.

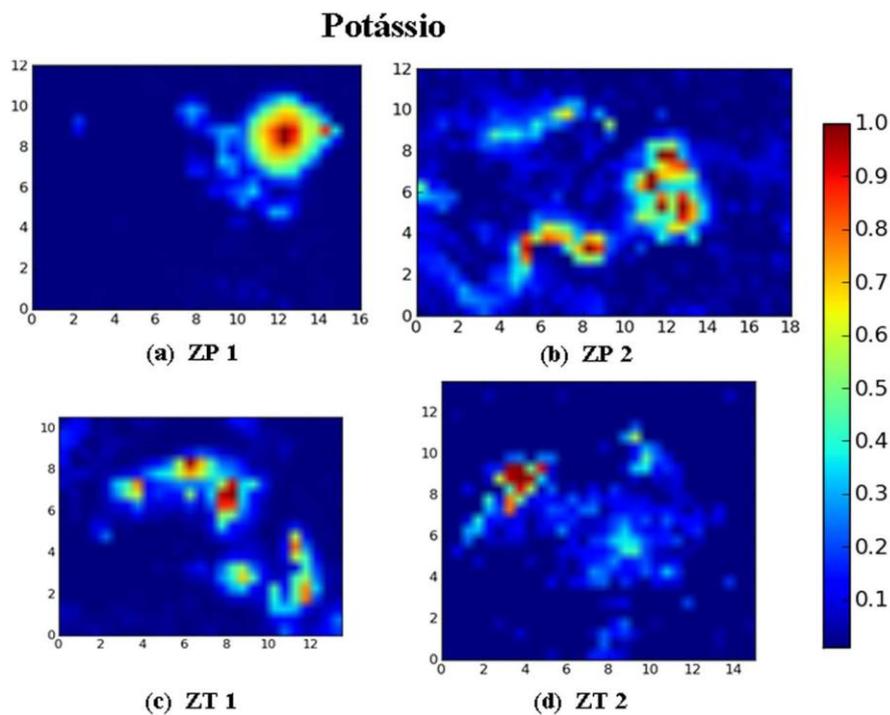


Figura 5.6. Mapa bidimensional da intensidade normalizada de potássio zonas periférica 1 e 2 (a e b) e zonas de transição 1 e 2 (c e d) do controle 1.

Os eixos mostram a dimensão das amostras em mm.

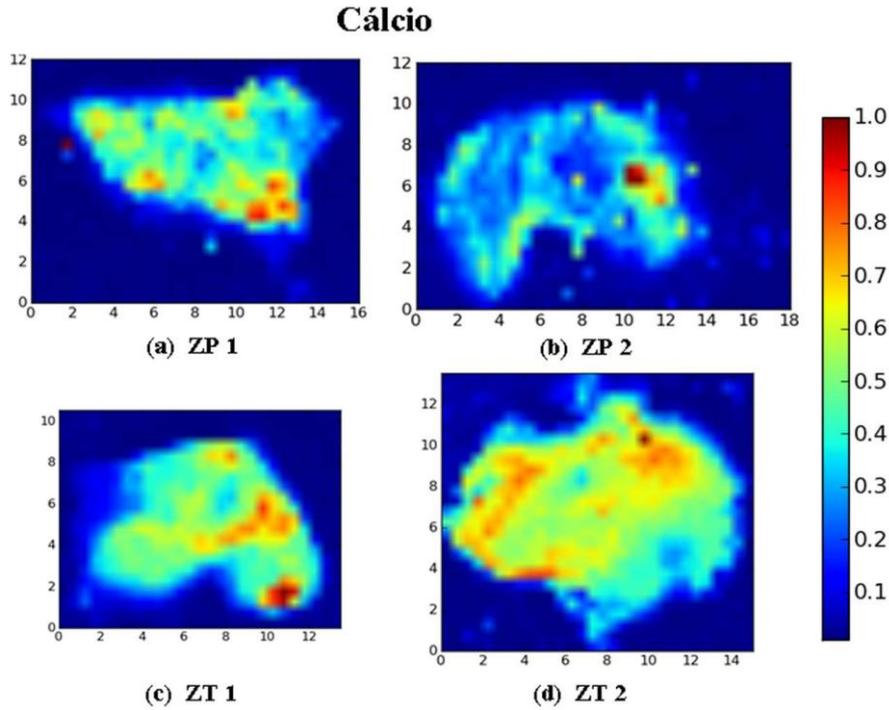


Figura 5.7. Mapa bidimensional da intensidade normalizada de cálcio zonas periférica 1 e 2 (a e b) e zonas de transição 1 e 2 (c e d) do controle 1.

Os eixos mostram a dimensão das amostras em mm.

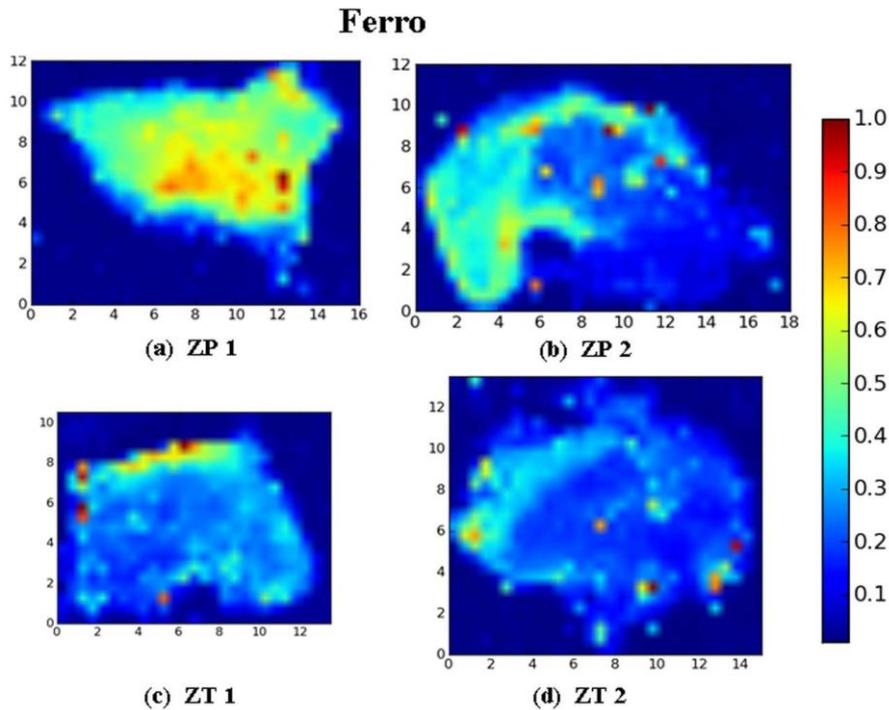


Figura 5.8. Mapa bidimensional da intensidade normalizada de ferro zonas periférica 1 e 2 (a e b) e zonas de transição 1 e 2 (c e d) do controle 1.

Os eixos mostram a dimensão das amostras em mm.

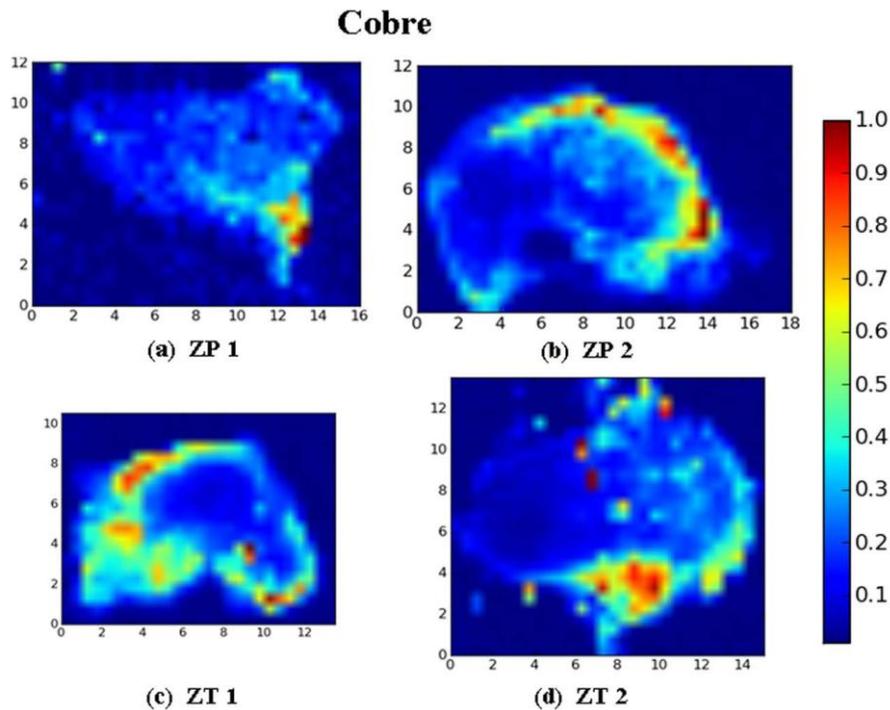


Figura 5.9. Mapa bidimensional da intensidade normalizada de cobre zonas periférica 1 e 2 (a e b) e zonas de transição 1 e 2 (c e d) do controle 1.

Os eixos mostram a dimensão das amostras em mm.

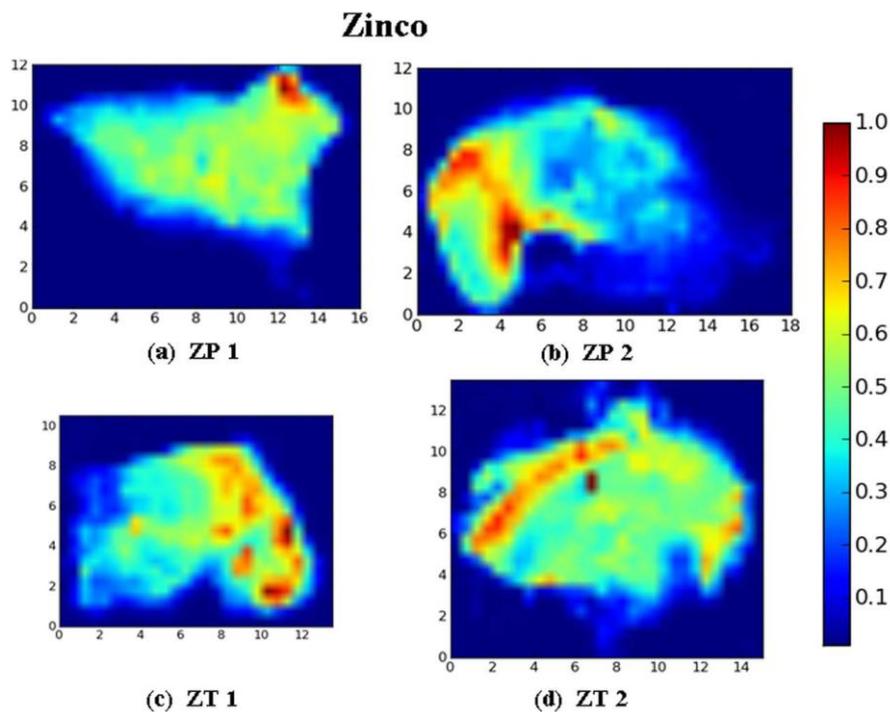


Figura 5.10. Mapa bidimensional da intensidade normalizada de zinco zonas periférica 1 e 2 (a e b) e zonas de transição 1 e 2 (c e d) do controle 1.

Os eixos mostram a dimensão das amostras em mm.

Analisando a figura 5.7 verificamos que o cálcio está distribuído de forma não uniforme em toda extensão das amostras analisadas. A figura 5.8 mostra que o Fe está presente por toda extensão das amostras e apresenta distribuições similares com pequenos pontos muito intensos em quase todas as amostras com exceção da amostra ZP 1 que apresenta distribuição menos heterogênea que as demais amostras.

Através da figura 5.9 podemos observar que o cobre está distribuído de forma heterogênea ao longo das amostras analisadas. Analisando a figura 5.10 verificamos que o zinco está distribuído de forma não uniforme por toda extensão das amostras analisadas.

As fotos das zonas periférica e de transição do controle 2 estão ilustradas na figura 5.11. As figuras 5.12 e 5.19 mostram os mapas bidimensionais da intensidade normalizada em tecidos de próstata das zonas periférica e transversal do controle 2 dos elementos: P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu e Zn. As intensidades relativas de fluorescência foram normalizadas utilizando o valor máximo encontrado para cada amostra.

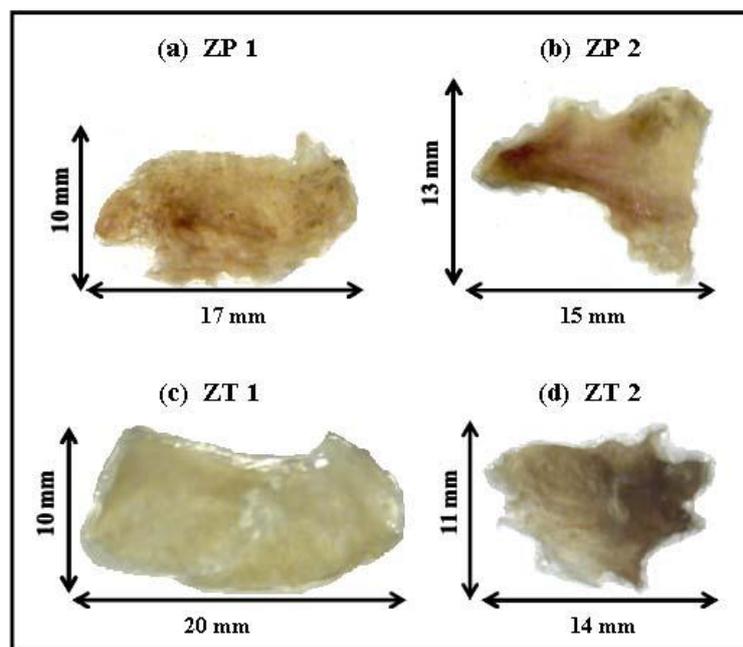


Figura 5.11. Fotos dos cortes do controle 2:

(a) e (b) Zonas periférica 1 e 2 e (c) e (d) Zonas de transição 1 e 2.

Fósforo

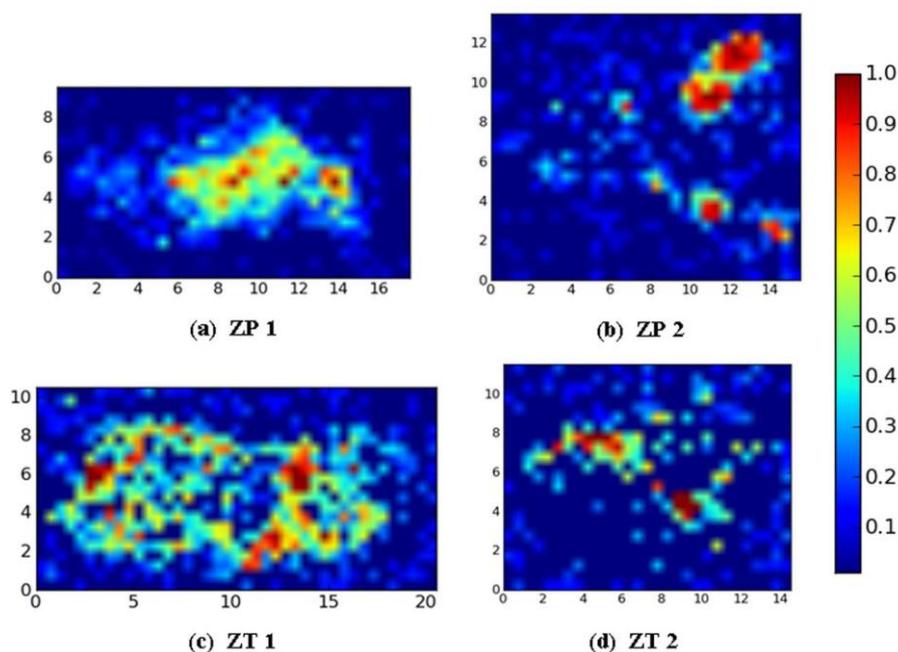


Figura 5.12. Mapa bidimensional da intensidade normalizada de fósforo zonas periférica 1 e 2 (a e b) e zonas de transição 1 e 2 (c e d) do controle 2. Os eixos mostram a dimensão das amostras em mm.

Enxofre

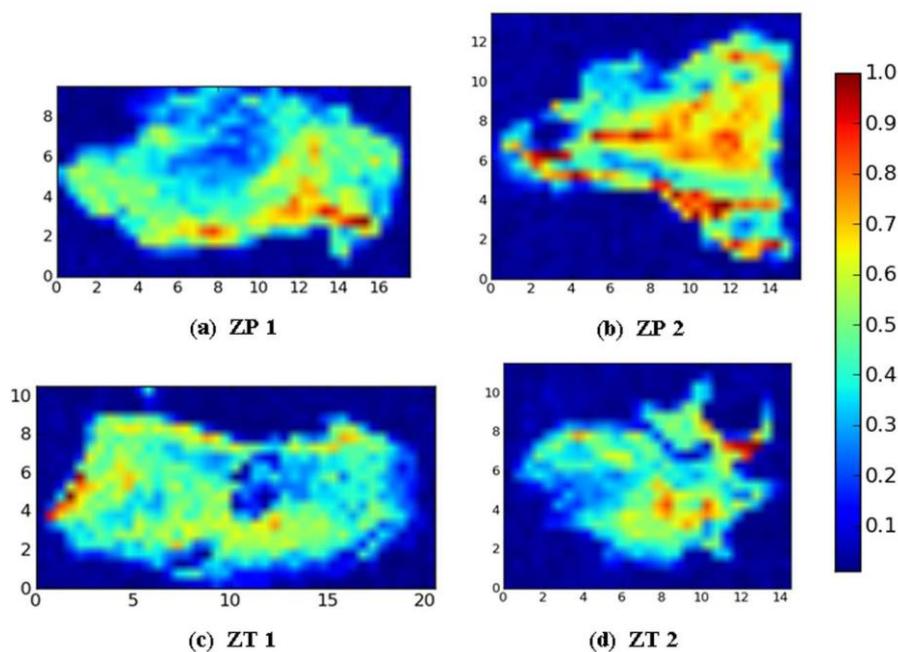


Figura 5.13. Mapa bidimensional da intensidade normalizada de enxofre zonas periférica 1 e 2 (a e b) e zonas de transição 1 e 2 (c e d) do controle 2. Os eixos mostram a dimensão das amostras em mm.

Cloro

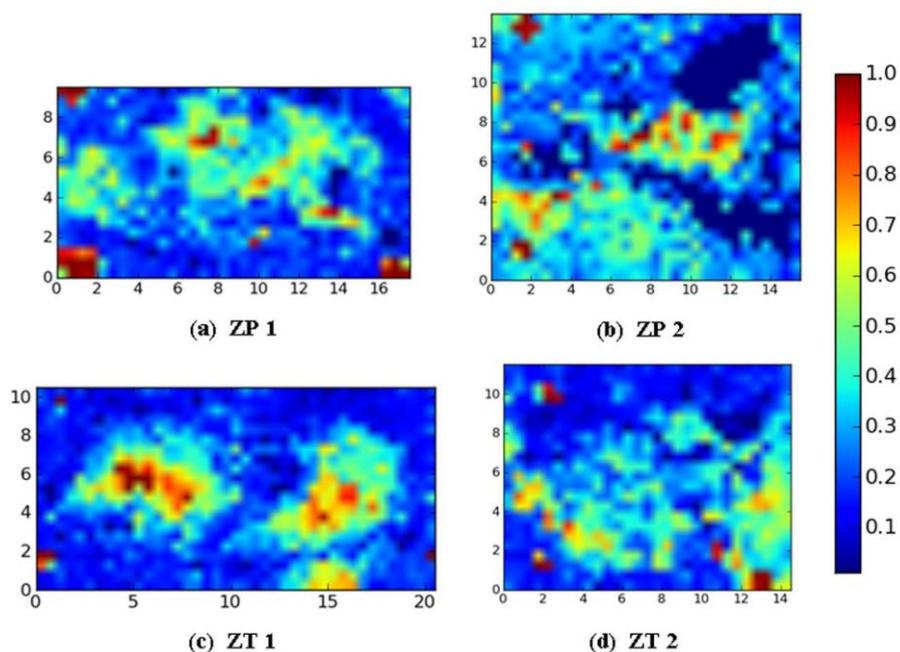


Figura 5.14. Mapa bidimensional da intensidade normalizada de cloro zonas periférica 1 e 2 (a e b) e zonas de transição 1 e 2 (c e d) do controle 2.

Os eixos mostram a dimensão das amostras em mm.

Potássio

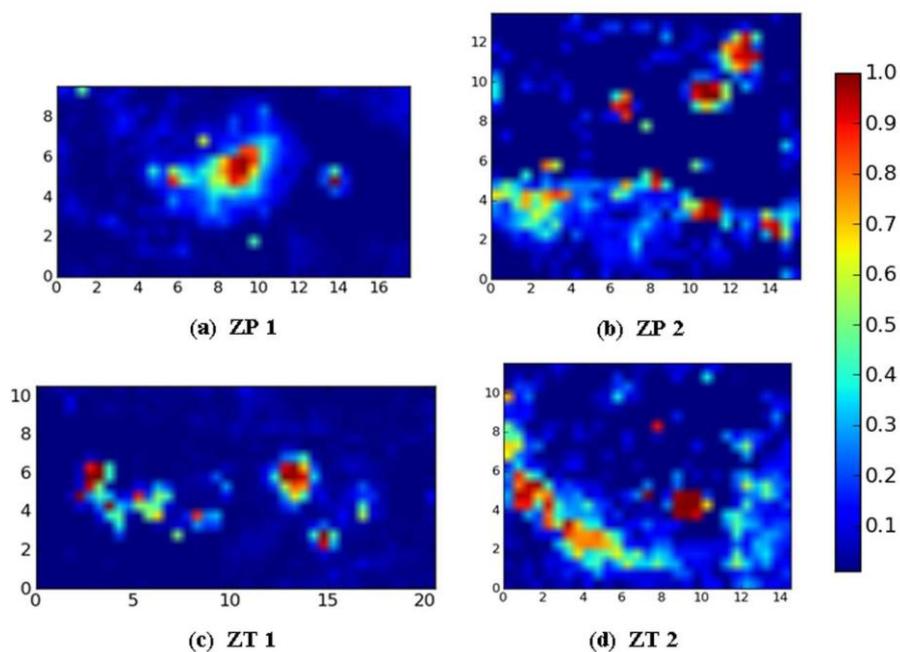


Figura 5.15. Mapa bidimensional da intensidade normalizada de potássio zonas periférica 1 e 2 (a e b) e zonas de transição 1 e 2 (c e d) do controle 2.

Os eixos mostram a dimensão das amostras em mm.

A figura 5.12 mostra que o fósforo apresenta distribuição não homogênea e não esta presente em toda extensão das amostras analisadas. Através da figura 5.13 podemos observar que S apresenta distribuição heterogênea e esta distribuído por toda extensão das amostras de tecido de próstata.

Analisando a figura 5.14 verificamos que o cloro apresenta distribuição não uniforme e não esta presente em toda extensão das amostras de tecido prostático. A figura 5.15 mostra que o potássio não esta distribuído em toda extensão das amostras analisadas e apresentaram pequenas regiões com nível alto de K.

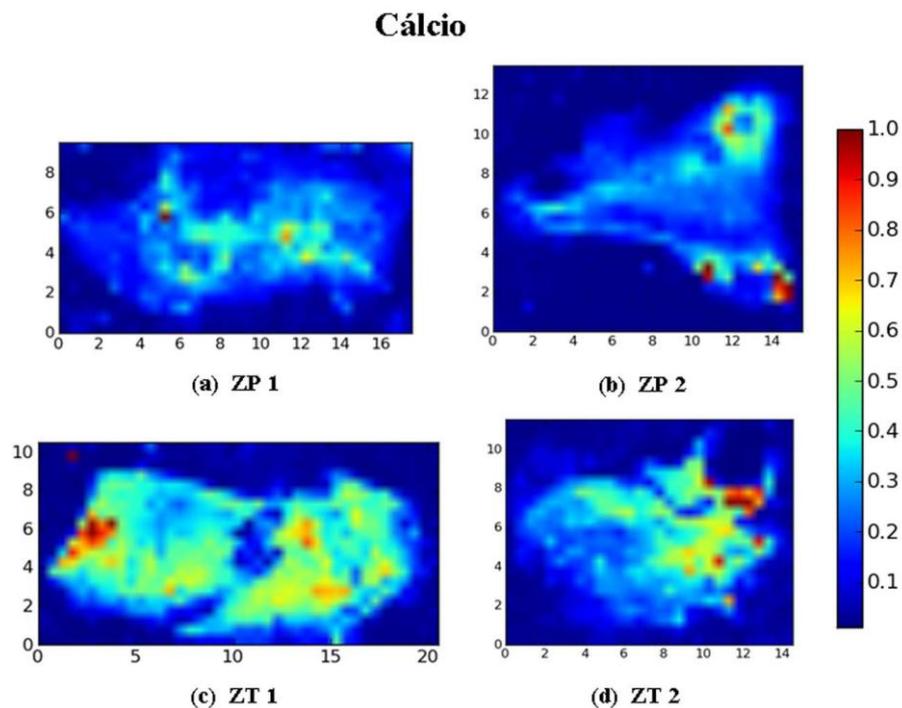


Figura 5.16. Mapa bidimensional da intensidade normalizada de cálcio zonas periférica 1 e 2 (a e b) e zonas de transição 1 e 2 (c e d) do controle 2.

Os eixos mostram a dimensão das amostras em mm.

Ferro

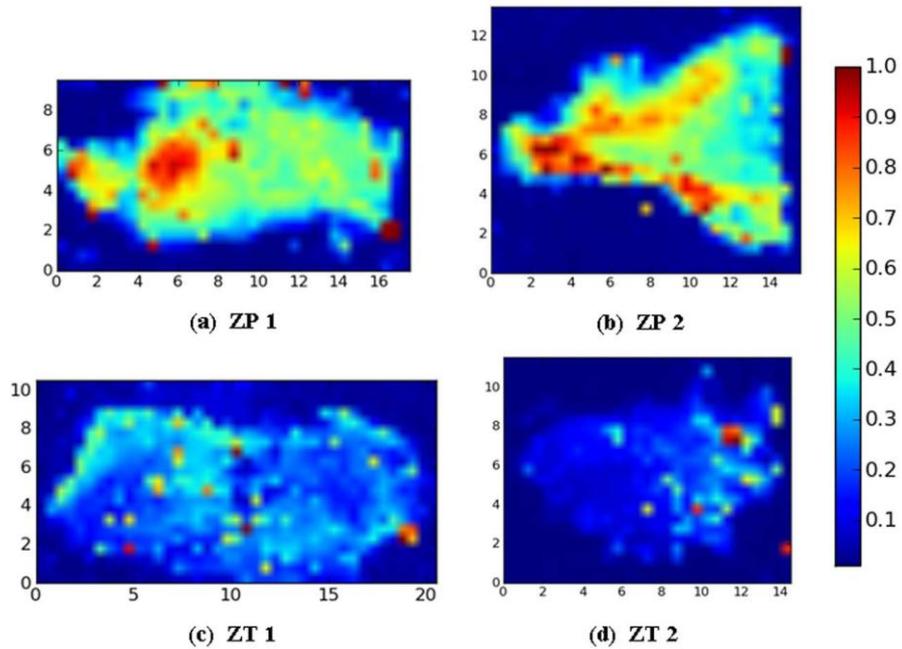


Figura 5.17. Mapa bidimensional da intensidade normalizada de ferro zonas periférica 1 e 2 (a e b) e zonas de transição 1 e 2 (c e d) do controle 2.

Os eixos mostram a dimensão das amostras em mm.

Cobre

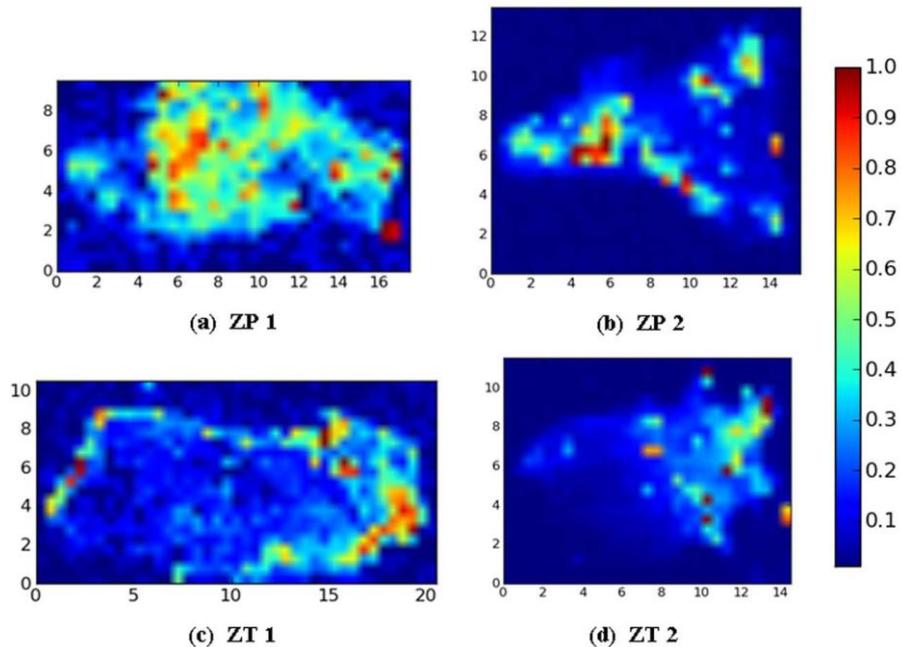


Figura 5.18. Mapa bidimensional da intensidade normalizada de cobre zonas periférica 1 e 2 (a e b) e zonas de transição 1 e 2 (c e d) do controle 2.

Os eixos mostram a dimensão das amostras em mm.

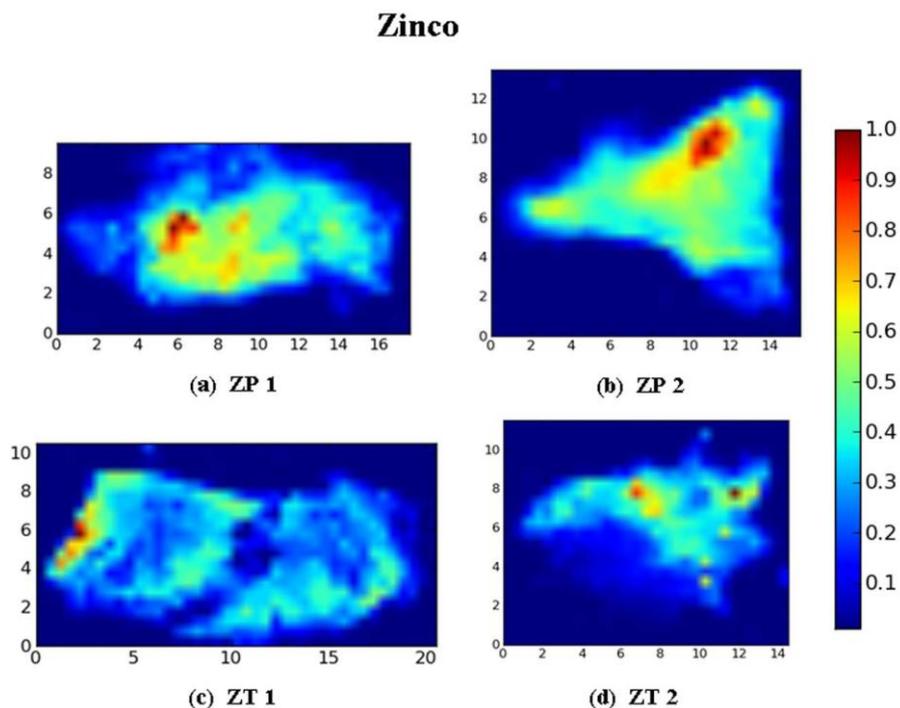


Figura 5.19. Mapa bidimensional da intensidade normalizada de zinco zonas periférica 1 e 2 (a e b) e zonas de transição 1 e 2 (c e d) do controle 2.

Os eixos mostram a dimensão das amostras em mm.

Através da figura 5.16 observamos que o cálcio está presente por toda extensão das amostras de forma muito heterogênea, com pequenas regiões com alta intensidade. Analisando a figura 5.17 verificamos que o Fe está distribuído ao longo de toda amostra de forma heterogênea, porém as amostras da zona periférica (ZP 1 e ZP 2) apresentaram distribuição menos heterogênea do que as amostras da zona de transição (ZT 1 e ZT 2).

A figura 5.18 mostra que o Cu apresenta distribuição não uniforme por toda extensão das amostras, com pequenas regiões de intensidade elevada. Através da figura 5.19 observamos que o zinco apresenta, por toda extensão das amostras analisadas, distribuição heterogênea.

V. 1. 2 – Análise de esferóides celulares de próstata.

A figura 5.20 ilustra o espectro de XRF de um esferóide de células de próstata com câncer. Foi possível detectar segundo as condições experimentais descritas no CAPÍTULO IV, os elementos: P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu e Zn.

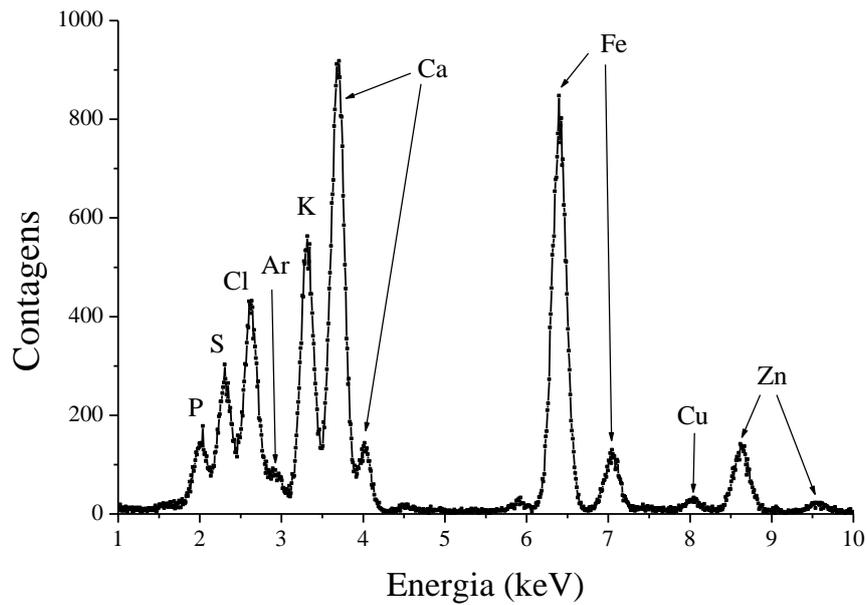


Figura 5.20. Espectro de XRF 44 do esferoide CaP 1.

As fotos dos esferóides analisados estão ilustradas na figura 5.21. As figuras 5.22 – 5.29 ilustram os mapas bidimensionais da intensidade normalizada dos esferóides analisados para os elementos P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu e Zn.

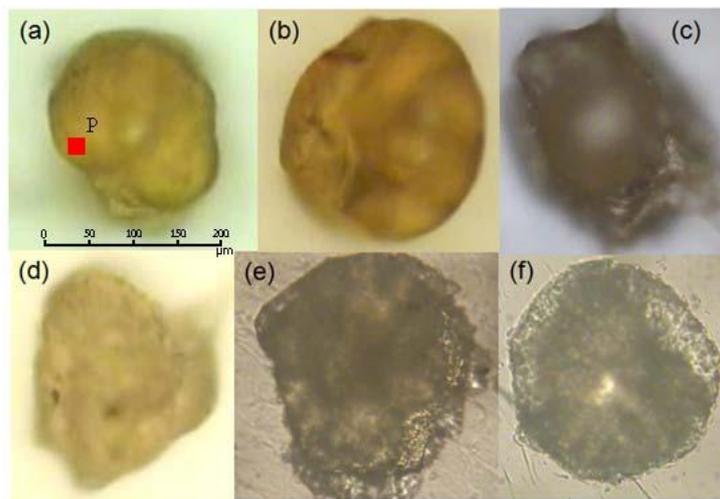


Figura 5.21. Micrografias dos esferoides obtidas de CaP (a, b, c) e de células de HPB (d, e, f).

Ponto P na figura 5.21(a) representa um pixel na imagem.

O espectro de XRF mostrado na figura 5.20 foi obtido exatamente neste ponto.

Fósforo

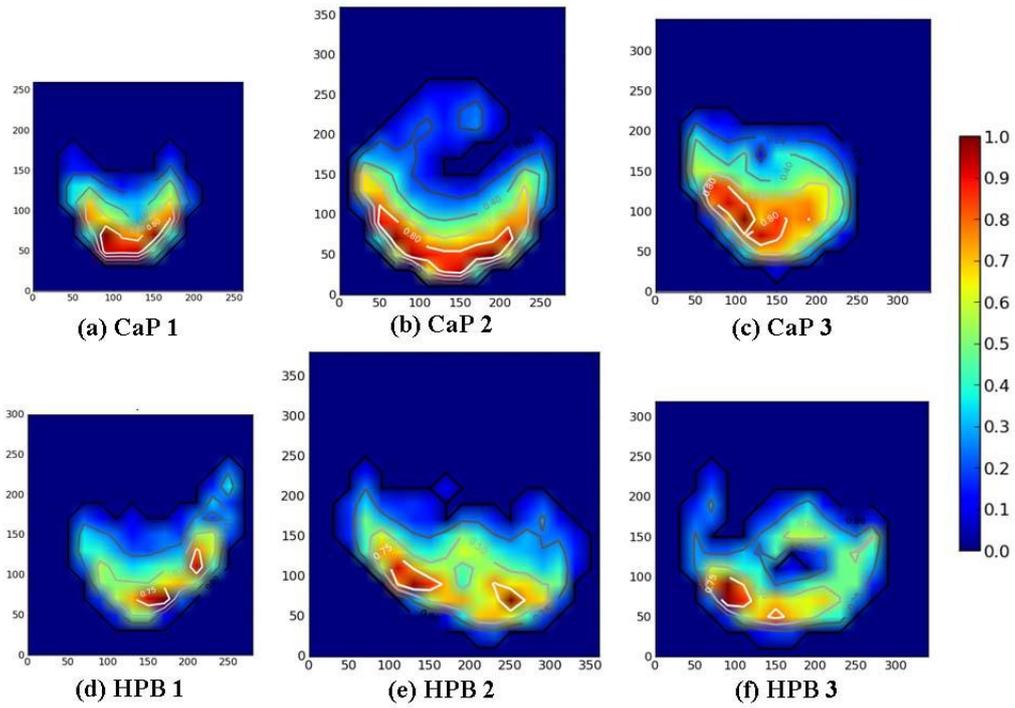


Figura 5.22. Mapa bidimensional da intensidade normalizada de fósforo dos esferóides: CaP (a, b, c) e de células de HPB (d, e, f).

Enxofre

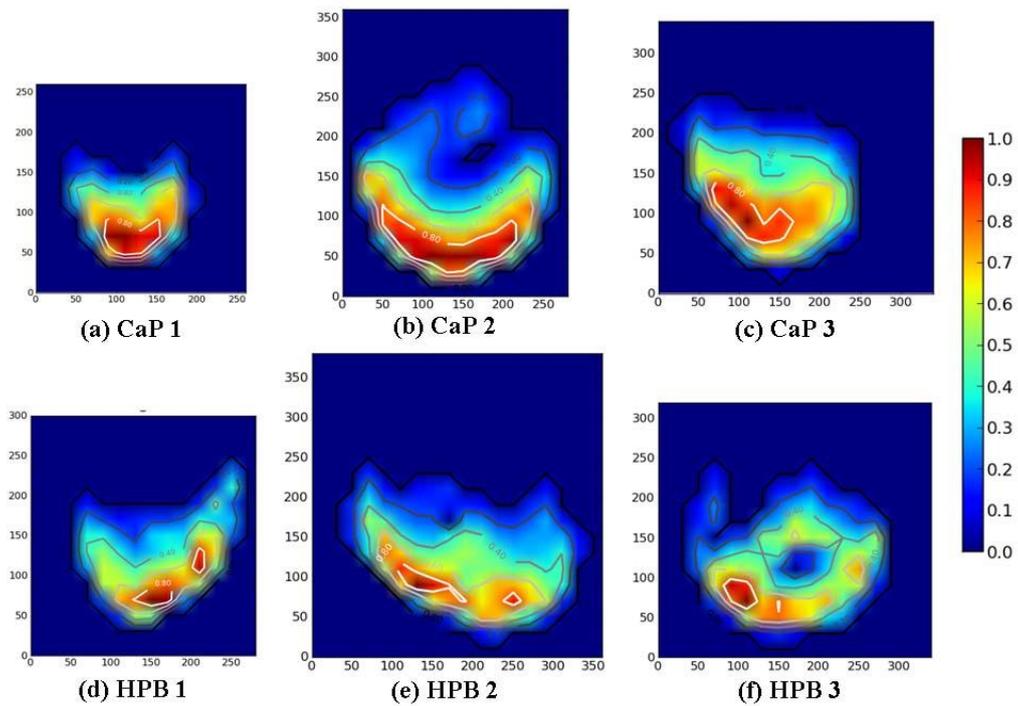


Figura 5.23. Mapa bidimensional da intensidade normalizada de enxofre dos esferóides: CaP (a, b, c) e de células de HPB (d, e, f).

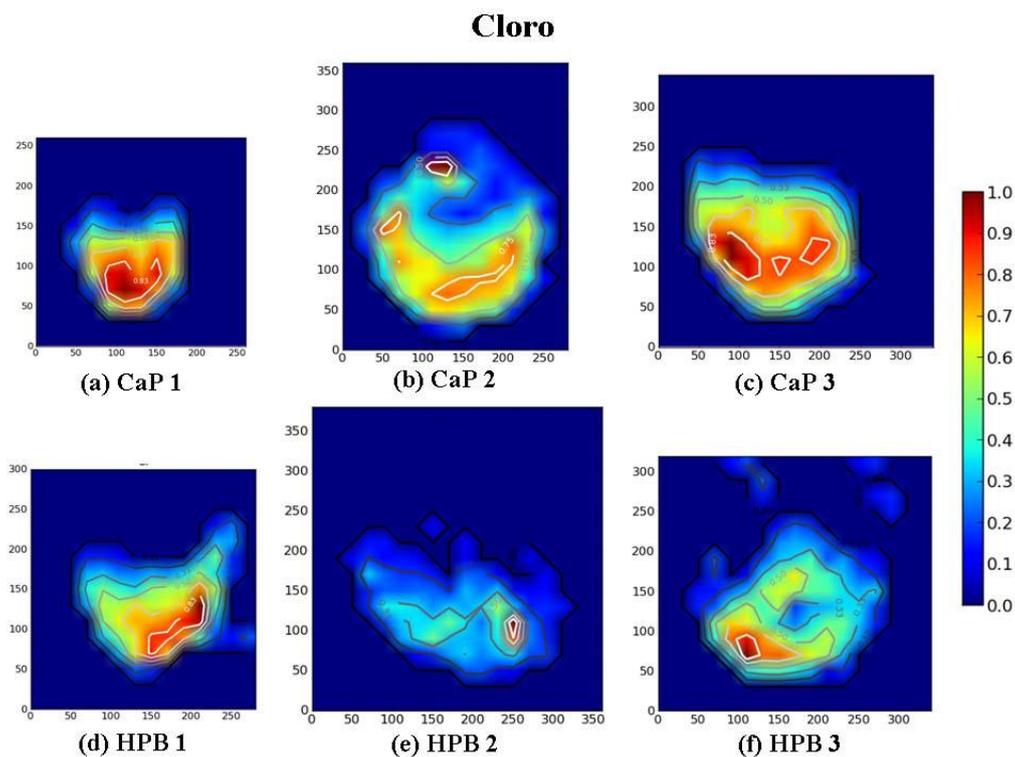


Figura 5.24. Mapa bidimensional da intensidade normalizada de cloro dos esferóides: CaP (a, b, c) e de células de HPB (d, e, f).

Não foi possível observar a parte superior dos esferóides nas figuras 5.22, 5.23, 5.24 devido o efeito de absorção causado devido a superfície dos esferóides não ser plana (formato esférico) e pela baixa energia das linhas K dos elementos P, S e Cl respectivamente.

Analisando as figuras 5.22 e 5.23 verificamos que as distribuições de P e S são similares. Fósforo e enxofre apresentam distribuição heterogênea em todos os esferóides analisados. Os esferóides celulares de CaP apresentam regiões, com nível elevado de P e S, mais extensas do que nos esferóides celulares de HPB.

A figura 5.24 mostra que o cloro, em todos os esferóides analisados, apresenta distribuição não uniforme. O mapa elementar do Cl é similar aos mapas do P e S, com exceção do esferóide HPB 2. As regiões com nível elevado de Cl foram mais extensas nos esferóides celulares de CaP do que nos esferóides celulares de HPB. O esferóide HPB 2 apresentou baixo nível de Cl ao longo de sua extensão.

Potássio

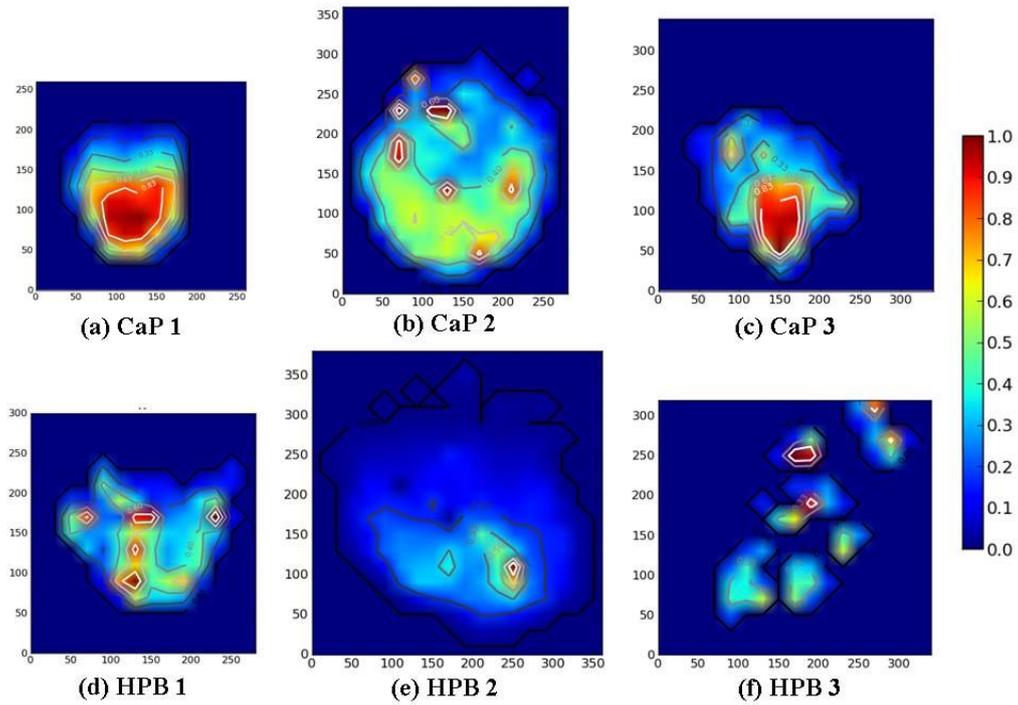


Figura 5.25. Mapa bidimensional da intensidade normalizada de potássio dos esferoides: CaP (a, b, c) e de células de HPB (d, e, f).

Cálcio

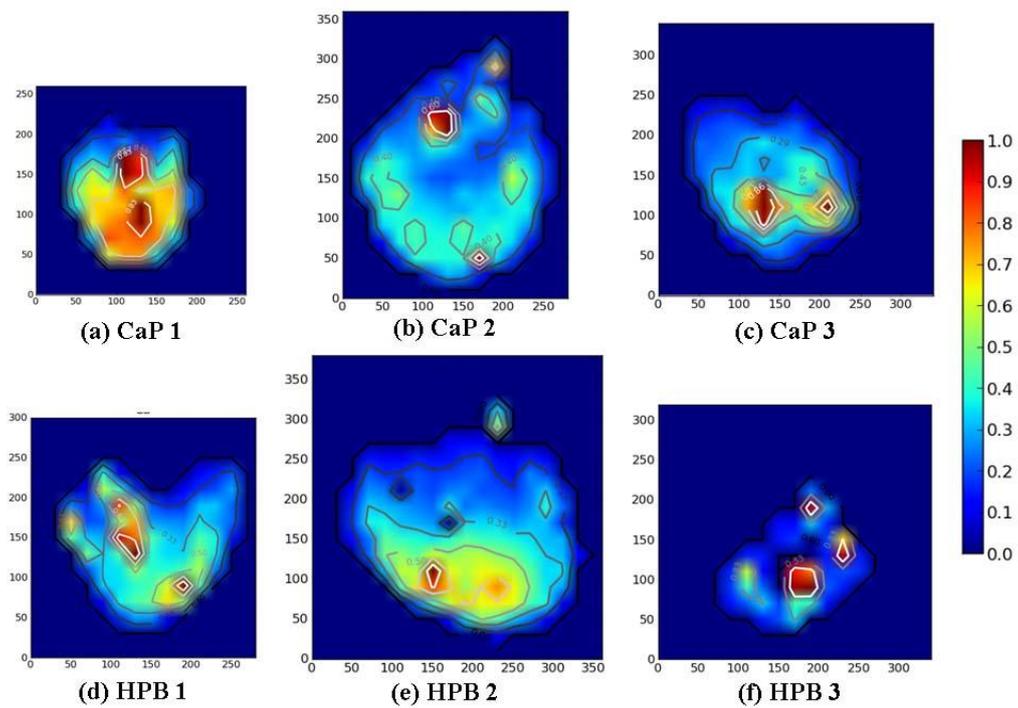


Figura 5.26. Mapa bidimensional da intensidade normalizada de cálcio dos esferóides: CaP (a, b, c) e de células de HPB (d, e, f).

Através da figura 5.25 observamos que o K apresenta distribuição muito heterogênea na maioria dos esferóides analisados com exceção dos esferóides CaP 1 e CaP 3. Os esferóides celulares de HPB e os esferóides CaP 1 e CaP 3 apresentam regiões com ausência de K. O potássio, assim com os elementos P, S e Cl, apresentam regiões com nível elevado mais extensas nos esferóides celulares de CaP do que nos esferóides celulares de HPB.

Analisando a figura 5.26 verificamos que a distribuição de Ca é heterogênea em todos esferóides analisados. Os esferóides de HPB e o esferoide CaP 3 apresentam níveis de Ca baixo na região de periferia. Os esferóides de CaP apresentam regiões com níveis de Ca mais intenso mais extensas do que nos esferóides de HPB que apresentam somente pontos mais intensos.

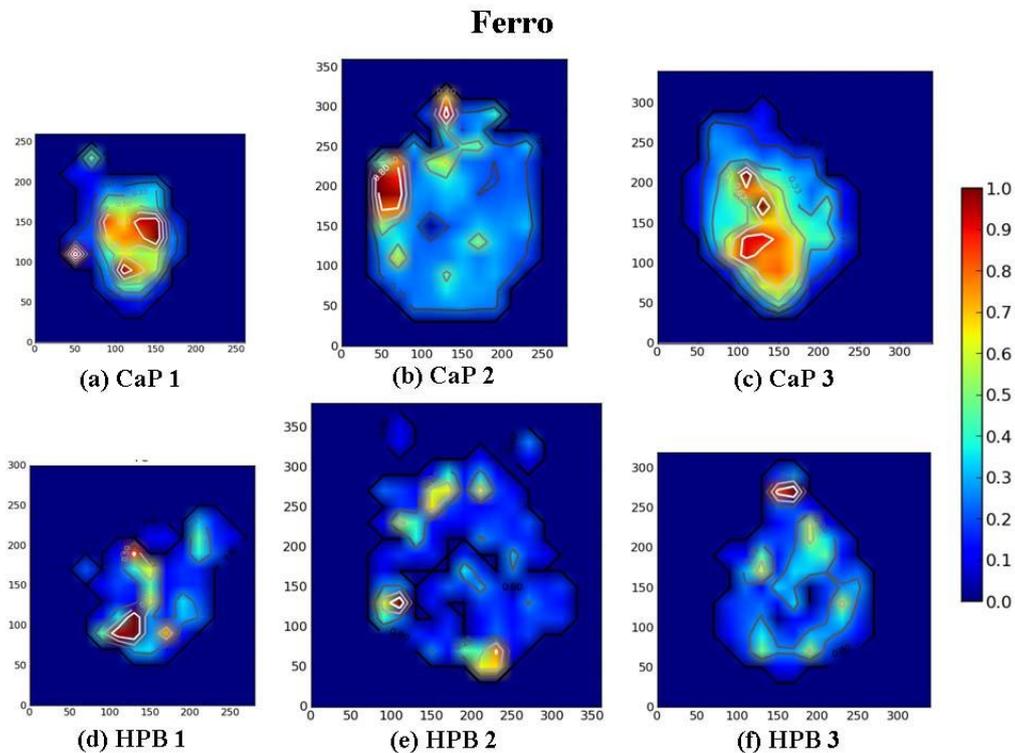


Figura 5.27. Mapa bidimensional da intensidade normalizada de ferro dos esferóides: CaP (a, b, c) e de células de HPB (d, e, f).

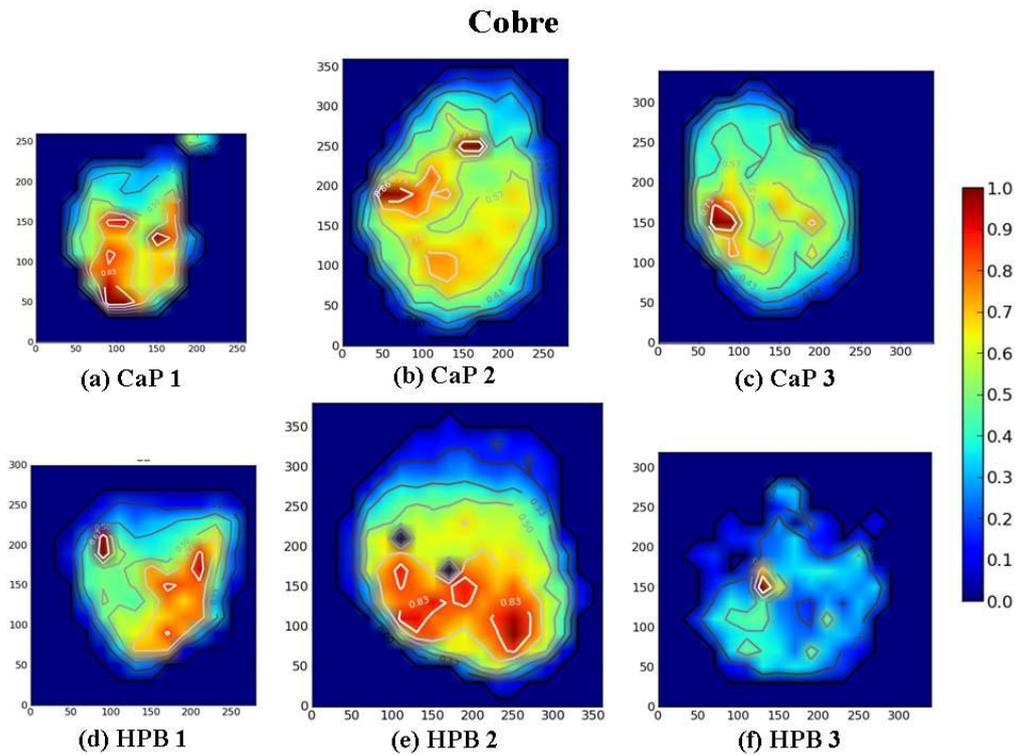


Figura 5.28. Mapa bidimensional da intensidade normalizada de cobre dos esferóides: CaP (a, b, c) e de células de HPB (d, e, f).

A figura 5.27 mostra que o Fe apresenta, em todos os esferóides analisados, distribuição muito heterogênea. Os esferóides de HPB apresentam poucas regiões com níveis de Fe mais intenso, comparando com os esferóides de CaP que apresentam regiões mais extensas.

Através da figura 5.28 verificamos que o Cu apresenta distribuição heterogênea em todos os esferóides analisados. Os esferóides celulares de CaP apresentam regiões mais extensas de níveis mais elevados de Cu. Entre os esferóides de HPB, o esferóide HPB 3 apresenta distribuição pequenas regiões de níveis mais elevados do que os demais esferóides.

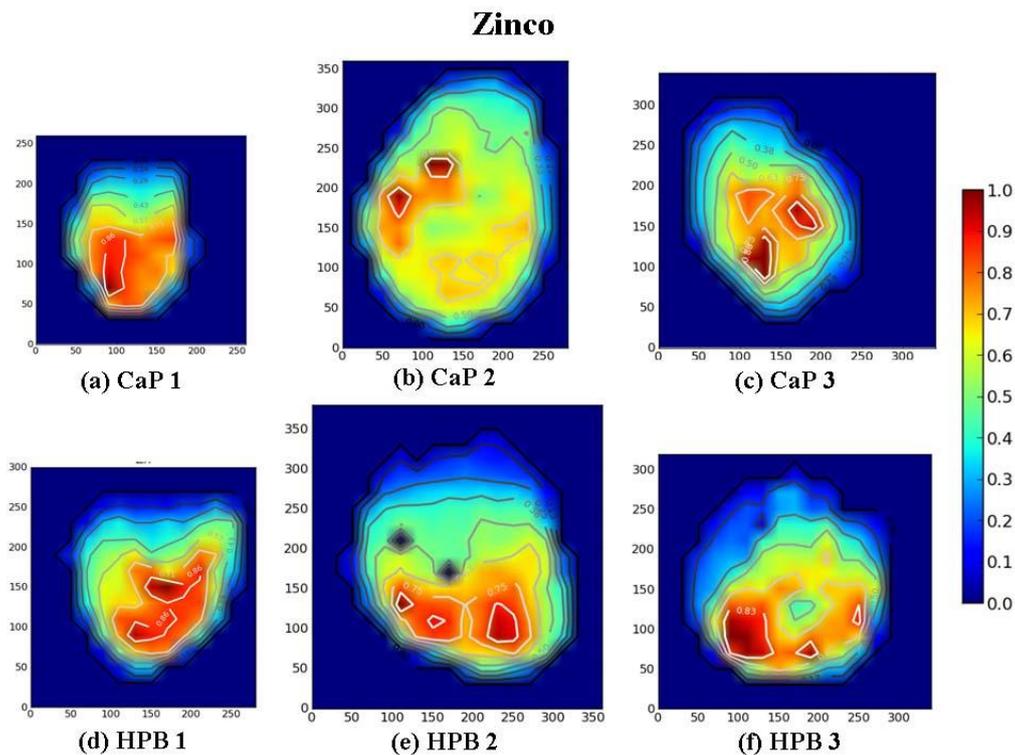


Figura 5.29. Mapa bidimensional da intensidade normalizada de zinco dos esferóides: CaP (a, b, c) e de células de HPB (d, e, f).

Analisando a figura 5.29 observamos que o Zn está distribuído de forma heterogênea por toda extensão dos esferóides analisados. Os esferóides CaP 1, CaP 3 e HPB 1 apresentam a região interna com níveis de Zn mais elevados. A região com nível mais elevado é mais extensa nos esferóides celulares de CaP do que nos esferóides celulares de HPB. Cu e Zn apresentam distribuições similares em todos os esferóides analisados.

V. 1. 2. 1 – Tratamentos com zinco

As figuras 5.30 – 5.37 ilustram os mapas bidimensionais da intensidade normalizada dos esferóides celulares de HPB e Du 145 para as diferentes suplementações com Zn: 0 μM , 75 μM , 100 μM e 150 μM .

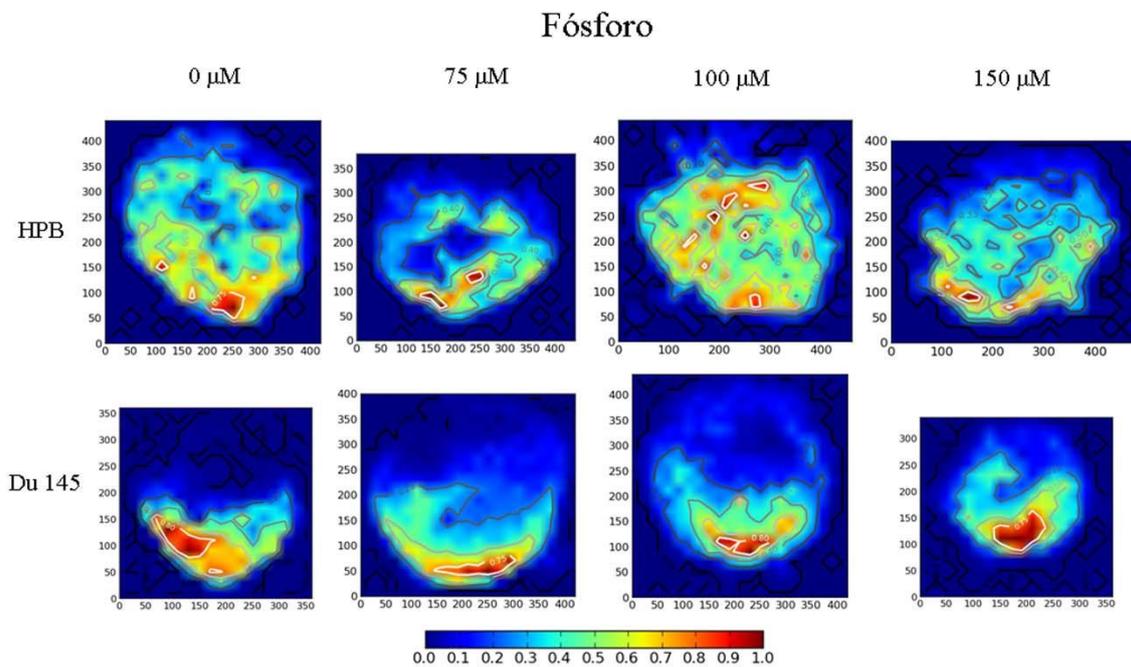


Figura 5.30. Mapa bidimensional da intensidade normalizada de fósforo dos esferóides celulares de HPB e Du 145 para as diferentes suplementações com Zn:

0 μM , 75 μM , 100 μM e 150 μM .

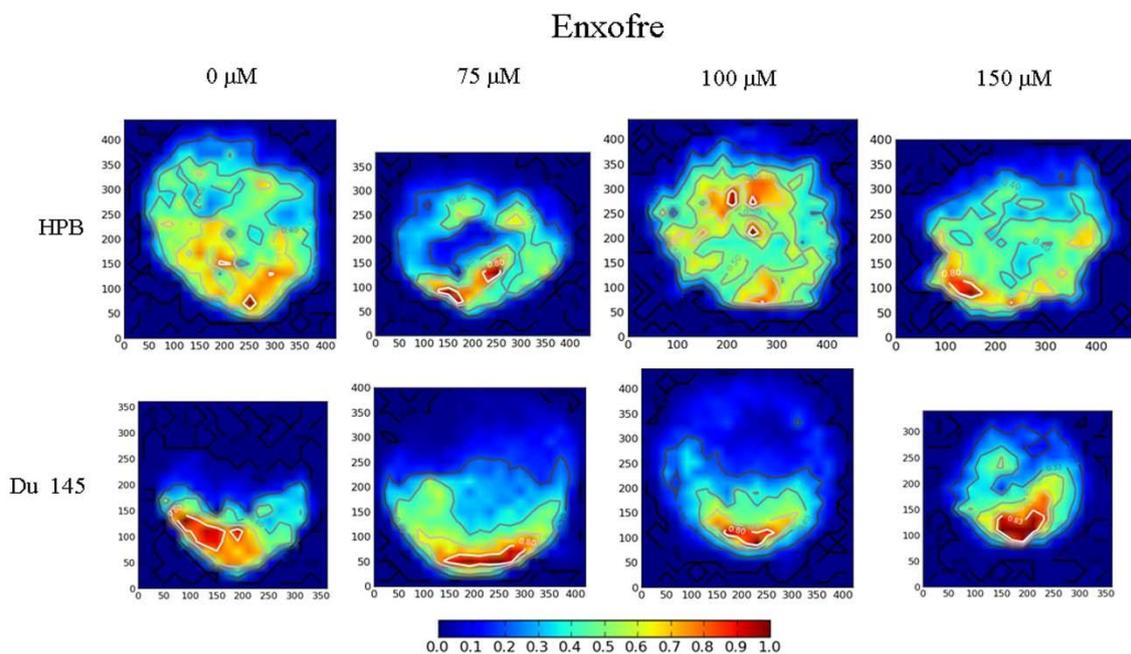


Figura 5.31. Mapa bidimensional da intensidade normalizada de enxofre dos esferóides celulares de HPB e Du 145 para as diferentes suplementações com Zn:

0 μM , 75 μM , 100 μM e 150 μM .

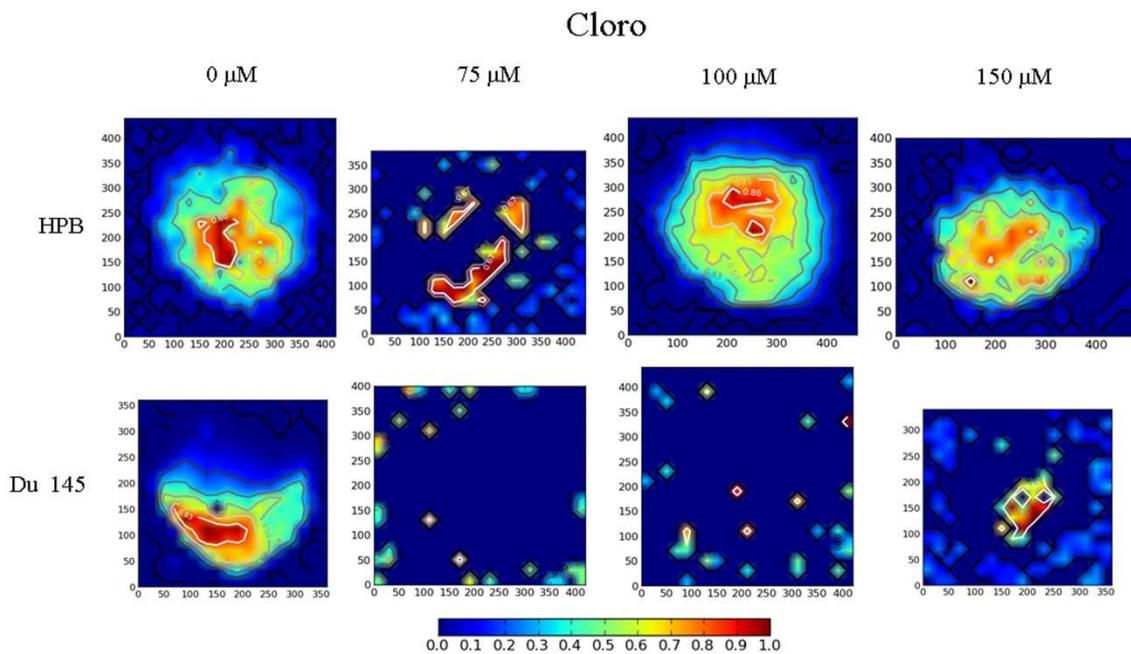


Figura 5.32. Mapa bidimensional da intensidade normalizada de cloro dos esferóides celulares de HPB e Du 145 para as diferentes suplementações com Zn: 0 μM , 75 μM , 100 μM e 150 μM .

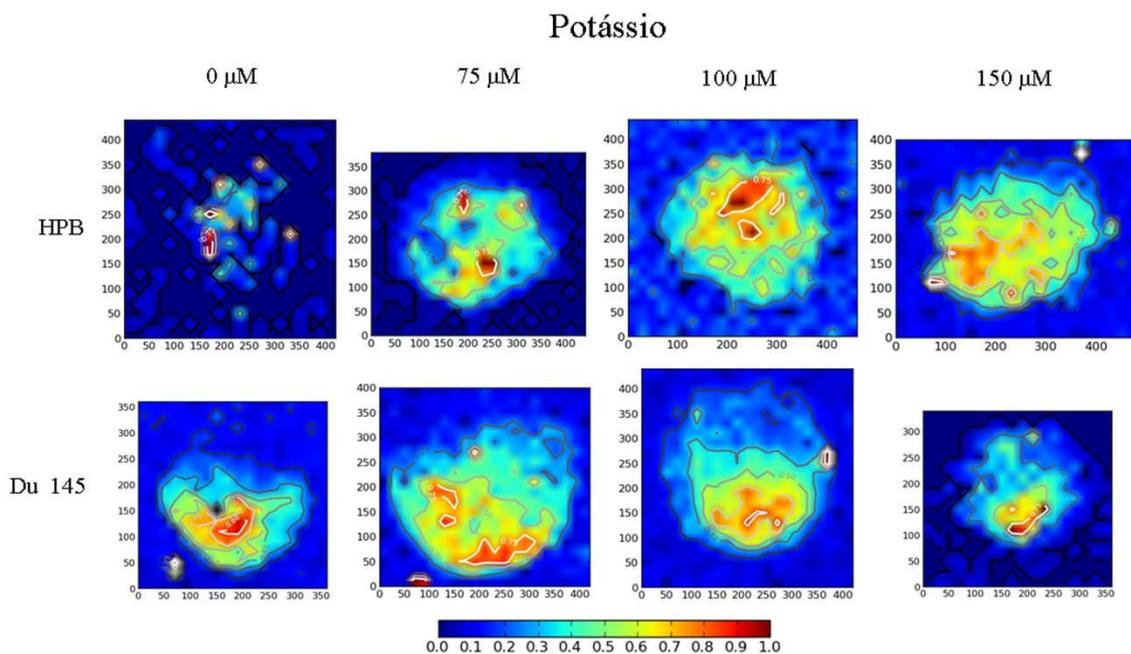


Figura 5.33. Mapa bidimensional da intensidade normalizada de potássio dos esferóides celulares de HPB e Du 145 para as diferentes suplementações com Zn: 0 μM , 75 μM , 100 μM e 150 μM .

As figuras 5.30 e 5.31 mostra que P e S apresentam distribuições heterogêneas similares em todos os esferóides analisados. Os esferóides celulares de Du 145 apresentam regiões mais intensas de P e S, mais extensas do que nos de HPB. Nas duas figuras o efeito de absorção foi maior nos esferóides celulares de Du 145 do que nos de HPB. Além disso, não houve diferenças quanto ao tratamento com Zn.

Através da figura 5.32 observa-se que o cloro, em todos os esferóides celulares de HPB analisados, apresenta distribuição não uniforme. O esferoide de HPB com tratamento de 75 μM de Zn apresenta regiões com ausência de Cl. Analisando os esferóides Du 145 nesta figura, pode se ver que o esferoide sem tratamento (0 μM) apresenta distribuição heterogênea, os esferóides com tratamentos 75 μM e 100 μM não apresentam regiões com Cl e o esferoide com tratamento 150 μM apresenta uma pequena região central com intensidade de Cl. As regiões com nível elevado de Cl foram mais extensas nos esferóides celulares de HPB do que nos esferóides celulares de Du 145.

Analisando a figura 5.33 verificamos que o K está distribuído heterogeneamente por toda extensão dos esferóides com exceção do esferoide de HPB sem tratamento (0 μM) que apresenta somente uma pequena região central com potássio.

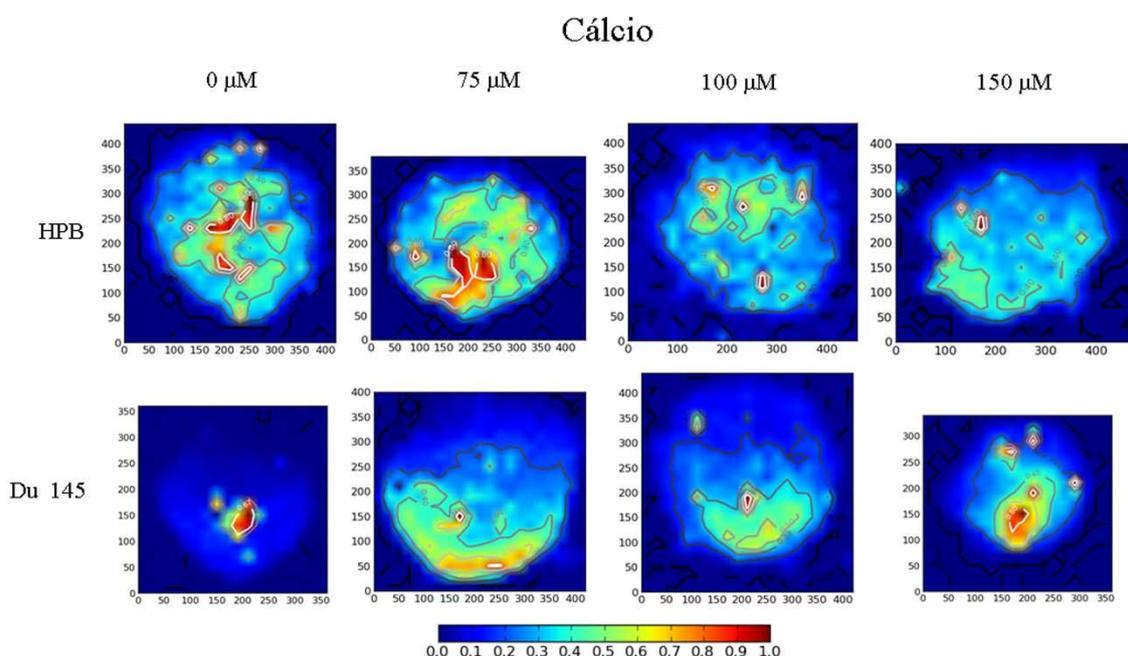


Figura 5.34. Mapa bidimensional da intensidade normalizada de cálcio dos esferóides celulares de HPB e Du 145 para as diferentes suplementações com Zn:

0 μM , 75 μM , 100 μM e 150 μM .

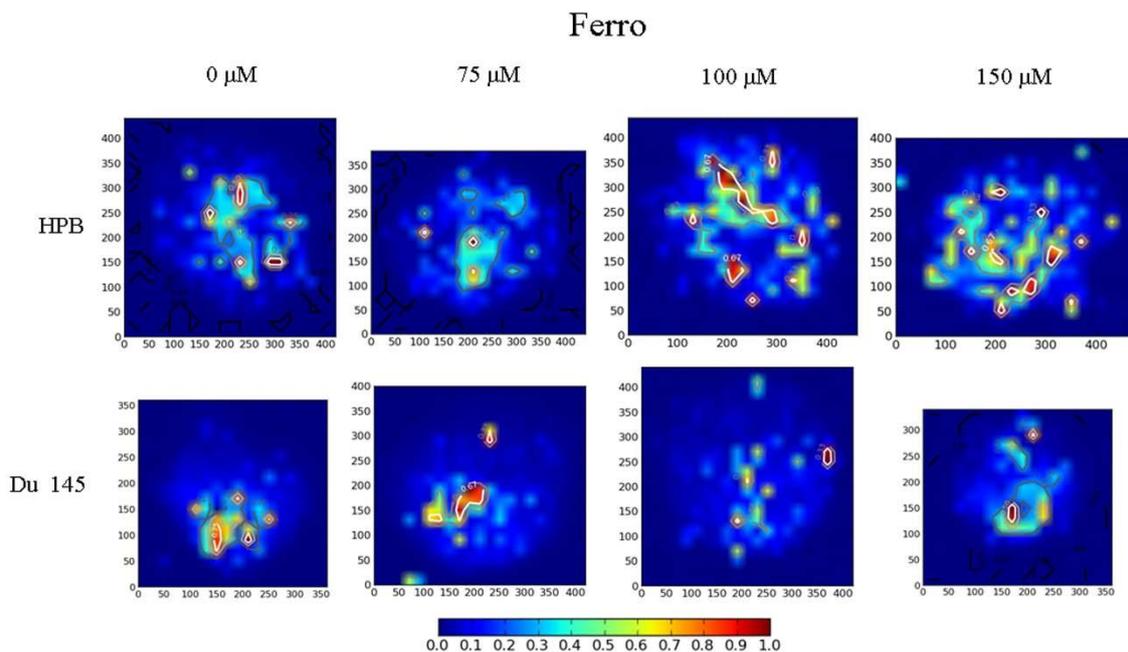


Figura 5.35. Mapa bidimensional da intensidade normalizada de ferro dos esféróides celulares de HPB e Du 145 para as diferentes suplementações com Zn: 0 μM , 75 μM , 100 μM e 150 μM .

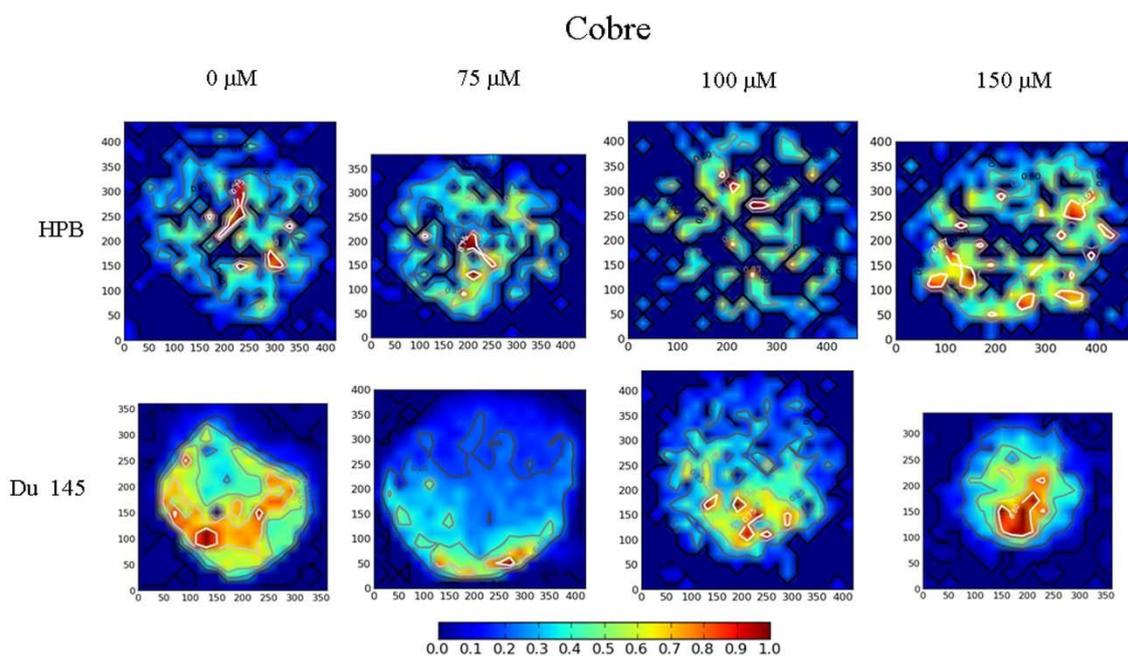


Figura 5.36. Mapa bidimensional da intensidade normalizada de cobre dos esféróides celulares de HPB e Du 145 para as diferentes suplementações com Zn: 0 μM , 75 μM , 100 μM e 150 μM .

Através da figura 5.34 observamos que o Ca apresenta distribuição heterogênea por toda extensão dos esferóides em todas as amostras analisadas. Além disso, o esferóide Du 145 sem tratamento ($0 \mu\text{M}$) apresenta a região central com maior intensidade de Ca.

Analisando a figura 5.35 é possível ver que o Fe apresenta, em todos os esferóides celulares analisados, distribuição muito heterogênea, com poucas regiões com níveis de Fe mais intensos.

A figura 5.36 mostra que a distribuição de Cu é heterogênea em todos os esferóides analisados. Porém os esferóides de HPB apresentam regiões com ausência de Cu.

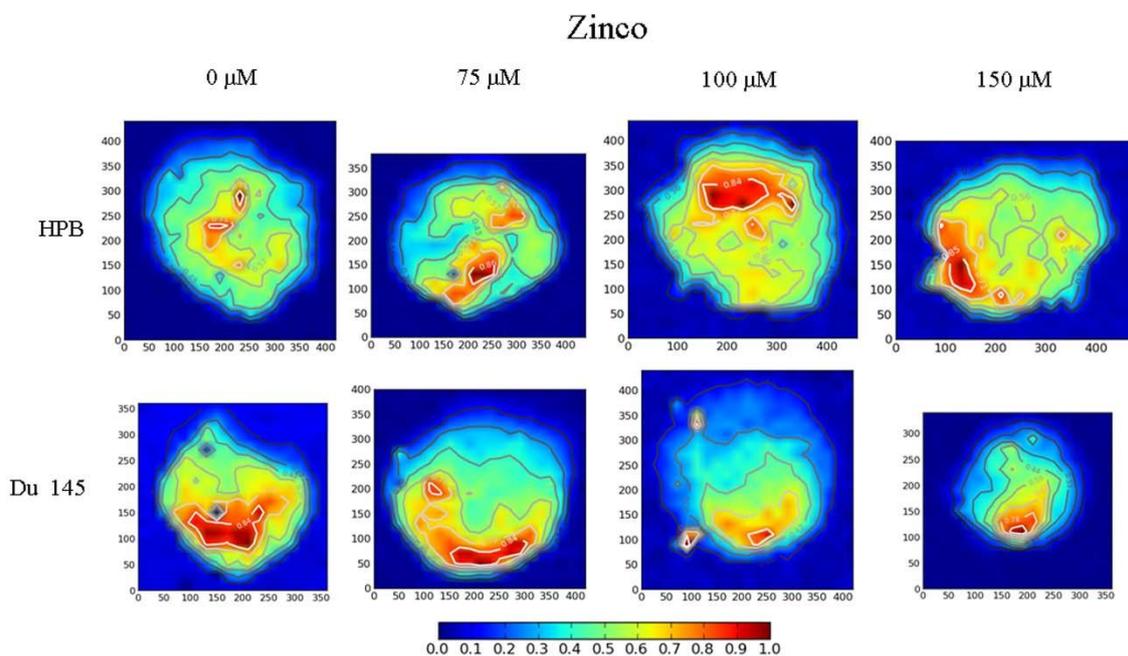


Figura 5.37. Mapa bidimensional da intensidade normalizada de zinco dos esferóides celulares de HPB e Du 145 para as diferentes suplementações com Zn: $0 \mu\text{M}$, $75 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$ e $150 \mu\text{M}$.

Através da figura 5.37 pode se ver que o Zn está presente por toda extensão dos esferóides celulares de forma heterogênea. Comparando os esferóides celulares de HPB, os esferóides com tratamentos $100 \mu\text{M}$ e $150 \mu\text{M}$ apresentam regiões mais extensas de maior intensidade. Além disso, comparando os esferóides celulares Du 145, o esferóide sem tratamento ($0 \mu\text{M}$) apresenta região mais extensa de alta intensidade.

Os gráficos das intensidades de Zn para cada tratamento estão ilustrados nas figuras 5.38 e 5.39.

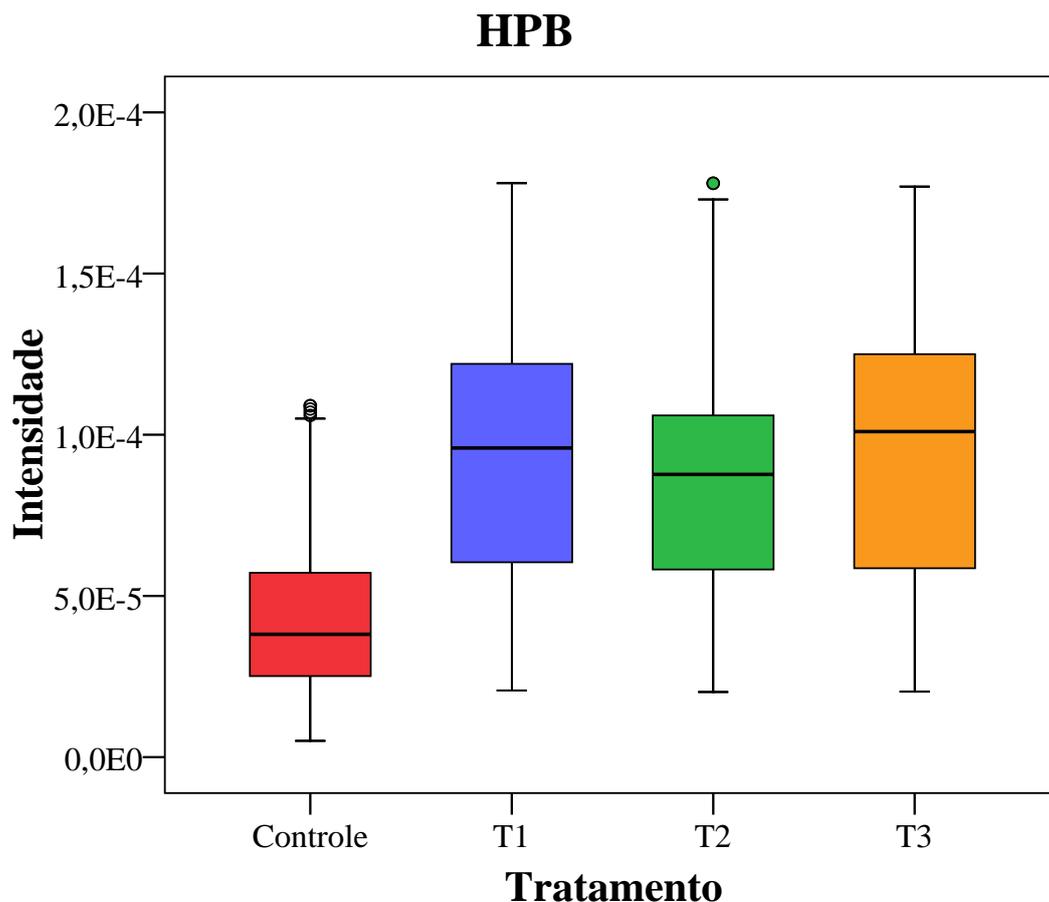


Figura 5.38. Comparação de intensidade de Zn em esferoides celulares de HPB para os tratamentos com Zn: Controle (0 μM), T1 (75 μM), T2 (100 μM) e T3 (150 μM).

A figura 5.38 mostra que a um aumento na intensidade de Zn com a suplementação com o Zn nos esferoides celulares de HPB comparando com o controle (0 μM). Entre os tratamento houve uma pequena redução no tratamento 2 comparando com os outros tratamentos. Para a análise estatística foi utilizado o teste não paramétrico Mann-Whitney com significância de $\alpha = 0.05$. O teste Mann-Whitney mostrou que todos os tratamentos diferem significativamente do controle. Entre os tratamentos não houve diferença significativa apenas entre os tratamentos T1 e T3.

Du 145

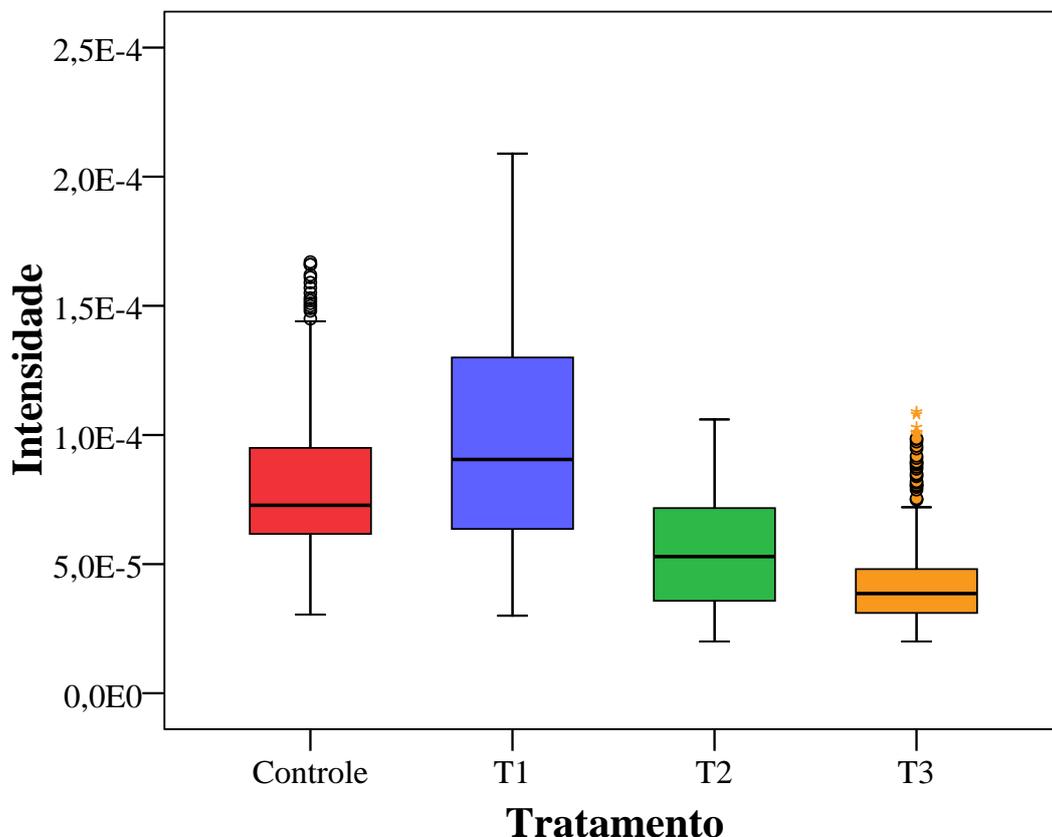


Figura 5.39. Comparação de intensidade de Zn em esferoides celulares de Du 145 para os tratamentos com Zn: Controle (0 μM), T1 (75 μM), T2 (100 μM) e T3 (150 μM).

Analisando a figura 5.39 pode se ver que para os esferoides Du 145 há um aumento na intensidade de Zn para o tratamento com 75 μM e uma redução para os tratamentos com 100 μM e 150 μM comparando com o controle (0 μM). O teste não paramétrico Mann-Whitney ($\alpha = 0.05$) mostrou que todos os grupos diferem significativamente entre eles.

V. 2. – Discussão geral dos resultados dos principais elementos envolvidos nas funções da próstata e em processos patológicos.

a) Potássio

Os resultados das amostras de tecido de próstata controle apresentam distribuição de potássio não uniforme e com grande flutuação nas intensidades. Na análise dos esferóides observamos que a distribuição é heterogênea em todos esferóides analisados

e os esferóides de CaP apresentam regiões com nível elevado mais extensas do que nos esferóides celulares de HPB.

O potássio é um cátion intracelular importante com vários papéis. Ela desempenha um papel significativo na geração de membranas celulares em repouso e potenciais de ação, mantendo a osmolaridade intracelular e na síntese de proteínas. É também um cofator necessário para obter uma atividade máxima da enzima piruvato-quinase que está envolvida na produção de energia glicolítica. As células cancerosas mostraram aumento dos níveis de glicólise em comparação com células normais (OGAWA *et al.*, 1999). Como proteínas quinases ter efeitos profundos sobre uma célula sua atividade é altamente regulado e desregulado e atividade quinase é uma causa freqüente de doença, especialmente câncer (AL-EBRAHEEM *et al.*, 2009).

b) Cálcio

Os resultados das amostras de tecido de próstata controle apresentaram distribuição de Ca heterogênea. A análise dos esferóides mostrou que os níveis de Ca são mais intensos na região central. Os esferóides de CaP apresentam regiões com níveis de Ca mais intenso mais extensas do que nos esferóides de HPB que apresentam somente pontos mais intensos.

O cálcio é agora o nutriente mais promovido pelos defensores da tradicional: nutricionais e medicina alternativa, no entanto, ao mesmo tempo, a necessidade assumida é baseada puramente na especulação de que a ingestão do corpo de cálcio é bem abaixo das suas necessidades. De cerca de 1g de cálcio em um corpo adulto médio de 70 kg, quase 98% é encontrada no osso, 1% em dentes, e o resto é encontrado no sangue, fluidos extracelulares e dentro das células, onde é um co-fator de várias enzimas. O cálcio promove a coagulação sanguínea, ativando a proteína fibrina e, juntamente com o magnésio ajuda a regular o batimento cardíaco, o tônus muscular, contração muscular e condução nervosa. Deficiência crônica de cálcio está associada a algumas formas de hipertensão, câncer de próstata e colorretal, alguns tipos de pedras nos rins, e aborto. Defeitos de nascimento (coração) são vistos em crianças quando a mãe tem doença periodontal, distúrbios do sono, saúde mental / distúrbios depressivos e doenças cardiovasculares ou hemorrágica. Níveis elevados de cálcio estão associados com a degeneração artrítica e vascular, a calcificação dos tecidos moles, hipertensão e distúrbios acidente vascular cerebral, gastrointestinal distúrbios de humor e depressão, fadiga crônica, alcalinidade aumentou, e desequilíbrios minerais em geral. Altos níveis

de cálcio interferem com a vitamina D e, posteriormente, inibem o efeito de proteção de câncer da vitamina, exceto quando quantidade extra de vitamina D são suplementadas (EKINCI e INGEÇ, 2008). Perturbações na função de detecção do receptor de Ca^{+2} podem contribuir para a progressão de câncer (KIRCHHOFF e GEIBEL 2006). Os resultados mostram que os esferóides de células de CaP acumulam mais Ca que os esferóides de células com HPB.

c) Ferro

O Fe apresenta distribuição heterogênea com pequenos pontos muito intenso em todas as amostras de tecido de próstata analisadas. Em todos os esferóides analisados, o Fe apresenta distribuição não homogênea.

O ferro é um elemento essencial no organismo humano essencial para as funções fisiológicas normais, porque é parte integrante de muitas proteínas e enzimas. Ele desempenha um papel vital na regulação do crescimento e diferenciação celular, de modo que parece que o ferro influencia o processo de carcinogênese. Ferro deve ser tanto ligado às proteínas ou mantidas no estado trivalente de redox, a fim de evitar danos no tecido a partir de radicais livres as formações que são considerados como relevantes para carcinogênese. A regulação da recepção de ferro intracelular é essencialmente feito através da transcrição do receptor de transferrina sobre o nível de ADN. Vários estudos têm mostrado que o ferro disponível pode ter algum papel em promover malignidade. O ferro pode catalisar a produção de radicais de oxigênio e estes podem ser imediatos carcinogênicos (KONEMANN *et al.*, 2005). Segundo lugar, pode promover o crescimento de células transformadas pela inibição da defesa do hospedeiro. A atividade tumoral de macrófagos é suprimida pelo ferro dextran, ferro carbonila ou ferro contendo ferritina (MAJEWSKA *et al.*, 2007).

Os esferóides de células de CaP que apresentam regiões com níveis de Fe mais intenso maiores que nos esferóides de HPB, os resultados estão de acordo com a literatura que indicam que o Câncer esta associado ao acúmulo de Fe.

d) Cobre

Através da análise das imagens de Cu em tecidos de próstata controle (figuras 5.9 e 5.14) verificamos que este apresenta distribuição heterogênea ao longo das amostras. A análise dos esferóides mostra que o Cu apresenta distribuição heterogênea. Os

esferóides celulares de CaP apresentam regiões mais extensas de níveis mais elevados de Cu.

O cobre é encontrado em todas as células vivas e é essencial para uma ampla variedade de processos bioquímicos, sendo um co-fator da enzima superóxido dismutase (SOD), uma enzima que impede o aparecimento e progressão de tumores, protegendo as células contra substâncias que causam formação de radicais livres. No entanto, é também um elemento potencialmente tóxico, por exemplo, pode afetar a carcinogênese por ser um co-fator para a angiogênese (MARTIN *et al.*, 2005). Cobre, pode ser associado com funções que protegem o corpo de doenças, mas também com os processos que facilitam a sua propagação. Por exemplo, as funções do cobre como um cofator para enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), que têm um papel na defesa do organismo humano contra a doença. Inversamente, o cobre é também um cofator para a lisil-oxidase envolvidas na invasão e deposição da matriz extracelular. Íons de cobre podem gerar radicais hidroxilas mais prontamente do que o ferro pode, e estes podem estar relacionados com a destruição dos tecidos. Uma possível função do cobre é o seu papel na função da inibição da superóxido dismutase 1 (SOD1), que é importante para a sinalização endotelial e, por conseguinte, a proliferação do tumor (FARQUHARSON *et al.*, 2007).

e) Zinco

Analisando as imagens do zinco nos tecido de próstata (Figuras 5.10 e 5.19) verificamos que o zinco esta distribuído de forma heterogênea por toda extensão das amostras analisadas. Nos esferóides, as distribuições de Zn (figura 5.31) é heterogênea por toda extensão dos esferóides analisados. Os esferóides de células de CaP apresentam região com nível mais elevado mais extensa do que nos esferóides celulares de HPB. O tratamento com Zn mostrou que nos esferoides celulares de HPB há um aumento na intensidade de Zn com a suplementação, mas este aumento não depende da concentração suplementada. Nos esferoides celulares Du 145 houve um aumento na intensidade de Zn com suplementação com 75 μM e uma redução quando suplementado com 100 μM e 150 μM , esta redução pode ser devido às células epiteliais malignas não terem a capacidade de acumular altos níveis de Zn.

Um traço característico dos tecidos da próstata ao contrário de outros tecidos é a sua capacidade de acumular concentração excepcionalmente elevada de zinco, que é tóxica para os tecidos de outras partes do corpo. A importância da concentração de

zinco elevada nestas células não é conhecida, mas o zinco é um elemento traço essencial importante que afeta várias enzimas e fatores de transcrição importantes para a proliferação de células normais e diferenciação. Ele modula a replicação do DNA, síntese protéica e vias de sinalização celular (VALLEE e FALCHUK 1993). Este oligoelemento desempenha um papel em uma grande variedade de processos fisiológicos e patológicos envolvidos na proliferação celular, diferenciação e ontogênese, na prevenção do estresse oxidativo e no status imunológico e envelhecimento (STEFANIDOU *et al.*, 2006; SENSI *et al.*, 2003). Como o zinco é um antioxidante, a desregulamentação do metabolismo de zinco também resulta em aumento da susceptibilidade a danos dos radicais livres e, portanto, a transformação maligna (MOCCHEGIANI *et al.*, 2006). Além disso, certas alterações moleculares e biológicas observadas no envelhecimento estão associadas com características patológicas de malignidade (DUNSMUIR *et al.*, 1998).

Embora as concentrações de zinco sejam relativamente elevadas ao longo da próstata, esta capacidade reside dentro das células secretoras do epitélio glandular da zona periférica, que é o principal local de origem da maioria das doenças malignas da próstata (COSTELLO *et al.*, 2005; FRANKLIN *et al.*, 2007). A principal função da zona periférica da próstata humana (como em outros animais) é a produção e secreção de níveis muito elevados de citrato, o que nos referimos como "produção de citrato líquida" (HUANG *et al.*, 2005).

Curiosamente, a função principal do Zn na próstata pode ser para facilitar a secreção de citrato. Ao contrário da maioria células em que o Zn é sequestrado em vesículas e organelas, Zn no citoplasma da célula da próstata compreende quase 35% do teor total de Zn intracelular. Este Zn é fracamente ligado a moléculas de peso molecular pequeno como o citrato e é considerado biologicamente ativo (COSTELLO e FRANKLIN 1998). O dogma atual sugere que essa bioativa associação de Zn é essencial para a inibição m-aconitase, poupando oxidação citrato no ciclo de Krebs, e fornecendo quantidades elevadas de citrato para a secreção no fluido prostático (COSTELLO *et al.*, 2005). Para manter a alta concentração de Zn celular e secreção, a homeostase do Zn na próstata deve ser muito bem regulada e só recentemente os possíveis modos de regulação pela homeostase do Zn foram elucidados (KELLEHER *et al.*, 2011).

O câncer de próstata surge tipicamente a partir do alto acúmulo de zinco na zona periférica da próstata, enquanto que HPB é pensado para originar na zona de transição

(COSTELLO *et al.*, 2005; FOSTER, 2000). Células malignas da próstata não têm a função especializada de produção e secreção de citrato. Elas devem substituir as vias metabólicas associadas com a produção de citrato líquido com as relações metabólicas que são adequadas para a existência maligna. A transformação metabólica para eficiência energética citrato-oxidante de células que perderam a capacidade de acumular zinco fornece suas necessidades metabólicas / bioenergética de malignidade. Além disso, a influência apoptótica do zinco é eliminada, o que permite a proliferação das células malignas (HUANG *et al.*,2005). Mais importante, raramente, ou nunca, é encontrado glândulas malignas que mantiveram os níveis de zinco alto que caracteriza a glândula normal. Além disso, a diminuição do zinco ocorre no início do desenvolvimento de tumores malignos da próstata (FRANKLIN *et al.*, 2005).

CAPÍTULO VI

CONCLUSÃO

Neste trabalho utilizou-se a microfluorescência de raios X com radiação síncrotron (μ SRXRF) para analisar amostras de tecido de próstata controle e esferóides de células com câncer e com HPB.

A μ SRXRF usando o módulo de fendas com resolução espacial de 500 μ m provou ser uma técnica altamente eficiente no mapeamento de amostras de tecido da ordem de centímetros (1,5 a 2,0 cm) sendo capaz de detectar os elementos: P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn.

O mapeamento das amostras de tecidos prostático controle mostrou que todos os elementos apresentaram distribuição heterogênea. Os elementos P, Cl e K não estão distribuídos em toda extensão das amostras. A zona periférica do controle 1 apresentou níveis de Cu e Zn maiores que a zona de transição. Estudos já mostraram que células secretoras do epitélio glandular da zona periférica possuem a capacidade de acumular altos níveis de Zn (FRANKLIN *et al.*, 2007, COSTELLO *et al.*, 2006). Cu e Zn são os grupos prostéticos de metaloenzimas diversas incluindo superóxido dismutase (SOD). Cu e Zn - SOD são as mais importantes enzimas antioxidantes envolvidas na principal defesa celular e pode, assim, ajudar a proteger contra a progressão da carcinogênese ou tumor (MCCORD *et al.*, 2005).

A μ SRXRF usando a ótica capilar com resolução espacial de aproximadamente 20 μ m provou ser uma técnica eficiente no mapeamento de esferóides celulares para alguns elementos. Através da técnica foi possível detectar os elementos: P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn. Porém o mapeamento foi eficiente apenas para os elementos: K, Ca, Fe, Cu, Zn. Os elementos P, S e Cl sofreram efeito de absorção causado devido a superfície dos esferóides não ser plana (formato esférico) e pela baixa energia das linhas K destes elementos parte da radiação fluorescente sofre absorção na parte mais espessa do esferóide. Todos os elementos apresentam distribuição heterogênea em todos os esferóides celulares analisados. Para todos os elementos detectados a distribuição foi mais extensa nos esferóides celulares de câncer. Mostrando que as células transformadas tendem a acumular estes elementos. Além disso, foi encontrada uma relação entre as distribuições de Cu e Zn.

A análise dos esferoides suplementados com diferentes concentrações de Zn mostrou que todos esferóides apresentaram distribuição heterogênea para todos os elementos detectados. Nos esferoides celulares de HPB houve um aumento na intensidade de Zn com a suplementação nas 3 concentrações de suplementação. O teste Mann-Whitney mostrou que a intensidade de Zn, em todos os tratamentos, difere significativamente do controle. Entre os tratamentos não houve diferença significativa apenas entre os tratamentos de 75 μM e 150 μM . Nos esferoides celulares Du 145 houve um aumento na intensidade de Zn com suplementação de 75 μM e uma redução para os tratamentos com 100 μM e 150 μM comparando com o controle (0 μM). O teste não paramétrico Mann-Whitney ($\alpha = 0.05$) mostrou que todos os grupos diferem significativamente entre eles.

Os resultados mostraram que a técnica μSRXRF é eficiente na análise de tecidos e esferoides celulares fornecendo informações importantes e pode ser usada em conjunto com outras técnicas na caracterização de amostras biológicas.

A capacidade das células secretoras do epitélio glandular da zona periférica da próstata de acumular altos níveis de Zn e produzir e secretar níveis muito elevados de citrato fazem do Zn o principal responsável por facilitar a secreção de citrato. A função específica de zinco nas células secretoras normais do epitélio e sua relação com o processo cancerígeno sugerem que mais estudos sobre o mapeamento elementar em esferóides em conjunto com estudos morfológicos podem ajudar a esclarecer a relação entre zinco e CaP.

Para trabalhos futuros que desenvolverão pesquisa nesta área de estudo pode-se sugerir:

- a) Realizar mais estudos com o tratamento de Zn em esferoides celulares de próstata utilizando intervalos de concentrações maiores de Zn, para verificar a saturação de Zn em células tumorais;
- b) Analisar outros tipos de linhagens tumorais prostáticas em conjunto com estudos de viabilidade celular e apoptose, para avaliar a influência do Zn nas diferentes linhagens;
- c) Utilizar um número maior de amostras por grupo, para uma melhor análise estatística.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABCANCER. Disponível online em: <http://www.abcancer.org.br/>. Acesso em: 15 maio 2008.

ABRALE. Disponível on line em: <http://www.abrale.org.br/doencas/cancer/>. Acesso em: 15 maio 2008.

ADAMS, F.; JANSSENS, K., SNIGIREV, A., 1998, “Microscopic X-ray fluorescence analysis and related methods with laboratory and synchrotron radiation sources”, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v.13, pp. 319-331.

AL-EBRAHEEM A., MERISOV A., GURUSAMY, K., *et al.*, 2010, “Distribution of Ca, Fe, Cu and Zn in primary colorectal cancer and secondary colorectal liver metastases”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, v. 619, pp. 338–343.

AL-EBRAHEEM, A., FARQUHARSON, M.J., RYAN, E., 2009, “The evaluation of biologically important trace metals in liver, kidney and breast tissue”, *Applied Radiation and Isotopes*, v. 67, pp. 470–474.

ANJOS, M.J., BARROSO, R.C., PÉREZ, C.A., *et al.*, 2004, “Elemental mapping of teeth using μ SRXRF”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, v. 213, pp. 569–573.

ARFELLI, F., 2000, “Synchrotron Light and Imaging Systems for Medical Radiology”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A*, v. 454, pp. 11-25.

BALLANGRUD, A. M., YANG, W. H., DNISTRAN, A., LAMPEN, N. M., SGOUROS, G., 1999, “Growth and characterization of LNCaP prostate cancer cell spheroids”, *Clinical Cancer Research*, v. 5, pp. 3171s–3176s.

BATES, R. C., EDWARDS, N. S., AND YATES, J. D., 2000, “Spheroids and cell survival”, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v.36, pp. 61–74.

BENDHACK D.A., DAMIÃO R., 1999, *Guia prático de urologia*. 1. ed., São Paulo, BG Cultural.

BENNINGHOFF, L., VONCZARNOWSKI, D., DENKHAUS, E., *et al.*, 1997, “Analysis of human tissues by total reflection X-ray fluorescence. Application of chemometrics for diagnostic cancer recognition”, *Spectrochim. Acta Part B*, v. 52, pp. 1039–1046.

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

BERNASCONI, TAJANI, 1996, Quantitative X-ray Analysis System, Software, Package: Documentation Version 1.2, International Atomic Energy Agency, Vienna.

BERRY, S.J., COFFEY, D.S., WALSH, P.C., *et al.*, 1984, “The development of human benign prostatic hyperplasia with age”, *The Journal of Urology*, v. 132, pp. 474-477.

BICHINHO, K. M., 2008, *Utilização da técnica de espectrometria de fluorescência de raios X para determinação de resíduos catalíticos em polímeros comerciais*. Tese* de D.Sc, Instituto de Química/UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

BILLIS, A., 1997, *Uropatologia da Próstata*. 1 ed, Goiania, Universidade Federal de Goiânia.

BILLIS, A., 2008, *Patologia Cirúrgica da Próstata*. 2. ed. Campinas, Impressão Digital do Brasil.

BOHIC, S., SIMIONOVICI, A., ORTEGA, R., *et al.*, 2001, “Synchrotron-induced X-ray microfluorescence on single cells”, *Nuclear instruments & methods in physics research. Section B*, v. 181, pp. 728–733.

BOUMANS, P., KLOCKENKÄMPER, R., 1989, “Total reflection X-ray fluorescence spectrometry”, *Spectrochim. Acta Part B*, v. 44, pp. 433-549.

BRADLEY, D.A., FARQUHARSON, M.J., GUNDOGDU, O., *et al.*, 2010, “Applications of condensed matter understanding to medical tissues and disease progression: Elemental analysis and structural integrity of tissue scaffolds”, *Radiation Physics and Chemistry*, v. 79, pp. 162–175.

BUSH A, I., 2000, “Metals and neuroscience” *Current opinion in chemical biology*, v. 4, n. 2, pp. 184–191.

CAMPBELL A., SMITH M. A., SAYRE L. M., *et al.*, 2001, “Mechanisms by which metals promote events connected to neurodegenerative diseases”, *Brain research bulletin*, v. 55, n. 2, pp. 125– 132.

CANCER FACTS & FIGURES 2011, 2011, American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2011. Atlanta: American Cancer Society.

CANCER FACTS & FIGURES 2012, 2012, American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2012. Atlanta: American Cancer Society.

CANELLAS, C.G.L., CARVALHO, S.M.F., ANJOS, M.J., LOPES, R.T., 2012, “Determination of Cu/Zn and Fe in human serum of patients with sickle cell anemia using radiation synchrotron”, *Applied Radiation and Isotopes*, v. 70, pp. 1277–1280.

CARLSON, K.E., KATZENELLENBOGEN, J.A., 1990, “A comparative study of the selectivity and efficiency of target tissue uptake of five tritium-labeled androgens in the rat”, *Journal of Steroid Biochemistry*, v. 36, n. 6, pp. 549-561.

CARREL A., 1912, “On the permanent life of tissues outside the organism”, *The Journal of Experimental Medicine*, v. 15, pp. 516-528.

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

CHWIEJ, J., SZCZERBOWSKA-BORUCHOWSKA, M., LANKOSZ, M., *et al.*, 2005, “Preparation of tissue samples for X-ray fluorescence microscopy”, *Spectrochimica Acta Part B*, v. 60, pp. 1531 – 1537.

COSTELLO, L.C., FRANKLIN, R. B., 1998, “Novel role of zinc in the regulation of prostate citrate metabolism and its implications in prostate cancer”, *The Prostate*, v.35, n. 4, pp. 285-296.

COSTELLO, L.C., FRANKLIN, R.B., 2006, “The clinical relevance of the metabolism of prostate cancer; zinc and tumor suppression: connecting the dots” *Molecular Cancer*, 5:17 doi:10.1186/1476-4598-5-17.

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

COSTELLO, L.C., FRANKLIN, R.B., FENG, P., *et al.*, 2005, “Zinc and prostate cancer: a critical scientific, medical, and public interest issue (United States)”. *Cancer Causes Control*, v. 16, pp. 901–915.

COTTE, M., CHECROUN, E., MAZEL, V., *et al.*, “Combination Of Ftir and X-Rays Synchrotron-Based Micro-Imaging Techniques for the Study of Ancient Paintings. A Practical Point of View”. *8th international conference of the Infrared and Raman Users' Group*, 1-9, Vienna, Austria, 26-29 March 2008.

CUKIERMAN, E., PANKOV, R., STEVENS, D. R., YAMADA, K. M., 2001, “Taking cell-matrix adhesions to the third dimension”, *Science*, v. 294, p. 1708-1712.

DAVIES, C. D., MULLER, H., HAGEN, I., GARSETH, M., HJELSTUEN, M. H., 1997, "Comparison of extracellular matrix in human osteosarcomas and melanomas grow-Prostate Tumor Spheroids 85 ing as xenografts, multicellular spheroids, and monolayer cultures", *Anticancer Research*, v. 17, pp. 4317–4326.

DE MARZO, A.M., MARCHI, V.L., EPSTEIN, J.I., *et al.*, 1999, "Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis", *The American journal of pathology*, v. 155, n. 6, pp. 1985-1992.

DESLYPERE, J.P., YOUNG, M., WILSON, J.D., *et al.* 1992, "Testosterone and 5 alpha-dihydrotestosterone interact differently with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene", *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 88, pp. 15-22.

DÍAZ, J, STIEFKEN, P, JIMÉNEZ, M, *et al.*, 2000, "Análisis de concordancia de clasificación de Gleason en biopsias transrectal de próstata", *Urologia colombiana*, v. 9, pp. 39-45.

DILLON, C.T., KENNEDY, B.J., LAY, P.A., *et al.*, 2003, "Implementation of X-ray microscopy and micro-XANES analysis for investigations of the cellular uptake and cellular metabolism of transition metals", *Journal de Physique IV*, v. 104, pp. 293–296.

DUNSMUIR, WD, HROUDA, D, KIRBY, R.S., 1998, "Malignant changes in the prostate with ageing", *British Journal of Urology*, v. 82, pp. 47–58.

EBRAHIM, A.M., ELTAYEB, M.A., SHAAT, M.K., *et al.*, 2007, "Study of selected trace elements in cancerous and non-cancerous human breast tissues from Sudanese subjects using instrumental neutron activation analysis", *Science of the Total Environment*, v. 383, pp. 52–58.

EKINCI, N., INGEÇ, M., 2008. "The analysis of leiomyomata uteri and uterus using energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry", *Applied Radiation and Isotopes*, v. 66, pp. 1117–1122.

EKINCI, N., S- AHIN, Y., 2002. "Determination of calcium and iodine in gall bladder stone using energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry", *Spectrochimica Acta Part B*, v. 57, pp.167–171.

EKINCI, R., EKINCI, N., 2004, "An alternative method for the determination of element concentrations in schizophrenic, lung cancer and leukaemia patient bloods", *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, v. 86, pp. 379–385.

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

ELLIOTT, N. T.; YUAN, F., 2011, "A review of three-dimensional in vitro tissue models for drug discovery and transport studies", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 100, n. 1, pp. 59-74.

EPSTEIN, J.I., CARMICHAEL, M.J., PARTIN, A.W., 1994, "Small high grade adenocarcinomas of the prostate in radical prostatectomy specimens performed for non-palpable disease: pathogenic and clinical implications", *The Journal of Urology*, v.151, p.1587–1592.

EPSTEIN, J.I., PIZOV, G., WALSH, P.C., 1993, "Correlation of pathologic findings with progression following radical retropubic prostatectomy", *Cancer, Philadelphia*, v.71, p.3582–3593.

FAIR, W.R., CORDONNIER, J.J., 1978, "The pH of prostatic fluid: reappraisal and therapeutic implications". *The Journal of Urology*, v. 120, n. 6, pp. 695-698.

FARQUHARSON, M.J, GERAKI, K., FALKENBERG, G., *et al.*, 2007, "The localisation and micro-mapping of copper and other trace elements in breast tumours

using a synchrotron micro-XRF system”, *Applied Radiation and Isotopes*, v. 65, pp. 183–188.

FENG, L. X., XIAO, H.Q., HE, X., *et al.*, 2005, “Spatial Distribution of Elements in the Brain of Rats Measured by Synchrotron Radiation X-Ray Fluorescence”, *High energy physics and nuclear physics*, v. 29, n. 10, pp. 1012-1016.

FLINN J. M., HUNTER D., LINKOUS D. H., *et al.*, 2005, “Enhanced zinc consumption causes memory deficits and increased brain levels of zinc”, *Physiology & Behavior*, v. 83, pp. 793–803.

FOSTER, C.S., 2000, “Pathology of benign prostatic hyperplasia”, *The Prostate. Supplement*, v. 9, pp. 4–14.

FRANKLIN, R.B., COSTELLO, L.C., 2007, “Zinc as an anti-tumor agent in prostate cancer and in other cancers”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, n. 463, pp. 211–217.

FRANKLIN, R.B., MILON, B., FENG, P., *et al.*, 2005, “Zinc and zinc transporter in normal prostate function and the pathogenesis of prostate cancer”, *Frontiers in Bioscience*, v. 10, pp. 2230-2239.

FRESHNEY, R. I. 2005, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 5. ed. New York, Wiley.

FRIEDRICH, J., EBNER, R., KUNZ-SCHUGHART, L.A., 2007, “Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids-old hat or new challenge”, *International journal of radiation biology*, v. 83, pp. 849–871.

GERAKI, K., FARQUHARSON, M.J., 2001, “An X-ray fluorescence system for measuring trace element concentrations in breast tissue”, *Radiation Physics and Chemistry*, v. 61, pp. 603–605.

GERAKI, K., FARQUHARSON, M.J., BRADLEY, D.A., 2002, “Concentrations of Fe, Cu and Zn in breast tissue: a synchrotron XRF study”, *Physics In Medicine and Biology*, v. 47, pp. 2327–2339.

GERAKI, K., FARQUHARSON, M.J., BRADLEY, D.A., *et al.*, 2004, “X-ray fluorescence and energy dispersive X-ray diffraction for the quantification of elemental concentrations in breast tissue”, *Physics In Medicine and Biology*, v. 49, pp. 99–110.

GLAESSGEN, A., 2008. *Markers of differentiation and prognosis in prostate cancer – A morphological and immunohistochemical study*. Tese de D.Sc., Department of oncology and pathology, Karolinska Institutet, Sweden, Stockholm.

GLEASON, D.F., 1966, “Classification of prostatic carcinomas”, *Cancer chemotherapy reports*, v. 50, pp. 125-128.

GUERRA, C.S., GERLACH, R.F., PINTO, N.G.V., *et al.*, 2010, “X-ray fluorescence with synchrotron radiation to elemental analysis of lead and calcium content of primary teeth”, *Applied Radiation and Isotopes*, v. 68, pp. 71–75.

HARRISON, R.G., 1907, “Observations on living developing nerve fibers”, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v.4, pp. 140-143.

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

HOFFMAN, R. M., 1994, “Three-dimensional sponge-gel matrix histoculture: methods and applications”, *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, pp. 367-379.

HOROWITZ, P., HOWELL, J.A., 1972, “A Scanning X-Ray Microscope Using Synchrotron Radiation”, *Science*, v. 178, pp. 608-611.

HUANG, R.B., FENG, P., MILON, B., 2005, “hZIP1 zinc uptake transporter down regulation and zinc depletion in prostate cancer”, *Molecular Cancer*, 4:32 doi:10.1186/1476-4598-4-32.

IDE-EKTESSABI, A., KAWAKAMI, T., WATT, F., 2004, "Distribution and chemical state analysis of iron in the Parkinsonian substantia nigra using synchrotron radiation micro beams", *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, v. 213, pp. 590–594.

INCA 2009, Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer, Coordenação de Educação, Rio de Janeiro. Disponível on line em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/estimativa20091201.pdf>. Acesso em: 05 out. 2011.

INCA 2011, Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas Coordenação de Educação, Rio de Janeiro. Disponível on line em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2012.

INCH, W. *et al.*, 1970, "Growth of nodular carcinomas in rodents compared with multi-cell spheroids in tissue culture", *Growth*, v. 34, p. 271-282.

INGRAM, M., TECHY, G.B., SAROUFEEM, R., *et al.*, 1997, "Three-dimensional growth patterns of various human tumor cell lines in simulated microgravity of a NASA bioreactor", *In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal*, v. 33, n. 6, pp. 459–466.

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

JEMAL, A., TIWARI, R.C., MURRAY, T., *et al.*, 2004, "Cancer statistics, 2004", *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 54, n. 1, pp. 8-29.

KASTYAK, M. Z., SZCZERBOWSKA-BORUCHOWSKA, M., ADAMEK, D., *et al.*, 2010, "Pigmented Creatine deposits in Amyotrophic Lateral Sclerosis Central Nervous System Tissues identified by Synchrotron Fourier Transform Infrared Microspectroscopy and X-Ray Fluorescence Spectromicroscopy", *Neuroscience*, vol. 166, pp. 1119–1128.

KAUR, D., ANDERSEN, J., 2004, "Does cellular iron dysregulation play a causative role in Parkinson's disease?", *Ageing research reviews*, v. 3, n. 3, pp. 327–343.

KELLEHER, S.L., MCCORMICK, N.H., VELASQUEZ V., 2011, "Zinc in Specialized Secretory Tissues: Roles in the Pancreas, Prostate, and Mammary Gland", *American Society for Nutrition Advances in Nutrition*, v. 2, pp. 101–111.

KELM, J. M., TIMMINS, N. E., BROWN, C. J., FUSSENEGGER, M., NIELSEN, L. K., 2003, "Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 83, pp. 173-180.

KEMNER, K.M., KELLY, S.D., LAI, B., *et al.*, 2004, "Elemental and redox analysis of single bacterial cells by X-ray microbeam analysis", *Science*, v. 306, pp. 686–687.

KIRCHHOFF, P., GEIBEL, J.P., 2006, "Role of calcium and other trace elements in the gastrointestinal physiology", *World Journal of Gastroenterology*, v. 12, n. 20, pp. 3229-3236.

KOLMOGOROV, Y., KOVALEVA, V., GONCHOR, A., 2000, "Analysis of trace elements in scalp hair of healthy people, hyperplasia and breast cancer patients with XRF", *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A*, v. 448, pp. 457–460.

- KONEMANN, S, BOLLING, T, MATZKIES, F, *et al.*, 2005, “Iron and iron-related parameters in oncology”, *Trace Elem. Electrolytes*, v. 22, n. 2, pp. 142–149.
- KUBALA KUKUS, A., BRAZIEWICZ, J., BANAS, D., *et al.*, 1999. “Trace element load in cancer and normal lung tissue”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B*, v. 150, pp. 193–199.
- KUBALA-KUKUS, A., BANAS, D., BRAZIEWICZ, J., 2007, “Analysis of elemental concentration censored distributions in breast malignant and breast benign neoplasm tissues”, *Spectrochim. Acta Part B*, v. 62, pp. 695–701.
- KWIATEK, W.M., HANSON, A.L., PALUSZKIEWICZ, C., *et al.*, 2004, “Application of SRIXE and XANES to the determination of the oxidation state of iron in prostate tissue sections”, *Journal of Alloys and Compounds*, v. 362, pp. 83–87.
- KWIATEK, W.M., PODGÓRCZYK, M., PALUSZKIEWICZ, C.Z., *et al.*, 2008, “Sulphur XANES Analysis of Cultured Human Prostate Cancer Cells”, *Acta Physica Polonica A*, v. 114, n. 2, pp. 463-470.
- LEE, C., BUSHMAN, W., 1995, “Prostatic duct biology”, *Prospectives*, v. 3, n. 1, pp. 1-4.
- LEIGHTON, J., 1954, “The growth patterns of some transplantable animal tumors in sponge matrix tissue culture”, *Journal of the National Cancer Institute*, v. 15, pp. 275 – 293.
- LEITE K.R.M., SROUGI M., KAUFFMANN J.R., *et al.*, 2005, “O padrão 4 de Gleason e o volume tumoral no prognóstico do carcinoma da prostate”, *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 51, pp. 329-333.
- LEWIS, R., 1997, “Medical Applications of Synchrotron radiation X-Rays”, *Physics in Medicine and Biology*, v. 42, pp. 1213-1243.
- LIMA, I., ANJOS, M. J., FARIAS, M. L. F., PANTALEÃO, T. U., COSTA, V. M. C., LOPES, R.T., 2008, “Evaluation of osteoporotic bone structure through synchrotron radiation X-ray microfluorescence images”, *European Journal of Radiology*, vol. 68S, pp. S95-S99.
- LIMA, I., ANJOS, M. J., FARIAS, PARCEGONI, N., ROSENTHAL, D., DUARTE, M.E.L., LOPES, R.T., 2008, “Bone diagnosis by X-ray techniques”, *European Journal of Radiology*, vol. 68S, pp. S100–S103.
- LIMA, I., ANJOS, M.J., FLEIUSS, M.L.F., *et al.*, 2008, “Characterization of osteoporotic bone structures by bidimensional images through x-ray microfluorescence with synchrotron radiation”, *X-Ray spectrometry*, v. 37, pp. 249–254.
- LIMA, I., FLEIUSS, M.L.F., PERCEGONI, N., *et al.*, 2010, “Micro imaging analysis for osteoporosis assessment”, *Spectrochimica Acta Part B*, v. 65, pp. 253–257.
- LIN, R.Z., CHANG, H.Y., 2008, “Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research”, *Journal of Biotechnology*, v. 3, pp. 1172–1184.
- LNLS, 2013, disponível on line em: www.lnls.br, Acesso em: 20 jan. 2013
- MAGALHÃES, T., CARVALHO, M.L., VON BOHLEN, A., *et al.*, 2010, “Study on trace elements behaviour in cancerous and healthy tissues of colon, breast and stomach: Total reflection X-ray fluorescence applications”, *Spectrochimica Acta Part B*, v. 65, pp. 493–498.
- MAJEWSKA, U., BANAS, D, BRAZIEWICZ, J., *et al.*, 2007, “Trace element concentration distributions in breast, lung and colon tissues”, *Physics in medicine and biology*, v52, pp. 3895–3911.
- MAJEWSKA, U., BRAZIEWICZ, J., BANAS, D., *et al.*, 1997, “An elemental correlation study in cancerous breast tissue by total reflection X-ray fluorescence”, *Biological Trace Element Research*, v. 60, pp. 91–100.

MAJEWSKA, U., BRAZIEWICZ, J., BANAS, D., *et al.*, 1999, “Some aspects of statistical distribution of trace element concentrations in biomedical samples”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B*, v. 150, pp. 254–259.

MANICA, J., 2006, *Estrutura eletrônica dos rutenatos 2D e 3D: Sr₂RuO₄ e SrRuO₃*. M.Sc., Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

MARGARITONDO, G., 1995, “A Primer in Synchrotron Radiation: everything you wanted to know about SEX (Synchrotron Emission of X-Rays) but were afraid to ask”, *Journal of Synchrotron Radiation*, v.2, pp. 148-154.

MARTIN, F., LINDEN, T., KATSCHINSKI, D.M., 2005. “Copper-dependent activation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1: implications for ceruloplasmin regulation”, *Blood*, v. 105, n. 12, pp. 4613–4619.

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

MCCORD, J., EDEAS, M.A., 2005, “SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision”, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 59, n. 4, pp. 139–142.

MCCULLOUGH, D.L., *Diagnosis and staging of prostate cancer*. In: Skinner, D.G.; Lieskovsky, G. (Ed.). *Diagnosis and management of genitourinary cancer*. Philadelphia: WB Saunders, cap. 23, p. 405-416, 1988.

MCLEAN, M., SRIGLEY, J., BANERJEE, D., *et al.*, 1997, “Interobserver variation in prostate cancer Gleason scoring: Are there implications for the design of clinical trials and treatment strategies”, *Clinical oncology*, v. 9, pp. 222-225.

MCNEAL, J.E., 1972, “The prostate and prostatic urethra: a morphologic synthesis”, *The Journal of Urology*, v. 107, n. 6, pp. 1008-1016.

MCNEAL, J.E., 1990, “Pathology of benign prostatic hyperplasia. Insight into etiology”, *Urologic Clinics of North America*, v. 17, pp. 477-486.

MCNEAL, J.E., 1988. “Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma”, *The American journal of surgical pathology*, v.12, pp.897.

MELLINGER, G.T., 1977, “Prognosis of prostatic carcinoma”, *Recent results in cancer research*, v. 60, pp. 61-72.

MILACIC, V., CHEN, D., GIOVAGNINI, L., *et al.*, 2008, “Pyrrolidine dithiocarbamate-zinc(II) and -copper(II) complexes induce apoptosis in tumor cells by inhibiting the proteasomal activity”, *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 231, pp. 24–33.

MILLOS, J., COSTAS-RODRIGUEZ, M., LAVILLA, I., *et al.*, 2008, “Multielemental determination in breast cancerous and non-cancerous biopsies by inductively coupled plasma-mass spectrometry following small volume microwave-assisted digestion”, *Analytica Chimica Acta*, v. 622, pp. 77–84.

MOCCHIGIANI, E., COSTARELLI, L., GIACCONI, R., *et al.*, 2006, “Nutrient-gene interaction in ageing and successful ageing: A single nutrient (zinc) and some target genes related to inflammatory/immune response”, *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 127, pp. 517-525.

MOLINARO E.M., CAPUTO L.F.G., AMENDOEIRA M. R. R., 2010 *Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 2 / - Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010.*

NCI, 2011. *National Cancer Institute*, 2011. Disponível on line em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/prostate>. Acesso em: 02/09/2011.

NEAL, D. E., CLEJAN, S. JR., CLEJAN, S., *et al.*, 1992, “Prostate specific antigen and prostatitis I. Effect of prostatitis on serum PSA in the human and nonhuman primate”, *The Prostate*, v. 20, n. 2, pp. 105-111.

NEDERMAN, T., NORLING, B., GLIMELIUS, B., CARLSSON, J., BRUNK, U., 1984, “Demonstration of an extracellular matrix in multicellular tumor spheroids”, *Cancer Research*, v. 44, pp. 3090–3097.

NG, K.H., BRADLEY, D.A., LOOI, L.M., 1997, “Elevated trace element concentrations in malignant breast tissues”, *British Journal of Radiology*, v 70, pp. 375–382.

NICKEL, J.C, 1999, *Textbook of prostatitis*, Oxford, UK, ISIS Medical Media Ltd.

NOGUEIRA L. P., 2011, *Microtomografia computadorizada e microfluorescência de raios x por luz síncrotron para avaliação dos efeitos da radiação em microestruturas ósseas de ratos*, Tese* de D.Sc, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

OGAWA, E., BAKER, M.L., AGAR, N.S., 1999, “The effect of potassium concentration on glycolysis and pyruvate kinase in high potassium and low potassium possum erythrocytes”, *Comparative Hematology International*, v.9, n. 3, pp. 139–141.

OLIVEIRA, O.L.M., 2005, *Avaliação da atividade da enzima Esateróide 5 α -Reductase tipo 2 em biópsias de próstata*. Tese* de D.Sc., Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, RS, Brasil.

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

PAN, C.C., POTTER, S.R., PARTIN, A.W., *et al.*, 2000, “The prognostic significance of tertiary Gleason patterns of higher grade in radical prostatectomy specimens: a proposal to modify the Gleason grading system”, *The American journal of surgical pathology*, v. 24, n. 4, pp. 563-569.

PARKIN, D.M., BRAY, F., FERLAY, J., *et al.*, 2005 “Global cancer statistics, 2002”, *CA: a cancer journal for clinicians*, v.55, p.74.

PAUNESKU, T., RAJH, T., WIEDERRECHT, G., *et al.*, 2003, “Biology of TiO₂-oligonucleotide nanocomposites”, *Nature Materials*, v. 2, pp. 343–346.

PEREIRA, G.R., ANJOS, M.J., ROCHA, H.S., FARIA, P., PÉREZ, C.A., LOPES, R.T, 2007, “Computed tomography and X-ray fluorescence CT of biological samples”, *Instruments and Methods in Physics Research A*, v. 580, pp. 951–954.

PEREIRA, G.R., LOPES, R.T., ANJOS, M.J., ROCHA, H.S., PÉREZ, C.A., 2007, “X-ray fluorescence microtomography analyzing reference samples”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, v. 579, pp. 322-325.

PEREIRA, G.R., ROCHA, H.S., ANJOS, M.J., FARIA, P., PÉREZ, C.A., LOPES, R.T, 2007, “X-ray fluorescence and X-ray transmission microtomography imaging system”, *Instruments and Methods in Physics Research A*, v. 581, pp. 128–132.

PEREIRA, G.R., ROCHA, H.S., ANJOS, M.J., LIMA, I., LOPES, 2012, “Elemental distribution images in prostate samples by X-ray Fluorescence microtomography”, *Applied Radiation and Isotopes*, v. 70, pp. 1379–1383.

PEREIRA, G.R., ROCHA, H.S., CALZA C., ANJOS, M.J., PÉREZ, C.A., LOPES, 2008, “Elemental distribution mapping on breast tissue samples”, *European Journal of Radiology*, v. 68S, pp. S104–S108.

PEREIRA, G.R., ROCHA, H.S., CALZA C., ANJOS, M.J., PÉREZ, C.A., LOPES, 2009, “Imaging System for XRF Microtomography at LNLS-Brazil”, *IEEE Transactions on Nuclear Science*, v. 56, pp. 1426-1429.

PEREIRA, G.R., ROCHA, H.S., CALZA C., ANJOS, M.J., PÉREZ, C.A., LOPES, 2009, “X-Ray fluorescence microtomography under various excitation conditions”, *X-Ray Spectrometry*, v. 38, pp. 244–249.

PEREIRA, G.R., ROCHA, H.S., CALZA C., ANJOS, M.J., PÉREZ, C.A., LOPES, 2010, “Biological tissues analysis by XRF microtomography”, *Applied Radiation and Isotopes*, v. 68, pp. 704–708.

PEREIRA, G.R., ROCHA, H.S., CALZA C., *et al.*, 2011, “3D elemental distribution images by XRF μ CT at LNLs—Brazil”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, v. 652, pp. 684–686.

PERES, C. M.; CURI, R., 2005, *Como cultivar células*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

POLETTI, M.E., GONCALVES, O.D., PEREZ, C.A., *et al.*, 2004, “A preliminary study of the distribution of trace elements in healthy and neoplastic breast tissues with synchrotron radiation X-ray fluorescence”, *Radiation Physics and Chemistry*, v. 71, pp. 975–976.

PRINS, M., 1984, “Trace elements analysis and element mapping by scanning X-Ray fluorescence at Daresbury SRS”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, v. 222, pp 324-328.

RAJU, G.J.N., SARITA, P., KUMAR, M.R., *et al.*, 2006, “Trace elemental correlation study in malignant and normal breast tissue by PIXE technique”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B*, v. 247, pp. 361–367.

RIOUX-LECLERCQ, N.C., CHAN, D.Y., EPSTEIN, J.I., 2002, “Prediction of outcome after radical prostatectomy in men with organ-confined Gleason score 8 to 10 adenocarcinoma”, *Urology*, v. 60, pp. 666-669.

ROCHA, H. S., 2007, *Desenvolvimento de sistemas Radiográfico e Tomográfico com Técnicas de Contraste de Fase e Realce por Difração de Raios X*. Tese* de D.Sc, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

ROCHA, H.S., PEREIRA, G.R., ANJOS, M.J., 2007, “Diffraction enhanced imaging and x-ray fluorescence microtomography for analyzing biological samples”, *X Ray Spectrometry*, v. 36, pp. 247-253.

SALES, E., LIMA, I., ASSIS, J.T. DE., GÓMEZ, W., PEREIRA W.C.A., LOPES R. T., 2012, “Bone quality analysis using X-ray microtomography and microfluorescence”, *Applied Radiation and Isotopes*, v. 70, pp. 1272–1276.

SALIDO, M., VILCHES, J., LOPEZ, A., *et al.*, 2001, “X-Ray microanalysis of etoposide-induced apoptosis in the PC-3 prostatic cancer cell line”, *Cell Biology International*, v. 25, n. 6, pp. 499–508.

SALVAJOLI, J.V., SOUHAMI, L., FARIA, S.L., 1999, *Radioterapia em Oncologia*. 1ed. SãoPaulo, Médica e Científica Ltda.

SANDA, M.G., BEATY, T.H., STUTZMAN, R.E., *et al.*, 1994, “Genetic susceptibility of benign prostatic hyperplasia”, *The Journal of Urology*, v. 152, pp. 115-119.

SENSI, S.L, TON-THAT, D., SULLIVAN, P.G., *et al.* 2003, “Modulation of mitochondrial function by endogenous Zn²⁺ pools”, *National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, pp. 6157–6162.

SERPA, R.F.B., 2007, *Análise de Tecidos Cerebrais Através da Microfluorescência de Raios X e Fluorescência de Raios X por Reflexão Total*. Tese* de D.Sc, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

SERPA, R.F.B., de JESUS, E.F.O., ANJOS, M.J., *et al.*, 2008, “Topographic Trace-Elemental Analysis in the Brain of Wistar Rats by X-ray Microfluorescence with Synchrotron Radiation”, *Analytical Sciences*, v. 24, pp. 839-842.

SGOUROS, G., YANG, W., ENMON, R., “Spheroids of prostate tumor cell lines”, In: Russel P.J., Jackson P., Kingsley E.A., *Prostate Cancer Methods and Protocols*, chapter 6, Totowa, NJ, USA, Humana Press, 2003.

- SHAND, R.L., GELMANN, E.P., 2006, "Molecular biology of prostate-cancer pathogenesis", *Current opinion in urology*, v. 3, pp.123-131.
- SHILSTEIN, S.SH., CORTESI, M., BRESKIN, A., *et al.*, 2006, "Prostatic Zn determination for prostate cancer diagnosis", *Talanta*, v. 70, n. 5, pp. 914–921.
- SIDDIQUI, M.K., JYOTI, J., SINGH, S., *et al.*, 2006, "Comparison of some trace elements concentration in blood, tumor free breast and tumor tissues of women with benign and malignant breast lesions: an Indian study", *Environment International*, v. 32, pp. 630–637.
- SILVA, M.P., TOMAL, A., PÉREZ, C.A., *et al.*, 2008, "Determination of Ca, Fe, Cu and Zn and their correlations in breast cancer and normal adjacent tissues", *X-ray Spectrometry*, v. 38, pp. 103–111.
- SILVA, M.P., ZUCCHI, O.L.A.D, SILVA, A.R., *et al.*, 2009, "Discriminant analysis of trace elements in normal, benign and malignant breast tissues measured by total reflection X-ray fluorescence", *Spectrochimica Acta Part B*, v. 64, pp. 587–592.
- SLIWINSKI, T., CZECHOWSKA, A., KOŁODZIEJCZAK, M., *et al.*, 2009, "Zinc salts differentially modulate DNA damage in normal and cancer cells", *Cell Biology International*, v. 33, pp. 542-547.
- SOGANI, P.C., ISRAEL, A., LIEBERMAN, P.H., *et al.*, 1985, "Gleason grading of prostate cancer: A predictor of survival", *Urology*, v. 25, n. 3, pp. :223-227.
- SOLÉ, V.A., PAPILLON, E., COTTE, M., *et al.*, 2007, "A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra", *Spectrochimica Acta Part B*, v. 62, pp. 63–68.
- SONG, Y., ELIAS, V., LOBAN, A., *et al.*, 2010, "Marginal zinc deficiency increases oxidative DNA damage in the prostate after chronic exercise", *Free Radical Biology & Medicine*, v. 48, pp. 82–88.
- SROUGI M., CURY J., 1998, *Hiperplasia benigna da prostate*. In: Schor N., Srougi M., *Nefrologia urologia clínica*, capítulo 6, São Paulo, Sarvier.
- STAMEY, T, A.; MCNEAL, J.E.; YEMOTO, C.M., 1999, "Biological determinants of cancer progression in men with prostate cancer", *The journal of the American Medical Association*, v.281, pp. 1395–1400.
- STEFANIDOU, M., MARAVELIAS, C., DONA, A., 2006, 'Zinc: a multipurpose trace element', *Archives of toxicology*, v. 80, pp. 1–9.
- STRELI, C., WOBRAUSCHEK, P., BAUER, V., *et al.*, 1997, "Total reflection X-ray fluorescence analysis of light elements with synchrotron radiation an special X-ray tubes", *Spectrochimica Acta Parte B*, v. 52, pp. 861-872.
- SUGIMOTO, T., IDE-EKTESSABI, A., ISHIHARA R., *et al.*, 2004, "An investigation of changes in element distribution and chemical states during differentiation of embryonic stem cells", *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, v. 137, pp. 831–838.
- SUTHERLAND, R. M., MCCREDIE, J. A., INCH, W. R., 1971, "Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas", *Journal of the National Cancer Institute*, v. 46, p. 113-120.
- SZCZERBOWSKA-BORUCHOWSKA, M., LANKOSZ, M., OSTACHOWICZ, J., *et al.*, 2004, "Topographic and quantitative microanalysis of human central nervous system tissue using synchrotron radiation", *X-Ray Spectrometry*, v. 33, pp. 3–11.
- TAKEDA, A., HIRATE, M., TAMANO, H., OKU, N., 2003, "Zinc movement in the brain under kainate-induced seizures", *Epilepsy research*, v. 54, pp. 123– 129.
- THI HONG, N., HA, VINH, 1996. "Application of EDXRF to the determination of lead and other trace elements in the body fluids of industrial workers in Vietnam", *X-Ray Spectrometry*, v. 25, pp. 3–14.

THOMLINSON, W., 2002, "Applications of Synchrotron Radiation in the Medical Sciences", *Medical Physics*, v. 29, pp. 1298-1298.

TOMIK, B., CHWIEJ, J., SZCZERBOWSKA-BORUCHOWSKA, M., *et al.*, 2006, "Implementation of X-ray Fluorescence Microscopy for Investigation of Elemental Abnormalities in Amyotrophic Lateral Sclerosis", *Neurochemical research*, v. 31, pp. 321-331.

TORRES, J. M., RUIZ, E., ORTEGA, E., 2003, "Development of a quantitative RT-PCR method to study 5 alpha-reductase mRNA isozymes in rat prostate in different androgen status", *Prostate*, v. 58, pp. 74-79.

TWINING, B.S., BAINES, S.B., FISHER, N.S., *et al.*, 2003, "Quantifying trace elements in individual aquatic protist cells with a synchrotron X-ray Fluorescence microprobe", *Analytical Chemistry*, 75, 3806-3816.

VALLEE, BL, FALCHUK, KH., 1993, The biochemical basis of zinc physiology, *Physiological Reviews*, v. 73, pp. 79-118.

VAN LEENDERS, G. J., AALDERS, T. W., HULSBERGEN-VAN DE KAA, C.A., RUITER, D. J. SCHALKEN, J. A., 2001, "Expression of basal cell keratins in human prostate cancer metastases and cell lines", *Journal of Pathology*, v. 195, pp. 563-570.

VARTSKY D., SHILSTEIN S., BERCOVICH A., *et al.*, 2003, "Prostatic Zinc and Prostate Specific Antigen: an Experimental Evaluation of Their Combined Diagnostic Value", *The Journal of Urology*, v. 170, pp. 2258-2262.

WALSH, P.C, RETIK, A., VAUGHAN, E.D., *et al.*, 2002, *Campbell's Urology*. 8 ed., Philadelphia, WB Saunders.

WALSH, P.C., 1992, *Benign prostatic hyperplasia*. In: Walsh PC, Retik AB, Stamey TA, Vaughan ED, *Campbell's urology*. 6 ed., v. 2, pp. 1007-1027, Philadelphia, Saunders.

WALSH, P.C., WORTHINGTON, J.F., 1998, *Doenças da próstata: um guia para os homens e para as mulheres que os amam*. São Paulo, Martins Fontes.

WATT, K. W., LEE, P.J., TINKULU, T.M., *et al.*, 1986, "Human prostatic specific antigen: Structural and functional similarities with serum proteases", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 83, pp. 3166-3170.

WEIDNER, W., JANTOS, C., SCHIEFER, H.G., *et al.*, 1991, "Semen parameters in men with and without proven chronic prostatitis", *Archives of andrology*, v. 26, n. 3, pp. 173-183.

WU, B., BECKER, J.S., 2011, "Imaging of elements and molecules in biological tissues and cells in the low-micrometer and nanometer range", *International Journal of Mass Spectrometry*, v. 307, pp. 112-122.

YAN, M., HARDIN, K. HO, E., 2010, "Differential response to zinc-induced apoptosis in benign prostate hyperplasia and prostate cancer cells", *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 21, pp. 687-694.

YIN, J., POLLOCK, C., TRACY, K., CHOCK, M., MARTIN, P., OBERST, M., KELLY, K., 2007, "Activation of the RalGEF/Ral Pathway Promotes Prostate Cancer Metastasis to Bone", *Molecular and Cellular Biology*, v. 27, pp. 7538-7550.

ZAICHICK, V., 2004, "INAA and EDXRF applications in the age dynamics assessment of Zn content and distribution in the normal human prostate", *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 262, n. 1, pp. 229-234.

ZAICHICK, V.Y., SVIRIDOVA, T.V., ZAICHICK, S.V., *et al.*, 1996, "Zinc concentration in human prostatic fluid: normal, chronic prostatitis, adenoma and cancer", *International urology and nephrology*, v. 28, n. 5, pp. 687-694.

ZAICHICK, V.Ye., SVIRIDOVA, T.V., ZAICHICK, S.V., 1997, “Zinc in the Human Prostate Gland: Normal, Hyperplastic and Cancerous”, *International urology and nephrology*, v. 29, n. 5, pp. 565-574.

ZIMMER, D., KRUSE, J., BAUM, C., *et al.*, 2011, “Spatial distribution of arsenic and heavy metals in willow roots from a contaminated floodplain soil measured by X-ray fluorescence spectroscopy”, *Science of the Total Environment*, v. 409, pp. 4094–4100.

APÊNDICE

Trabalhos publicados em periódicos com os resultados obtidos no trabalho de Doutorado

Elemental Distribution of Prostate Samples by Synchrotron Radiation X-Ray Fluorescence Techniques

Roberta G. Leitão, Gabriela R. Pereira, Inaya Lima, Antônio Palumbo, Jr., Pedro A. V. R. Souza, Marcelino J. Anjos, Luis E. Nasciutti, and Ricardo T. Lopes

Abstract—Synchrotron X-ray imaging systems with fluorescence techniques were developed for biomedical research at the Brazilian Synchrotron Laboratory. Two different X-ray fluorescence systems were implemented to analyze human prostate samples with and without disorders.

Index Terms—Fluorescence, prostate, synchrotron, X-ray.

I. INTRODUCTION

MANY elements play an essential role in a number of biological processes as activators or inhibitors of cellular and enzymatic activity. The quantitative elemental analysis of pathologically changed tissues may shed some new light on processes leading to the degeneration of cells in case of selected diseases.

The knowledge of the spatial distribution of trace elements in tissues is involved in many biological functions of living organisms. These elements take part in all metabolic processes, and they are components of different enzymes, catalyzing chemical interactions in living cells. It is now recognized that there is an association between the levels of certain trace elements in human tissue and the presence of various diseases [1]–[3]. From these elements, zinc is a component of over 300 proteins and over 100 DNA-binding proteins with zinc fingers. Zinc is essential for proper maintenance of all cells. It is particularly important in the prostate which secretes high levels of citrate and proteins that contain zinc [4], [5].

Manuscript received May 30, 2012; revised August 13, 2012; accepted September 18, 2012. This work was supported in part by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), and in part by the Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).

R. G. Leitão, I. Lima, and R. T. Lopes are with the Nuclear Instrumentation Laboratory, Federal University of Rio de Janeiro, 21941-942 Rio de Janeiro, Brazil (e-mail: roberta@lin.ufrj.br).

G. R. Pereira is with the Non-destructive Testing, Corrosion and Welding Laboratory (LNDC), Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

A. Palumbo, Jr., P. A. V. R. Souza, and L. E. Nasciutti are with the Department of Histology and Embryology, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

M. J. Anjos is with the Physics Institute, Stated University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Color versions of one or more of the figures in this paper are available online at <http://ieeexplore.ieee.org>.

Digital Object Identifier 10.1109/TNS.2012.2222045

Benign prostate hyperplasia (BPH) is one prostate disease that primarily results in symptoms in the lower urinary tract and can significantly impair life quality [6]. The high concentration of zinc in the prostate with BPH suggests that zinc may play a role in prostate health.

The X-ray fluorescence analysis is a microanalysis technique with a large application in several fields of research and can supply important information about the chemical properties of a sample in order to characterize samples with and without disorders.

In this study, X-ray fluorescence (XRF) techniques are used to analyze prostate samples. The XRF Facility (D09B-XRF) at the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS), Campinas, Brazil was used in this study.

X-Ray Microfluorescence: Among X-ray microprobe methods based on synchrotron radiation, X-ray microfluorescence (μ XRF) can be pointed out. This technique has been successfully used in the academic area in several applications, such as material, archeological and biological sciences.

This analytical technique provides information about the chemical composition. When the X-ray impinges on the sample it interacts via the photoelectric effect with the surface of the material, which emits radiation that is characteristic of the atoms present in the sample. This radiation is called X-ray fluorescent radiation and it is specific for each material. The fluorescent X-rays emitted by the material are collected by a solid state detector and, when associated with a multichannel analyzer, produce a spectrum that contains the X-ray characteristic intensity (number of counts per second) of each chemical element and its energy. When X-ray fluorescence is associated with a synchrotron radiation (SR) source, many advantages can be achieved, such as high energy, tunability and polarization of X-rays.

X-Ray Fluorescence Microtomography: X-ray fluorescence microtomography (XRF μ CT) is based on the detection of photons from the fluorescent emission from the elements in a sample. These photons are acquired by an energy dispersive detector, placed 90° from the incident beam direction. A value in a projection is obtained measuring the fluorescence radiation emitted by all pixels throughout the beam. The sample is translated and another value is measured in the projection. These steps are repeated until the whole sample passes through the beam, completing the projection. The sample is rotated and another projection is measured. The projections are measured until the sample is rotated 180° [7].

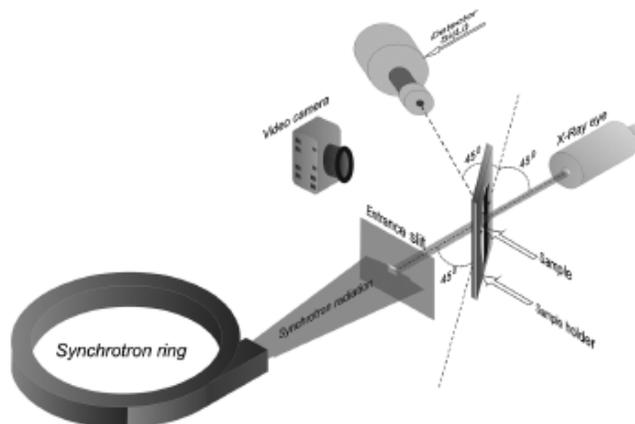


Fig. 1. The experimental arrangement for an X-ray microfluorescence measurements.

The data acquisition of the XRF μ CT results in a bi-dimensional raw data called sinogram. A sinogram consists of the line scans that were taken for every rotational angle. For each emission line of the fluorescence spectrum there is a separate sinogram. In general, a sinogram plots the property measured by the setup over the direction perpendicular to the beam and the angle of rotation. The tomogram, which is a two dimensional slice across the sample, can be reconstructed from the sinogram by an appropriate algorithm.

Those two techniques work together as a complement to each other. Together may elucidate some questions of the relationship between element distribution and diseases of the prostate.

II. EXPERIMENTAL CONDITIONS

This paper presents the development of two different systems to study biological samples at the XRF Facility (D09B-XRF) at LNLS, Campinas, Brazil.

A. μ XRF SR Mapping

This study was conducted following approval of the Internal Review Board at the Clementino Fraga Filho Teaching Hospital at the Federal University of Rio de Janeiro, Brazil. The prostate samples were collected from samples of individuals from the age of 30 that died from unexpected death. The samples were divided into two zones: transitional (TZ) and peripheral (PZ). Each zone was divided into two sides: left and right. After that, samples were frozen in liquid nitrogen and cut into thin slices about 500- μ m thick. These slices were deposited on Mylar film (6 μ m) and then dried in air at room temperature.

The measurements were performed at LNLS, which is installed in Campinas, Brazil. Currently, this facility has eleven beamlines. Among them there is the XRF beamline in which this experiment was carried out. The SR source for the XRF beamline is at the D09B bending-magnet of the LNLS storage ring. For these measurements this line was equipped with a Si(Li) detector with a resolution of 165 eV at 5.9 keV in air atmosphere. The experiment was performed in standard geometry

($45^\circ \times 45^\circ$), excited with a white beam and using orthogonal slits. Pixels of $300 \mu\text{m} \times 300 \mu\text{m}$ were obtained keeping a high flux of photons on the sample. A two-dimensional scanning was performed in order to study the tendency of elemental distribution variation. Data analysis was performed by QXAS software in order to correct the synchrotron background and fit elemental X-ray lines [8]. The two-dimensional maps were obtained after normalization of the intensities of characteristic X-ray lines to the value of the ionization chamber. The counting live time for each pixel was of 6 s/step and the step size was of 300 μm /step in both directions. A schematic of the experimental setup for an X-ray microfluorescence is shown in Fig. 1. The elemental mapping was obtained using PyMCA software developed at the ESRF synchrotron [9].

B. XRF μ CT

XRF μ CT were performed on human prostate tissues samples. The prostate samples were collected from 4 patients with Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) submitted to surgery at the Andaraí Hospital in Rio de Janeiro city—Brazil. The age-range of the patients was 40–85 years old. The component tissues were identified by the pathologist who made the samples available. The tissues were cut in cylindrical form with a thickness of 1.5 mm to 2.0 mm and a height of 4.0 mm to 5.0 mm and were frozen and dried before being analyzed.

A quasi-monochromatic beam produced by a multilayer monochromator at 12 keV, $\Delta E/E = 0.03$ collimated to a $200 \times 200 \mu\text{m}^2$ area with a set of slits was used for sample excitation. The crystal monochromator is made of W-C and it has 75 layer pairs [10].

The intensity of the incident beam was monitored with an ionization chamber placed in front of the beam, before the sample. A schematic of the experimental setup for an X-ray fluorescence microtomography using a monochromatic beam is shown in Fig. 2.

The sample was placed in a high precision goniometer with translation stages that allow rotating as well as translating the sample perpendicularly to the beam. The fluorescence photons

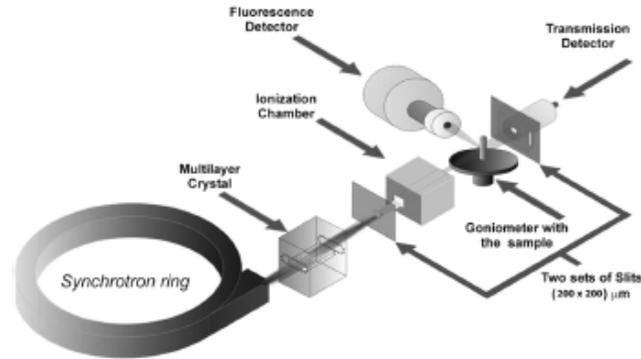


Fig. 2. The experimental arrangement for an X-ray fluorescence microtomography measurement using a quasi-monochromatic beam.

were collected with an energy dispersive HPGe detector (CANBERRA Industries inc.) placed 90° to the incident beam, while transmitted photons were detected with a fast NaI (TI) scintillation counter (CYBERSTAR-Oxford anfyisik) placed behind the sample in the beam's direction. The geometry of the detector allows reducing the elastic and Compton X-ray scattering from the sample due to the high linear polarization of the incoming beam in the plane of the storage ring, thus improving the signal to background ratio for the detection of trace elements [11].

The quality of the reconstruction is a compromise between the measuring time required for an acceptable counting statistic of the X-ray fluorescence peaks and the step size necessary to linearly move and rotate the samples. In one projection, samples were positioned in steps of $200\ \mu\text{m}$ (actual beam size) perpendicularly to the beam direction covering the whole transversal section of the sample.

Each single value in a projection is obtained by measuring the fluorescence radiation emitted by all pixels along the beam. The object is then rotated and another projection is measured. Projections were obtained in steps of 3° until the object had completed 180° . The selected measuring time was of 2 s for each scanned point.

The X-ray transmission and the X-ray fluorescence images were reconstructed using an in-house program developed using MATLAB applying filtered-back projection algorithm. The absorption corrected matrix was obtained using MKCORR, a program developed by Brunetti and Golosio [7]. The 3D images were reconstructed using the 3D-DOCTOR software.

III. RESULTS AND DISCUSSION

A. $\mu\text{XRF SR}$ Mapping

By using μXRF with synchrotron radiation technique it was possible to detect the following elements: P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn, Br and Rb. Fig. 3 shows a typical X-ray fluorescence spectrum of a sample of prostate tissue.

The concentration of zinc in the prostate is higher than that in any other soft tissue in the body [12]. Due to the importance of the participation of zinc in cellular processes of the prostatic tissue, we focused our study on the distribution of this element in

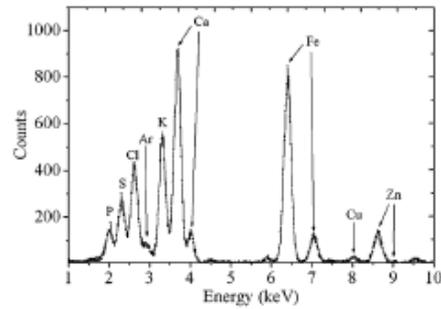


Fig. 3. The X-ray fluorescence spectra of a prostatic tissue sample.

distinct zones of the prostate. The distributions of Zn in a healthy sample of prostatic tissue are shown in Fig. 4. The relative fluorescence intensities were normalized using the maximum value found for each sample.

The prostate gland in a human male is divided into three zones: the peripheral zone (PZ) covers about 70% of the gland, whereas the central zone (CZ) is comprised of 25% and the transition zone (TZ) covers the remaining 5% of the gland. A major function of the PZ epithelium is to secrete an extraordinary amount of citrate and the same zone accumulates about 10-fold more zinc than the rest of the gland [4], [5], [13]. The zonal anatomy is important in prostate pathology. Studies carried out by McNeal [14] showed that most cancers develop in the peripheral zone (PZ) and benign hyperplasia mainly in the transition zone (TZ) of the prostate gland.

The highest levels of zinc are found in the mitochondria and prevent citrate oxidation by Krebs cycle. The decrease in citrate oxidation represents 65% of the adenosine triphosphate (ATP) efficiency [13], [15]. It is well known that the concentration of zinc decreases in prostate tissue with cancer when compared to normal prostatic tissue. In prostate cancer, the malignant cells undergo a metabolic transformation from citrate-producing to citrate oxidizing cells. This occurs because of the loss of the ability of the malignant cells to accumulate zinc. The absence of high mitochondrial zinc levels removes the inhibition of

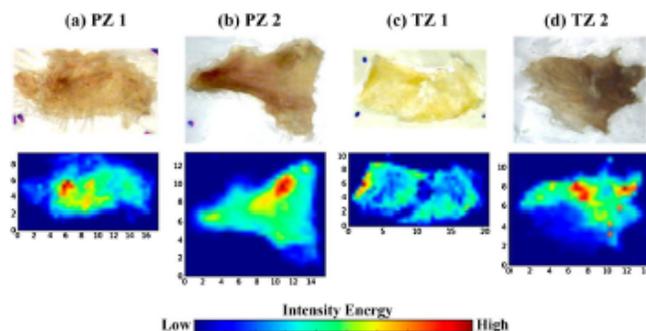


Fig. 4. (a) and (b) photo of prostate slice and image of zinc mapping of peripheral zone; (c) and (d) photo of prostate slice and image of zinc mapping of transition zone.

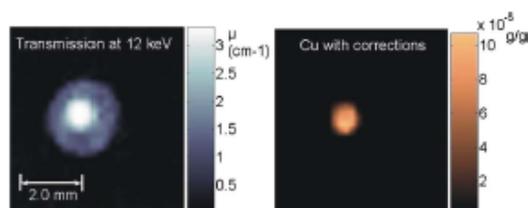


Fig. 5. Tomographic images using a quasi-monochromatic beam at 12 keV (left: X-ray transmission microtomography and right: XRF μ CT of Cu with absorption correction).

m-aconitase activity. Citrate is then oxidized and the typical complete oxidation of glucose restores the efficient ATP production. For a detailed description of the relationships of citrate metabolism and zinc in prostate see recent reviews [15], [16].

The analysis of X-ray fluorescence mapping in Fig. 4 shows that the zinc distribution was not uniform in different zones of the prostate. Fig. 4 showed that the zinc distribution is more intense in certain areas, which is in accordance with previous studies that found that zinc distribution in the prostate tissue is not uniform [13], [17]. These results can be due to the tissue being formed by different types of cells and molecules. The great dispersion of zinc concentration values already described in the literature is due the zinc distribution is not uniform [13], [17]–[19].

B. XRF μ CT

Four BPH samples from patients submitted to surgery were analyzed by XRF μ CT and the results are shown in Figs. 6 and 7.

Before that in Fig. 5, the result for a reference sample made of polyethylene is shown.

The image in Fig. 5 shows in the left side the X-ray transmission microtomography, and in the right side, the image shows the XRF μ CT of copper with absorption corrections. It can be observed analyzing the images that while the X-ray transmission tomography shows the polyethylene matrix and the internal

cylinder with copper solution, the XRF μ CT show only those regions where the elements of interest were localized, in this case copper. These tomographies show the viability of fluorescence microtomography and confirm that this technique can be used to complement others techniques for sample characterization. It is important to verify that the XRF μ CT shows the corrected concentration of copper about 100 μ g/g.

X-ray fluorescence microtomographies were performed in human prostate tissue samples. Three prostate samples with BPH for three different patients were analyzed.

The result for human prostate samples is shown in Fig. 6. Each line in Fig. 6 shows the X-ray transmission microtomography and the XRF microtomographies of Fe, Cu and Zn with absorption corrections for each prostate tissue.

The XRF microtomographies of human prostate tissue sample fragments show the elemental distribution of iron, copper and zinc. It is possible to observe that these tissues have a smaller concentration of copper and iron than zinc and the mean concentration of zinc in the BPH samples is of about 150 to 300 μ g/g.

Fig. 6(f) shows a flaw in the iron fluorescence distribution image. There is no iron in the entire sample.

Fig. 7 shows the 3D images of a prostate sample with BPH. It is not possible to reconstruct the 3D XRF μ CT of copper because the concentration of this element in that sample is very small, less than 3 μ g/g. Analysis of the prostate samples used led to the determination of the elemental distribution of iron, copper and zinc. It was verified that these tissues have a smaller concentration of copper and iron than zinc and the mean concentration of zinc in the BPH samples is of about 150 to 300 μ g/g.

Although trace elements such as Fe, Cu, and Zn are extremely common, an assessment of their amounts is crucial for disease diagnostics. Both excess and deficiency of trace elements have been associated with many diseases including cancer. Thus, further research including an analysis and quantification of element concentrations in more samples and an analysis and comparison of biological tissues (both normal and abnormal) by means of X-ray fluorescence microtomography can be very helpful. Pathologist-oncologist cooperation would be most advantageous for future research in this area.

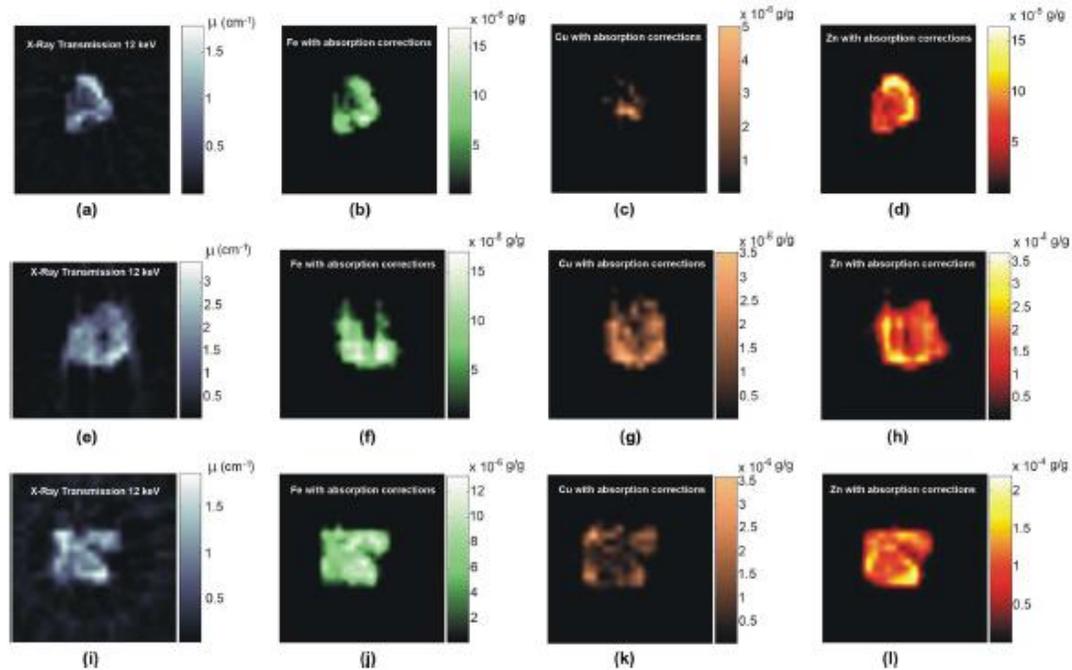


Fig. 6. X-ray transmission microtomographies and XRF $_{\mu}$ /CT of iron, copper and zinc in human prostate BPH samples. (a) X-ray transmission CT, (b) XRF $_{\mu}$ /CT of Fe, (c) XRF $_{\mu}$ /CT of Cu, (d) XRF $_{\mu}$ /CT of Zn, (e) X-ray transmission CT, (f) XRF $_{\mu}$ /CT of Fe, (g) XRF $_{\mu}$ /CT of Cu, (h) XRF $_{\mu}$ /CT of Zn, (i) X-ray transmission, (j) XRF $_{\mu}$ /CT of Fe, (k) XRF $_{\mu}$ /CT of Cu, (l) XRF $_{\mu}$ /CT of Zn.

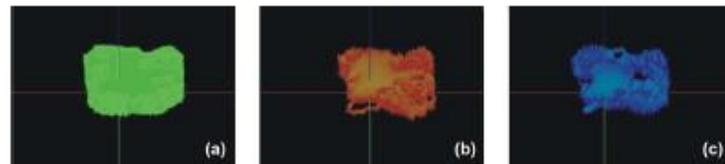


Fig. 7. 3D Tomographic images of a prostate sample with BPH, (a) CT, (b) XRF $_{\mu}$ /CT of iron, (c) XRF $_{\mu}$ /CT of zinc.

The radial streak effects that can be visualized in tomographic reconstructions in Figs. 6 and 7 are because of the low counting statistic in each projection. The images were not processed.

IV. CONCLUSION

μ XRF $_{\mu}$ 2D map proved to be a powerful tool to study the distribution of zinc content in prostate gland. The maps obtained for zinc were not uniform for different zones of the analyzed prostate.

2D and 3D visualizations by XRF $_{\mu}$ /CT showed that the distribution of iron, copper and zinc was different and heterogenic in those samples. XRF $_{\mu}$ /CT technique allowed determining the elemental distribution of the elements inside the sample without destroying it. It is a useful tool for qualitative and quantitative analysis of biological tissues. The biggest advantage of this technique is the three-dimensional visualization of the elemental distribution without material damages. Analyzing 3D visualization, it was observed that the distribution of iron, copper and zinc was different and heterogenic in those samples.

REFERENCES

- [1] S. Garg, G. P. Talwar, and S. N. Upadhyay, "Comparison of extraction procedures on the immunocontraceptive activity of neem seed extracts," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 22, pp. 87–92, 1994.
- [2] J. Rose, *Trace Elements in Health: A Review of Current Issues*. London, U.K.: Butterworth, 1983, pp. xvi–317.
- [3] K. Geraki and M. J. Farquharson, "An X-ray fluorescence system for measuring trace element concentrations in breast tissue," *Radiat. Phys. Chem.*, vol. 61, pp. 603–605, 2001.
- [4] D. P. Byar, "Zinc in the Male Accessory Organs: Distribution and Hormonal Response," in *Male Sex Organ: Structure and Function in Mammals*. New York: Academic, 1974, pp. 61–171.
- [5] J. E. Cooper and I. Farid, "The role of citric acid in physiology of the prostate lactic/citrate ratios in benign and malignant prostatic homogenates as an index of prostatic malignancy," *J. Urol.*, vol. 92, pp. 533–536, 1964.
- [6] R. S. Kirby, "The natural history of benign prostatic hyperplasia: What have we learned in the last decade?," *Urology*, vol. 56, pp. 3–6, 2000.
- [7] A. Brunetti and B. Golosio, "Software for X-ray fluorescence and scattering tomographic reconstruction," *Comput. Phys. Commun.*, vol. 141, no. 3, pp. 412–425, 2001.
- [8] G. Bernasconi and A. Tajani, *Quantitative X-ray Analysis System (QXAS) Software, Package: Documentation Version 1.2*, International Atomic Energy Agency. Vienna, Austria, 1996.

- [9] V. A. Solé, E. Papillon, M. Cotte, P. Walter, and J. Susini, "A multi-platform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra," *Spectrochim. Acta B*, vol. 62, pp. 63–68, 2007.
- [10] G. R. Pereira, H. S. Rocha, C. Calza, M. J. Anjos, C. A. Pérez, and R. T. Lopes, "X-ray fluorescence microtomography under various excitation conditions," *X-Ray Spectrom.*, vol. 38, no. 3, pp. 244–249, 2009.
- [11] M. Naghedolfeizi, J. S. Chung, R. Morris, G. E. Ice, W. B. Yun, and Z. Cai *et al.*, "X-ray fluorescence microtomography study of trace elements in a SiC nuclear fuel shell," *J. Nucl. Mater.*, vol. 312, no. 2–3, pp. 146–155, 2003.
- [12] P. M. Bertsch and D. B. Hunter, "Application of synchrotron-based X-ray microprobes," *Chem. Rev.*, vol. 101, pp. 1809–1842, 2001.
- [13] V. Zaichick, T. V. Sviridova, and S. V. Zaichick, "Zinc in the human prostate gland: Normal, hyperplastic and cancerous," *Int. Urol. Nephrol.*, vol. 29, pp. 565–574, 1997.
- [14] J. E. Mcneal, E. A. Redwine, F. S. Freiha, and T. A. Stamey, "Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma," *Amer. J. Surg. Pathol.*, vol. 12, pp. 897–906, 1988.
- [15] L. C. Costello and R. B. Franklin, "Concepts of citrate production and secretion by prostate I. Metabolic relationships," *Prostate*, vol. 68, pp. 25–46, 2006.
- [16] R. B. Franklin, B. Milon, P. Feng, and L. C. Costello, "Zinc and zinc transporter in normal prostate function and the pathogenesis of prostate cancer," *Front. Biosci.*, vol. 10, pp. 2230–2239, 2005.
- [17] D. Vartsky, S. Shilstein, A. Bercovich, M. Huszar, A. Breskin, and R. Chechik *et al.*, "Prostatic zinc and prostate specific antigen: An experimental evaluation of their combined diagnostic value," *J. Urol.*, vol. 170, pp. 2258–2262, 2003.
- [18] W. M. Kwiatek, A. Banas, M. Gajda, M. Galka, B. Pawlicki, and G. Falkenberg *et al.*, "Cancerous tissues analyzed by SRXRF," *J. Alloys Comp.*, vol. 401, pp. 173–177, 2005.
- [19] M. Yaman, "Comparison of trace metal concentrations in malign and benign human prostate," *J. Med. Chem.*, vol. 48, pp. 630–634, 2005.

Distribution of Fe, Cu and Zn in Cellular Spheroid Derived Human Prostate Tumor Cells by Synchrotron X-Ray Fluorescence

Roberta G. Leitão, C. A. N. Santos, A. Palumbo, Jr, P. A. V. R. Souza, G. R. Pereira, M. J. Anjos, L. E. Nasciutti, and R. T. Lopes

Abstract—The formation of three-dimensional cell microspheres such as spheroids has attracted attention as a useful culture technique. In this study, we investigated the distribution (mapping) of Fe, Cu and Zn in cellular spheroid derived human prostate tumor cells. The measurements were performed in standard geometry of 45° incidence, exciting with a white beam collimated with the help of a 20 μm diameter optical capillary in the XRF beam line at the Synchrotron Light National Laboratory (Campinas, Brazil). The results showed that all the elements analyzed presented non-uniform distribution. The spheroids analyzed showed different elemental distribution of Fe and Cu. Zinc concentrations were higher in the central regions of the spheroids analyzed

Index Terms—Elemental distribution, prostate tissues, synchrotron radiation, X-ray fluorescence.

I. INTRODUCTION

PROSTATE cancer (PCa) is the most frequently diagnosed form of noncutaneous cancer in men and the second leading cause of cancer death in many countries [1]. PCa tends to occur more commonly in older men, suggesting that ageing is one of the contributing factors. Genetic predisposition and numerous environmental factors, including diet and hormonal changes, play important roles in the pathogenesis of the disease [2].

Recently, three-dimensional multicellular aggregates of various animal cells have attracted attention as a useful culture

technique for tissue engineering or regenerative medicine research, pharmacological and toxicological studies, and fundamental studies in cell biology [3]. Unlike classical monolayer-based models, spheroids strikingly mirror the 3D cellular context and therapeutically relevant pathophysiological gradients of *in vivo* tumors [4]. Spheroids are sphere-shaped cell colonies formed by self-assembly that allow various growth and functional studies of diverse tissues [5]. Spheroids serve as excellent physiologic tumor models as they mimic avascular tumors and micrometastases [6] and are known to provide more reliable and meaningful therapeutic readouts [7]. These advantages of tumor spheroids have been widely recognized [8]. In general, *in vitro* 3D models (e.g., explants and traditional 2D cultures in matrix scaffolds) have been developed as intermediate between the 2D cultures and animal models to better understand *in vivo* 3D physiological conditions/environment [9], [10]. On the other hand, these 3D models have some disadvantages such as significant variability of *in vivo* conditions and offer only short term *in vitro* conditions [11]. However, the most significant difficulty is the inability of these *in vitro* 3D models to fully mimic the defined *in vivo* 3D orientation, of either normal (i.e., polarity; distinct structural architecture) or aberrant (loss of structural integrity) epithelial cells, that dictates intracellular, intercellular and cell extracellular matrix signaling [12].

The distribution and local chemical environment of metals and non-metals in tissues and cells is the most fundamental knowledge of any kind of organism. To obtain information concerning the chemical species, as well as their concentrations and locations is crucial for understanding their biological functions and metabolic process [13]. Micro X-Ray Fluorescence (μXRF) has been used for more than 30 years to obtain information regarding the distribution of elements in cells and tissues [14]. μXRF can investigate sample regions with a spatial resolution at the micrometer scale. It allows the determination of the distribution of elements in addition to their concentration [15]. Along with the construction of more powerful synchrotron radiation facilities around the world, μXRF has become a popular trend in X-ray spectroscopic analysis of small areas [13]. Synchrotron-based X-ray microfluorescence (SR μXRF) is a powerful technique for the mapping of elemental distributions at a subcellular level. Sub-micron spatial resolutions can be achieved in two-dimensional scans by an appropriate focusing of the incident high energy X-ray beam produced by a third-generation synchrotron source [16]. An inherent advantage of this method is its multielement detection

Manuscript received May 30, 2012; revised September 10, 2012; accepted October 22, 2012. This work was supported in part by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).

R. G. Leitão and R. T. Lopes are with the Nuclear Instrumentation Laboratory, Federal University of Rio de Janeiro, 21941-942 Rio de Janeiro, Brazil (e-mail: roberta@lin.ufrj.br).

C. A. N. Santos is with the Biotechnology Laboratory – Bioengineering – DIPRO, National Institute of Metrology, Standardization and Technology, Xerém, 20261-232 Duque de Caxias, Brazil.

A. Palumbo Jr, P. A. V. R. Souza, and L. E. Nasciutti are with the Biomedical Science Institute, Federal University of Rio de Janeiro, 21941-590 Rio de Janeiro, Brazil.

G. R. Pereira is with the Non-Destructive Testing, Corrosion and Welding Laboratory (LNDC), Federal University of Rio de Janeiro, 21941-942 Rio de Janeiro, Brazil.

M. J. Anjos is with the Physics Institute, Stated University of Rio de Janeiro, 20550-900 Rio de Janeiro, Brazil.

Color versions of one or more of the figures in this paper are available online at <http://ieeexplore.ieee.org>.

Digital Object Identifier 10.1109/TNS.2012.2231095

capability, which enables the detection of different elements simultaneously. A further advantage of this method is that it is non-destructive, allowing staining and histopathological examination of the samples after the elemental analyses. The improvement of the lateral resolution of brilliant X-ray microbeams induced numerous applications of SR μ XRF in biomedical and environmental studies [17]. All these advantages make SR μ XRF a widely used technique in biological investigations when two-dimensional elemental imaging of tissues and cells at the micrometer or even submicrometer scale is necessary [18].

Although the trace elements Fe, Cu and Zn are extremely common in biochemical processes of the human organism, assessment of their amounts is crucial for disease diagnostics. Iron, copper and zinc can be associated either with functions that protect the body against diseases, or with processes that facilitate their propagation [19].

Iron is a central element in the human organism essential for normal physiological functions because it is a constituent of many proteins and enzymes. It plays a vital role in the regulation of cell growth and differentiation, thus iron might influence the process of carcinogenesis [20].

Copper is found in all living cells and is essential for a wide range of biochemical processes, being a cofactor of superoxide dismutase (SOD), an enzyme which prevents the onset and progression of tumors by protecting the cell against substances that cause free radical formation [21].

A characteristic of the tissues of the prostate gland is that, unlike other tissues, they accumulate uniquely high concentration of zinc [3]. Although zinc concentrations are relatively high throughout the prostate, zinc accumulation mainly occurs in the peripheral zone. Zinc concentrations in this region can be 3–10 times greater than in other soft tissues [22]. Zinc is essential for growth and development. At the cellular level, it is critically involved in proliferation, differentiation, and apoptosis. Examples of functions that require zinc include immunity, intermediary metabolism, DNA metabolism and repair, reproduction, vision, taste, and cognition/behavior [23]. Previous studies have demonstrated that accumulation of high levels of zinc in the prostate is associated with two major functions, citrate production and normal growth of prostate tissue [24]. The normal secretory epithelial cells are highly specialized cells that synthesize, accumulate and secrete enormously high levels of citrate into the prostatic fluid; which is a major function of the prostate gland. This is achieved by the ability of these cells to accumulate high cellular and mitochondrial levels of zinc. In the mitochondria, zinc inhibits m-aconitase activity, thereby preventing citrate oxidation via the Krebs cycle [25].

The most consistent characteristic of prostate malignancy is the loss of zinc accumulation to values 60–70% lower than in normal prostate epithelial cells [24]. Studies indicate that the loss of zinc from prostate cells alters their metabolic function, resulting in increased m-aconitase activity, oxidation of citrate and increased production of adenosine triphosphate (ATP) [26]. However, to date, whether the malignancy causes the disruption of zinc accumulation or vice versa remains unknown [25].

Recent examples of elemental imaging of prostate tissue include XRF analysis. [27] proposed a method of visualization

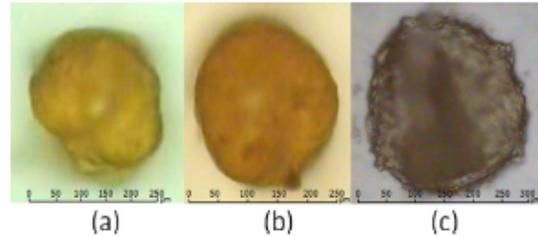


Fig. 1. Photo of spheroids: (a) PCa 1, (b) PCa 2 and (c) PCa 3.

of correlation between two or three elements based on RGB color model to identify the spatial distributions and the local elemental levels in prostate tissues. Other studies have established a correlation between zinc-concentration maps and disease management. A significant increase of zinc depletion with increasing Gleason pattern (grade) classification was observed [28]–[30]. In addition, [19], [31] analyzed the qualitative and quantitative distribution of the elements inside a prostate tissue sample using X-ray fluorescence microtomography technique.

The main purpose of this work was to determine the elemental distribution of Fe, Cu and Zn using SR μ XRF in spheroids derived from tissue prostate cancer (PCa), data that may be used in future treatment or prevention of prostate disease.

II. MATERIALS AND METHODS

A. Population Characteristics

This study was conducted after approval from the Internal Review Board of the Clementino Fraga Filho Teaching Hospital of the Federal University of Rio de Janeiro, Brazil. The prostate samples were collected from 3 patients with prostate cancer submitted to surgery at the Andaraí Hospital in Rio de Janeiro city – Brazil. The age-range of the patients was 40 – 85 years old.

B. Cell Culture and Spheroids

The specimens were maintained under sterile conditions in flask-contained “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium – DMEM, Sigma Chemical Co.” culture medium supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) plus antibiotic/antimycotic mixture Penicillin 100 U/mL, Streptomycin 100 μ g/mL and Fungizone 25 μ g/mL (Gibco). To isolate prostate cells, specimens of malign tissue were diced into approximately 1 mm³ pieces using forceps and scissors with 0.1% collagenase enzymatic solution (Worthington Biochemicals, Lakewood, NY, USA) prepared in culture medium DMEM without serum and incubated at 37°C and 5% CO₂ atmosphere for 1 hour. At the end of the dissociation, the cell homogenate was centrifuged; the cell pellet was resuspended in 1 mL of culture medium supplemented with 10% FBS. The cells were seeded in 25 mm³ flasks and left to allow attachment in a defined medium composed of DMEM supplemented with 10% FBS and placed in a tissue culture incubator at 37°C in humidified air containing 5% CO₂. The cells were fed 3 times a week and at confluence, they were detached with 0.25% trypsin/EDTA (Sigma). After one or two weeks, the same procedure was realized and after

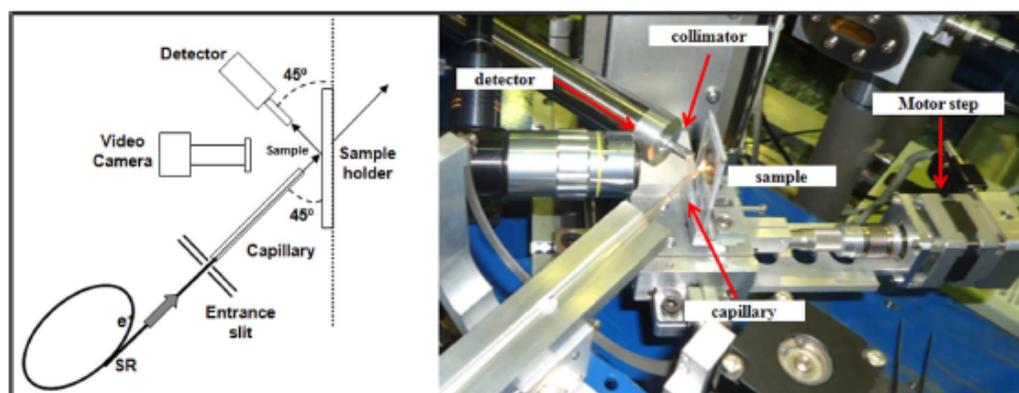


Fig. 2. Experimental setup of X-ray microfluorescence.

establishment of prostate cell primary cultures (epithelial and stromal cells); the cells were detached and replated.

Prostate spheroid cultures were made from primary prostate cells. Cells were seeded at 2×10^4 cells/well on a 96-well tissue culture plate (round bottom) (STARSTEDT, USA) on a base of 1% agarose. The 3D cultures were performed in DMEM culture medium supplemented with 10% FBS. After 72 hours, the spheroids already had a spherical shape and were daily monitored by microscopy. Every 5 days, approximately 90% of the total culture medium volume was replaced by fresh medium. In all the studies, the prostatospheres were cultured for at least 7 days prior to their use. After 10 days of incubation, the spheroids were fixed with 4.0% paraformaldehyde for 20 min. Following three washes with phosphate buffer solution (PBS) 0.1 M, the spheroids were placed in PBS solution, pH 7.4 at 4°C until analysis. Before μ XRF analysis, the spheroids were repeatedly washed in MILLI-Q water. Finally, with a micropipette (100–1000 μ L) they were taken and deposited on ultralene film (4 μ m) fixed in holder sample and dried in air at room temperature. Fig. 1 shows spheroids PCa 1, PCa 2 and PCa 3.

C. Experimental Conditions

The measurements were carried out using SR μ XRF technique in the XRF beam line at the Synchrotron Light National Laboratory, in Campinas, São Paulo, using a polychromatic beam with maximum energy of 20 keV for excitation (the photon flux at 8 keV in an area of 20 mm² is 4.2×10^9 photons s⁻¹) and a Si(Li) detector with resolution of 165 eV at 5.9 keV (shaping time 12 μ s and active area of 30 mm²). The experiment was performed in standard geometry (45° × 45°), exciting with a white beam and using a 20 μ m diameter optical capillary collimation. A fine conical capillary, which allows condensing the white beam into a small area, produces the X-ray microbeam [32]. A more detailed description of the XRF beamline has been presented elsewhere [33]. The obtained X-ray fluorescence spectra were evaluated by AXIL software from the QXAS [34] package for peak deconvolution and subtraction of the radiation background. The two-dimensional

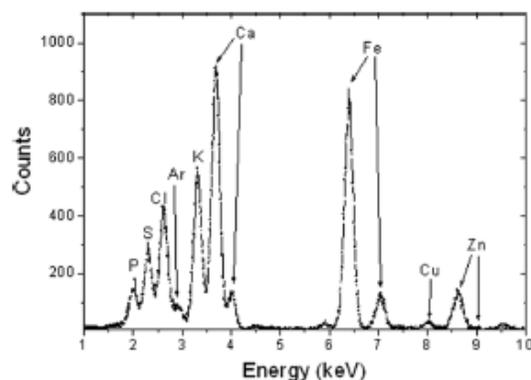


Fig. 3. X-ray fluorescence spectrum of a prostatic tissue sample.

maps were obtained after normalization of the intensities of characteristic X-ray lines to the value of ionization chamber. The counting live time for each pixel was 20 s/step (deadtime was approximately 10%) and the step size was 30 μ m/step in both directions. The mean total time measurement for each sample was 2 hours. A schematic of the experimental setup for an SR μ XRF is shown in Fig. 2. The elemental mapping was obtained through a batch treatment using PymCA software developed at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) [35].

III. RESULTS AND DISCUSSION

Using the SR μ XRF technique it was possible to detect the following elements: P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu and Zn. Fig. 3 shows a typical X Ray fluorescence spectrum of a sample of PCa spheroids. However, only Fe, Cu and Zn were studied because these elements are very important cell building blocks and play important roles in cell and tissue physiology.

Fig. 4 shows Zn mapping in PCa 2 spheroid before and after bilinear interpolation by PymCA for the PCa 2 spheroid. The X-Ray fluorescence mappings of spheroids PCa1, PCa 2 and

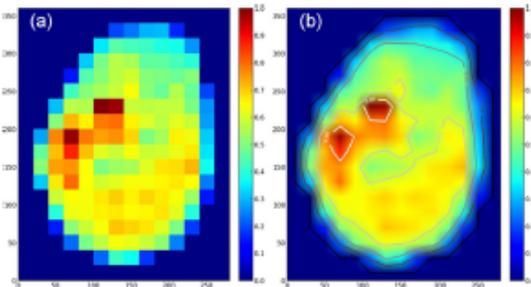


Fig. 4. Image of zinc mapping in PCa 2 spheroid before (a) and after (b) bilinear interpolation by PyMCA.

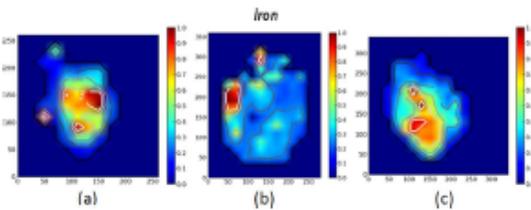


Fig. 5. Image of iron mapping of: (a) PCa 1, (b) PCa 2 and (c) PCa 3 spheroids.

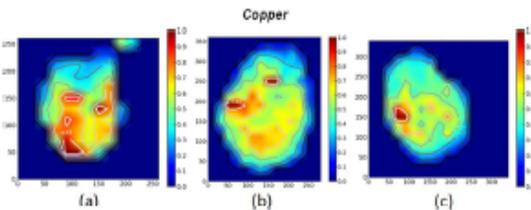


Fig. 6. Image of copper mapping of: (a) PCa 1, (b) PCa 2 and (c) PCa 3 spheroids.

PCa 3 are shown in Figs. 5–7 for elements Fe, Cu and Zn, respectively. The relative fluorescence intensities were normalized using the maximum value found for each sample.

The analysis of Fe image (Fig. 5) shows that it is not uniformly distributed. Moreover, more intense small areas can be observed in all the spheroids analyzed. PCa 1 and PCa 3 spheroids presented more intense elemental mapping of Fe in the central area.

Fig. 6 shows that copper is distributed heterogeneously, in low concentrations, along the full extent of the spheroids, in addition the images of Cu present small regions with high intensity (four in PCa 1, two in PCa 2 and one in PCa 3).

Zn mapping (Fig. 7) presents heterogeneous distribution and a more intense central region is observed in PCa 1 and PCa 3 spheroids. Furthermore, the comparison of Figs. 6 and 7, shows that copper and zinc have a similar distribution in spheroids PCa 1 and PCa 2.

This study indicates that the distribution of zinc is more intense in the central region, suggesting that in this region there is an accumulation of epithelial cells. It is known that the epithelial cells of secretory glands are zinc accumulating. Thus, a

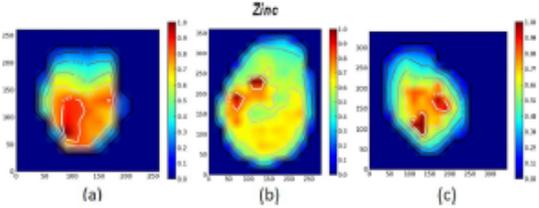


Fig. 7. Image of zinc mapping of: (a) PCa 1, (b) PCa 2 and (c) PCa 3 spheroids.

histomorphological study is necessary to evaluate how the different cell types are distributed in spheroids and the formation of different tissues in spheroid.

IV. CONCLUSION

Using the SR μ XRF technique we were able to determine the distribution of Fe, Cu and Zn in cellular spheroids of prostate samples with cancer. All the elements were heterogeneously distributed in different areas of the spheroids analyzed. Fe images showed more intense small areas in all the spheroids analyzed. The elemental distribution of Cu also presented more intense small regions. In two spheroids analyzed, zinc presented more intense distributions in the central region of the spheroid. The particular function of zinc in the normal secretory epithelial cells and its relationship to the carcinogenic process suggests that further studies on elemental mapping in spheroids may help clarify the relationship between zinc and PCa.

REFERENCES

- [1] A. G. Sarafanov, T. I. Todorov, A. Kajdacsy-Balla, M. A. Grayd, V. Maciasc, and J. A. Centeno, "Analysis of iron, zinc, selenium and cadmium in paraffin-embedded prostate tissue specimens using inductively coupled plasma mass-spectrometry," *J. Trace Elem. Med Biol.*, vol. 22, pp. 305–314, 2008.
- [2] P. F. Wong and S. AbuBakar, "LNCaP prostate cancer cells are insensitive to zinc-induced senescence," *J. Trace Elem. Med Biol.*, vol. 22, pp. 242–247, 2008.
- [3] Y. Sakai *et al.*, "Effect of microwell chip structure on cell microsphere production of various animal cells," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 110, pp. 223–229, 2010.
- [4] F. Hirschhaeuser, H. Menne, C. Dittfeld, J. West, W. Mueller-Klieser, and L. A. Kunz-Schughart, "Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again," *J. Biotechnol.*, vol. 148, pp. 3–15, 2010.
- [5] M. Ingram *et al.*, "Three-dimensional growth patterns of various human tumor cell lines insimulated microgravity of a NASA bioreactor. In Vitro," *Cell Dev. Biol. Anim.*, vol. 33, pp. 459–66, 1997.
- [6] D. Klob, M. Fischer, A. Rothermel, J. C. Simon, and A. A. Robitzki, "Drug testing on 3D *in vitro* tissues trapped on a microcavity chip," *Lab Chip*, vol. 8, pp. 879–884, 2008.
- [7] L. A. Kunz-Schughart, J. P. Freyer, F. Hofstaedter, and R. Ebner, "The use of 3-D cultures for high-throughput screening: The multicellular spheroid model," *J. Biomol. Screen.*, vol. 9, pp. 273–285, 2004.
- [8] J. M. Kelm and M. Fussenegger, "Microscale tissue engineering using gravityenforced cell assembly," *Trends Biotechnol.*, vol. 22, pp. 195–202, 2004.
- [9] H. R. Kumar *et al.*, "Three-dimensional neuroblastoma cell culture: Proteomic analysis between monolayer and multicellular tumor spheroids," *Pediatr. Surg. Int.*, vol. 24, no. 11, pp. 1229–1234, 2008.
- [10] J. Morales and M. L. Alpaugh, "Gain in cellular organization of inflammatory breast cancer: A 3D *in vitro* model that mimics the *in vivo* metastasis," *BMC Cancer* vol. 9:462, Dec. 2009.
- [11] K. M. Yamada and E. Cukierman, "Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D," *Cell*, vol. 130, no. 4, pp. 601–610, 2007.

- [12] L. G. Griffith and M. A. Swartz, "Capturing complex 3D tissue physiology *in vitro*," *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, vol. 7, no. 3, pp. 211–224, 2006.
- [13] B. Wu and J. S. Becker, "Imaging of elements and molecules in biological tissues and cells in the low-micrometer and nanometer range," *Int. J. Mass. Spectrom.*, vol. 307, pp. 112–122, 2011.
- [14] G. M. Roomans and A. Von Euler, "X-ray microanalysis in cell biology and cell pathology," *Cell. Biol. Int.*, vol. 20, pp. 103–109, 1996.
- [15] I. Lima, M. J. Anjos, M. L. F. Farias, T. U. Pantaleão, V. M. C. Costa, and R. T. Lopes, "Evaluation of osteoporotic bone structure through synchrotron radiation X-ray microfluorescence images," *Eur. J. Radiol.*, vol. 68S, pp. S95–S99, 2008.
- [16] R. Ortega, P. Cloetens, G. Devès, A. Carmona, and S. Bohic, "Iron storage within dopamine neurovesicles revealed by chemical nano-imaging," *PLoS ONE*, vol. 2, no. 9, p. e925, 2007.
- [17] C. S. Guerra *et al.*, "X-ray fluorescence with synchrotron radiation to Elemental analysis of lead and calcium content of primary teeth," *Appl. Radiat. Isot.*, vol. 68, pp. 71–75, 2010.
- [18] C. J. Fahmi, "Biological applications of X-ray fluorescence microscopy: Exploring the subcellular topography and speciation of transition metals," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 11, no. 121, p. 127, 2007.
- [19] G. R. Pereira *et al.*, "Elemental distribution images in prostate samples by X-ray Fluorescence microtomography," *Appl. Radiat. Isot.*, vol. 70, pp. 1379–1383, 2012.
- [20] U. Majewska, D. Banas, J. Braziewicz, S. Gozdz, A. Kubala-Kukus, and M. Kucharzewski, "Trace element concentration distributions in breast, lung and colon tissues," *Phys. Med. Biol.*, vol. 52, pp. 3895–3911, 2007.
- [21] A. Al-Ebraheem, M. J. Farquharson, and E. Ryan, "The evaluation of biologically important trace metals in liver, kidney and breast tissue," *Appl. Radiat. Isot.*, vol. 67, pp. 470–474, 2009.
- [22] L. C. Costello, R. B. Franklin, P. Feng, M. Tan, and O. Bagasra, "Zinc and prostate cancer: A critical scientific, medical, and public interest issue (United States)," *Cancer Causes Control*, vol. 16, pp. 901–915, 2005.
- [23] W. Maret and H. H. Sandstead, "Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation," *J. Trace Elem. Med. Biol.*, vol. 20, pp. 3–18, 2006.
- [24] S. Lin, H. Wei, D. Maeder, R. B. Franklin, and P. Feng, "Profiling of zinc-altered gene expression in human prostate normal, vs. cancer cells: A time course study," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 20, pp. 1000–1012, 2009.
- [25] R. B. Franklin and L. C. Costello, "Zinc as an anti-tumor agent in prostate cancer and in other cancers," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 463, pp. 211–217, 2007.
- [26] L. C. Costello, R. B. Franklin, and P. Feng, "Mitochondrial function, zinc, and intermediary metabolism relationships in normal prostate and prostate cancer," *Mitochondrion*, vol. 5, pp. 143–153, 2005.
- [27] A. Banas, K. Banas, G. Falkenberg, G. Dyduch, B. Pwlicki, and W. M. Kwiatek, "Using micro-synchrotron radiation induced X-ray emission distribution maps to determine correlation between elements in prostate tissue," *Spectrochim. Acta, Part B*, vol. 63, pp. 957–961, 2008.
- [28] M. Cortesi *et al.*, "Clinical assessment of the cancer diagnostic value of prostatic zinc: A comprehensive needle-biopsy study," *The Prostate*, vol. 68, no. 9, pp. 994–1006, 2008.
- [29] M. Cortesi *et al.*, "Evaluating the cancer detection and grading potential of prostatic-zinc imaging: A simulation study," *Phys. Med. Biol.*, vol. 54, pp. 781–796, 2009.
- [30] M. Cortesi *et al.*, "New prospective for non-invasive detection, grading, size evaluation, and tumor location of prostate cancer," *The Prostate*, vol. 70, pp. 1701–1708, 2010.
- [31] G. R. Pereira *et al.*, "3D elemental distribution images by XRFmCT at LNLS—Brazil," *Nucl. Instrum. Meth. A*, vol. 652, pp. 684–686, 2011.
- [32] C. A. Pérez, H. J. Sánchez, R. A. Barrea, M. Grenón, and J. Abraham, "Microscopic X-ray fluorescence analysis of human dental calculus using synchrotron radiation," *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 19, pp. 392–397, 2004.
- [33] C. A. Pérez *et al.*, "Synchrotron Radiation X-Ray Fluorescence at the LNLS: Beamline Instrumentation and Experiments," *X-Ray Spectrom.*, vol. 28, pp. 320–326, 1999.
- [34] G. Bernasconi and A. Tajani, *Quantitative X-ray Analysis System (QXAS) Software*. Vienna, Austria: International Atomic Energy Agency, 1996. Package: Documentation Version 1.2.
- [35] V. A. Solé, E. Papillon, M. Cotte, P. Walter, and J. Susini, "A multi-platform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra," *Spectrochim. Acta, Part B*, vol. 62, pp. 63–68, 2007.

Spatial Distribution of Elements in the Spheroids by Prostate Tumor Cells using Synchrotron Radiation X-Ray Fluorescence

Roberta G. Leitão¹, Carlos Antônio N. Santos², Antônio Palumbo Junior³,
Pedro A. V. R. Souza³, Catarine G. L. Canellas¹, Marcelino J. Anjos^{1,4},
Luiz E. Nasciutti³ and Ricardo T. Lopes¹

¹*Laboratório de Instrumentação Nuclear, PEN/COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, 21941-972, Rio de Janeiro, RJ, Brasil*

²*Laboratório de Biotecnologia – Bioengenharia – DIPRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, Xerém, 25250-020, Duque de Caxias, RJ, Brasil.*

³*Laboratório de Interações Celulares, ICB-CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.*

⁴*Instituto de Física, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Maracanã, 20550-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.*

Abstract. The formation of three-dimensional cell microspheres such as spheroids has attracted attention as a useful culture technique. In this study, we investigated the trace elemental distribution (mapping) in spheroids derived from tissue prostate cancer (PCa). The measurements were performed in standard geometry of 45° incidence, exciting with a white beam and using an optical capillary with 20 µm diameter collimation in the XRF beam line at the Synchrotron Light National Laboratory (Campinas, Brazil). The results showed that most elements analyzed presented non-uniform distribution. P, S and Cl showed similar elemental distribution in all the samples analyzed. K, Ca, Fe, and Cu showed different elemental distribution for the spheroids analyzed. Zinc presented more intense distributions in the spheroid central region for all spheroids analyzed.

Keywords: X-ray fluorescence; Synchrotron radiation; Elemental distribution; Prostate tissues.

PACS: 82.80.Dx

INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa) is the most frequently diagnosed form of noncutaneous cancer in men and the second leading cause of their cancer death in many countries [1]. PCa tends to occur more commonly in older men, suggesting that ageing is possibly one of the contributing factors. Genetic predisposition and numerous environmental factors, including diet and hormonal changes, play important roles in the pathogenesis of the disease [2].

Recently, three-dimensional multicellular aggregates of various animal cells have attracted attention as a useful culture technique for tissue engineering or regenerative medicine research, pharmacological and toxicological studies, and fundamental studies in cell biology [3]. Unlike classical monolayer-based models, spheroids strikingly mirror the 3D cellular context and therapeutically relevant pathophysiological gradients of in vivo

tumors [4]. Spheroids are sphere-shaped cell colonies formed by self-assembly that allow various growth and functional studies of diverse tissues. Spheroids serve as excellent physiologic tumor models as they mimic avascular tumors and micrometastases and are known to provide more reliable and meaningful therapeutic readouts. These advantages of tumor spheroids have been widely recognized [5].

The distribution and local chemical environment of metals and non-metals in tissues and cells is the most fundamental knowledge of any kind of organism. To obtain information concerning the chemical species, as well as their concentrations and locations is crucial for understanding their biological functions and metabolic process [6]. Micro X-Ray Fluorescence (µXRF) has been used for more than 30 years to obtain information regarding the distribution of elements in cells and tissues [7]. Along with the construction of more power-ful synchrotron radiation facilities around the world, µXRF has become a popular trend in X-ray

spectroscopic analysis of small areas [6]. Synchrotron-based X-ray fluorescence is a powerful technique for the mapping of elemental distributions at a subcellular level. Sub-micron spatial resolutions can be achieved in two-dimensional scans by an appropriate focusing of the incident high energy X-ray beam produced by a third-generation synchrotron source [8]. An inherent advantage of this method is its multielement detection capability, which enables the detection of different elements simultaneously. A further advantage of this method is that it is non-destructive, allowing staining and histopathological examination of the measured samples after the elemental analyses. The improvement of the lateral resolution of brilliant X-ray microbeams induced numerous applications of μ XRF in biomedical and environmental studies [9]. All these advantages make the μ XRF widely used in biological investigations when two-dimensional elemental imaging of tissues and cells at the micrometer or even submicrometer scale is necessary [10].

In this work, Synchrotron Radiation X-Ray Fluorescence was used to measure the elemental distributions in spheroids derived from tissue prostate cancer (PCa), which may help to elucidate the mechanisms and effects of trace elements on prostate functions.

MATERIAIS E MÉTODOS

Population Characteristics

This study was conducted following approval by the Internal Review Board of the Clementino Fraga Filho Teaching Hospital of the Federal University of Rio de Janeiro, Brazil. The prostate samples were collected from 3 patients submitted to surgery at the Andaraí Hospital in Rio de Janeiro city - Brazil. The age-range of the patients was 40 – 85 years old.

Cell Culture and spheroids

The specimens were collected under sterile conditions in flask-contained culture medium, "Dulbecco's Modified Eagle's Medium – DMEM, Sigma Chemical Co." and Penicillin-Streptomycin solution (P-0906, Sigma) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS). To isolate prostate cells, specimens of malign tissue were diced into approximately 1 mm³ pieces using forceps and scissors with a solution of enzymatic solution 0.1% collagenase (Worthington Biochemicals, Lakewood, NY, USA) prepared in culture medium DMEM (Sigma) without serum and incubated at 37°C and atmosphere of 5% CO₂ for 1 hour. At the end of dissociation, the cell homogenate was centrifuged; the

cell pellet was resuspended in 1 ml of culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (GIBCO). Cells were seeded in 25 mm³ flasks and left to allow attachment in a defined medium composed of DMEM supplemented with 10% FBS plus antibiotic/antimycotic mixture Penicillin 100 U/mL, Streptomycin 100 µg/ml and Fungizone 25 µg/mL (Gibco) and placed in a tissue culture incubator at 37°C in humidified air containing 5% CO₂. Cells were fed 3 times a week and at confluence, cells were detached with 0.25% trypsin/EDTA (Sigma) and replated in a ratio of 1:3 into new flasks. After one or two weeks, the same procedure was realized and establishment of prostate cells primary cultures (PHP-1); the cells were detached and replated.

To obtain the three-dimensional structures (the spheroids) PHP-1 cells were cultured in the proportion of 1:1 (1.5 × 10⁴ cells), in tissue 96-well culture plate previously covered with 1% agarose gel, containing DMEM culture medium with 10% FBS. After 72 h, the prostatospheres were formed, characterized and monitored daily. Each 48 h, approximately 90% of the total culture medium volume were changed by fresh medium. For all studies, prostatospheres were cultured for at least 7 days prior to their use.

The spheroids were fixed after an incubation of 10 days with 4.0% paraformaldehyde for 20 min. After three washes with PBS, spheroids were placed in a phosphate buffer solution (PBS) 0.1 M, pH 7.4 at 4°C until analysis. Before analysis, spheroids were washed in MILLI-Q water. Finally, they were deposited on ultralene film (4 µm) and dried in air at room temperature. Figure 1 shows spheroids PCa 1, PCa 2 and PCa 3.

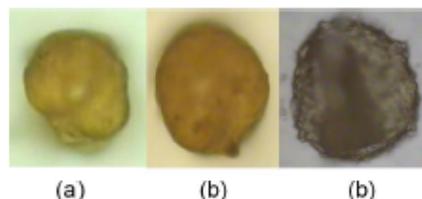


FIGURE 1. Photo of spheroids: (a) PCa 1, (b) PCa 2 and (c) PCa 3.

Experimental Organization

The measurements were carried out using X-ray microfluorescence with synchrotron radiation (μ SRXRF) technique in the XRF beam line at the Synchrotron Light National Laboratory, in Campinas, São Paulo, using a polychromatic beam with maximum energy of 20 keV for excitation and an Si(Li) detector with resolution of 165 eV at 5.9 keV.

The experiment was performed in standard geometry ($45^\circ \times 45^\circ$), exciting with a white beam and using an optical capillary with $20 \mu\text{m}$ diameter collimation. The obtained X-ray fluorescence spectra were evaluated by the QXAS software distributed by the International Atomic Energy Agency [11]. The two-dimensional maps were obtained after normalization of the intensities of characteristic X-ray lines to the value of ionization chamber. The counting live time for each pixel was 20 s/step and the step size was $20 \mu\text{m/step}$ in both directions. XRF spectra were quantitatively analyzed with the PyMCA software developed at the ESRF synchrotron [12].

RESULTS AND DISCUSSIONS

The distribution of the elements P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu and Zn were determined using the μSRXRF technique. Figure 2 shows a typical X Ray fluorescence spectrum of a sample of PCa spheroids. The X-Ray fluorescence mapping of spheroids PCa1, PCa 2 and PCa 3 are shown in figures 3-10 for elements P, S, Cl, K, Ca, Fe, Zn, respectively.

Figures 3-5 show mappings of P, S and Cl, the typical circular shape is not observed because of the absorption effect caused by low energy K-lines of these elements.

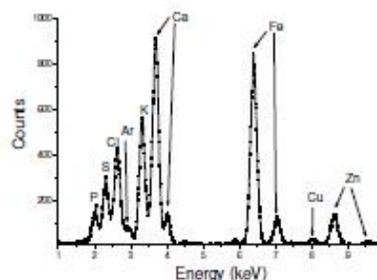


FIGURE 2. The X-ray fluorescence spectra of a sample of PCa spheroids.

Similar elemental mappings more intense on the wrap of spheroids can be observed for elements P, S and Cl in Figures 3-5. Fig 6 shows that K elemental distribution is concentrated (?) in a particular region of spheroids, and that spheroids PCa 1 and PCa 2 present the same distribution pattern for this element. The analysis of images of Ca and Fe (figures 7 and 8) indicates very small intense regions for all spheroids analyzed. Figure 9 shows that Cu is distributed in the entire region of the spheroid, although with more intensity in some areas. Besides, Cu mapping presents

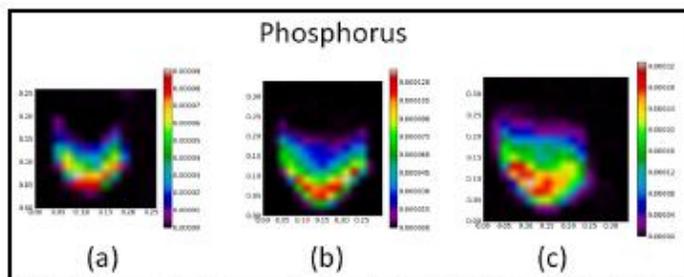


FIGURE 3. Image of phosphorus mapping the spheroids of: (a) PCa 1, (b) PCa 2 and (c) PCa 3.

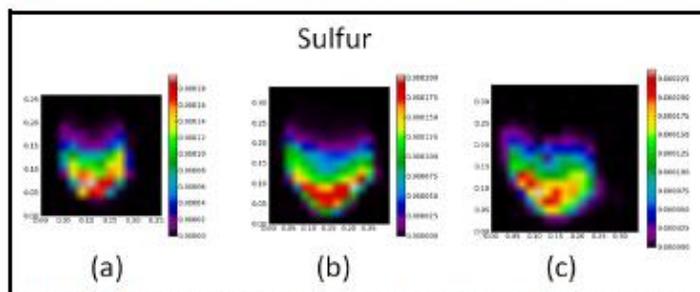


FIGURE 4. Image of sulfur mapping the spheroids of: (a) PCa 1, (b) PCa 2 and (c) PCa 3.

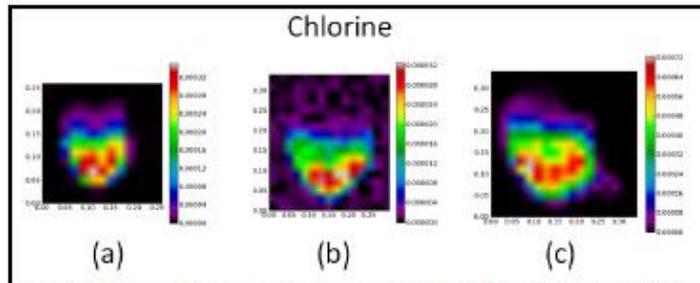


FIGURE 5. Image of chlorine mapping the spheroids of: (a) PCA 1, (b) PCA 2 and (c) PCA 3.

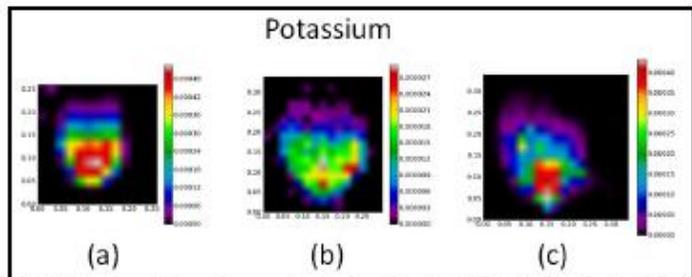


FIGURE 6. Image of potassium mapping the spheroids of: (a) PCA 1, (b) PCA 2 and (c) PCA 3.

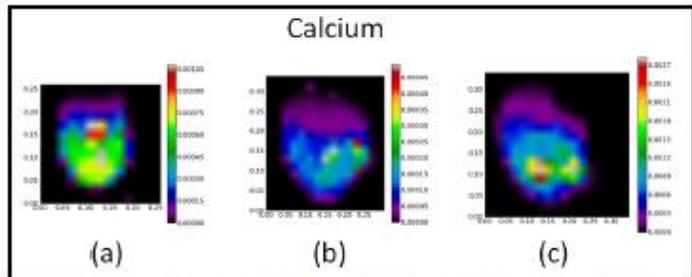


FIGURE 7. Image of calcium mapping the spheroids of: (a) PCA 1, (b) PCA 2 and (c) PCA 3.

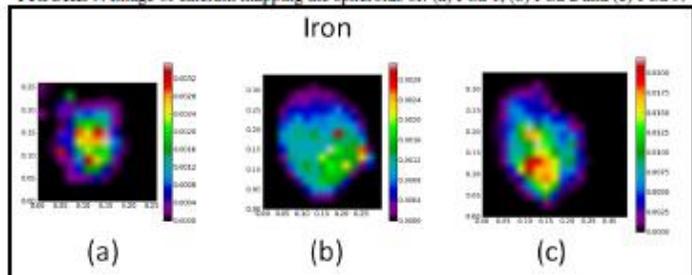


FIGURE 8. Image of iron mapping the spheroids of: (a) PCA 1, (b) PCA 2 and (c) PCA 3.

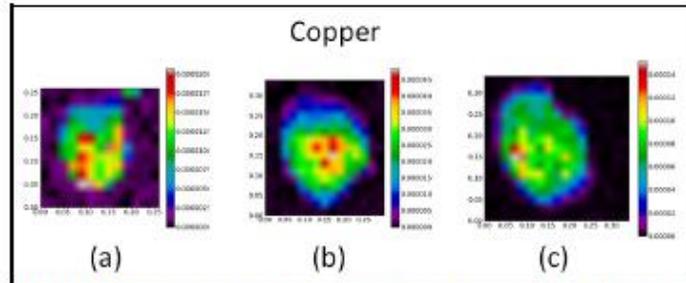


FIGURE 9. Image of copper mapping the spheroids of: (a) PCa 1, (b) PCa 2 and (c) PCa 3.

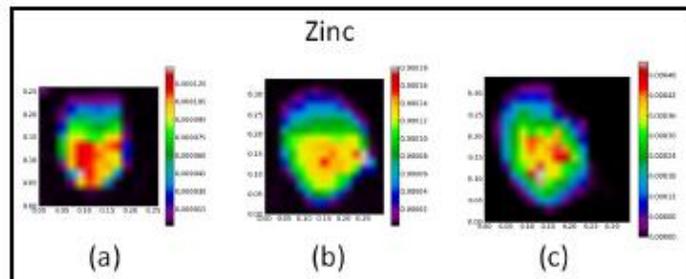


FIGURE 10. Image of zinc mapping the spheroids of: (a) PCa 1, (b) PCa 2 and (c) PCa 3.

similar distribution for PCa 1 and PCa 2 spheroids. Zn mapping presents heterogeneous distribution with a more intense central region in all spheroids analyzed. PCa 1 and PCa 3 spheroids presents elemental mapping of K and Fe distributed more intensely in similar regions of the spheroid.

All elements studied are important cell building blocks and play important roles in cell and tissue physiology. One characteristic feature of the tissues of the prostate gland unlike other tissues is their ability to accumulate uniquely high concentration of zinc [3]. Although zinc concentrations are relatively high throughout the prostate, zinc accumulation mainly occurs in the peripheral zone. Zinc concentrations in this region can be 3–10 times greater than in other soft tissues [13]. Zinc is essential for growth and development. At the cellular level, it is critically involved in proliferation, differentiation, and apoptosis. Examples of functions that require zinc include immunity, intermediary metabolism, DNA metabolism and repair, reproduction, vision, taste, and cognition/behavior [14]. Previous studies have demonstrated that accumulation of a high level of zinc in the prostate is associated with two major functions, citrate production and normal growth of prostate tissue [15]. The normal secretory epithelial cells are highly specialized cells that synthesize, accumulate and secrete enormously high levels of citrate into the prostatic fluid; which is a major function of the prostate gland. This is achieved by the ability of these cells to accumulate high cellular and mitochondrial levels of zinc. In the mitochondria, the zinc inhibits m-

aconitase activity, thereby preventing citrate oxidation via the Krebs cycle [16].

The most consistent characteristic of prostate malignancy is the loss of zinc accumulation, 60–70% lower than that of normal prostate epithelial cells [15]. Studies indicate that the loss of zinc from prostate cells alters their metabolic function, resulting in increased m-aconitase activity, oxidation of citrate and increased production of adenosine triphosphate (ATP) [17]. However, to date, whether the malignancy causes the disruption of zinc accumulation or vice versa remains unknown [16]. This study indicates that the distribution of zinc is more intense in the central region, suggesting that in this region there is an accumulation of epithelial cells. It is known that the epithelial cells of secretory glands are zinc accumulating. Thus, a histomorphological study is necessary to evaluate how the different cell types are distributed in spheroids and the formation of different tissues in spheroids.

CONCLUSIONS

Using the μ SRXRF technique we were able to determine the distribution of 8 elements: P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu and Zn in spheroid samples. All the elements were heterogeneously distributed in different areas of the spheroids analyzed. P, S and Cl showed similar elemental distribution. Elemental mapping of K showed a particular more intense region. Ca and Fe showed very small more intense distribution regions. Elemental distribution of Cu was more intense in some areas.

In all spheroids analyzed, zinc presented more intense distributions in the central region of the spheroid. The particular function of zinc in the normal secretory epithelial cells and its relationship to the carcinogenic process suggests that further studies on elemental mapping in spheroids may help clarify the relationship between zinc and PCa.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially developed at Brazilian National Synchrotron Light Laboratory (projects XRF 10009 and 10894) and had the financial support of CNPq and FAPERJ.

REFERENCES

1. A. G. Sarafanov, T. I. Todorov, A. Kajdacsy-Balla, M. A. Grayd, V. Maciasc, J. A. Centeno, "Analysis of iron, zinc, selenium and cadmium in paraffin-embedded prostate tissue specimens using inductively coupled plasma mass-spectrometry", *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **22**, 305–314 (2008).
2. P. -F. Wong, S. AbuBakar, "LNCaP prostate cancer cells are insensitive to zinc-induced senescence", *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **22**, 242–247 (2008).
3. Y. Sakai, S. Yoshida, Y. Yoshiura, R. Mori, T. Tamura, K. Yahiro, H. Mori, Y. Kanemura, M. Yamasaki, K. Nakazawa, "Effect of microwell chip structure on cell microsphere production of various animal cells", *J. Biosci. Bioeng.*, **110**, 223–229 (2010).
4. F. Hirschhaeuser, H. Menne, C. Dittfeld, J. West, W. Mueller-Klieser, L. A. Kunz-Schughart, "Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again", *J Biotechnol.*, **148**, 3–15 (2010).
5. A. Y. Hsiao, Y. Torisawa, Y. Tung, S. Sud, R. S. Taichman, K. J. Pienta, S. Takayama, "Microfluidic system for formation of PC-3 prostate cancer co-culture spheroids", *Biomaterials*, **30**, 3020–3027 (2009).
6. B. Wu, J. S. Becker, "Imaging of elements and molecules in biological tissues and cells in the low-micrometer and nanometer range", *Int J Mass Spectrom.* doi:10.1016/j.ijms.2011.01.019 (2011).
7. G. M. Roomans, A. Von Euler, "X-ray microanalysis in cell biology and cell pathology", *Cell Biol Int.*, **20**, 103–109 (1996).
8. R. Ortega, P. Cloetens, G. Devès, A. Carmona, S. Bohic, "Iron storage within dopamine neurovesicles revealed by chemical nano-imaging", *PLoS ONE*, **2**(9), e925 (2007).
9. C. S. Guerra, R. F. Gerlach, N. G. V. Pinto, S. C. Cardoso, S. Moreira, A. P. Almeida, I. T. A. Peixoto, C. H. Meloni, C. L. Mota, L. F. Oliveira, D. Braz, R. C. Barroso, "X-ray fluorescence with synchrotron radiation to Elemental analysis of lead and calcium content of primary teeth", *Appl Radiat Isot.*, **68**, 71–75 (2010).
10. C. J. Fahmi, "Biological applications of X-ray fluorescence microscopy: exploring the subcellular topography and speciation of transition metals", *Curr Opin Chem Biol.*, **11** (121), 127 (2007).
11. G. Bernasconi, A. Tajani, Quantitative X-ray Analysis System (QXAS) Software, Package: Documentation Version 1.2. International Atomic Energy Agency, Vienna, (1996).
12. V. A. Solé, E. Papillon, M. Cotte, P. Walter, J. Susini, "A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra", *Spectrochim. Acta B*, **62**, 63–68 (2007).
13. L. C. Costello, R. B. Franklin, P. Feng, M. Tan, O. Bagasra, "Zinc and prostate cancer: a critical scientific, medical, and public interest issue (United States)", *Cancer Causes Control*, **16**, 901–915 (2005).
14. W. Maret, H. H. Sandstead, "Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation", *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **20**, 3–18 (2006).
15. S. Lin, H. Wei, D. Maeder, R. B. Franklin, P. Feng, "Profiling of zinc-altered gene expression in human prostate normal, vs. cancer cells: a time course study", *J Nur Biochem*, **20**, 1000–1012 (2009).
16. R. B. Franklin, L. C. Costello, "Zinc as an anti-tumor agent in prostate cancer and in other cancers", *Arch Biochem Biophys*, **463**, 211–217 (2007).
17. L. C. Costello, R. B. Franklin, P. Feng, "Mitochondrial function, zinc, and intermediary metabolism relationships in normal prostate and prostate cancer", *Mitochondrion*, **5**, 143–153 (2005).



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Radiation Physics and Chemistry

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

Elemental concentration analysis in prostate tissues using total reflection X-ray fluorescence

R.G. Leitão^a, A. Palumbo Jr.^b, P.A.V.R. Souza^b, G.R. Pereira^c, C.G.L. Canellas^d, M.J. Anjos^{a,d},
L.E. Nasciutti^b, R.T. Lopes^{a,*}

^a Nuclear Instrumentation Laboratory, Federal University of Rio de Janeiro, P.O.Box 68.509, Ilha do Fundão, 21941-942, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Biological Science Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Non-destructive Testing, Corrosion and Welding Laboratory(LNDC), Ilha do Fundão, 21941-942, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^d Stated University of Rio de Janeiro, Rua São Francisco Xavier, 524—Maracanã, 20550-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

HIGHLIGHTS

- ▶ Prostate cancer is the most frequently diagnosed form of cancer in men.
- ▶ Intracellular Zn is correlated with proliferation, differentiation, or apoptosis.
- ▶ The prostate gland accumulate high concentration of Zn.
- ▶ SR-TXRF is a technique widely used in the analysis of low concentration in samples.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 September 2012

Accepted 25 December 2012

Keywords:

X-ray fluorescence spectroscopy

Synchrotron radiation

Trace elements

Prostate tissue

ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) currently represents the second most prevalent malignant neoplasia in men, representing 21% of all cancer cases. Benign Prostate Hyperplasia (BPH) is an illness prevailing in men above the age of 50, close to 90% after the age of 80. The prostate presents a high zinc concentration, about 10-fold higher than any other body tissue. In this work, samples of human prostate tissues with cancer, BPH and normal tissue were analyzed utilizing total reflection X-ray fluorescence spectroscopy using synchrotron radiation technique (SR-TXRF) to investigate the differences in the elemental concentrations in these tissues. SR-TXRF analyses were performed at the X-ray fluorescence beamline at Brazilian National Synchrotron Light Laboratory (LNLS), in Campinas, São Paulo. It was possible to determine the concentrations of the following elements: P, S, K, Ca, Fe, Cu, Zn and Rb. By using Mann–Whitney *U* test it was observed that almost all elements presented concentrations with significant differences ($\alpha=0.05$) between the groups studied.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Prostate cancer is the most frequently diagnosed form of noncutaneous cancer in men and the second leading cause of male cancer death in many countries (Sarafanova et al., 2008). Benign prostate hyperplasia (BPH) is another disease of the prostate that primarily results in symptoms in the lower urinary tract and can significantly impair quality of life (Kirby, 2000).

Intracellular zinc concentration is correlated with cell fate, i.e., proliferation, differentiation, or apoptosis and modifications of zinc homeostasis are linked to several pathologies affecting humans at any stage of life (Banudevi et al., 2010).

One characteristic feature of the tissues of the prostate gland unlike other tissues is their ability to accumulate uniquely high

concentration of zinc, which is toxic to tissues elsewhere in the body (Franklin and Costello, 2007).

Total reflection X-ray fluorescence using synchrotron radiation (SR-TXRF) is a multi elemental technique widely used in the analysis of low concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$) in environmental, medical and biological samples (Kubala-Kukus et al., 2007).

In this study, was to analyze prostate samples through SR-TXRF investigate the differences in the elemental concentrations among different prostate tissues: PCa, BPH and normal.

2. Materials and methods

2.1. Population characteristics

This study was conducted following approval by the Internal Review Board of the Clementino Fraga Filho Teaching Hospital of

* Corresponding author. Tel.: +55 21 2 562 7311.

E-mail addresses: ricardo@lin.ufrj.br, roberta@lin.ufrj.br (R.T. Lopes).

the Federal University of Rio de Janeiro, Brazil. The prostate samples were collected from 56 patients submitted to surgery at the Andaraí Hospital in Rio de Janeiro city—Brazil. The age-range of the patients was 40–85 years old. The experimental groups were constituted of 12 patients with PCa with Gleason score between 6 and 9 and 44 patients with BPH. The control group was formed by 8 samples of individuals with age-range from 18 to 30 years old who died from unexpected death (accident, murder, cardiac arrest).

2.2. Samples preparation

The mass of the tissues samples varied from 10 mg to 50 mg. The tissues were washed in MILLI-Q water, lyophilized in a freeze-dryer at -60°C , crushed and afterwards they were digested in HNO_3 at 60°C . The solutions digested were diluted in MILLI-Q water up to 2 mL and a 50 μL aliquot of Ga solution (Standard ICP Ga $-100\ \mu\text{g g}^{-1}$) was added as internal standard. Next, the solution was homogenized by shaking and a small aliquot of 5 μL was pipetted on a precleaned Lucite carrier (Perspex – Molecular formula: $(\text{C}_5\text{O}_2\text{H}_8)_n$, rectangular-plate with dimensions: $30 \times 15 \times 2\ \text{mm}$). After deposition, the samples were oven dried at 40°C . All samples were analyzed in triplicate. The methodology was validated through analysis of samples of standard reference material (Bovine liver 1577b), prepared under the same conditions as the prostate samples.

2.3. Experimental organization

The measurements were carried out using SR-TXRF technique in the XRF beam line at the Synchrotron Light National Laboratory, in Campinas, São Paulo, using a polychromatic beam with maximum energy of 20 keV for excitation coming from a storage ring with 0.1 mm width and 5.0 mm height. This beam was directed onto the sample at angle approximately 1.0 mrad. The detector was of HpGe with resolution of 140 eV at 5.9 keV. The TXRF geometry used was 0° , 90° and Lucite carrier–detector distance was 12 mm. The acquisition time was set to 100 s for each measurement. The obtained X-ray fluorescence spectra were evaluated by software QXAS distributed by International Atomic Energy Agency (Bernasconi and Tajani, 1996).

3. Results and discussions

The methodology was validated by analysis of standard reference material from NIST (bovine liver—1577b). The results with relative error varied from 0.01 for Potassium and 0.21 for Rubidium. The obtained results agree well with the certified values.

By using the SR-TXRF technique it was possible to detect the following elements: P, S, K, Ca, Fe, Cu, Zn and Rb. Fig. 1 shows a typical X-ray fluorescence spectrum of a sample of a prostate tissue with BPH. Table 1 shows the mean elemental concentration with confidence intervals ($\alpha=0.05$) and median values for normal prostate, BPH and PCa tissues. The elements that showed higher concentration levels were P, S and K. The results showed that there was a reduction in the concentration of S, K, Ca, Fe, Zn and Rb on the two pathologies studied (PCa and BPH), as comparing with the concentrations obtained in normal tissues. The elemental concentration values determined in this work are close to the values found in the literature (Zaichick et al., 1997; Vartsky et al., 2003; Yaman et al., 2005; Kwiatek et al., 2005).

For a non-parametric comparison of two groups Mann-Whitney U test was applied in order to verify if there were statistical differences between BPH and normal population and between PCa and normal

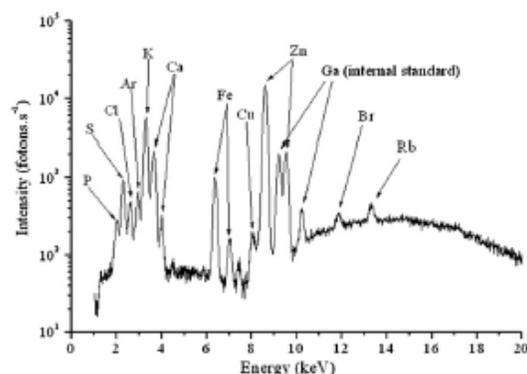


Fig. 1. The X-ray fluorescence spectrum of a prostatic tissue sample with BPH.

Table 1

Mean values with confidence intervals and medians of concentrations of trace elements in the prostate tissue.

Element	Mean with confidence intervals ($\mu\text{g g}^{-1}$)		Median ($\mu\text{g g}^{-1}$)
	BPH	Cancer	Normal
P	3422 ± 299 3243	3621 ± 684 3751	2852 ± 564 2743
S	8662 ± 546 8548	6871 ± 1140 6516	10756 ± 1587 10331
K	1744 ± 211 1488	1456 ± 327 1236	3839 ± 415 3934
Ca	861 ± 94 707	658 ± 109 665	2715 ± 1207 1435
Fe	63 ± 11 45	35 ± 9 30	173 ± 55 164
Cu	3.5 ± 0.5 3.0	4.5 ± 1.0 4.0	ND ^a
Zn	420 ± 43 372	210 ± 44 192	699 ± 221 493
Rb	7 ± 1 6	8 ± 1 8	12 ± 2 12

^a ND=Not detected.

population. In this case it was used a level of significance of 5% in all tests. All statistic analyses were performed by SPSS 15.0 for windows software (SPSS Inc., Chicago, USA).

Mann-Whitney U for BPH and normal population presented significant differences between the median concentrations of the elements K, Ca, Fe, Zn and Rb. It can be observed a decrease of concentration of K (62%), Ca (51%), Fe (73%), Zn (25%) and Rb (50%) in samples with BPH as compared to samples of normal prostatic tissue. Besides, the test presented statistical differences between the normal samples and PCa population for the elements S, K, Fe, Zn and Rb, particularly, a decrease of concentrations of S (37%), K (69%), Ca (54%), Fe (82%), Zn (61%) and Rb (38%) in PCa was observed, as compared to the median concentrations obtained in normal tissue. In addition, statistically significant differences between samples with PCa and BPH were found for concentrations of S, Fe and Zn, a decrease of concentrations of S (24%), Fe (33%) and Zn (48%) in tissues samples of prostate with cancer was observed as compared to tissues samples with BPH. Besides, it has been showed in literature that trace elements have essential physiological functions such as maintenance and regulation of cell function, gene regulation, activation or inhibition of enzymatic reactions, and regulation of membrane function. Essential or toxic

(mutagenic, carcinogenic) properties of trace elements depend on tissue-specific need or tolerance, respectively (Zaichick, 2006).

In this study it was observed that the concentration of zinc decreases in prostate tissue with cancer as compared to normal prostatic tissue. This result is close to another work in literature (Zaichick et al., 1997). Accumulation of cellular zinc and secretion of zinc into the prostatic fluid in prostate glands are essential functions of the prostate secretory epithelial cell (Liping Huang et al., 2006). The highest levels of zinc are found in the mitochondria and prevent citrate oxidation by Krebs cycle. The decrease in citrate oxidation represents 65% of the adenosine triphosphate (ATP) efficiency (Zaichick et al., 1997, Costello and Franklin, 2006). In prostate cancer, the malignant cells undergo a metabolic transformation from citrate-producing to citrate oxidizing cells. This occurs because of the loss of the ability of the malignant cells to accumulate zinc. The absence of high mitochondrial zinc levels removes the inhibition of m-aconitase activity. Citrate is then oxidized and the typical complete oxidation of glucose restores the efficient ATP production. For a detailed description of the relationships of citrate metabolism and zinc in prostate see recent reviews (Costello and Franklin, 2006, Franklin and Costello, 2007). However it has been reported that zinc concentration may vary according to age (Zaichick, 2004) and should be considered that the patients of PCA group are older than the patients of normal group. Then, it is still unknown how exactly it is the relationship between zinc accumulation capability and the development of prostate disease.

4. Conclusions

SR-TXR proved to be a highly efficient technique in the analysis of biological samples, being capable of determining low elemental concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$). It was possible to determine the concentrations of the elements P, S, K, Ca, Fe, Cu, Zn and Rb. Analysis using Mann-Whitney *U* test showed, with 5% of significance, that there was a decrease in K, Ca, Fe, Zn and Rb concentration in BPH as compared to normal prostatic tissues. On the other hand in PCA, the Mann-Whitney *U* showed that there was a reduction of S, K, Ca, Fe, Zn and Rb, therefore suggesting an association of these elements with carcinogen processes. The PCA and BPH samples present significant differences only for S, Fe and Zn. The PCA samples presented a 61% reduction of Zn

concentration, as compared to normal prostate tissues, suggesting that this element can be a bioindicator for prostate illness.

Acknowledgments

This work was partially developed at Brazilian National Synchrotron Light Laboratory (projects XRF 5959 and XRF 6736) and had the financial support of CNPq and FAPERJ.

References

- Banudevi, S., Senthilkumar, K., Sharmila, G., Arunkumar, R., Vijayababu, M.R., Arunakaran, J., 2010. Effect of zinc on regulation of insulin-like growth factor signaling in human androgen-independent prostate cancer cells. *Clin. Chim. Acta.* 411, 172–178.
- Bernasconi, G., Tajani, A., 1996. Quantitative X-ray Analysis System (QXAS) Software, Package: Documentation Version 1.2. International Atomic Energy Agency, Vienna.
- Costello, L.C., Franklin, R.B., 2006. Concepts of citrate production and secretion by prostate 1. Metabolic relationships. *Prostate* 68, 25–46.
- Franklin, R.B., Costello, L.C., 2007. Zinc as an anti-tumor agent in prostate cancer and in other cancers. *Arch. Biochem. Biophys.* 463, 211–217.
- Kirby, R.S., 2000. The natural history of benign prostatic hyperplasia: what have we learned in the last decade? *Urology* 56, 3–6.
- Kubala-Kukus, A., Banas, D., Braziewicz, J., Gózdź, S., Majewska, U., Pajek, M., 2007. Analysis of elemental concentration censored distributions in breast malignant and breast benign neoplasm tissues. *Spectrochim. Acta. Part B* 62, 695–701.
- Kwiatek, W.M., Banas, A., Gajda, M., Pawlicki, B., Falkenberg, G., Gchocki, T., 2005. Cancerous tissues analyzed by SRXRF. *J. Alloys Compd.* 401, 173–177.
- Liping Huang, L., Kirschke, C.P., Zhang, Y., 2006. Decreased intracellular zinc in human tumorigenic prostate epithelial cells: a possible role in prostate cancer progression. *Cancer Cell Int.* 6, 10.
- Sarafova, A.G., Todorov, T.I., Kajdacsy-Ballac, A., Grayd, M.A., Maciasec, V., Centeno, J.A., 2008. Analysis of iron, zinc, selenium and cadmium in paraffin-embedded prostate tissue specimens using inductively coupled plasma mass-spectrometry. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 22, 305–314.
- Vartsky, D., Shilstein, S., Berzovich, A., Huszar, M., Breskin, A., Chechik, R., Korotinsky, S., Malnick, S.D., Moriel, E., 2003. Prostatic zinc and prostate specific antigen: an experimental evaluation of their combined diagnostic value. *J. Urol.* 170, 2258–2262.
- Yaman, M., Atici, D., Bakirdere, S., Akdeniz, I., 2005. Comparison of trace metal concentrations in malign and benign human prostate. *J. Med. Chem.* 48, 630–634.
- Zaichick, V., 2004. INAA and EDXRF applications in the age dynamics assessment of Zn content and distribution in the normal human prostate. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 262, 229–234.
- Zaichick, V., 2006. Medical elementology as a new scientific discipline. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 269, 303–309.
- Zaichick, V.Y.E., Sviridova, T.V., Zaichick, S.V., 1997. Zinc in the human prostate gland: normal, hyperplastic and cancerous. *Int. Urol. Nephrol.* 29 (5), 565–574.