



COPPE/UFRJ

ANÁLISE MULTIELEMENTAR DE TECIDOS DE PRÓSTATA
USANDO FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR REFLEXÃO TOTAL
E RADIAÇÃO SÍNCROTRON

Roberta Gama Leitão

Dissertação de Mestrado 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 Mestre em Ciências em Engenharia Nuclear.

Orientador: Ricardo Tadeu Lopes

Rio de Janeiro

Fevereiro de 2009

ANÁLISE MULTIELEMENTAR DE TECIDOS DE PRÓSTATA
USANDO FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR REFLEXÃO TOTAL
E RADIAÇÃO SÍNCROTRON

Roberta Gama Leitão

DISSERTAÇÃO 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 MESTRE EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA NUCLEAR.

Aprovada por:

Prof. Ricardo Tadeu Lopes, D.Sc.

Prof. Marcelino José dos Anjos, D.Sc.

Prof. Edgar Francisco Oliveira de Jesus, D.Sc.

Prof. Luiz Eurico Nasciutti, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

FEVEREIRO DE 2009

LEITÃO, ROBERTA GAMA

Análise Multielementar de Tecidos de Próstata usando Fluorescência de Raios X por Reflexão Total e Radiação Síncrotron /Roberta Gama Leitão. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2009.

XIX, 109 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: Ricardo Tadeu Lopes

Dissertação – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Nuclear, 2009.

Referencias Bibliográficas: p. 68-78.

1. Fluorescência de Raios X. 2. Próstata. 3. Câncer. 4. Radiação Síncrotron. I. Lopes, Ricardo Tadeu. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Nuclear. III. Título.

*A minha família, pelo amor e dedicação,
e por minha educação e formação.*

*“O futuro pertence àqueles que acreditam
na beleza de seus sonhos.”
(Eleanor Roosevelt)*

AGRADECIMENTOS

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

Ao professor Ricardo Tadeu Lopes por sua orientação, pelo auxílio e atenção durante a elaboração deste trabalho e por permitir o desenvolvimento desta dissertação.

Ao professor Marcelino por sua orientação, disponibilidade, pelos conhecimentos transmitidos, pelas críticas construtivas, pelo incentivo, paciência para com as minhas dificuldades, oportunidade de desenvolver esta dissertação e por sua amizade.

Ao Dr. Luiz Eurico Nasciutti, chefe do Laboratório de Interações Celulares do ICB/CCS/UFRJ, pelo fornecimento das amostras e comprometimento durante a elaboração deste trabalho.

Ao Dr. Pedro Souza, do Laboratório de Interações Celulares do ICB/CCS/UFRJ, pelo fornecimento das amostras e comprometimento durante a elaboração deste trabalho.

A Ms. Catarine Leitão, amiga e colaboradora neste estudo, pela ajuda na preparação das amostra e desenvolvimento deste trabalho, pela dedicação, paciência, incentivo e amizade.

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

Ao aluno Antônio Palumbo Júnior, do Laboratório de Interações Celulares do ICB/CCS/UFRJ, pela disponibilidade e ajuda na elaboração deste trabalho.

Agradeço a minhas amigas Patrícia, Michele, Sheila e Maria Angélica pelo apoio, pelo incentivo nas horas difíceis e pelo carinho e amizade.

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

Agradeço a todos os funcionários do laboratório de Instrumentação Nuclear.

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.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), 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 Dissertação apresentada à COPPE/ UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau em Mestre em Ciências (M.Sc.)

ANÁLISE MULTIELEMENTAR DE TECIDOS DE PRÓSTATA
USANDO FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR REFLEXÃO TOTAL
E RADIAÇÃO SÍNCROTRON

Roberta Gama Leitão
Fevereiro/2009

Orientadores: Ricardo Tadeu Lopes
Marcelino José dos Anjos

Programa: Engenharia Nuclear

O câncer de próstata é o sexto tipo de câncer mais comum em todo o mundo, correspondendo cerca de 10% do total de casos de câncer. No Brasil, o câncer de próstata é a segunda neoplasia mais freqüente nos homens, ficando atrás dos tumores de pele não melanona, e foi estimado cerca de 49.530 novos casos em 2008. Neste trabalho foi utilizada a técnica de Fluorescência de Raios X por Reflexão Total com Radiação Síncrotron (SRTXRF) para analisar as concentrações elementares em amostras de tecidos de próstata com câncer, com Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) e em amostras de tecidos prostático normal. Foram analisados 73 amostras de tecidos de próstata, sendo 12 amostras com câncer, 53 amostras com HPB e 8 amostras normais. A SRTXRF foi realizada na linha de Fluorescência de Raios X no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas, São Paulo. Foi possível determinar as concentrações dos seguintes elementos: P, S, Cl, K, Ca, Fé, Cu, Zn, Br e Rb. Utilizando o teste não paramétrico Mann-Whitney U foi observado que quase todos elementos apresentam concentrações com diferenças significantes ($\alpha = 0,05$) entre os grupos estudados. Os elementos e grupos foram: S, Cl, K, Ca, Fe, Zn, Br e Rb (PCa X Normal); S, Cl, Fe, Zn e Br (PCa X HPB); Cl, K, Ca, Fe, Zn, Br, Rb (HPB X Normal).

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

MULTIELEMENTAR ANALYSIS OF PROSTATE TISSUES
USING TOTAL REFLECTION X RAY FLUORESCENCE
AND SYNCHROTRON RADIATION

Roberta Gama Leitão

February/2009

Advisors: Ricardo Tadeu Lopes

Marcelino José dos Anjos

Department: Nuclear Engineering

Prostate cancer is the sixth cancer more common all over the world, accounting for approximately 10% of all cancer cases. In Brazil, prostate cancer is the second kind of cancer more frequent in man leaving behind just the skin neoplasm no-melanoma. It was estimated that approximately 49.530 new cases in 2008. In this work was used Total Reflection X-Ray Fluorescence Spectroscopy using Synchrotron Radiation (SRTXRF) technique to analyze the elemental concentrations in samples of tissues with prostate cancer and Benign Prostate Hyperplasia (BPH) and in samples of normal prostate tissues. 73 samples of prostate tissues were analyzed, in that 12 samples with cancer, 53 samples with BPH and 8 normal samples. The SRTXRF was carried out in the XRF beam line at the Synchrotron Light National Laboratory (LNLS) in Campinas – São Paulo. It was possible to determine the concentrations of the following elements: P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn, Br e Rb. By using not test parametric Mann-Whitney U it was observed that almost all elements presented concentrations with significant differences ($\alpha = 0.05$) between the groups studied. The elements and groups were: S, Cl, K, Ca, Fe, Zn, Br and Rb (PCa X Normal); S, Cl, Fe, Zn and Br (PCa X HPB); Cl, K, Ca, Fe, Zn, Br and Rb (HPB X Normal).

ÍNDICE

	Página
CAPÍTULO I	01
INTRODUÇÃO	01
I.1– ESTIMATIVAS PARA O SURGIMENTO DO CÂNCER NO MUNDO	01
I.2 – O CÂNCER DE PRÓSTATA E SUA INCIDÊNCIA	01
I.3 – RELEVÂNCIA	02
I.4 – AMOSTRAGEM UTILIZADA	02
I. 5 – OBJETIVOS	03
I.6 – SEQUENCIA DESTA DISSERTAÇÃO	03
CAPÍTULO II	05
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	05
II - ANÁLISE MULTIELEMENTAR POR FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X.	05
II.1 – ANÁLISE EM TECIDOS BIOLÓGICOS	05
II.2 – ANÁLISE EM TECIDOS DE PRÓSTATA	07
CAPÍTULO III	10
FUNDAMENTOS TEÓRICOS	10
III. 1– CÂNCER	10
III. 2. A PRÓSTATA	11
III. 2. 1. PROSTATITE	14

III. 2. 2. HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA	15
III. 2. 3. CÂNCER DE PRÓSTATA	16
III. 3. A FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X	19
III. 3. 1 - FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR REFLEXÃO TOTAL (TXRF)	24
III. 3. 1. 2. ANÁLISE QUANTITATIVA POR TXRF	28
III. 3.2. LIMITE DE DETECÇÃO	31
III.3. 3. RADIAÇÃO SÍNCROTRON	32
CAPÍTULO IV	34
MATERIAIS E MÉTODOS	34
IV.1 – AMOSTRAGEM	34
IV.2 – PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS	34
IV. 2. 1. AMOSTRAS DE PRÓSTATA	34
IV. 2. 2. BRANCO	35
IV. 2. 3. AMOSTRAS CERTIFICADAS	36
IV.3 - CURVA DE SENSIBILIDADE	36
IV.4 - ARRANJO EXPERIMENTAL	37
IV.5 - LABORATÓRIO NACIONAL DE LUZ SÍNCROTRON (LNLS)	41
IV.6 TRATAMENTO ESTATÍSTICO	42

CAPÍTULO V	44
RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
V.1. – CURVA DE SENSIBILIDADE RELATIVA	44
V.1.1 – PRIMEIRA ETAPA DE MEDIDAS EXPERIMENTAIS	45
V.1.2 - SEGUNDA ETAPA DE MEDIDAS EXPERIMENTAIS	46
V.3 – LIMITE DE DETECÇÃO	47
V.2 - ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE CERTIFICADAS	49
V.3 - ANÁLISE DOS RESULTADOS	50
CAPÍTULO VI	66
CONCLUSÕES E SUGESTÕES	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
APÊNDICE A	79
A.1 – FORMAÇÃO DE UM TUMOR	79
A.2 – CÂNCER	80
A.2.1 – FORMAÇÃO DO CÂNCER	80
A.2.2 – CATEGORIAS	81
A.2.3 – ORGANIZAÇÃO	82
A.2.4 – CAUSAS	82
A.2.5 – ESTIMATIVAS	84

APÊNDICE B	88
B.1 - DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DAS AMOSTRAS DE PRÓSTATA COM HPB	88
B.2 - DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DAS AMOSTRAS DE PRÓSTATA COM CÂNCER	93
B.3 - DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DAS AMOSTRAS DE PRÓSTATA NORMAIS	98
APÊNDICE C	103
C.1 – DISTRIBUIÇÕES DE FREQUENCIAS	103
C.1.1 – CARACTERISTICAS DE UMA DISTRIBUIÇÃO	103
C.1.1.1 - MEDIDAS DE TENDÊNCIA CENTRAL	103
C.1.1.2 - MEDIDAS DE POSIÇÃO	104
C.1.1.3 - MEDIDAS DE DISPERSÃO.	105
C.2 – DISTRIBUIÇÃO NORMAL	106
C.2.1 - OS PARÂMETROS DA DISTRIBUIÇÃO NORMAL	106
C.3 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	106
C.3.1 – ESCOLHA DO TESTE ESTATÍSTICO	106
C.3.1.1 – TESTES PARAMÉTRICOS	107
C.3.1.2 - TESTES NÃO-PARAMÉTRICOS	108
C.3.2 - COMPARAÇÕES ENTRE AMOSTRAS	108

INDÍCE DE FIGURAS

	página
3.1 Ilustração da parte externa da próstata e de outros órgãos e da parte interna da próstata, uretra, reto e bexiga	12
3.2 Ilustração anatômica da próstata dividida em zonas e disposição das doenças da próstata por zona	13
3.3 Sistema de gradação histológico de Gleason	19
3.4 Diagrama esquemático mostrando os processos de absorção e de decaimento para o Oxigênio	21
3.5 Representação esquemática do ângulo crítico (em minutos) para os Raios X do Mo e Cu, incidindo sobre quartzzo	26
3.6 Geometria de excitação/deteccção da TXRF, com as linhas pretas representando os raios X incidentes e espalhados, e as coloridas os característicos	27
3.7 Desenho esquemático do sistema de SRTXRF	32
4.1 Amostras sendo liofilizadas	35
4.2 Recipiente graduado com amostra de próstata triturada	36
4.3 Esquema de preparação de amostras	37
4.4 Vista geral da Linha D09B-XRF	38
4.5 Arranjo experimental (Setembro de 2007)	38
4.6 Arranjo experimental - porta amostra e detector (Setembro de 2007)	39
4.7 Vista geral do anel de armazenamento	42
5.1 Curva da Sensibilidade Relativa (S_{Ri}) para a linha K (Setembro de 2007)	46
5.2 Curva da Sensibilidade Relativa (S_{Ri}) para a linha K (Março de 2008)	47
5.3 Limite de deteccção para amostras de fígado bovino	48

5.4 Espectro característico de uma amostra de próstata com HPB obtido com feixe branco	50
5.5 Espectro característico de uma amostra de próstata com HPB obtido com feixe quasi-monocromático de 16 keV	51
5.6 Ilustração do gráfico Box –Plot	54
5.7 Comparação de concentração de fósforo na próstata entre os grupos HPB, câncer e normal	55
5.8 Comparação de concentração de enxofre na próstata entre os grupos HPB, câncer e normal	55
5.9 Comparação de concentração de cloro na próstata entre os grupos HPB, câncer e normal	56
5.10 Comparação de concentração de potássio na próstata entre os grupos HPB, câncer e normal	56
5.11 Comparação de concentração de cálcio na próstata entre os grupos HPB, câncer e normal	57
5.12 Comparação de concentração de ferro na próstata entre os grupos HPB, câncer e normal	57
5.13 Comparação de concentração de cobre na próstata entre os grupos HPB e câncer	58
5.14 Comparação de concentração de zinco na próstata entre os grupos HPB, câncer e normal	58
5.15 Comparação de concentração de bromo na próstata entre os grupos HPB, câncer e normal	59
5.16 Comparação de concentração de bromo na próstata entre os grupos HPB, câncer e normal	59
A.1 Ilustração do crescimento de um tumor	80
A.2 Distribuição de novos casos por região do Brasil	87

B.1	Distribuição de frequência de fósforo em amostras de próstata com HPB.	88
B.2	Distribuição de frequência de enxofre em amostras de próstata com HPB.	89
B.3	Distribuição de frequência de cloro em amostras de próstata com HPB	89
B.4	Distribuição de frequência de potássio em amostras de próstata com HPB.	90
B.5	Distribuição de frequência de cálcio em amostras de próstata com HPB.	90
B.6	Distribuição de frequência de ferro em amostras de próstata com HPB.	91
B.7	Distribuição de frequência de cobre em amostras de próstata com HPB.	91
B.8	Distribuição de frequência de zinco em amostras de próstata com HPB.	92
B.9	Distribuição de frequência de bromo em amostras de próstata com HPB.	92
B.10	Distribuição de frequência de cloro em amostras de próstata com HPB.	93
B.11	Distribuição de frequência de fósforo em amostras de próstata com câncer.	93
B.12	Distribuição de frequência de enxofre em amostras de próstata com câncer.	94
B.13	Distribuição de frequência de cloro em amostras de próstata com câncer.	94
B.14	Distribuição de frequência de potássio em amostras de próstata com câncer.	95
B.15B	Distribuição de frequência de cálcio em amostras de próstata com câncer.	95
B.16	Distribuição de frequência de ferro em amostras de próstata com câncer.	96
B.17	Distribuição de frequência de cobre em amostras de próstata com câncer.	96
B. 18	Distribuição de frequência de zinco em amostras de próstata com câncer.	97
B. 19	Distribuição de frequência de bromo em amostras de próstata com câncer.	97
B.20	Distribuição de frequência de rubídio em amostras de próstata com câncer.	98
B.21	Distribuição de frequência de fósforo em amostras de próstata normal.	98
B.22	Distribuição de frequência de enxofre em amostras de próstata normal.	99
B.23	Distribuição de frequência de cloro em amostras de próstata normal.	99

B.24 Distribuição de frequência de potássio em amostras de próstata normal.	100
B.25 Distribuição de frequência de cálcio em amostras de próstata normal.	100
B.26 Distribuição de frequência de ferro em amostras de próstata normal.	101
B.27 Distribuição de frequência de zinco em amostras de próstata normal.	101
B. 28 Distribuição de frequência de bromo em amostras de próstata normal.	102
B.29 Distribuição de frequência de fósforo em amostras de próstata normal.	102
C.1. Tipos de distribuições	103
C.2. Divisão em quartis	105

INDÍCE DE TABELAS

	página
4.1 Condições experimentais da primeira etapa de medidas	40
4.2 Condições experimentais da segunda etapa de medidas	40
5.1 Concentrações nos padrões usados para levantamento da curva de sensibilidade para a linha K	44
5.2 Sensibilidade relativa para as linhas K	45
5.3 Limites de detecção para as amostras de fígado bovino por SRTXRF	48
5.4 Comparação dos valores medidos e os certificados de fígado bovino	49
5.5 Concentração média \pm intervalo de confiança e mediana para os grupos HPB, Câncer e Normal	52
5.6 Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) para os grupos HPB, Câncer e Normal encontrados na literatura	53
5.7. Erros relativos entre os grupos Câncer, HPB e Normal	59
A.1 Estimativas, para o ano 2008, do número de mortes s de câncer nos EUA, em homens e mulheres, segundo localização primária	85
A.2 Estimativas, para o ano 2008, do número de novo casos s de câncer nos EUA, em homens e mulheres, segundo localização primária	86
A.3 Estimativas, para o ano 2008, do número de novos casos de câncer no Brasil, em homens e mulheres, segundo localização primária	86
C.1 Testes estatísticos para a comparação entre os parâmetros de grupos de dados com distribuição paramétrica	108
C.2 Testes estatísticos para a comparação entre os parâmetros de grupos de dados com distribuição não paramétrica	109

INDÍCE DE NOMENCLATURAS

AAS - Espectrometria de absorção atômica.

ABCANCER – Associação Brasileira do Câncer

ABRALE - Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia

ACS - American Cancer Society

CCS - Centro de Ciência da Saúde

COPPE - Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia

DHSS - Delaware Health and Social Services

EDXRF - Fluorescência de raios X por dispersão de energia

Gráfico Box-Plot – Gráfico de caixa

HPB – Hiperplasia Prostática Benigna

HpGe - Germânio hiperpuro

IAEA - Agência Internacional de Energia Atômica

ICB - Instituto de Ciências Biomédicas

INAA – Ativação Instrumental por Ativação Neutrônica

INCA – Instituto Nacional do Câncer

LMD - Limite mínimo detectável

LNLS - Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

NCI - National Cancer Institute

PCa – Câncer de próstata

PIXE - Emissão de raios X induzida por prótons.

PSA - Antígeno específico da próstata

SR – Radiação síncrotron

SRIXE - Emissão de Raios X induzida por Radiação Síncrotron

SRTXRF - Fluorescência de raios X por Reflexão Total com Radiação Síncrotron

TXRF - Fluorescência de raios X por Reflexão Total

WDXRF - Fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda

XANES - Espectrometria de alta resolução na borda de absorção

XRF - Fluorescência de raios X

μ SRXRF - Microfluorescência de raios X com Radiação Síncrotron

μ XANES - Microespectrometria de alta resolução na borda de absorção

μ XRF - Microfluorescência de raios X

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

I.1 – ESTIMATIVAS PARA O SURGIMENTO DO CÂNCER NO MUNDO

Nos últimos anos o aumento da mortalidade causado por neoplasias tem gerado um enorme número de estudos. O desenvolvimento de novas técnicas pode possibilitar uma melhor compreensão sobre as neoplasias assim como suas possíveis causas, medidas de prevenções, precocidade, precisão nos diagnósticos e melhoria nos tratamentos clínicos. O câncer é a neoplasia mais freqüente em todo o mundo, pois não se trata de uma doença única e sim um conjunto de mais de 200 patologias (ABRALE, 2008). Nos Estados Unidos da América (EUA), o câncer é a segunda maior causa de mortes sendo responsável por 1 em 4 mortes. Em 2008, espera-se diagnosticar aproximadamente 1.437.180 novos casos de câncer (ACS, 2008). No Brasil, as estimativas para o ano de 2008, válidas também para o ano de 2009, apontam que ocorreram 466.730 casos novos de câncer (INCA, 2008).

I.2 – O CÂNCER DE PRÓSTATA E SUA INCIDÊNCIA

O câncer de próstata é o sexto tipo de câncer mais comum em todo o mundo e corresponde cerca de 10% do total de casos de câncer (INCA, 2008). Nos Estados Unidos, este tipo de câncer é responsável por cerca de 28.660 das mortes e estima-se que em 2008 serão diagnosticados 186320 novos casos (NCI, 2008). No Brasil, o câncer de próstata é a segunda neoplasia mais freqüente nos homens, ficando atrás dos tumores de pele não melanoma. No ano de 2008, são esperados cerca de 49.530 novos casos de câncer de próstata no Brasil (INCA, 2008).

I.3 – RELEVÂNCIA

A análise multielementar em tecidos de próstata a fim de determinar a correlação entre a concentração de certos elementos e o câncer prostático já foi relatada em outros estudos (IDE-EKTESSABI et al, 2002; YAMAN et al, 2005; KWIATEK et al, 2005, 2007), porém ainda não foi possível determinar se a alteração da concentração elementar é uma consequência da patologia ou se esses elementos químicos estão associados ao desenvolvimento da neoplasia na próstata.

A XRF é uma técnica analítica multielementar bastante difundida e com aplicações em várias áreas da ciência e tecnologia. Tem como princípio físico básico a produção de raios X característicos emitidos por átomos presentes em uma amostra quando devidamente excitada. Alguns elementos (cobre e rubídio) presentes nos tecidos prostáticos estão em concentrações muito baixas, da ordem de $1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Estas concentrações baixas tornam o uso da XRF impróprio devido ao limite de detecção. Portanto, a utilização da TXRF devido ao seu limite de detecção da ordem de $1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ foi utilizada. A TXRF que é uma variante da XRF foi utilizada nesse estudo a fim de identificar e quantificar a concentração multielementar presente no tecido de próstata de indivíduos portadores de PCa, de portadores de HPB e de indivíduos sem estas patologias prostáticas (grupo normal). Espera-se que os resultados sejam relevantes para a determinação de um elemento ou um grupo de elementos associado a um bioindicador para o desenvolvimento de câncer de próstata de seus estágios

I.4 – AMOSTRAGEM UTILIZADA

As amostras de próstata utilizadas neste estudo foram cedidas pelo Laboratório de Interações Celulares nos Sistemas Endócrino e Reprodutor do Departamento de Histologia e Embriologia do ICB/CCS/UFRJ. As amostras de próstata com patologias foram provenientes de pacientes submetidos a biopsias e as amostras controle proveniente de indivíduos que sofreram morte inesperada.

A preparação de amostras foi realizada no Laboratório de Química de Apoio aos Usuários, instalado no LNLS assim como todas as medidas experimentais deste trabalho foram realizadas na linha XRF também do LNLS, instalado em Campinas, S.P.

A análise dos resultados foi realizada no Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN) que pertence ao Programa de Engenharia Nuclear do Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia (COPPE) localizado na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

I. 5 - OBJETIVOS

Este Trabalho teve como objetivo principal analisar a composição química multielementar presente em amostras de tecido prostático de portadores de câncer de próstata, de portadores de hiperplasia prostática benigna (HPB) e de indivíduos sem as patologias prostáticas citadas (grupo normal).

Os objetivos específicos são:

1. Usar a Técnica de Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF) para obter quantitativamente e qualitativamente o perfil multielementar em amostras de tecido de próstata humana de portadores de PCa e HPB e de indivíduos normais (grupo controle);
2. Analisar as diferenças entre as concentrações elementares de amostras com patologias e as amostras com ausência das patologias citadas, utilizando testes estatísticos;
3. Comparar os resultados obtidos neste trabalho e os descritos na literatura.
4. Verificar a possibilidade de usar um elemento ou um grupo de elementos como bioindicador para a determinação do câncer de próstata e seus estágios;

I.6 – SEQUENCIA DESTA DISSERTAÇÃO

Este trabalho terá a seguinte seqüência:

Capítulo II - Será apresentada uma revisão bibliográfica do estado da arte da técnica de fluorescência de raios X aplicada na análise de tecidos cancerígenos e em especial em tecidos de próstata.

Capítulo III – Apresentação da fundamentação teórica sobre: o câncer, a próstata e suas patologias, a fluorescência de raios X, para o entendimento e desenvolvimento deste trabalho.

Capítulo IV – Constará da descrição de toda a instrumentação, preparação de amostras e da metodologia utilizada no levantamento dos perfis multielementares e na análise quantitativa.

Capítulo V – Exposição e discussão dos resultados obtidos: análise de amostras padrão e amostras de tecido de próstata, estudo comparativo e testes estatísticos.

Capítulo VI – Serão apresentadas as conclusões e sugestões sobre todo o trabalho.

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRAFICA

É bem estabelecido que vários elementos químicos desempenham papel essencial em processos biológicos, portanto exercem ação direta ou indireta em processos cancerígenos (KUBALA-KUKUS *et al*, 2007). A análise multielementar é uma ferramenta poderosa em estudos de tecidos biológicos, pois pode-se correlacionar as concentrações de certos elementos a determinadas doenças.

II.1 - ANÁLISE MULTIELEMENTAR POR FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X.

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).

II.1.1 – ANÁLISE EM TECIDOS BIOLÓGICOS

KUBALA – KUKUS *et al* (1999) estudaram a concentração de elementos traço em tecido de pulmão de 65 pacientes com câncer e 5 pacientes com tumor benigno utilizando dois métodos complementares PIXE e TXRF como técnicas analíticas. As concentrações de P, S, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Cu, Zn, Se, Sr, Hg e Pb foram calculadas e observaram que há um aumento das concentrações de Ti, Cr, e Mn e uma diminuição de Sr e Pb em tecidos com câncer.

KWIATEK *et al.* (2001) realizaram vários procedimentos de preparação de amostra para determinar o melhor procedimento para a determinação da concentração elementar em diferentes tipos de amostras de tecidos biológicos. As técnicas utilizadas foram: SRIXE, EDXRF, TXRF e PIXE.

GERAKI *et al.* (2001) analisaram amostras de tecido de mama, 10 normais e 14 com câncer utilizando um sistema de XRF. Na comparação entre tecidos saudável e com patologia utilizando o teste t , encontraram diferença significativa na concentração de Zn entre os dois grupos.

GERAKI *et al.* (2004) analisaram amostras de tecido de mama sadio e com tumor utilizando as técnicas Fluorescência de Raios X e Difração de Raios X. Os resultados obtidos com análise por XRF mostraram uma elevação nas concentrações de todos os elementos nas amostras com tumor. A análise estatística mostrou diferenças significantes entre os grupos de amostras nas concentrações dos elementos K, Fe e Zn.

CARVALHO *et al.* (2007) realizaram um estudo bibliográfico analisando diversos tecidos humanos saudáveis e com câncer utilizando quatro variantes da fluorescência de raios X (SRIXE, EDXRF, TXRF e PIXE). Concluíram que alguns elementos podem ser indicadores de câncer e que as técnicas de fluorescência de raios X se mostraram muito eficazes na análise de tecidos biológicos.

MAJEWSKA *et al.* (2007). 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. O método de Kaplan-Meier foi utilizado para a reconstrução da distribuição. Foi utilizado o teste de log-rank para comparar as amostras malignas e benignas de um mesmo tecido e para comparar as concentrações de amostras cancerosas entre os três tipos de tecidos. Foi encontrada diferença estatística entre tecidos cancerosos e não cancerosos de amostras pareadas para os elementos Fe e Se nas amostras de tecido de mama, Cu e Zn nas amostras de tecidos pulmonares e Zn nas amostras de tecido de cólon. A comparação entre tecidos cancerosos de diferentes tecidos mostrou diferença estatística para todos os elementos.

FARQUHARSON *et al.* (2007) avaliaram os elementos Cl, Ca, K, P, S, Ti, Fe, Cu e Zn em amostras de tecidos de mama com câncer através de μ XRF com Radiação Síncrotron. Através dos resultados obtidos a SR- μ XRF provou ser eficaz, pois forneceu imagens com alta resolução.

KUBALA – KUKUS *et al.* (2007) utilizaram TXRF para estudar as concentrações elementares em tecidos de mama com câncer e com tumor benigno e realizaram um estudo comparativo. Realizaram também o estimador de Kaplan-Meier para estimar os valores médios e o número médio das distribuições de concentração. O estudo comparativo mostrou que há uma elevação significativa nas concentrações de alguns elementos nas amostras com câncer.

FARQUHARSON *et al.* (2008). Examinaram amostras de tecidos de mama com tumor e sem tumor por dois métodos: para determinar a localização dos metais utilizaram μ SRXRF e para determinar o estado de oxidação de Cu nas amostras foi utilizado μ XANES. A μ SRXRF mostrou correlações entre as imagens de referência e as encontradas no estudo. As imagens obtidas mostraram um aumento nas concentrações de quase todos elementos, com exceção do Fe, nas regiões de tumor das amostras de tecido de mama. A técnica XANES determinou a presença de Cu em dois estados de oxidação Cu^{+1} e Cu^{+2} . Nas regiões de tumor foi encontrada uma maior concentração de Cu^{+2} comparada a de Cu^{+1} . A concentração de Cu^{+1} foi maior em regiões do tecido com tumor comparada com as normais.

II.1.2 – ANÁLISE EM TECIDOS DE PRÓSTATA

ZAICHICK *et al.* (1997) usaram a técnica de Fluorescência de Raios X para determinar a concentração de Zinco em amostras de 50 pacientes com Hiperplasia Prostática Benigna (HPB), 59 pacientes com câncer prostático e 37 próstatas de pessoas que morreram acidentalmente ou subitamente. Para análise estatística utilizaram o teste t de Student e concluíram que a concentração de Zn é maior em tecidos com HPB comparando com os normais, e que o tecido com câncer perde a capacidade de acumular zinco, pois apresenta concentração mais baixa do que em tecidos normais.

VARTSKY *et al.* (2003) utilizaram o método de Fluorescência de Raios X para analisar amostras de próstata de 28 pacientes com diagnósticos iniciais de HPB (21 pacientes), câncer de próstata (6 pacientes) e câncer de Bexiga (1 paciente). Os resultados obtidos mostraram que existe uma diferença significativa entre as concentrações de zinco em HPB e em câncer. Porém, em 41% dos casos houve um diagnóstico falso positivo indicando que o Zn não pode ser usado como um único indicador de patologias da próstata.

ZAICHICK *et al.* (2004) analisaram amostras de tecido de próstata de indivíduos com idades entre 5 dias e 87 anos e amostras de fluido prostático de 22 voluntários com idades entre 18 e 75 anos foram analisadas através das técnicas de INAA e EDXRF para a determinação da concentração de Zn. A concentração de Zn nas amostras de tecidos prostáticos aumentou com o aumento da idade até 55 anos e em seguida uma progressiva diminuição nos idosos, o que não ocorreu nas concentrações encontradas nas amostras de fluido prostático.

KWIATEK *et al.* (2004) investigaram a concentração elementar em amostras de tecido de próstata de pacientes com câncer de próstata e com câncer de bexiga através da técnica SRIXE e determinaram o estado de oxidação do Ferro utilizando a técnica XANES. Eles concluíram que a utilização de radiação Síncrotron foi capaz de analisar concentrações de elementos de baixo número atômico e que as duas técnicas utilizadas são complementares.

KWIATEK *et al.* (2005) analisaram amostras de próstata de pacientes com câncer e HPB utilizando a técnica SRIXE. Os espectros foram analisados utilizando o programa AXIL e os elementos detectados foram: Cl, K, Ca, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu e Zn. Concluíram que os elementos como Mn, Fe, Co, Ni, apresentam elevadas concentrações nos tecidos com câncer. Também concluíram que os elementos Cu e Zn podem indicar o avanço do Câncer de próstata pois há uma redução na concentração destes elementos em amostras com câncer.

SHILSTEIN *et al.* (2006) estudaram a concentração de Zn utilizando a técnica XRF em amostras *in vitro* de pacientes com câncer de próstata e HPB e desenvolveram um sistema de XRF para a determinação de zinco em amostras *in vivo* utilizando doses de 0,13-0,5 mGy. Os resultados da análise *in vitro* mostraram que a diminuição da

concentração de zinco está relacionada ao câncer prostático, mostrando que o poder diagnóstico do zinco nas patologias de próstata é maior que em PSA.

KWIATEK *et al.* (2007) analisaram por micro fluorescência com radiação síncrotron, amostras de próstata com HPB e normal. A técnica XANES foi utilizada para determinar o estado de oxidação do Fe e K nas amostras de próstata. Foi determinada a concentração dos elementos S, Mn, Cu, Fe e Zn. Comparando as amostras de próstata com HPB com as normais houve um aumento para as concentrações de Mn, Cu, Fe e Zn e uma redução de enxofre.

CAPÍTULO III

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

III.1 – CÂNCER

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 (ABCÂNCER, 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). O APÊNDICE A apresenta informações sobre a formação de um tumor, a formação de um tumor maligno, dados sobre as categorias, a organização, as causas e dados estatísticos sobre o câncer nos EUA e no Brasil.

III.2 - 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 do esperma. A próstata é um órgão sólido, com massa em torno de 20 gramas, se encontra 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 fâscia de Denovillier) o qual se une, acima pelo peritônio e abaixo, pelo diafragma urogenital. Na extensão pósterio-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,1972, 1998; SALVAJOLI *et al.*, 1999; NICKEL 1999). A Figura 3. 1. ilustra a próstata e outros órgãos e uma seção da próstata, uretra, reto e bexiga (NCI).

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 glândulas periuretrais e é rica em estroma, enquanto a chamada próstata externa é composta pela zona periférica e é 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%). A figura 3.2 mostra a ilustração anatômica da próstata dividida em zonas e a disposição das doenças da próstata por zona.

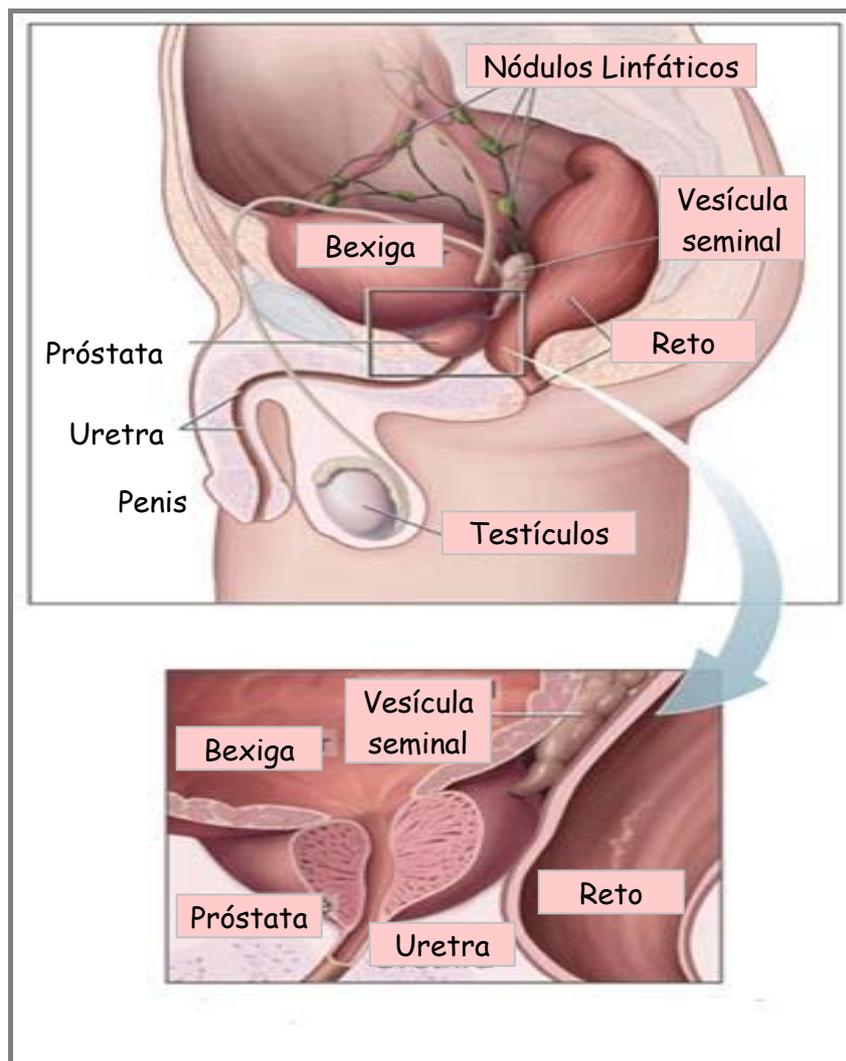


Figura 3.1. Ilustração da próstata e de outros órgãos e da seção da próstata, uretra, reto e bexiga (NCI).

A principal função da próstata é a produção do líquido prostático, este fluido, como parte do sêmen, facilita o transporte, ajuda nutrir e proteger o espermatozóide (que é produzido nos testículos) 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, esterasas e fosfatases (FAIR e CORDONNIER, 1978; WEIDNER *et al.*, 1991; ZAICHICK *et al.*, 1996; WALSH *et al.*, 2002). Entre elas o PSA que provou ser de grande importância para o diagnóstico PCa. 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).

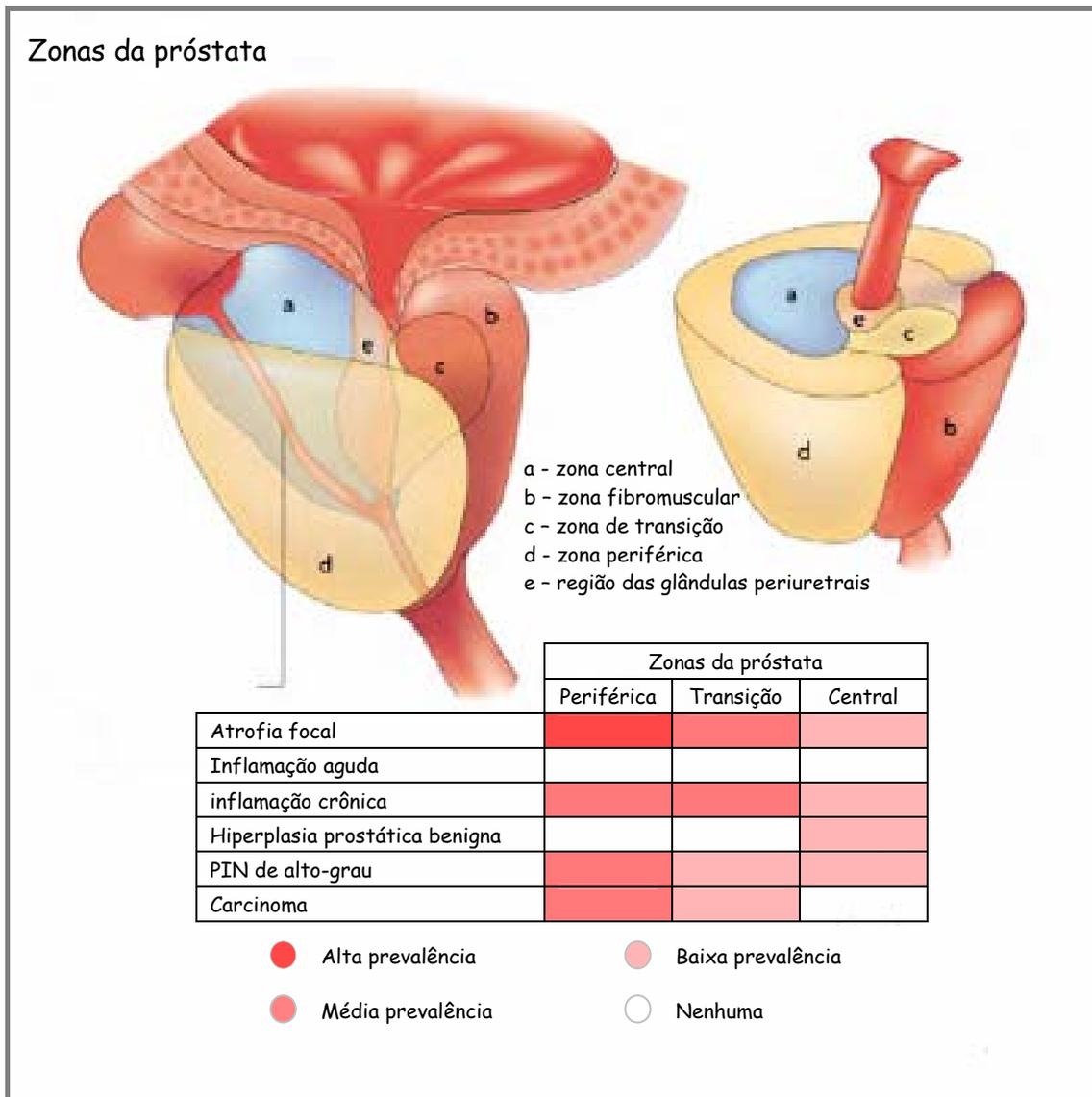


Figura 3.2. Ilustração anatômica da próstata dividida em zonas e disposição das doenças da próstata por zona. (GLAESSGEN, 2008).

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. Dentro das células glandulares a DHT se liga a proteína AR (andrógeno receptor), a DHT possui maior afinidade para

AR que a testosterona. A AR-DHT dentro de sucessões de DNA específicas, conhecido como elementos de resposta de andrógeno leva a ativação das funções da célula, como crescimento e proliferação (CARLSON e KATZENELLENBOGEN, 1990; DESLYPERE *et al.*, 1992; RUSSEL e WILSON 1994).

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 (HPB) e o câncer de próstata (PCa) (TORRES *et al.*, 2003).

III.2.1 - PROSTATITE

A prostatite ocorre devido a vários fatores: migração de bactérias através da uretra em direção à próstata, deficiências da atividade antibacteriana da secreção prostática (a falta de zinco na secreção é freqüentemente apontada), falta de anticorpos locais e sistêmicos. Cada paciente pode apresentar preponderância de um ou de mais fatores. A bactéria mais comum encontrada em prostatites infecciosas é a *Escherichia coli* (80%) a qual também é a mais encontrada em infecções do aparelho urinário. Microorganismos causadores de doenças sexualmente transmissíveis também são responsáveis por prostatites, principalmente, prostatite aguda. É o caso da *Chlamydia trachomatis* (URO PATOLOGIAS, 2008).

Existem outros tipos de prostatite, porém mais raros e não vinculadas com bactérias, como as prostatites não bacterianas (virais, fúngicas, granulomatosas). A prostatodinia seria uma situação na qual os sintomas se assemelham a prostatite. Entretanto, nenhum agente infeccioso é encontrado, ficando entre suas causas desde espasmos da musculatura perineal até estresse emocional. A prostatite pode ser classificada em quatro categorias:

- Categoria I - Prostatite bacteriana aguda,
- Categoria II - Prostatite bacteriana crônica,

- Categoria III - Prostatite crônica / síndrome dolorosa pélvica crônica,
 - III. a - Inflamatória (antiga prostatite crônica bacteriana),
 - III. b - Não-inflamatória (antiga prostatodinia).
- Categoria IV - Prostatite inflamatória assintomática.

Apesar do seu nome, a prostatite infecciosa, tanto aguda como crônica, não é uma doença contagiosa, não podendo ser considerada uma DST (doença sexualmente transmissível) (URO PATOLOGIAS, 2008).

É crítica a distinção entre pacientes com queixas do trato urinário baixo associadas a bacteriúria (cerca de 10% dos casos) daqueles que não apresentam bacteriúria (90% restantes). A maioria dos pacientes pode ser enquadrada numa das categorias seguintes: prostatite bacteriana aguda, prostatite bacteriana crônica, prostatite abacteriana e prostatodinia (BENDHACK e DAMIÃO, 1999).

III.2.2 - HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA (HPB)

A hiperplasia benigna da próstata é a doença urológica de maior prevalência em homens com idade superior a 50 anos (Guia Prático de Urologia). 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 25% 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). É causada pela obstrução infravesical provocada pelo aumento do tecido prostático periuretral correspondente a zona de transição. Ocorre devido um aumento na proliferação (hiperplasia), e não um crescimento celular propriamente dito (hipertrofia), tanto no componente estromal (muscular liso e conjuntivo) quanto no epitélio 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 (BARRY, 1984 1990; SANDA *et al.*, 1994).

III.2.3 - CÂNCER DE PRÓSTATA (PCa)

O câncer de próstata é a neoplasia mais frequentemente 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, 2008). Aproximadamente 680.000 novos casos são diagnosticados por ano no mundo (PARKIN *et al.*, 2005). Nos EUA, 186.320 novos casos são previstos para 2008, com 28.660 óbitos relacionados, sendo a segunda neoplasia em causa de morte no sexo masculino (NCI). No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer previu 49.530 novos casos para 2008, este número corresponde um risco estimado de 52 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, 2008).

As taxas de incidência desse tipo de câncer são cerca de seis vezes maiores nos países desenvolvidos, se comparadas às dos países em desenvolvimento. As taxas de mortalidade são 2,5 maiores nos países desenvolvidos, se comparadas às dos países em desenvolvimento de certas regiões do mundo, tendo uma razão mortalidade / incidência variando de 0,13 na América do Norte a 0,80 na África (NCI, INCA).

Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento dessa neoplasia, o principal é a idade, pois o PCa é raro em homens com idade inferior a 45 anos e a partir desta idade a incidência sobe exponencialmente. Nos Estados Unidos, a maioria dos homens com câncer de próstata tem idade em torno de 65 anos. 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). 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 PCa. Atualmente, não existe um marcador que seja capaz de predizer a terapia específica para o PCa. Vários sistemas de classificação são disponíveis, possuindo variável aceitação (BILLIS. 2008; BACCHI *et al.*, 1995; DÍAZ *et al.*, 2000):

- Sistema da Clínica Mayo: proposto por Utz e Farrow em 1969, que utilizando sete características patológicas (estrutura acinar, estrutura celular individualmente, características nucleares individuais, presença de nucléolo, características citoplasmáticas, atividade mitótica e grau de invasão) classifica o câncer em quatro graus. Foi pouco adotado (UTZ e FARROW, 1969).

- Sistema Mostofi: proposto por Mostofi em 1975. Constitui-se num sistema de graduação baseado na anaplasia nuclear e no grau de diferenciação glandular,

classificando-os em três graus. Ele não considera o arranjo cribriforme como de grau especial, sendo a classificação final baseada no grau predominante (MOSTOFI, 1975).

- Sistema da Organização Mundial de Saúde baseia-se no sistema de Mostofi, considerando a anaplasia e a diferenciação glandular. O grau final vem da soma do valor da anaplasia (de 1 a 3) e da diferenciação nuclear (de 1 a 5), portanto vai de 2 a 8 (MOSTOFI *et al.*, 1980).

- Sistema de Gaeta: proposto por Gaeta e Gardner em 1979 que criaram um sistema baseado em características arquiteturais e citológicas, sendo agrupado em quatro graus (MURPHY *et al.*, 1980).

- Sistema de Böcking: proposto em 1982. Baseia-se na anaplasia nuclear e na diferenciação glandular, indo de 2 a 7. A pontuação deve ser realizada segundo as áreas mais indiferenciadas da neoplasia (BÖCKING *et al.*, 1982).

- Sistema de Gleason: é atualmente, a classificação mais aceita (GLEASON 1966; EPSTEIN *et al.*, 2005; LOPEZ *et al.*, 2006). Em 1966, Donald F. Gleason publicou sua classificação que diferia das anteriores 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 (Figura 3.3). 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).

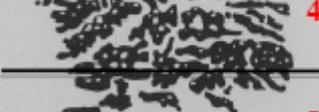
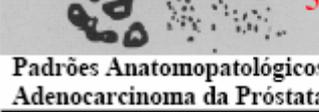
SISTEMA DE GRADAÇÃO HISTOLÓGICO DE GLEASON				
Escala de Gleason		GLÂNDULA		
	MARGENS	Padrão Glandular	Tamanho	Distribuição
 GLEASON 1	Bem definida	Simples Separadas Redondas	Médio	Pacote fechado
 2	Menos definida	Simples - Separadas Redondas Mais Variadas	Pequeno Médio Grande	Espaçamento médio de um diâmetro glandular
 3	Irregular Infiltrada	Simples, separadas, mais irregular Massas epiteliais redondas cribriformes ou papilar	Pequeno	Espaçamento médio de mais de um diâmetro glandular. Raramente em pacotes. Massas arredondadas c/
 4	Irregular Infiltrada	Massas glandulares fundidas do tipo hipernefróide	Pequeno	Massas epiteliais anaplásicas irregulares
 5	Mal definida	Poucos e pequenos lúmens envolvidos por massa epitelial sólida às vezes com necrose central	Pequeno	Massas irregulares ou cordões com contornos pouco definidos
Padrões Anatomopatológicos Adenocarcinoma da Próstata				

Figura 3.3. Sistema de gradação histológica de Gleason (GLEASON 1977).

Vários estudos têm demonstrado correlação entre o escore de Gleason e o prognóstico. 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; FERGUSON *et al.*, 1995). O escore de Gleason é um parâmetro de referência para todos os antigos e novos indicadores de prognóstico em câncer de próstata (EPSTEIN, 1993, 1994).

III.3 – A FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X (XRF)

A análise por fluorescência de raios X é um método qualiquantitativo 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 a amostra é excitada, o campo eletromagnético da radiação interage com os elétrons dos átomos do material no qual ele incide. Um fóton pode ser absorvido ou

espalhado por um átomo devido a diversos processos, entre eles, o efeito Compton, o efeito fotoelétrico e a geração de pares elétron-pósitron. Cada um desses processos possui uma probabilidade de ocorrer que depende do elemento absorvedor e da energia do fóton incidente. 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 gerados em tubos.

Uma vez que ocorre a absorção do fóton por níveis internos, o átomo fica em um estado excitado e tendem 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).

O efeito Auger é mais comum em elementos com baixo número atômico ($Z < 20$) porque os elétrons estão mais fracamente ligados e os fótons característicos são mais facilmente absorvidos. Uma das consequências do efeito Auger é que as linhas espectrais de uma dada série não são tão intensas como previsto pelo número de vacâncias criadas no orbital associado. A emissão de fótons de fluorescência e elétrons Auger são processos de decaimento concorrentes e a predominância de um ou outro depende basicamente do número atômico do elemento analisado na amostra. A emissão de elétrons Auger é a principal limitação na sensibilidade de experimentos com elementos com baixo número atômico (OLIVEIRA, 2000).

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 .

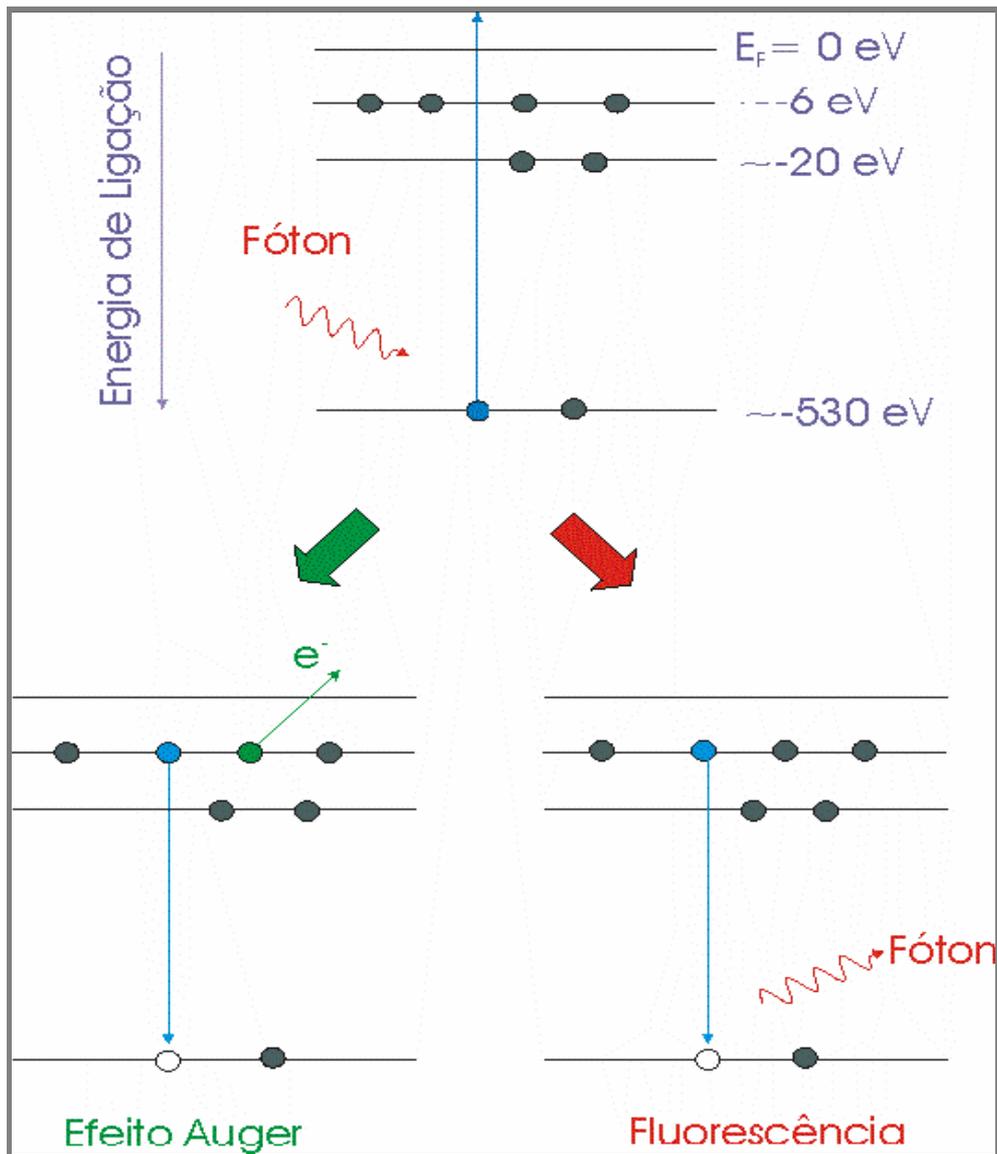


Figura 3.4. Diagrama esquemático mostrando os processos de absorção e de decaimento para o Oxigênio ((MANICA, 2006).

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-L₂ e K-L₃;

$P_{\text{fluorescência}}$ 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.3.1 - FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR REFLEXÃO TOTAL (TXRF)

Quando ocorre a passagem de um feixe de radiação monoenergético de um meio (ar ou vácuo) e atinge uma superfície plana de um dado material, pode ocorrer a refração, adentrando pelo material, ou a reflexão, sendo refletido pela sua superfície, em ângulo de emergência igual ao de incidência. A ocorrência de um ou outro processo dependerá da energia da radiação incidente, da densidade eletrônica do material e do ângulo de incidência da radiação (AIGINGER e WOBRAUSCHEK, 1974, KLOCKENKÂMPER et al., 1992).

No processo de reflexão total o ângulo de refração tende a zero e o feixe de radiação refratado tangencia a interface entre os meios 1 e 2. Conseqüentemente, há um ângulo de incidência mínimo, chamado de ângulo crítico (φ_{crit}) a partir do qual a refração não ocorre e toda radiação incidente sofre reflexão total. (COSTA, 2003). A equação 3.6 mostra o cálculo para determinar o ângulo crítico (AIGINGER e WOBRAUSCHEK, 1974, KLOCKENKÂMPER et al., 1992).

$$\Phi_{crit} = \frac{e.h}{E} \sqrt{\frac{n_e}{2.\pi.m}} \quad (3.6)$$

Onde:

Φ_{crit} = ângulo crítico, em radianos;

e = carga elétrica do elétron = $4,8.10^{-10}$ ues;

h = constante de Planck = $6,625. 10^{-27}$ erg.s;

E = energia da radiação (erg);

n_e = densidade eletrônica do material (elétrons. cm^{-3});

m = massa do elétron = $9,11. 10^{-28}$ gramas;

A densidade eletrônica do material n_e é dada pela equação 3.7:

$$n_e = \frac{N_0.\rho.Z}{A} \quad (3.7)$$

onde:

N_0 = número de Avogrado = $6,023. 10^{23}$ at/atg;

ρ = densidade do material ($g.cm^{-3}$);

Z = número de elétrons em um átomo ou molécula do material;

A = átomograma ou molécula-grama do material ($g.mol^{-1}$).

Substituindo-se os valores constantes, e utilizando-se a energia da radiação em unidades de keV ($1 \text{ keV} = 1,6. 10^{-12}$ erg), pode-se calcular o ângulo crítico ϕ_{crit} em minutos pela equação 3.8:

$$\Phi_{crit} = \frac{99,1}{E} \sqrt{\frac{\rho.Z}{A}} \quad (3.8)$$

Desse modo, se o raio X $K\alpha$ do Cu de 8,04 keV incidir sobre o quartzo (30 elétrons, $A = 60,0843 \text{ g}$ e $\rho = 2,5 \text{ g.cm}^{-3}$), o ângulo crítico ϕ_{crit} será de 13,8 minutos. Para este mesmo material, o ângulo crítico para os raios X Mo- $k\alpha$ de 17,44 keV será de 6,4 minutos (Figura 3.5).

O fenômeno de reflexão total de raios X somente ocorre se o ângulo de incidência do feixe incidente (α_1) for menor do que o ângulo crítico. Para a maioria dos refletores utilizados em TXRF este valor é menor do que $0,1^\circ$. Dois parâmetros são importantes quando ocorre a reflexão total: O coeficiente de reflexão total (R), que é aproximadamente 100% para ângulos de incidência menores do que o ângulo crítico e poder de penetração (Z_p), que para ângulos menores do que o ângulo crítico é da ordem de 10^{-9} m. Tanto o coeficiente de reflexão (R) como o poder de penetração (Z_p), podem ser calculados a partir da Teoria Clássica do Eletromagnetismo.

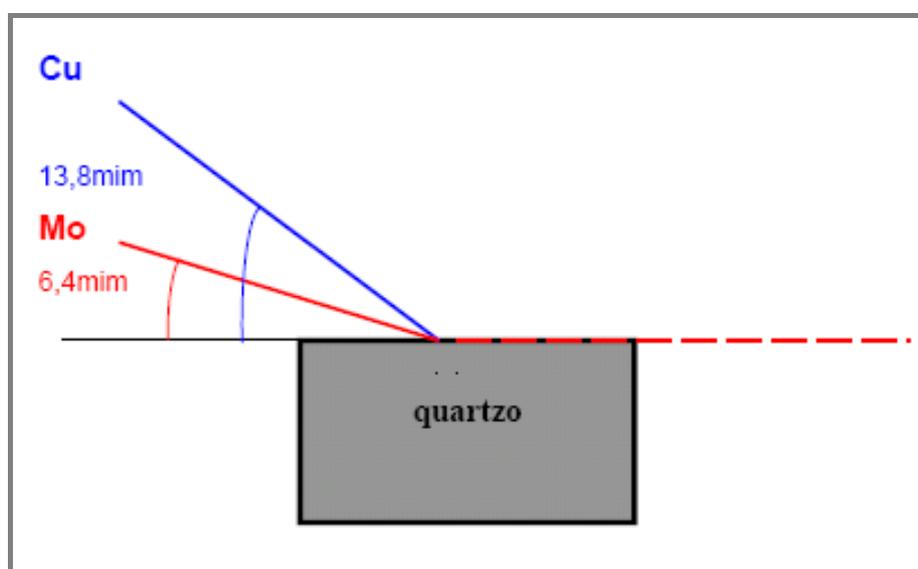


Figura 3.5. Representação esquemática do ângulo crítico (em minutos) para os Raios X do Mo e Cu, incidindo sobre quartzo (OLIVEIRA, 2004).

A técnica de TXRF (Figura 3.6) é um caso particular da Fluorescência de Raios X por Dispersão em Energia (EDXRF) que utiliza os efeitos da reflexão total de raios X numa superfície lisa e polida de um material refletor. Se um feixe colimado de radiação eletromagnética incide sobre uma superfície polida de um material num ângulo menor que o ângulo crítico, a maior parte do feixe é refletida totalmente e somente uma pequena parte do feixe sofre refração no material. Usando este fenômeno para a excitação das amostras, depositadas num material refletor, é possível obter algumas vantagens em relação a EDXRF (convencional).

As vantagens da técnica de TXRF:

- redução do *background*;
- dupla excitação da amostra por ambos os feixes primário e refletido;
- pequena distância amostra-detector ($\cong 1$ mm) – ângulo sólido grande;
- pequenos volumes da amostra;
- limites de detecção em nível de pg.

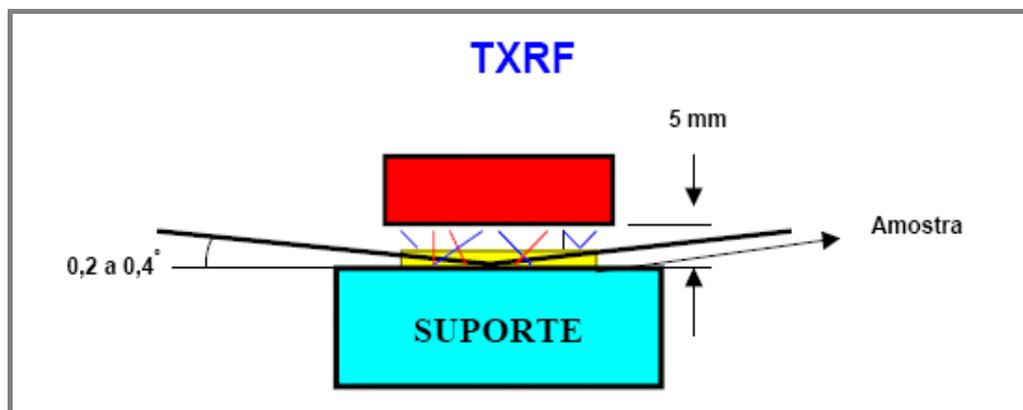


Figura 3.6. Geometria de excitação/detecção da TXRF, com as linhas pretas representando os raios X incidentes e espalhados, e as coloridas os característicos, (NASCIMENTO FILHO, 1999).

III.3.1.2 - ANÁLISE QUANTITATIVA POR TXRF

Uma característica importante da técnica de TXRF é a pequena quantidade da amostra que é utilizada para análise (μ L). Por este motivo, a amostra pode ser considerada um filme fino e os efeitos de absorção podem ser desprezados (COSTA, 2003).

Devido à diminuta espessura da amostra e alta energia dos raios X normalmente utilizados na excitação (raios X Mo- K_{α} de 17 keV), não há ocorrência do efeito de

absorção e reforço na TXRF, e, conseqüentemente, não é necessária a correção para o efeito matriz.

Neste caso, a equação básica 3.9 para análise quantitativa é a relação entre a intensidade fluorescente da linha característica K_α ou L_α e a concentração de um elemento de interesse na amostra:

$$I_i = K \cdot I_0 \cdot S_i \cdot C_i \cdot [1 + R(\alpha)] \cdot T_{ar} \quad (3.9)$$

onde:

I_i = intensidade líquida dos raios X (cps) da linha característica K ou L do elemento i de interesse;

K = constante que depende apenas de fatores geométricos;

I_0 = intensidade da radiação incidente;

S_i = sensibilidade elementar do sistema (cps.μg.L⁻¹), para o elemento i de interesse;

C_i = concentração do elemento i (ppm ou μg.mL⁻¹), na solução pipetada no suporte;

$R(\alpha)$ = coeficiente de reflexão do material utilizado como refletor para a energia da radiação incidente e α o ângulo de incidência da radiação;

T_{ar} = absorção da radiação no ar para o feixe incidente e o feixe de radiação fluorescente.

Devido à ausência do efeito matriz, pode-se determinar a sensibilidade elementar de modo simultâneo para vários elementos, utilizando-se uma solução padrão multielementar, contendo esses elementos em baixa concentração (na faixa de ppm) e emissores de raios X de energias não muito próximas, evitando a ocorrência de sobreposição de picos.

Além disso, na TXRF é possível adicionar um padrão interno à amostra e neste caso tem-se a vantagem de corrigir as instabilidades do sistema e erros operacionais.

Então com base nas sensibilidades elementares dos elementos contidos na solução padrão multielementar, pode-se estimar a sensibilidade para um elemento detectado na

amostra e, conseqüentemente, estimar a sua concentração, mesmo que o padrão não contenha este elemento.

Utilizando a equação 3.9 podemos fazer a razão entre a intensidade do elemento *i* e o padrão interno *Y*.

$$\frac{I_i}{I_y} = \frac{K \cdot I_0 \cdot S_i \cdot C_i \cdot [1 + R(\alpha)] \cdot T_{ar}}{K \cdot I_0 \cdot S_y \cdot C_y \cdot [1 + R(\alpha)] \cdot T_{ar}}$$

$$\frac{I_i}{I_y} \cdot C_y = \frac{S_i}{S_y} \cdot C_i$$

Fazendo:

$$R_i = \frac{I_i}{I_y} \cdot C_y \quad \text{e} \quad S_{Ri} = \frac{S_i}{S_{y_i}} \quad (3.10)$$

Temos:

$$R_i = S_{Ri} \cdot C_i \quad (3.11)$$

Onde:

R_i = intensidade relativa;

I_i = intensidade de elemento *i* na amostra;

C_i = concentração do elemento *i* na amostra;

I_y = intensidade do padrão interno (*Y*) na amostra;

C_y = concentração do padrão interno (*Y*) na amostra;

S_i = sensibilidade do detector para o elemento *i*;

S_Y = sensibilidade do detector para o padrão interno *Y*;

S_{Ri} = sensibilidade relativa para o elemento *i*.

O coeficiente angular (S_{Ri}) da reta, no gráfico R_i x C_i , representa a sensibilidade relativa do elemento *i*.

Com isto, pode-se calcular a concentração do elemento de interesse, utilizando-se a equação 3.12:

$$C_i = \frac{I_i}{I_y} \cdot \frac{1}{S_{Ri}} \cdot C_y \quad (3.12)$$

A função do padrão interno é eliminar o efeito de geometria, porque o filme fino formado sobre o suporte não possui geometria regular. Desta forma, a contagem obtida na irradiação da amostra depende da posição em que esta for colocada no suporte. Com a adição do padrão interno, o resultado obtido será sempre em relação a este padrão, não importando a posição da amostra.

Cabe ressaltar que existe uma alta correlação matemática entre sensibilidade elementar e o número atômico dos elementos. Assim, com base nas sensibilidades elementares dos elementos contidos na solução padrão multielementar, pode-se estimar a sensibilidade para um elemento detectado na amostra não contido na solução padrão e conseqüentemente estimar a sua concentração na amostra de interesse.

De maneira análoga, as mesmas equações podem ser utilizadas para a linha K_β e outras, como L e M, onde logicamente as sensibilidades elementares terão outros valores.

III.3.2 - LIMITE DE DETECÇÃO

O limite mínimo detectável representa a menor quantidade (concentração, massa, volume, etc.) que pode ser discriminada estatisticamente em relação ao “background” de uma medida. Para o cálculo do limite mínimo detectável (LMD) para TXRF, com radiação síncrotron, foi ajustada a área abaixo do pico de cada elemento de interesse no espectro dos raios X característicos, obtendo-se as intensidades do *background*. Os ajustes foram realizados para amostras certificadas de fígado bovino utilizando-se a seguinte equação (STRELI, *et al.*, 2008):

$$\text{LMD} = 3\sqrt{N_B} \frac{C_i}{N_i} \quad (3.13)$$

onde:

N_B = intensidade do "background" dos raios X do elemento i na amostra.

C_i = concentração do elemento i na amostra.

N_i : intensidade dos raios X do elemento i na amostra.

Os limites de detecção para a técnica de TXRF são bem menores do que para outras técnicas de fluorescência, devido principalmente a três fatores: **(1)** baixa intensidade do *continuum*, devido a reduzida transferência de energia ao suporte da amostra em relação à XRF, **(2)** o fluxo da radiação primária disponível para a excitação da amostra, devido ao feixe refletido, é muito mais efetivo do que na XRF e **(3)** a distância amostra - detector é muito menor que na ED-XRF, aumentando, assim a eficiência de detecção dos raios X característicos.

III.3. 3. RADIAÇÃO SÍNCROTRON

A radiação síncrotron é a radiação eletromagnética emitida quando partículas carregadas com velocidade relativística são submetidas a aceleração radial. A base teórica para a produção de radiação síncrotron 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. 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, 1997).

Algumas propriedades básicas da radiação síncrotron são importantes para TXRF:

- Forma contínua a nível de infravermelho a raios X;
 - Alta intensidade;
 - Alto nível de colimação;
 - Polarização linear no plano de órbita;
 - Polarização elíptica ou circular acima e abaixo do plano da órbita para a radiação magnética da curva;
- Tamanho da fonte é pequena determinada por feixe de elétrons;
- Estrutura de tempo bem definida;
 - Características quantitativas conhecidas;
 - Alta estabilidade de intensidade e posição de fonte.

A figura 3.7 apresenta o esquema de fluorescência de raios X por reflexão total com radiação síncrotron (SRTXRF).

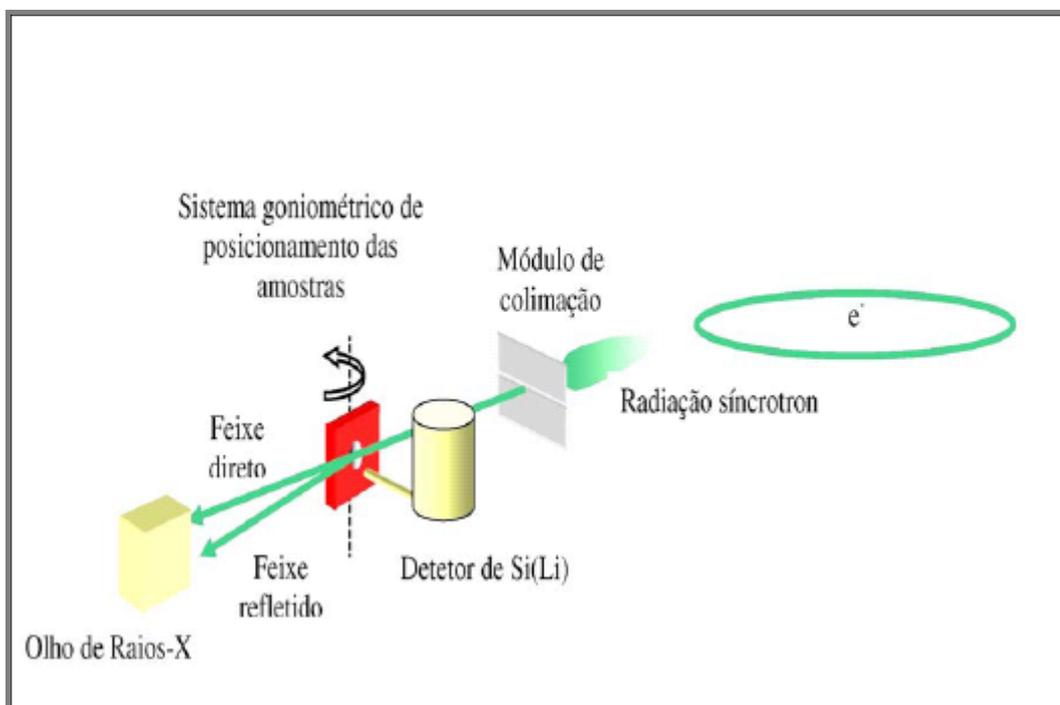


Figura 3.7. Desenho esquemático do sistema de SRTXRF (OLIVEIRA, 2004).

O uso de uma fonte de luz síncrotron permite alcançar baixos limites de detecção, mais baixos do que quando se usa um tubo de raios X de alta potência. Três vantagens do uso desta fonte de excitação devem ser observadas (KLOCKENKAMPER, 1996):

- O alto brilho espectral de um feixe da radiação síncrotron resulta em um aumento da intensidade de raios X primários da ordem de 3-5 vezes comparado com os tubos de raios X convencionais;

- Desde que a radiação síncrotron cobre um amplo nível de energia do espectro de raios X, é altamente adequado para *energy tuning*. Um cristal com multicamadas preferencialmente usado para a seleção de uma banda de energia particular, pode ser facilmente ajustado para uma determinada energia de excitação na procura de elementos;

- O *background* espectral já reduzido por reflexão total é bastante baixo devido a polarização da radiação síncrotron. O feixe síncrotron é linearmente polarizado a 100% do plano horizontal do anel de armazenagem. O detector deve ser colocado num plano horizontal ou vertical. Com esta configuração, o *background* pode alcançar seus mais baixos limites.

CAPÍTULO IV

MATERIAIS E MÉTODOS

IV.1 - AMOSTRAGEM

As amostras de próstata utilizadas neste estudo foram cedidas pelo Laboratório de Interações Celulares do ICB/CCS/UFRJ. Foram utilizadas 12 amostras de próstata com PCa e 53 com HPB provenientes de pacientes com idades acima de 40 anos submetidos a biopsias prostática transversal no Hospital Municipal do Andaraí (Rio de Janeiro) e 08 amostras normais provenientes de indivíduos com idades entre 18 e 30 anos que sofreram morte inesperada (acidental, insuficiência cardíaca, etc). O Projeto passou pelo Comitê de Ética em Pesquisa- CONED e tem número de cadastro CAAE-0029.0.197.000-05.

IV.2 - PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

IV.2.1 - AMOSTRAS DE PRÓSTATA

As amostras de próstata possuíam de 1 a 3 fragmentos. Todas as amostras foram devidamente identificadas por grupo (HPB - HPB, câncer - CAN e normal - N), por indivíduo (numeração arábica) e por fragmento (letras), exemplo: amostra de um fragmento com câncer CAN 01-A. Cada fragmento de tecido prostático foi lavado com água MILLI-Q e em seguida liofilizado a 60°C (figura 4.1). Após a liofilização os fragmentos foram triturados e colocados em recipientes graduados que foram previamente lavados com água MILLI-Q (figura 4.2). Em seguida aferiu-se a massa de cada amostra. Após a medição das massas as amostras foram digeridas em meio ácido: ácido nítrico – 70% (HNO₃ – 70%) e aquecidas a uma temperatura de 60°C durante 2 horas. As soluções digeridas foram diluídas em água MILLI-Q até 2 mL e depois, uma alíquota de 50 µL de solução de Ga (Gálio ICP Padrão - 100 µg.g⁻¹) como padrão interno foi adicionada em cada uma das amostras. Finalmente, uma pequena alíquota de

5 μL de cada amostra foi pipetada em triplicata em refletores de lucite. Em seguida os refletores foram levados para secar em uma estufa a uma temperatura de 40°C. A Figura 4.3 ilustra o procedimento de preparação de amostras.

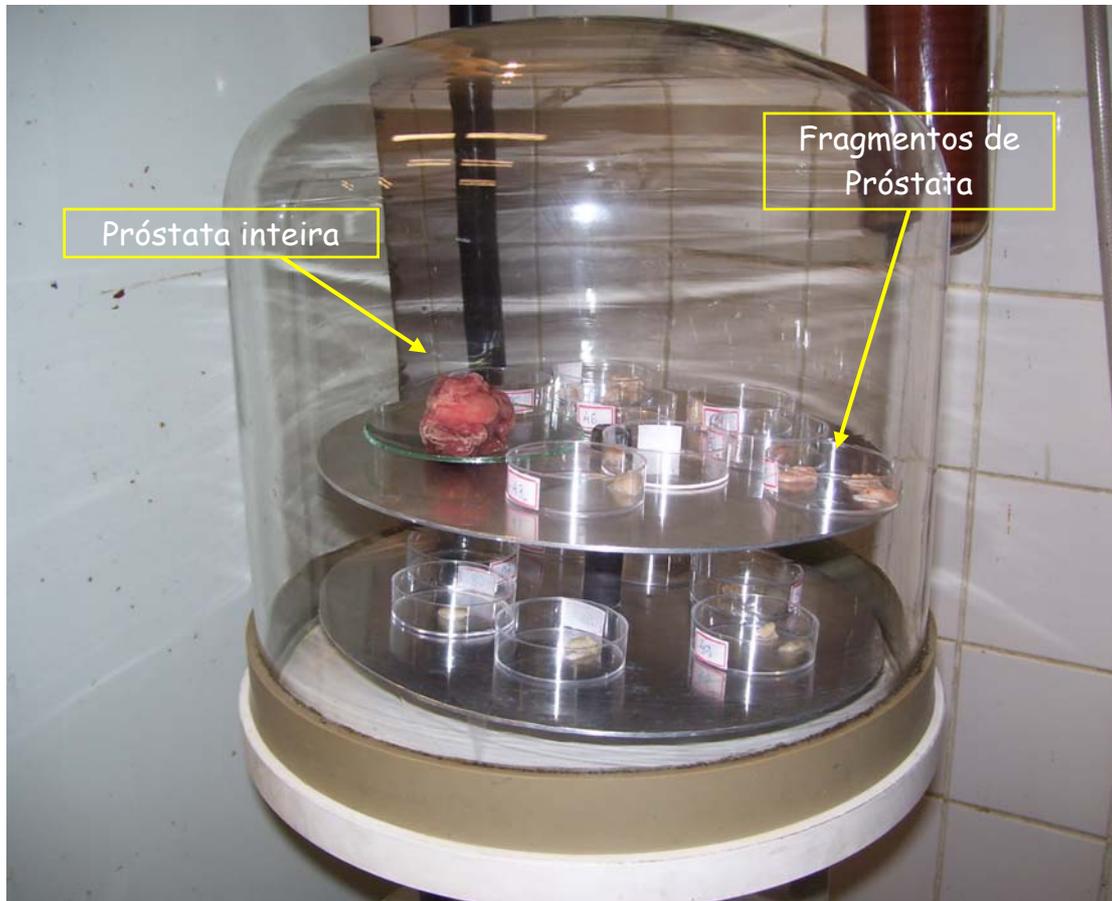


Figura 4.1. Amostras sendo liofilizadas.

IV.2.2 - BRANCO

Para corrigir efeitos referentes a possíveis contaminações, foram preparadas cinco amostras de maneira análoga às amostras de próstatas, contendo apenas água e ácido nítrico. Permitindo verificar, dessa maneira, a qualidade dos materiais utilizados na dissolução das amostras.



Figura 4.2. Recipiente graduado com amostra de próstata triturada.

IV.2.3 - AMOSTRAS CERTIFICADAS

A metodologia no preparo das amostras e acurácia das medidas foram validadas através da determinação da concentração elementar de 50 mg de amostra certificada de fígado bovino (NIST1577b) preparada nas mesmas condições das amostras de próstata.

IV.3 - CURVA DE SENSIBILIDADE

A curva de sensibilidade do sistema TXRF para a linha K foi determinada utilizando três soluções padrões multielementares conhecidas e em diferentes concentrações da solução *Multielement Atomic Spectroscopy Standard Solution Da Fluka*, acrescidas do elemento gálio (Ga), como padrão interno. A partir das medidas de intensidade da radiação fluorescente obtidas para cada elemento e suas respectivas concentrações a sensibilidade pode ser obtida a partir da equação 3.11 mostrada no capítulo III.

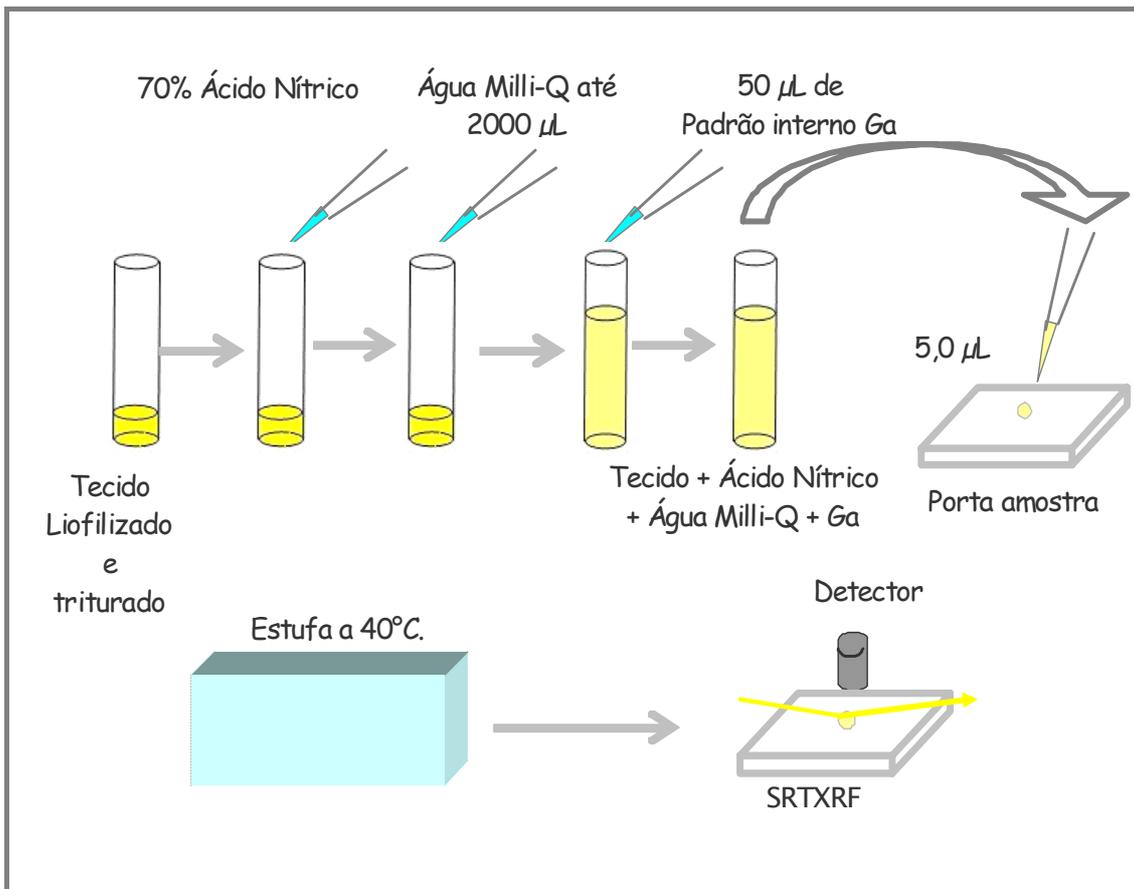


Figura 4.3. Esquema de preparação de amostras.

IV.4 - ARRANJO EXPERIMENTAL

As análises foram realizadas na linha D09B - XRF no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) (figura 4.4) através da técnica de Fluorescência de Raios X por Reflexão Total com Radiação Síncrotron (SRTXRF). O arranjo experimental é mostrado na figura 4.5, possui geometria de modo a proporcionar a reflexão total. O refletor de lucite é fixado no porta - amostra horizontalmente ao detector de HPGe (figura 4.6).



Figura 4.4. Vista geral da Linha D09B-XRF.

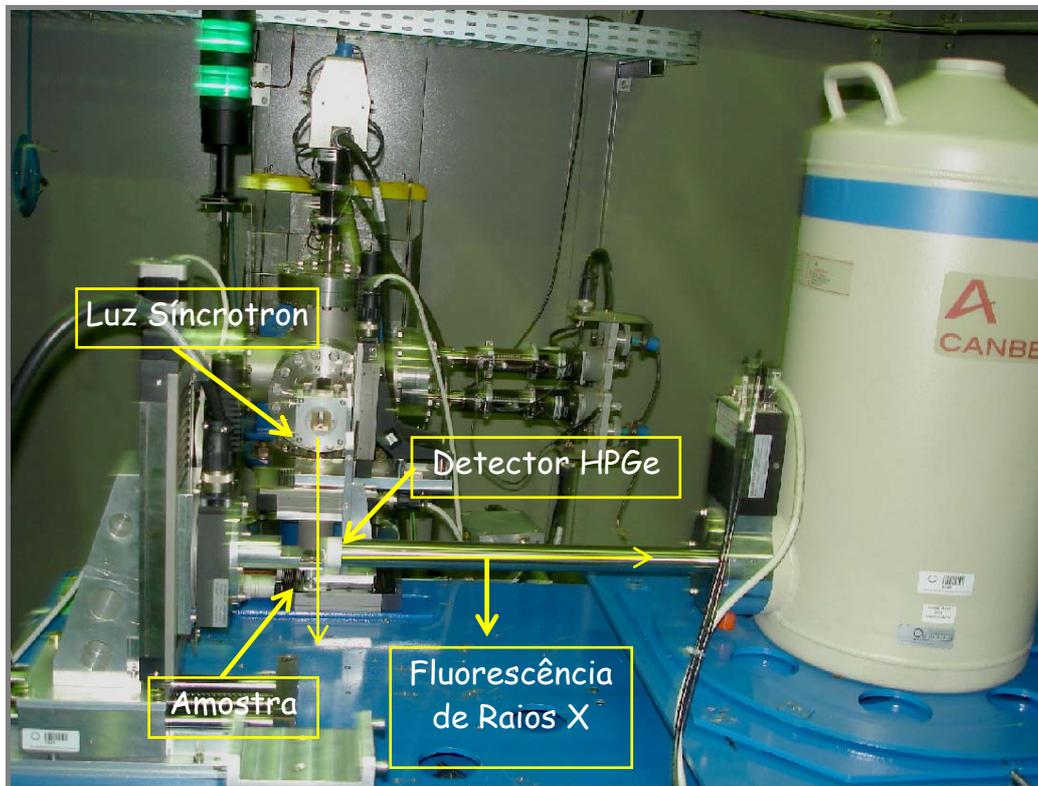


Figura 4.5. Arranjo experimental (Setembro de 2007).

O tempo de medida de todas as amostras e dos padrões foi de 100 s. Para a análise dos espectros obtidos foi utilizado o 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.

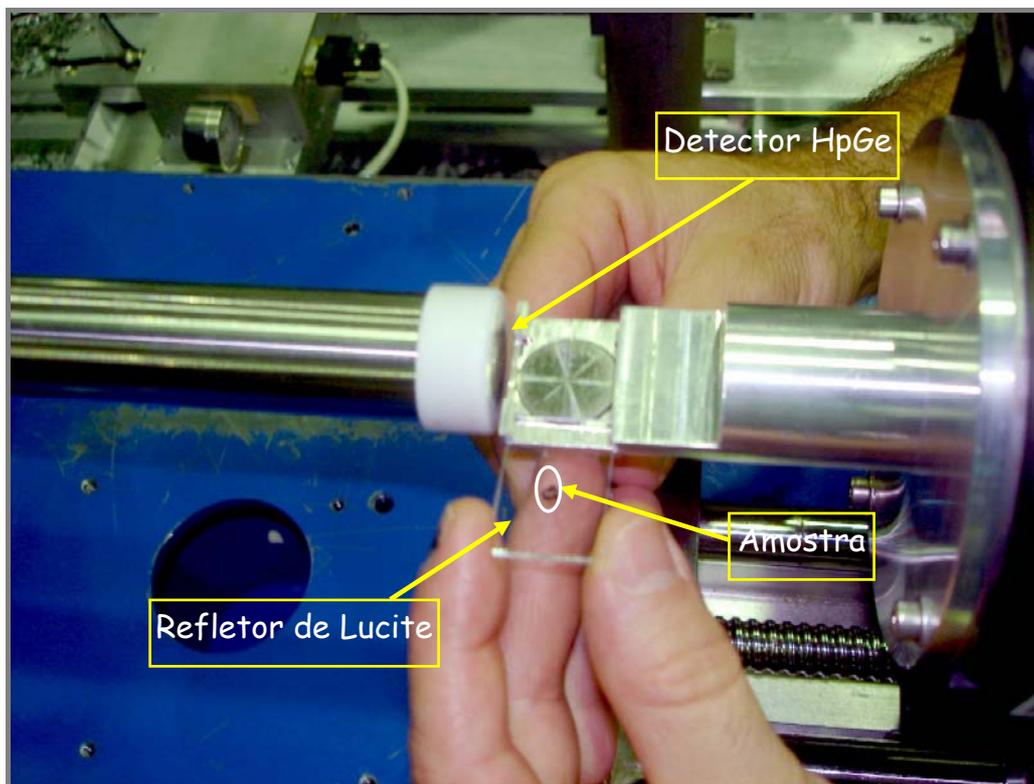


Figura 4.6. Arranjo experimental - porta amostra e detector (Setembro de 2007).

Foram realizadas duas etapas de medidas a primeira em setembro de 2007 e a segunda em março de 2008. As condições experimentais de cada etapa estão dispostas nas tabelas 4.1 e 4.2.

Tabela 4.1. Condições experimentais da primeira etapa de medidas.

Condições experimentais - Setembro de 2007	
Feixe:	Branco
Absorvedor:	0,75 mm de Al (filtro no feixe)
Absorvedor_ PreMono:	0,150 mm Al
Colimador:	1,0 mm (Ta) (no detector)
Geometria:	TXRF
Câmara 1:	2x1
Distância amostra - detector:	12 mm
Detector:	Hp Ge, resolução de 140 eV
Altura:	0,15 mm
Largura:	5,00 mm
Ângulo de incidência:	1,0 mrad

Tabela 4.2. Condições experimentais da segunda etapa de medidas.

Condições experimentais – Março 2008	
Feixe:	Quase- monocromático (16 keV)
Absorvedor:	0,75 mm de Al (filtro no feixe)
Colimador:	4,0 mm (Ta) (no detector)
Geometria:	TXRF
Camara 1:	2x1
Distância amostra - detector:	12 mm
Detector:	Si(Li) SL30165, Resolução de 165 eV em 5.9 keV
Altura	0,2 mm
Largura	4,88 mm
Ângulo de incidência:	1,0 mrad

IV.5 - LABORATÓRIO NACIONAL DE LUZ SÍNCROTRON (LNLS)

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.

O LNLS encontra-se em funcionamento desde julho de 1997 e 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 (LNLS, 2008).

Ao redor do anel existem doze linhas de luz, sendo em três linhas feixes ultravioletas, em sete feixes de raios X formando um total de 24 estações experimentais. A figura 4.7 mostra uma vista geral do anel de armazenamento.



Figura 4.7. Vista geral do anel de armazenamento.

IV.6 - TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Após a aquisição dos espectros e a obtenção dos resultados das concentrações elementares, os dados foram analisados. As distribuições de frequências dos dados para cada grupo estão ilustradas nas figuras do APÊNDICE B (B.1 - B.29). No APÊNDICE C é apresentado os tipos de distribuições, suas características e a análise estatística para diferentes tipos de distribuições.

A análise dos gráficos mostrou que a maioria das distribuições é assimétrica. Com isso, o teste não-paramétrico de Mann-Whitney U foi escolhido para comparar os dados dos grupos.

O teste de Mann-Whitney U é um teste não paramétrico utilizado para comparar a diferença de dois grupos independentes e testar a significância dessa diferença. O poder de eficiência deste teste tende a 95,5 % quando o número de dados aumenta (SIEGEL,1975). Neste teste não-paramétrico admite-se como hipótese nula (H_0) que as amostras provêm da mesma distribuição e, portanto, possuem médias iguais. Contraposta a esta se tem a hipótese alternativa (H_1) de que as amostras provêm de distribuições diferentes, e sendo assim, possuem médias distintas. A resposta do teste é um o valor de p que indica a probabilidade de rejeitarmos H_0 . Se o valor de p for menor que α ($p < \alpha$) o teste rejeita H_0 , ou seja, pode se afirmar que as médias são significativamente distintas. Caso contrario, se o valor de p for maior ou igual a α ($p \geq \alpha$) aceita-se H_0 , ou seja, as amostras provêm da mesma distribuição e, portanto, suas médias não possuem diferenças significantes.

O teste estatístico Mann-Whitney U foi utilizado com nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$) através do programa SPSS versão 10,0.

CAPÍTULO V

RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1 – CURVA DE SENSIBILIDADE RELATIVA

Para determinar a sensibilidade relativa, foram utilizadas três soluções padrões multielementares conhecidas e em diferentes concentrações, acrescidas do elemento gálio (Ga), como padrão interno. A tabela 5.1 apresenta os valores das concentrações dos elementos e do padrão interno em cada amostra padrão, para determinação da sensibilidade relativa para a linha K.

Tabela 5.1 - Concentrações nos padrões usados para levantamento da curva de sensibilidade para a linha K.

Concentrações (mg.g ⁻¹) dos elementos nos padrões				
Z	Elemento	PADRÃO A	PADRÃO B	PADRÃO C
19	<i>K</i>	4,88	7,68	11,28
20	<i>Ca</i>	0,49	0,77	1,13
24	<i>Cr</i>	2,44	3,84	5,64
25	<i>Mn</i>	0,49	0,77	1,13
26	<i>Fe</i>	0,49	0,77	1,13
27	<i>Co</i>	0,49	0,77	1,13
28	<i>Ni</i>	2,44	3,84	5,64
29	<i>Cu</i>	0,49	0,77	1,13
30	<i>Zn</i>	0,49	0,77	1,13
31	<i>Ga</i>	2,40	4,00	6,00
38	<i>Sr</i>	0,49	0,77	1,13

Através da relação existente entre a intensidade relativa (R_i) e a concentração elementar (C_i) mostrada na equação 3.11, foi possível determinar a sensibilidade relativa (S_{Ri}) para cada elemento de cada solução padrão. A partir disto, foi obtida a curva de sensibilidade relativa em função do número atômico para a série K. A tabela 5.2 mostra a sensibilidade relativa, obtida experimentalmente para a linha K.

Tabela 5.2. Sensibilidade relativa para as linhas K

<i>Z</i>	<i>Elemento</i>	Sensibilidade relativa (S_{Ri})	
		Setembro de 2007	Março de 2008
19	K	0,03	0,11
20	Ca	0,05	0,17
24	Cr	0,32	0,79
25	Mn	0,37	0,96
27	Co	0,64	0,82
28	Ni	0,85	1,11
29	Cu	0,98	1,14
30	Zn	1,04	0,80
31	Ga	1,00	1,00
38	Sr	0,21	2,06

V.1.1 – CURVA DE SENSIBILIDADE - PRIMEIRA ETAPA DE MEDIDAS

A curva da sensibilidade relativa (S_{Ri}) em função do número atômico (Z) para a série K no período de setembro de 2007 está representada na figura 5.1.

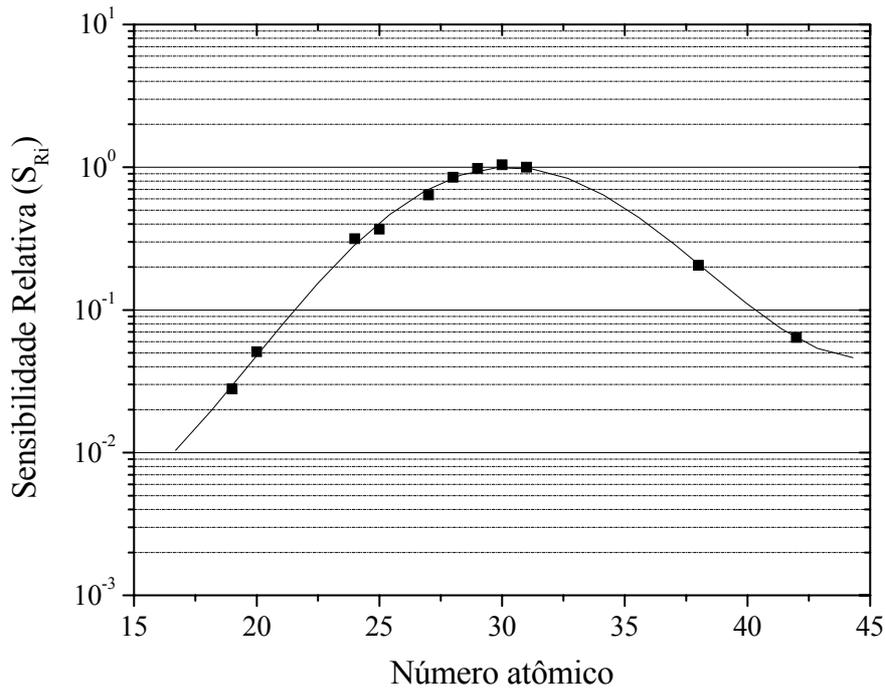


Figura 5.1. Curva da Sensibilidade Relativa (S_{Ri}) para a linha K (Setembro de 2007).

A curva de sensibilidade para a linha K na primeira etapa de medidas foi obtida utilizando feixe branco. A equação ajustada que relaciona a sensibilidade relativa (S_{Ri}) e o número atômico (Z) do elemento, para a série K, é dada por:

$$\text{Log} (S_{Ri} (Z)) = 6,614 - 1,844 Z + 0,125 Z^2 - 0,003 Z^3 + 2,752E-5 Z^4 \quad (5.1)$$

$$R^2 = 0,997$$

Através da equação 5.1 pode-se obter qualquer valor de sensibilidade para linha K em função do número atômico.

V.1.2 - CURVA DE SENSIBILIDADE - SEGUNDA ETAPA DE MEDIDAS

A curva da sensibilidade relativa (S_{Ri}) em função do número atômico (Z) para a série K no período de março de 2008 está representada na figura 5.2.

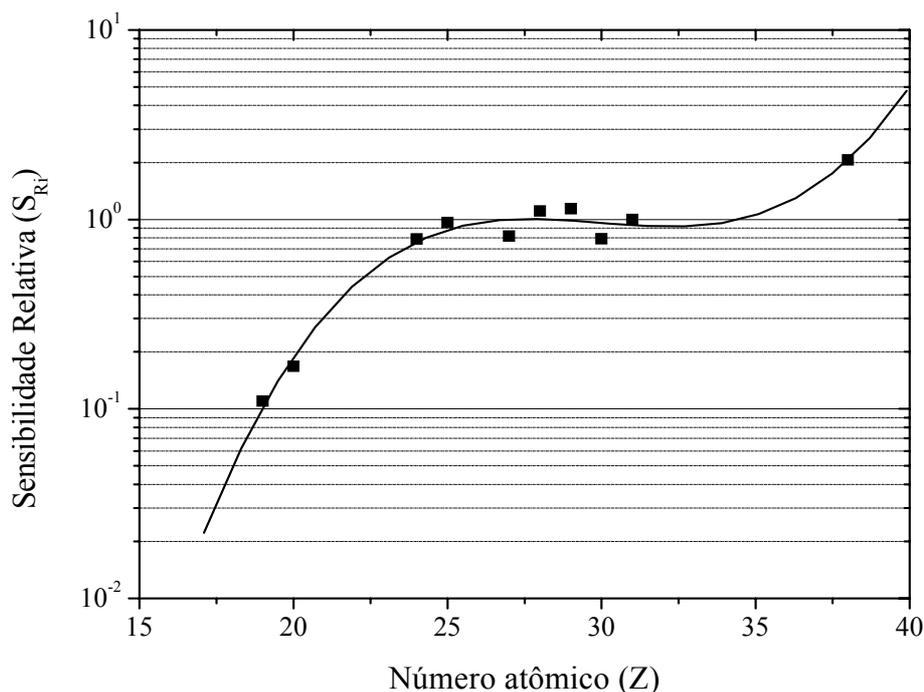


Figura 5.2. Curva da Sensibilidade Relativa (S_{Ri}) para a linha K (Março de 2008).

A curva de sensibilidade para a linha K na segunda etapa de medidas foi obtida utilizando feixe quasi monocromático de 16 keV. A curva obtida nesta etapa apresenta uma elevação para o número atômico 38, isto se deve ao fato de o K de absorção deste elemento ser próximo da energia de excitação (16 keV) utilizada nesta etapa de medidas. A equação ajustada que relaciona a sensibilidade relativa (S_{Ri}) e o número atômico (Z) do elemento, para a série K, é dada por:

$$\text{Log}(S_{Ri}(Z)) = -22,441 + 2,271 \cdot Z - 0,076 \cdot Z^2 + 8,474 \cdot 10^{-4} \cdot Z^3 \quad (5.2)$$

$$R^2 = 0,980$$

Através da equação 5.2 pode-se obter qualquer valor de sensibilidade para linha K em função do número atômico.

V.3 – LIMITE DE DETECÇÃO

Os valores obtidos para os limites de detecção para as amostras de fígado bovino por SRTXRF, calculados pela equação 3.13. A tabela 5.3 são apresentados os valores de

limite de detecção obtidos experimentalmente. A figura 5.3 ilustra a curva do limite mínimo de detecção (LMD), para um tempo de contagem de 100 s.

Tabela 5.3. Limites de detecção para as amostras de fígado bovino por SRTXRF.

<i>Elemento</i>	Limite de detecção (ng.g⁻¹)
<i>P</i>	16 x 10 ³
<i>S</i>	5,7 x 10 ³
<i>K</i>	4,9 x 10 ²
<i>Ca</i>	2,4 x 10 ²
<i>Mn</i>	56
<i>Fe</i>	46
<i>Cu</i>	76
<i>Zn</i>	65
<i>Rb</i>	34

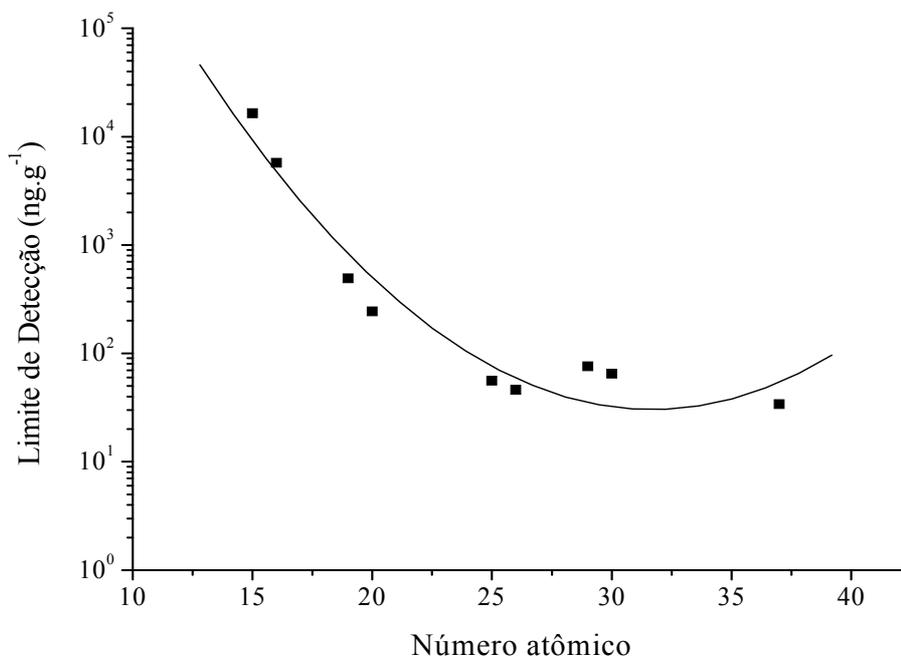


Figura 5.3. Limite de detecção para amostras de fígado bovino.

A partir da equação 5.3 pode se obter o LD da série K para qualquer elemento.

$$\text{Log(DL)} = 10,436 - 0,565 Z + 0,009 Z^2 \quad (5.3)$$

$$R^2 = 0,934$$

V.2 - ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE CERTIFICADAS

Para verificar a metodologia no preparo das amostras e avaliar a calibração do sistema de SRTXRF, foram analisadas amostras de referência de fígado bovino (NIST1577b) e os dados calculados comparados com os valores certificados. Na tabela 5.4 são apresentados os dados medidos neste trabalho, os valores certificados e o erro relativo entre os dois valores.

Tabela 5.4. Comparação dos valores medidos e os certificados de fígado bovino.

<i>Elemento</i>	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		Erro relativo
	Valor Certificado	Valor medido	
<i>P (%)</i>	1,10 \pm 0,03	1,08 \pm 0,16	0,02
<i>S (%)</i>	0,785 \pm 0,006	0,81 \pm 0,07	0,03
<i>K (%)</i>	0,994 \pm 0,02	1,01 \pm 0,12	0,01
<i>Ca</i>	116 \pm 4	127 \pm 58	0,09
<i>Mn</i>	11 \pm 2	9 \pm 1	0,18
<i>Fe</i>	184 \pm 15	171 \pm 7	0,07
<i>Cu</i>	160 \pm 8	166 \pm 6	0,04
<i>Zn</i>	127 \pm 16	139 \pm 8	0,09
<i>Rb</i>	14 \pm 1	11 \pm 2	0,21

Os valores medidos neste trabalho apresentaram desvios padrões inferiores a 20% para a maioria dos elementos, com exceção do Rb com erro relativo de 21%, confirmando um bom ajuste para a curva de calibração utilizando o sistema de SRTXRF.

V.3 - ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os espectros de cada amostra de próstata foram analisados e as concentrações de cada elemento foram calculadas a partir da equação 3.12. As figuras 5.4 e 5.5 ilustram os espectros característicos de duas amostras de próstata. Foi possível detectar segundo as condições experimentais descritas no CAPÍTULO IV, os elementos: P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn, Br e Rb.

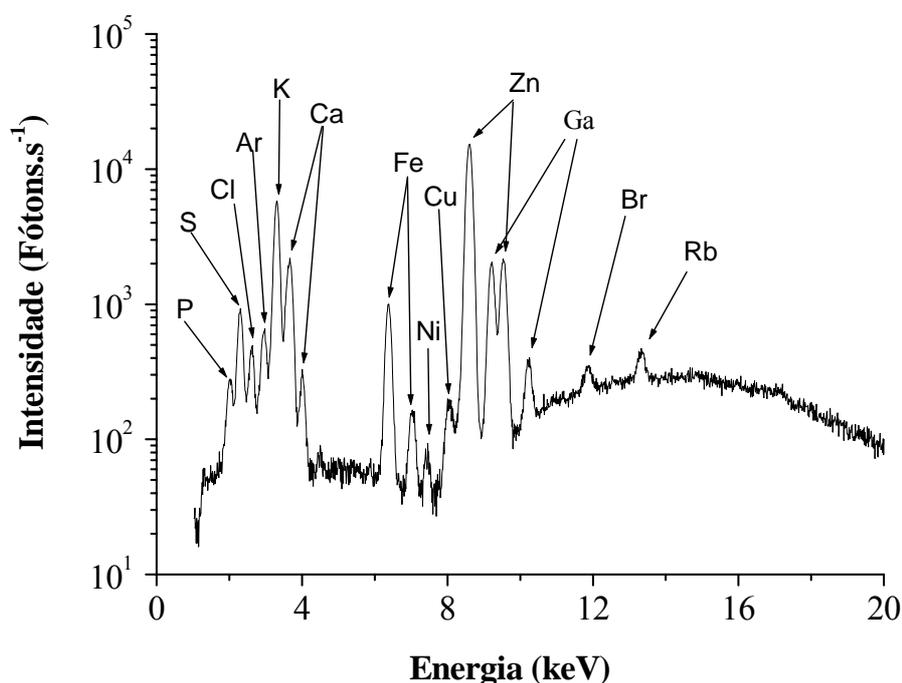


Figura 5.4. Espectro característico de uma amostra de próstata com HPB obtido com feixe branco.

A análise das distribuições mostrou que se trata de distribuições assimétricas. Estudos já mostraram que a distribuição da concentração elementar em tecidos biológicos é assimétrica (MAJEWSKA *et al.*, 1997, KUBALA-KUKUS *et al.*, 2004).

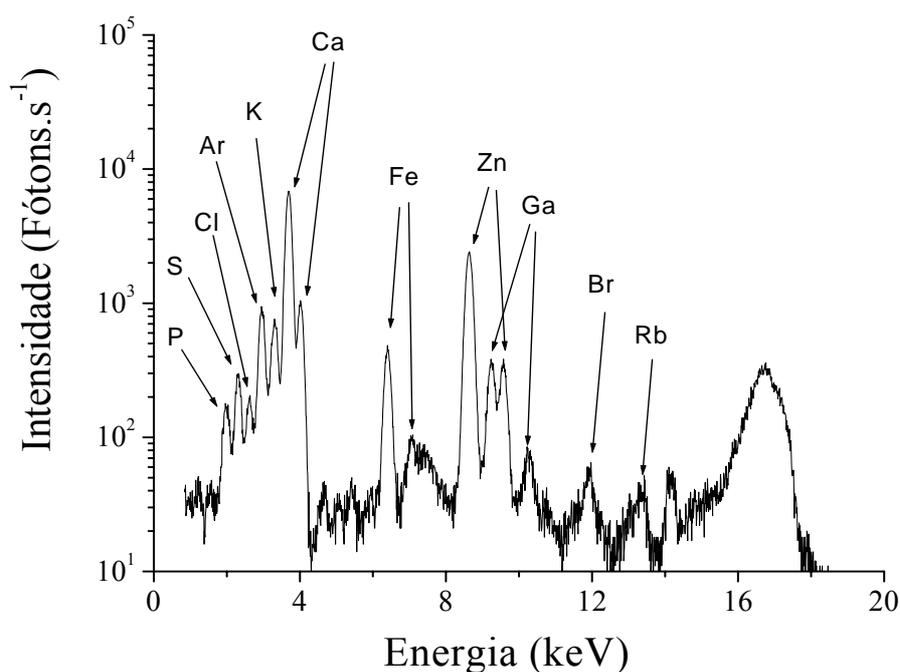


Figura 5.5. Espectro característico de uma amostra de próstata com HPB obtido com feixe quasi-monocromático de 16 keV.

Durante a análise dos dados, verificou-se a necessidade de uma depuração de dados que destoavam da população estudada. A aplicação do Critério de Chauvenet serve, neste caso, para eliminar valores mais discrepantes com relação à população (LIMA, 2001). Após a aplicação do Critério de Chauvenet e a eliminação de alguns dados, embora as distribuições sejam assimétricas, foram calculadas as médias, os intervalos de confiança e a mediana, para assim poder comparar com dados obtidos em outros estudos. A tabela 5.5 mostra as concentrações (média \pm intervalo de confiança e mediana) obtidas neste estudo para cada grupo estudado (HPB, Câncer e Normal) e a tabela 5.6 mostra valores descritos na literatura.

Os elementos encontrados em maiores concentrações foram P, S e K. Não foi detectado Cu nas amostras de próstata com PCa. As amostras de próstata com tumor apresentaram redução nas concentrações de quase todos elementos, com exceção do fósforo que apresentou um aumento em sua concentração.

Através das tabelas 5.5 e 5.6 é possível verificar que os valores experimentais obtidos ficaram bem próximos daqueles encontrados na literatura, com exceção do Cl que será estudado mais adiante.

Tabela 5.5. Concentração média \pm intervalo de confiança e mediana para os grupos HPB, Câncer e Normal.

<i>Elemento</i>	Média e intervalo de confiança ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		
	HPB	Câncer	Normal
<i>P</i>	3422 \pm 299	3621 \pm 684	2852 \pm 564
	3243	3751	2743
<i>S</i>	8662 \pm 546	6871 \pm 1140	10756 \pm 1587
	8548	6516	10331
<i>Cl</i>	817 \pm 111	515 \pm 151	2429 \pm 386
	640	463	2127
<i>K</i>	1744 \pm 211	1456 \pm 327	3839 \pm 415
	1488	1236	3934
<i>Ca</i>	861 \pm 94	658 \pm 109	2715 \pm 1207
	707	665	1435
<i>Fe</i>	63 \pm 11	35 \pm 9	173 \pm 55
	45	30	164
<i>Cu</i>	4 \pm 0,5	4 \pm 1	ND ⁽¹⁾
	3	4	
<i>Zn</i>	420 \pm 43	210 \pm 44	699 \pm 221
	372	192	493
<i>Br</i>	7 \pm 1	4 \pm 1	14 \pm 4
	6	3	7
<i>Rb</i>	7 \pm 1	8 \pm 1	12 \pm 2
	6	8	12

⁽¹⁾ Não detectado.

Tabela 5.6. Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) para os grupos HPB, Câncer e Normal encontrados na literatura.

<i>Elemento</i>	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)			<i>Técnica</i>	<i>Literatura</i>
	HPB	Câncer	Normal		
Cl	1800 ± 190	1830 ± 190 – 1700 ± 60	-	<i>SRIXE</i> ⁽¹⁾	Kwiatek
K	1475 ± 250	3620 ± 80 – 2560 ± 470	-	<i>SRIXE</i> ⁽¹⁾	Kwiatek
Ca	-	1441 ± 646	787 ± 675	<i>FAAS</i> ⁽¹⁾	M. Yaman
	-	1830	6540	<i>SRIXE</i>	Ide-Ektessabi
Fe	52 ± 4	115 ± 19 – 24 ± 4	-	<i>SRIXE</i> ⁽¹⁾	Kwiatek
	-	30 ± 21 ⁶	18 ± 9	<i>FAAS</i> ⁽¹⁾	M. Yaman
Cu	12,7 ± 3	12 ± 2 – 15 ± 2	-	<i>SRIXE</i> ⁽¹⁾	Kwiatek
	-	1 ± 1	0,6 ± 0,2	<i>FAAS</i> ⁽¹⁾	M. Yaman
	1142 ± 543	146 ± 76	1018 ± 754	<i>EDXRF</i> ⁽²⁾	Zaichick
	158 ± 28	174 ± 16 – 176 ± 19	-	<i>SRIXE</i> ⁽¹⁾	Kwiatek
	7 – 329	15 – 71	-	<i>XRF</i> ⁽¹⁾	Vartsky
	-	68 ± 31	47 ± 15	<i>FAAS</i> ⁽¹⁾	M. Yaman
	-	149,2	290,5	<i>SRIXE</i>	Ide-Ektessabi
Zn	151-279	19-45	-	<i>XRF</i> ⁽¹⁾	Shilstein
	3770 ± 13	814 ± 17	2734 ± 12	<i>AAS</i> ⁽¹⁾	Jafa
	774 ± 524	147 ± 103	348 ± 269	<i>AAS</i> ⁽¹⁾	Feustel
	851 ± 410	320 ± 147	965 ± 435	<i>AAS</i> ⁽¹⁾	Marezyńska
	904 ± 111	160 ± 57	-	<i>AAS</i> ⁽¹⁾	Lahtonen
	1177 ± 485	413	488 ± 190	<i>AAS</i> ⁽¹⁾	Feustel

⁽¹⁾ Tecido *in natura*

⁽²⁾ Tecido seco

A figura 5.6 ilustra o gráfico Box-Plot que será utilizado para a apresentação dos resultados. A linha do centro da caixa indica a mediana. Os limites inferiores e superiores da caixa indicam respectivamente o 1º e o 3º quartis. Os travessões indicam o menor e o maior valores que não são outlier. As \circ indicam os outliers moderados. As $*$ identificam os outliers extremos. As figuras 5.7 - 5.16 mostram a comparação entre as concentrações dos grupos câncer, HPB e Normal, para cada elemento estudado através do gráfico Box-Plot.

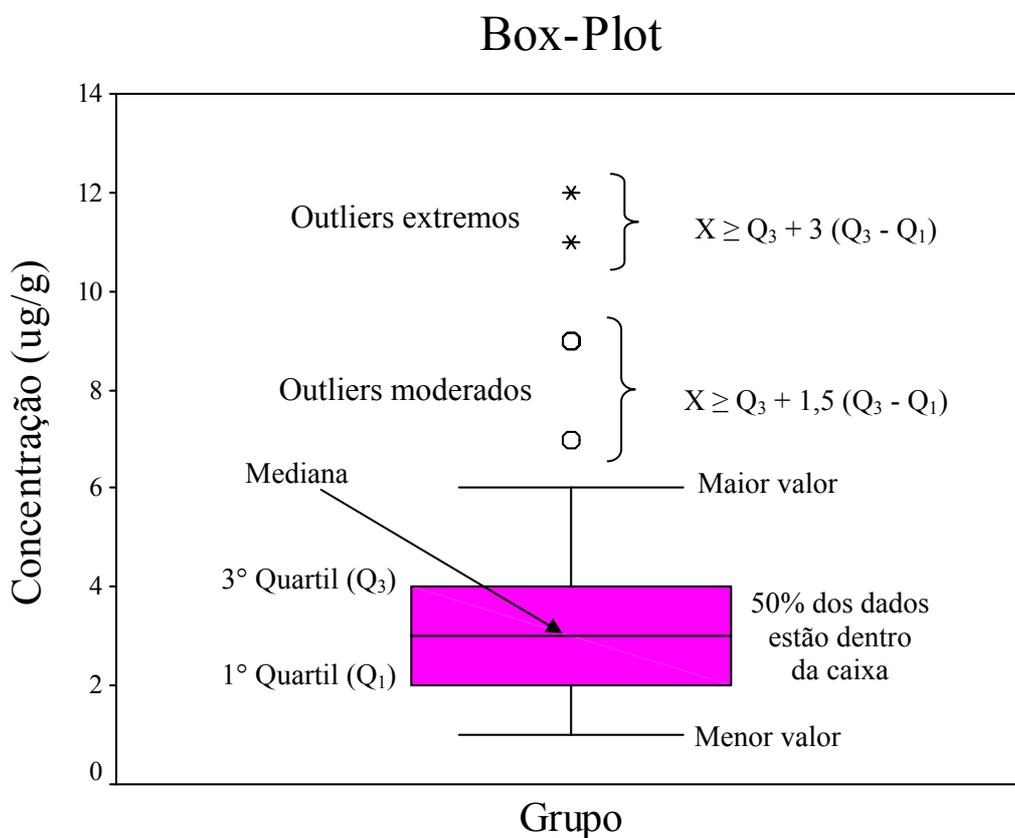


Figura 5.6. Ilustração do gráfico Box -Plot.

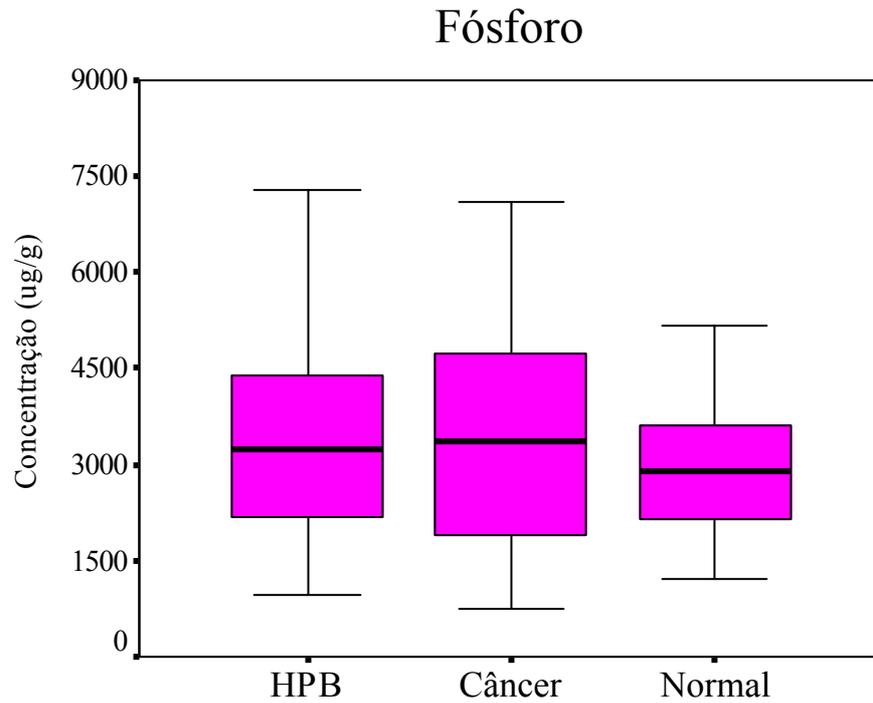


Figura 5.7. Comparação de concentração de fósforo na próstata entre os grupos HPB, câncer e normal.

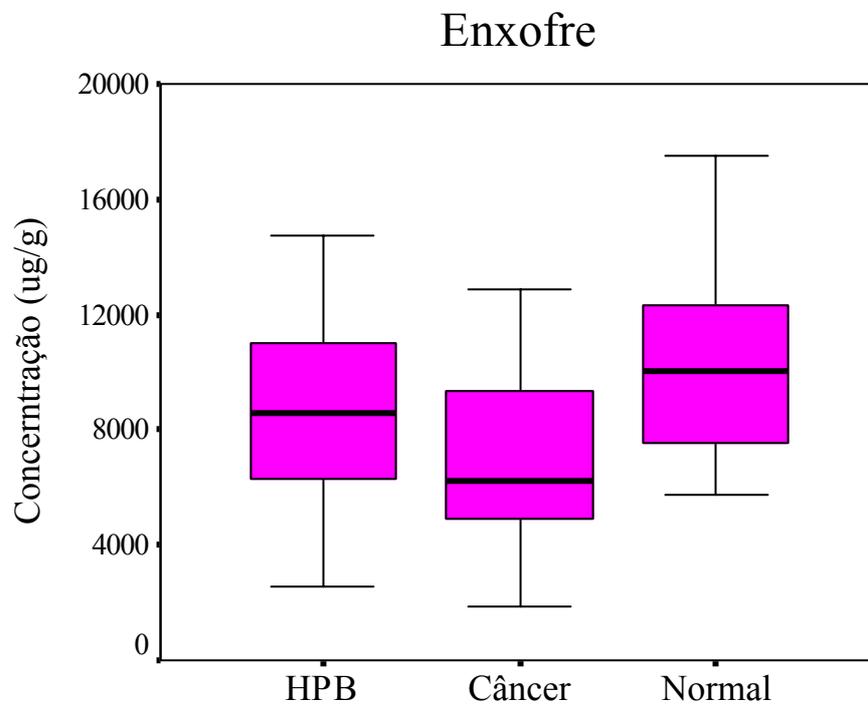


Figura 5.8. Comparação de concentração de enxofre na próstata entre os grupos HPB, câncer e normal.

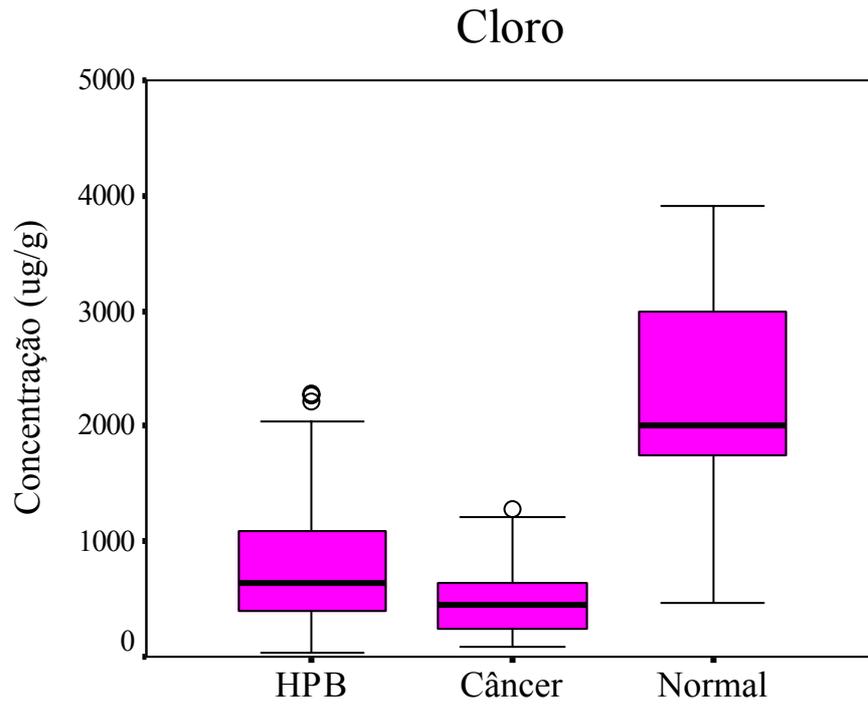


Figura 5.9. Comparação de concentração de cloro na próstata entre os grupos HPB, câncer e normal.

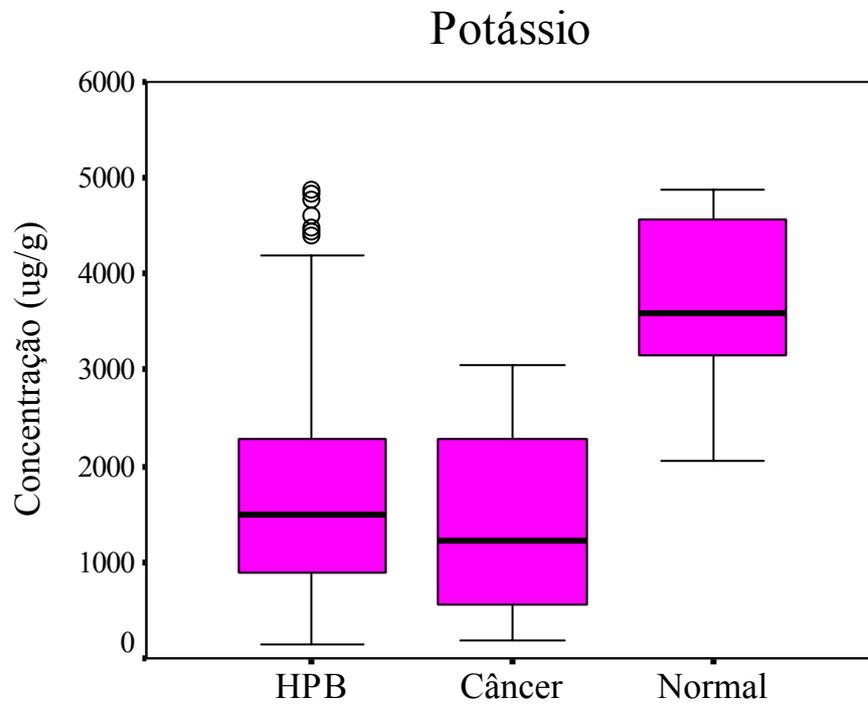


Figura 5.10. Comparação de concentração de potássio na próstata entre os grupos HPB, câncer e normal.

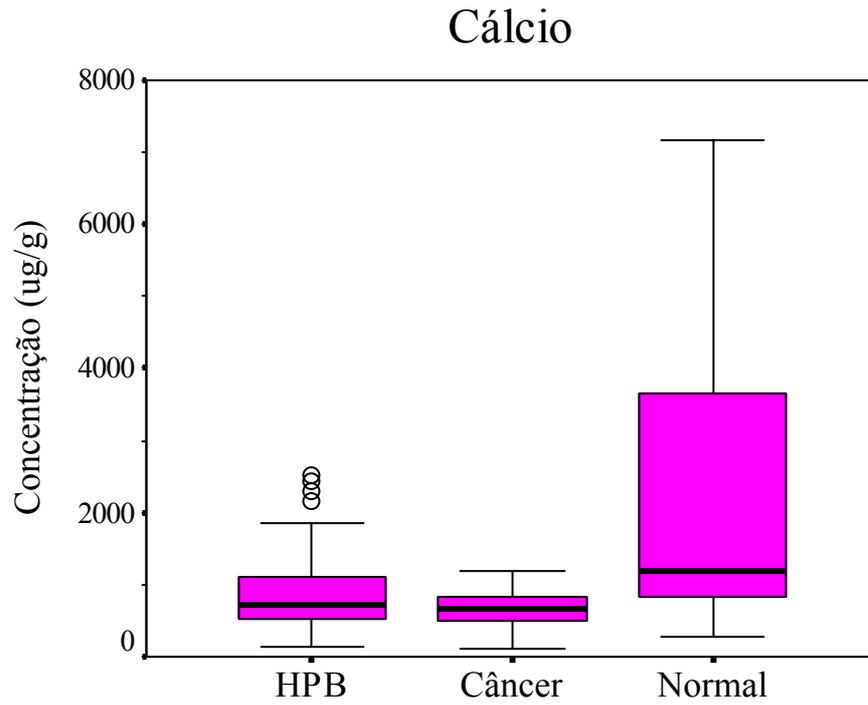


Figura 5.11. Comparação de concentração de cálcio na próstata entre os grupos HPB, câncer e normal.

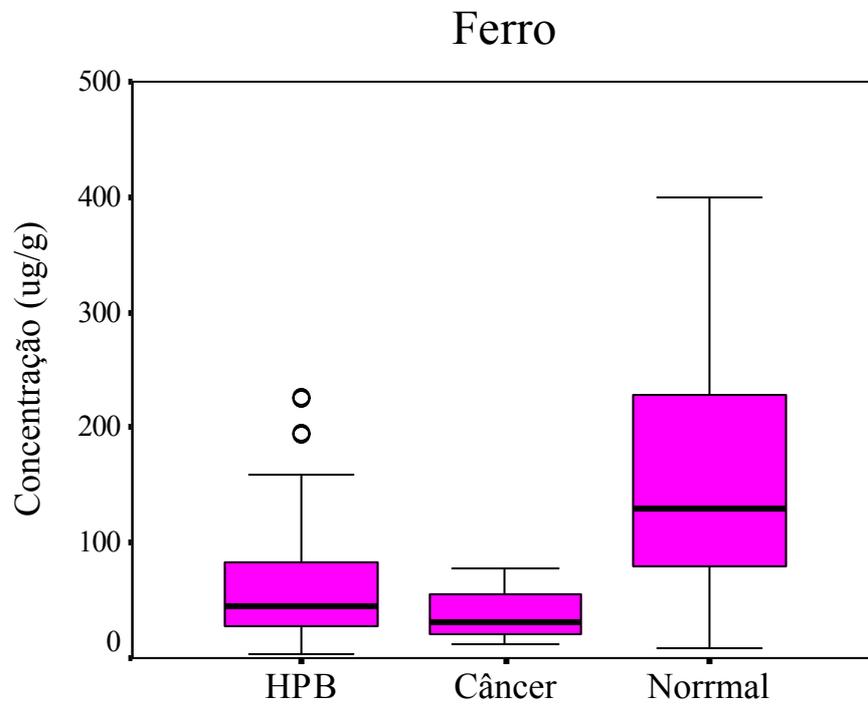


Figura 5.12. Comparação de concentração de ferro na próstata entre os grupos HPB, câncer e normal.

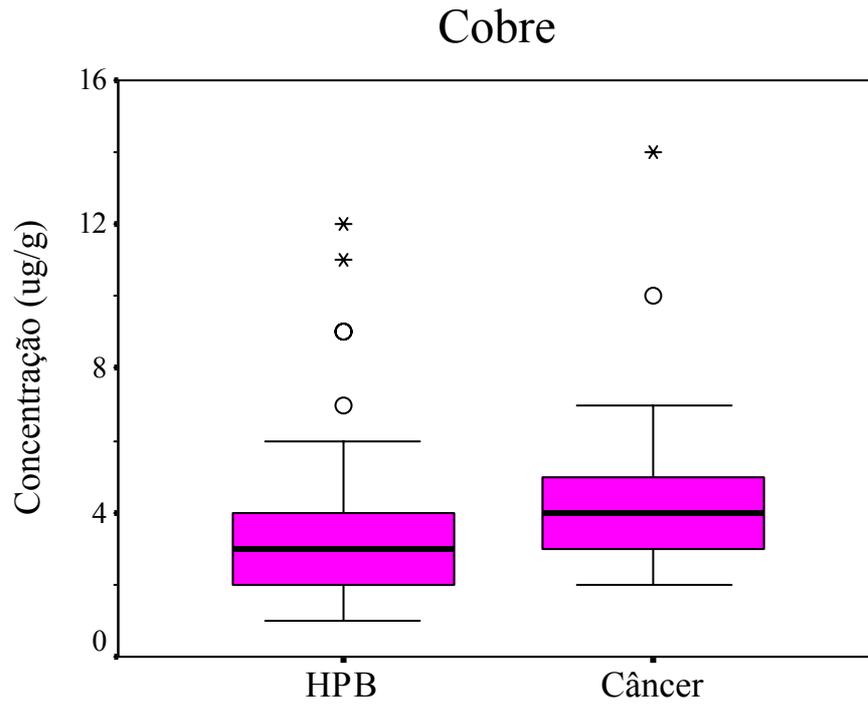


Figura 5.13. Comparação de concentração de cobre na próstata entre os grupos HPB e câncer.

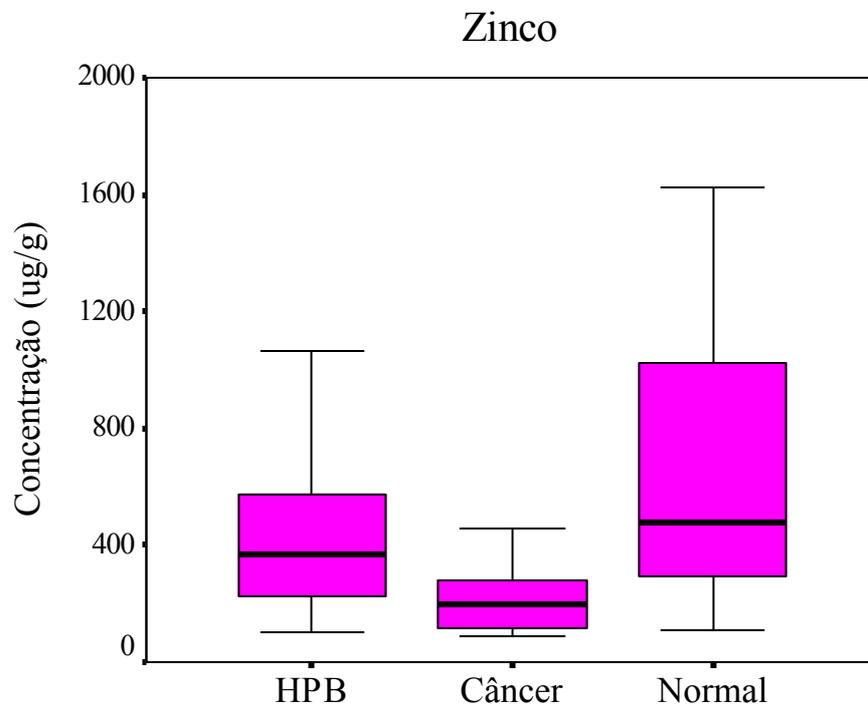


Figura 5.14. Comparação de concentração de zinco na próstata entre os grupos HPB, câncer e normal.

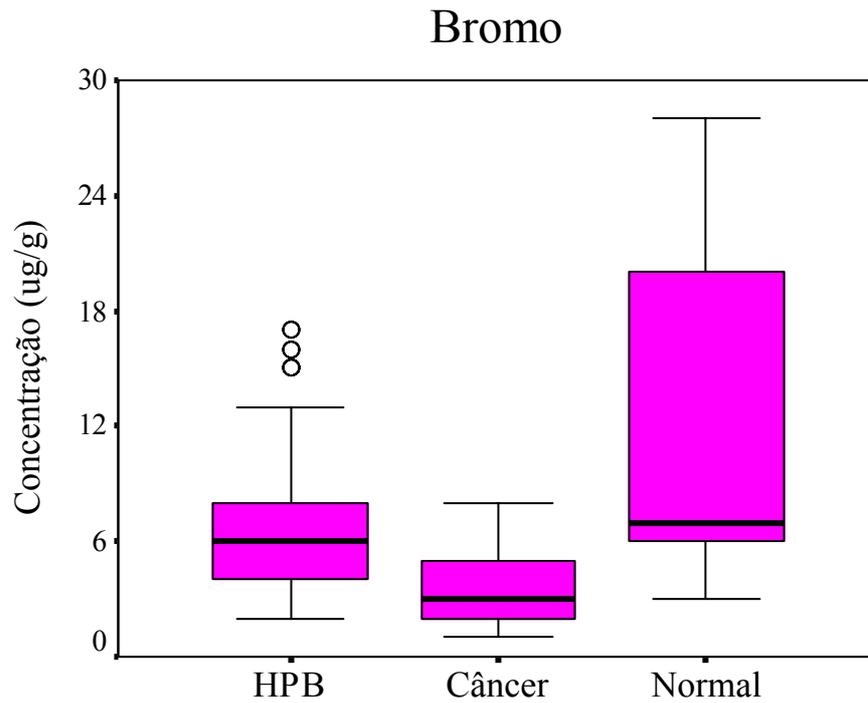


Figura 5.15. Comparação de concentração de bromo na próstata entre os grupos HPB, câncer e normal.

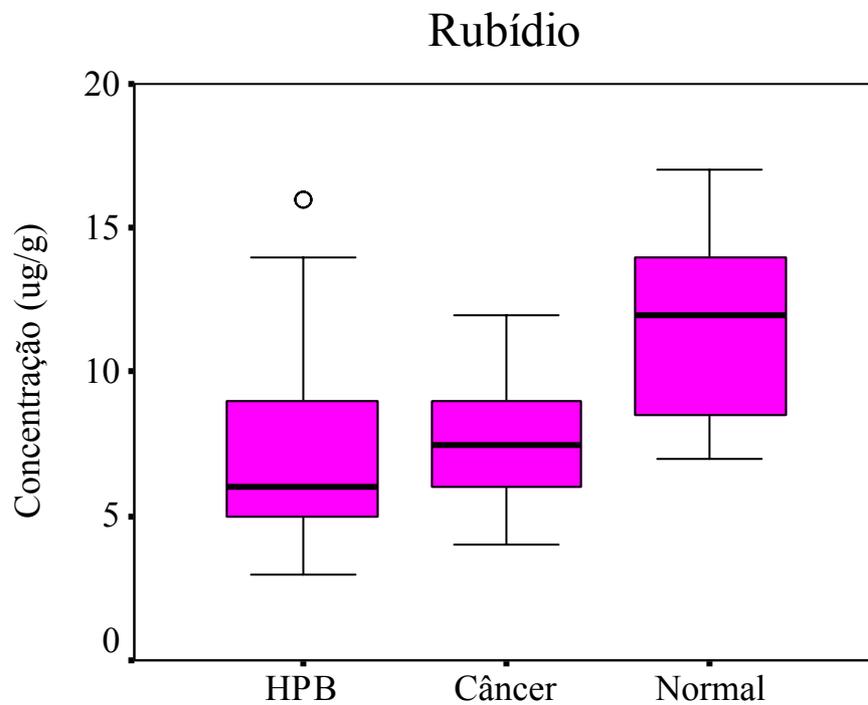


Figura 5.16. Comparação de concentração de rubídio na próstata entre os grupos HPB, câncer e normal.

Após a análise dos parâmetros básicos dos dados, determinou-se que o melhor teste comparativo era o teste U de Mann-Whitney, com 95% de confiança. Os erros relativos para os elementos que apresentaram diferença estatística são mostrados na tabela 5.7. O erro entre os grupos PCa e Normal é com relação ao grupo Normal, entre PCa e HPB é com relação ao grupo HPB e HPB e Normal com relação ao grupo Normal. As diferenças nas concentrações dos elementos já eram esperadas, pois a maioria dos elementos está associada a processos biológicos.

Tabela 5.7. Erros relativos entre os grupos Câncer, HPB e Normal.

<i>Elemento</i>	Erro relativo entre as medianas (%)		
	Câncer x Normal	Câncer x HPB	HPB x Normal
<i>S</i>	-37	-24	-
<i>Cl</i>	-78	-28	-70
<i>K</i>	-69	-	-62
<i>Ca</i>	-54	-	-51
<i>Fe</i>	-82	-33	-73
<i>Zn</i>	-61	-48	-25
<i>Br</i>	-57	-50	-14
<i>Rb</i>	-38	-	-50

A seguir apresenta-se uma análise dos elementos que apresentaram diferença significativa entre os grupos.

a) Enxofre

A concentração de enxofre em amostras de próstata com câncer apresentou uma redução de 37 % comparando com as concentrações obtidas em amostras de próstata normais e uma redução de 24 % com relação às amostras com HPB. Sabe-se que o enxofre é componente de vários aminoácidos que são de vital importância para a

formação de proteínas, é constituinte de várias vitaminas, isto faz deste elemento um intercessor de grande importância no desenvolvimento de neoplasias, principalmente em processos carcinogênicos (MINERAIS, 2008).

b) Cloro

As amostras de próstata com câncer apresentaram concentração de Cloro 78% e 28% menor com relação a obtida em amostras de próstata normais e com HPB, respectivamente. Comparando amostras de HPB e normais, a concentração de Cl foi 70 % menor em amostras com HPB. O Cloro ajuda na eliminação dos metabólitos do organismo, auxilia o funcionamento do fígado, auxilia na digestão ajudando na flexibilidade do organismo, reage com rapidez com muitos elementos e compostos químicos (MINERAIS, 2008; CLORO, 2008), essa característica prejudicou sua análise, pois o processo de digestão química foi realizado com ácido nítrico e este reagiu com o Cloro promovendo a liberação deste elemento na forma de gás e assim prejudicou os resultados. Comparando com as concentrações obtidas por KWIAATEK 2005 houve uma redução devido à perda durante ao processo de digestão química.

c) Potássio

O potássio apresentou concentração média 69% menor em amostras com tumor comparando com a obtida em amostras normais e não apresentou diferenças significativas com relação à obtida em amostras com HPB. Em desacordo com este trabalho KWIAATEK *et al.* (2005) encontrou um aumento na concentração média de K em tecidos com HPB comparando com as amostras com câncer. As medianas obtidas em amostras com HPB apresentaram uma redução de 62% com relação à mediana das amostras normais. O potássio encontra-se na forma de íon K^+ e está presente nas extremidades dos cromossomos (telômeros) estabilizando a estrutura do DNA e RNA, compensando a carga negativa dos grupos fosfatos. A bomba de sódio é um mecanismo pelo qual se consegue concentrações requeridas de K^+ e Na^+ dentro e fora da célula (concentrações de íon K^+ mais altas dentro da célula do que no seu exterior para possibilitar a transmissão do impulso nervoso), estes dois íons fazem um papel crucial

na fisiologia das células, tornando os íons K^+ e Na^+ indicadores de danos nas células dos tecidos (LEITÃO, 2005).

d) Cálcio

A mediana da concentração de Cálcio em amostras com câncer apresentou uma redução de 54 % com relação à mediana obtida em amostras normais. YAMAN *et al.* (2005) também encontrou uma redução na concentração de cálcio comparando tecidos cancerosos com tecidos normais, em desacordo IDE-EKTESSABI *et al.* (2002) encontrou um aumento. Não houve diferenças significativas entre amostras com tumor e amostras com HPB. A diferença entre a mediana das amostras com HPB e normal foi uma redução de 51 % em amostras com HPB. O cálcio é o elemento encontrado em maior quantidade no organismo humano. Quase todo o cálcio do organismo (por volta de 1 kg e meio) se encontra nos dentes e nos ossos (MINERAIS, 2008). O íon Ca^{2+} atua como um mediador intracelular cumprindo uma função de segundo mensageiro intervindo na contração dos músculos. O íon Ca^{2+} também implica no controle de algumas enzimas quinases que realizam funções de fosforilação. O cálcio participa de funções enzimáticas de maneira similar ao magnésio em processos de transferência de fosfato (MENDONÇA, *et al.*, 2003) o que o torna sensível às mudanças ocorridas na célula e por isso sua concentração é alterada em células com neoplasias.

e) Ferro

A mediana de ferro em amostras cancerígenas foi 82 % menor com relação a mediana de amostras normais e 33 % mais baixa com relação a encontrada em amostras com HPB. KWIA TEK *et al.* (2005) encontrou um aumento na concentração de ferro em amostras com PCa de escore gleason 5 e uma redução para escore gleason 3 com relação as amostras de próstata com HPB. A mediana das concentrações em amostras com HPB apresentou uma redução de 73% com relação à de amostras normais. Em contraste YAMAN *et al.* (2005) encontrou um aumento em amostras de tecidos prostáticos com HPB comparando com amostras normais. O ferro é um elemento vital para o organismo humano. Ele é essencial para funções fisiológicas porque é parte integrante de algumas proteínas. Faz um papel vital no regulamento do crescimento de

célula e diferenciação, por isso o ferro influencia o processo de carcinogenesis. O Ferro está ligado a proteínas ou está no estado de Fe^{+3} , prevenindo os danos em tecido causados por formações de radicais livres que fazem parte do processo de carcinogenesis. Vários estudos mostraram que o ferro disponível pode ter algum papel no desenvolvimento de tumores malignos. O ferro pode promover o crescimento de células transformadas inibindo a defesa de anfitrião. O Ferro está diretamente ligado aos processos patológicos ocorridos na célula principalmente em processos carcinogênicos, isto justifica ter sido encontrado em menor concentração nas amostras de próstata com neoplasias (MAJEWSKA, 2007).

f) Zinco

As concentrações de Zn em amostras de próstata com câncer apresentou uma redução de 61% comparando com as concentrações obtidas em amostras de próstata normais e a relação com as amostras com HPB foi uma redução de 48%. A mediana em amostras de próstata com HPB foi 25% menor comparando com a mediana obtida em amostras normais. O zinco participa de muitas reações do metabolismo celular, incluindo processos fisiológicos, tais como função imune, defesa antioxidante, crescimento e desenvolvimento, atuando como um componente estrutural e/ou funcional de várias metaloenzimas e metaloproteínas (SZCKUREK, *et al.*, 2001). É o elemento mais abundante nas células, e cada vez mais provas enfatizam que ele desempenha papel importante na estabilidade e função genética. Faz parte da cromatina, que é o complexo estável do DNA e proteínas no núcleo da célula, e também desempenha um papel na replicação, transcrição e de reparação de DNA (MAFRA, *et al.*, 2004; WU, *et al.*, 2004).

O Zinco desempenha papel na organização polimérica de macromoléculas como DNA e RNA, e é indispensável para atividade de enzimas envolvidas diretamente com a síntese de DNA e RNA, como por exemplo a RNA polimerase. Além disso, influencia a divisão celular, por meio da atividade da dioxitimidina quinase, adenosina e tetrafosfato-adenosina. Alterações da função do RNA mensageiro parecem ser induzidas pela deficiência de zinco (SANDSTRÖM, 1997).

Estudos mostram que a próstata tem a capacidade de secretar alto nível de zinco, sendo cerca de 10 vezes mais do que em outros tecidos (ZAICHICK, *et al.*, 1997) A distribuição deste mineral na próstata não é uniforme, sua concentração aumenta com o aumento da distância da bexiga, estudos encontraram concentrações mais elevadas no lobo lateral da zona periférica e níveis mais baixos na zona central. São encontrados níveis elevados nas mitocôndrias das células epiteliais o que causa inibição da oxidação e baixa respiração celular (COSTELLO, *et al.*, 1999, 2000)

As células epiteliais são altamente especializadas em sintetizar, acumular e segregar altos níveis de citrato, que é uma das principais funções da glândula prostática. O alto nível de zinco nas mitocôndrias inibe a atividade da m-acomitase, enquanto previne a oxidação do citrato pelo ciclo de Krebs, resultando o truncamento do ciclo de Krebs antes do primeiro passo da oxidação. O citrato é o produto final do metabolismo nas células prostáticas, considerando que a oxidação do citrato é essencial na maioria das células. A diminuição na oxidação do citrato representa 65% do rendimento de ATP (COSTELLO *et al*, 1998; 1999; 2000).

Diversos estudos mostram que o zinco está associado ao PCa e também a outros tipos de câncer. As células malignas perdem a habilidade de acumular zinco ocasionando uma remoção na inibição da atividade da m-acomitase. O citrato passa a ser completamente oxidado e assim ocorre um aumento na produção de ATP. A proteína transportadora de zinco ZIP1 é responsável pela sua acumulação em células prostáticas. Nas glândulas malignas há uma diminuição de ZIP1 ocasionando a diminuição da concentração de zinco nestas células e propondo que ZIP1 é um tumor supressor e o zinco é um agente anti-tumor no câncer de próstata (COSTELLO *et al*, 1998; 1999; 2000).

Em contraste com a maioria dos dados da literatura (ZAICHICK *et al*, 1997; VARTSKY *et al*, 2003) poucos autores encontraram que há um aumento da concentração de zinco em tecidos com PCa (YAMAN *et al*, 2005). Alguns autores relataram que a diminuição da concentração de zinco se dá no início da formação do tumor e outros que a diminuição ocorre quando a doença já está em um estado avançado. Tem sido bem documentado que há um aumento na concentração de zinco em tecidos de próstatas com Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) em comparação com tecidos normais (ZAICHICK, *et al.*, 1997). Foi documentado que a concentração de

zinco varia linearmente com idade a partir de 14 anos até um máximo na idade entre 46 a 55 anos e após a idade de 55 anos ocorre uma ligeira diminuição da concentração. Sendo o valor médio das concentrações na idade entre 41 e 65 anos 2 vezes superior do que em homens com idade entre 14 e 40 anos. O aumento drástico da incidência de PCa em homens com mais de 50 anos pode estar relacionado com elevado teor de zinco, pois concorda com a idade dinâmica da acumulação do zinco (ZAICHICK, 2004). Estudos observaram que há maior mortalidade por PCa em países com maior consumo per cápito de zinco e um aumento no risco de PCa pelo uso elevado de suplementos de zinco, mas sugerem que mais estudos sejam realizados quanto à suplementação de zinco (SCHRAUZER *et al.*, 1977, KEY *et al.*, 1997, KRISTAL *et al.*, 1999).

g) Bromo

A concentração de bromo apresentou diferenças significativas entre os três grupos estudados. As amostras com tumor apresentaram redução em sua mediana de 57 % com relação a mediana de amostras normais e de 50 % com relação as amostras com HPB. A mediana de Br foi 14 % menor em amostras com HPB com relação as amostras normais. A maior parte do bromo é encontrada no mar na forma de brometo. Ainda não se conhece muito bem as suas funções no organismo. O bromo funciona como a insulina no metabolismo do açúcar. Também ajuda a levar as proteínas no lugar onde são necessárias. À medida que se envelhece, retem-se menos bromo no organismo. O bromo também ajuda no crescimento, evita a hipertensão e abaixa a pressão sanguínea. Assim como o cloro o bromo também reage com rapidez com muitos elementos e compostos químicos, assim sua análise também foi prejudicada.

h) Rubídio

A mediana do rubídio apresentou redução de 38% nas amostras cancerígenas comparando com a das amostras normais. As amostras com HPB apresentaram uma redução de 50% em relação às amostras normais. O Rb pertence à mesma série periódica do lítio, sódio, potássio, e céσιο. O rubídio é encontrado em potencialmente todos sistemas biológicos (FIEVE, JAMISON., 1982). Os metais alcalinos penetram membranas celulares que seguem certas leis definidas, o lítio que desloca sódio, e o

rubídio e o céσιο que deslocam o potássio (SCHROEDER, 1960). Fisiologicamente, o rubídio se assemelha ao potássio, e é assumido que estes dois elementos têm um alto grau metabólico de intermutabilidade. Em células com câncer, somente a água, o açúcar, o potássio, o céσιο e o rubídio podem incorporar-se às células, conseqüentemente o rubídio é um dos minerais usados na terapia para elevação do pH. Em estudos com ratos, o rubídio ajudou na redução do tumor.

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Neste trabalho utilizou-se a fluorescência de raios X por reflexão total com radiação síncrotron para analisar amostras de próstata com câncer, com HPB e amostras de próstata normais.

A SRTXRF provou ser uma técnica altamente eficiente na análise de amostras biológicas sendo capaz de determinar concentrações elementares baixas ($\mu\text{g.g}^{-1}$). Através da técnica foi possível detectar os elementos: P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn, Br e Rb.

A análise das distribuições mostrou que se trata de uma distribuição assimétrica, o que já era esperado já que estudos anteriores relataram que a distribuição da concentração elementar em tecidos biológicos é assimétrica (MAJEWSKA *et al*, 1997, KUBALA-KUKUS *et al.*, 2004).

As concentrações elementares encontradas em níveis mais elevados foram dos elementos P, S e K. A análise dos resultados mostrou uma redução na concentração dos elementos S, Cl, K, Ca, Fe, Zn, Br e Rb nas duas patologias comparando com as concentrações obtidas para tecidos normais e um aumento na concentração de P. Comparando com os resultados da literatura, os valores de concentração elementares determinados estão próximos.

A análise através do teste não paramétrico de Mann-Whitney U mostrou, com 5% de significância, que as amostras de próstata com Câncer apresentam uma diminuição de 37% de S, 78% de Cl, 69% de K, 54% de Ca, 82% de Fe, 61% de Zn, 57% de Br e de 38% de Rb, em comparação com tecidos prostáticos normais.

Em amostras de próstata com HPB, a mesma análise mostrou que há uma redução na concentração de 70% de Cl, 62% de K, 51% de Ca, 73% de Fe, 25% de Zn, 14% de Br e de 50% de Rb em relação às amostras de próstatas normais.

A comparação das concentrações de amostras de próstata com Câncer com as amostras de próstata com HPB mostrou com 95% de confiança uma diminuição significativa de 24% de S, 28% de Cl, 33% de Fe, 48% de Zn e 50% de Br.

A diferença encontrada entre as concentrações elementares mostrou que os elementos que apresentaram alterações podem estar envolvidos no processo das neoplasias da próstata.

O alto nível de zinco no tecido prostático em comparação a outros tecidos, sua associação com enzimas que estão associadas a processos cancerígenos e a alteração da concentração encontrada neste e em outros estudos, mostram que o desenvolvimento e progressão de neoplasias prostáticas podem estar relacionados à concentração de zinco na próstata. Estas associações fazem deste mineral um possível bioindicador de câncer prostático.

Com o propósito de dar continuidade a esse estudo segue abaixo sugestões para trabalhos futuros.

- a) Aumentar o número de amostras com câncer e amostras normais para assim melhorar a análise estatística,
- b) Analisar a distribuição elementar bidimensional na próstata através da técnica μ XRF com radiação Síncrotron
- c) Aplicar a técnica XANES para determinar a estrutura molecular vizinha aos átomos de Zn em tecidos prostáticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRALE. Disponível on line em: <http://www.abrale.org.br/doencas/cancer/>. Acesso em: 15/05/2008.

AIGINGER H., WOBRAUSCHEK P., 1974, "A method for quantitative X-ray fluorescence analysis in the monogram region, Nuclear Instruments and Methods, v. 114, pp. 157.

ACS, 2008, "*Cancer Facts & Figures 2008*", Atlanta: American Cancer Society. Disponível on line em: www.cancer.org. Acesso em: 15/05/2008.

ABCANCER. Disponível online em: <http://www.abcancer.org.br/>. Acesso em: 15/05/2008.

AUREA. Disponível online em: http://www.uac.pt/~aurea/pdf__S_Social_novo/slides3.pdf. Acesso em: 04/08/2008.

BACCHI C.E., ALMEIDA P.C.C., FRANCO M., 1995, "Manual de padronização de laudos histopatológicos", São Paulo, Sociedade Brasileira de Patologia, pp. 147-161.

BARRY M.J., 1990, "Epidemiology and natural history of benign prostatic hyperplasia", *Urologic Clinics of North America*, v. 17, pp. 495-507.

BARRY S.J., ISAACS J.T., 1984, "The development of human benign prostatic hyperplasia with age", *The Journal of Urology*, v. 132, pp. 474-477.

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

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

BERRY M.J., COFFEY D.S., WALSH P.C., *et al.*, 1984, "The development of human benign prostatic hyperplasia whith age", *The Journal of Urology*, v. 182, pp. 474-479.

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.

BÖCKING A., KIEHN J., HEINZEL-WACH M., 1982, "Combined histologic grading of prostatic carcinoma", *Cancer*, v. 50, pp. 288-294.

BOUMANS P., KLOCKENKÄMPER R., 1989, "Total reflection X-ray fluorescence spectrometry", *Spectrochimica Acta B*, v. 44, pp. 433-549.

BUNCHAFT G., KELLNER S.R.O., 1997, *Estatística sem mistérios*. 2 ed., Petrópolis, Vozes.

CAMPOS H., 1976, *Estatística Experimental Não-Paramétrica*. Piracicaba, SP, ESALQ/USP.

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.

CARVALHO M.L., MAGALHÃES T., BECKER M., *et al.*, 2007, "Trace elements in human cancerous and healthy tissues: a comparative study by EDXRF, TXRF, synchrotron radiation and PIXE", *Spectrochimica Acta Parte B*, v 62, pp. 1004 – 1011.

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.

COLORO. Disponível on line: <http://www.higieneocupacional.com.br/download/cloro-carbocloro.pdf>. Acesso em: 29/06/2008.

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

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., LIU Y., ZOU J., *et al*, 1999, "Evidence for a zinc uptake transporter in human prostate cancer cells which is regulated by prolactin and testosterone", *The Journal of Biological Chemistry*, v. 274, pp. 17499-17504.

COSTELLO L.C., FRANKLIN R.B., LIU Y., *et al.*, 2000, "Zinc causes a shift toward citrate at equilibrium of the m-aconitase reaction of 87. prostate mitochondria", *Journal of Inorganic Biochemistry*. v. 78, pp.161-165.

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.

DHSS. Disponível on line em: <http://www.dhss.delaware.gov/>. Acesso em: 15/05/2008.

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.

EDNALDO. Disponível online em: <http://www.famat.ufu.br/prof/ednaldo/eqq18/Material2-2008.pdf>. Acesso em: 04/08/2008

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.

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., ALLSBROOK W.C., AMIN M.B., *et al.*, 2005, “The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma”. *The American journal of surgical pathology*, v. 29, pp. 1228-1242.

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.

FARQUHARSONA M. J., GERAKIB K., FALKENBERGC 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.

FARQUHARSON M.J., AL-EBRAHEEM A., FALKENBERG G., *et al.*, 2008 “The distribution of trace elements Ca, Fe, Cu and Zn and the determination of copper oxidation state in breast tumour tissue using μ SRXRF and μ XANES”, *Physics in Medicine and Biology*, v. 53, n. 11, pp. 3023–3037.

FERGUSON J.K., BOSTWICK D.G., SUMAN V., *et al.*, 1995, “Prostate-specific antigen detected prostate cancer: Pathological characteristics of ultrasound visible versus ultrasound invisible tumors”, *European urology*, v.27, p.8-12.

FEUSTEL A., WENNRICH R., DRRNUCRK H., 1987, “Zinc, Cadmium and Selenium Concentrations in Separated Epithelium and Stroma from Prostatic Tissues of Different Histology”, *Urological Research*, v. 15, pp. 161-163.

FEUSTEL A., WENNRICH R., SCHMITT B., 1989, “Serum-Zn-levels in prostatic cancer”, *Urological Research*, v. 17, pp. 41.

FIEVE RR, JAMISON KR., 1982, “Rubidium: overview and clinical perspectives”, *Modern problems of pharmacopsychiatry*, v.18, pp. 145–63.

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.

GERAKIK A, M.J. FARQUHARSON D.A., BRADLEY R.P., *et al.*, 2004, “A synchrotron XRF study on trace elements and potassium in breast tissue”. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, v. 213, pp. 564–568.

GLAESSGEN A., 2008. Markers of differentiation and prognosis in prostate câncer – 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.

GLEASON D.F., 1977, “Histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma”. In: Tannenbaum M. *Urologic Pathology: The Prostate Philadelphia*, Lea & Febiger, 171-198.

IDE-EKTESSABI A., FUJISAWA S., SUGIMURA K., *et al.*, 2002, “Quantitative analysis of zinc in prostate cancer tissues using synchrotron radiation microbeams”, *X-Ray Spectrometry*, v. 38, pp. 7-11.

INCA. Disponível on line: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em 01/11/2008.

JAJA A., MAHENDRA N. M., CHOWDHURY A. R., *et al.*, 1980, “Trace elements in prostatic tissue and plasma in prostatic diseases of man”, *Indian journal of cancer*, v. 17, pp. 34-37.

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.

JONES K.W, 1992, “Synchrotron Radiation-Induced X-ray Emission”. In: Van Grieken. R.E., Markowicz A., *Handbook of X-ray Spectrometry*, 1 ed, chapter 8, New York, Marcel Deckker.

KEY T.J.A., SILCOCKS P.B., DAVEY G.K., et al., 1997, "A case-control study of diet and prostate cancer", *British journal of cancer*, v. 76, pp. 678-687.

KIM J.K., KIM D.Y., LEE Y.H., et al., 1998, "In vivo differential diagnosis of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: localized proton magnetic resonance spectroscopy using external-body surface coil", *Magnetic Resonance Imaging*, v. 16, n. 10, pp. 1281-1288,

KLOCKENKÄMPER R., KNOTH, J., PRANGE A, et al., 1992, "Total Reflection XRay Fluorescence Spectroscopy", *Analytical Chemistry*, v. 64, pp. 1115 - 1123.

KLOCKENKÄMPER R., VON BOHLEN A., 1996, "Elemental Analysis of environmental samples by Total-Reflection X-Ray Fluorescence: a review", *X-Ray Spectrometry*, v. 25, pp. 156-162.

KRISTAL A.R., STANFORD J.L., COHEN J.H., et al., 1999, "Vitamin and mineral supplement use is associated with reduced risk of prostate cancer", *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, v. 8, pp. 887-92.

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 B*, v. 150, pp. 193 – 199.

KUBALA-KUKUS A., KUTERNOGA E., BRAZIEWICZ J., et al., 2004, "Log-stable concentration distributions of trace elements in biomedical samples", *Spectrochim. Acta Part B*, v. 59, pp. 1711-1716.

KUBALA-KUKUS A., BANAS D., BRAZIEWICZ J., et al., 2007, "Analysis of elemental concentration censored distributions in breast malignant and breast benign neoplasm tissues", *Spectrochimica Acta Part B*, v.62, pp. 695-701.

KWIATEK W.M., KUBICA B., PALUSZKIEWICZ C., et al., 2001, "Trace element analysis by means of synchrotron radiation, XRF, and PIXE: selection of sample preparation procedure", *Journal of Alloys and Compounds*, v. 328, pp. 283-288.

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., BANAS A., GAJDA M., et al., 2005, "Cancerous tissues analyzed by SRIXE". *Journal of Alloys and Compound*, v. 401, pp. 173-177.

KWIATEK W.M., BANAS A., BANAS K., et al., 2007, "Micro and bulk analysis of prostate tissues classified as hyperplasia", *Spectrochimica Acta Part B*, v. 62, pp 707-710.

LACHANCE G.R., CLAISSE, F., 1995, *Quantitative X-Ray Fluorescence Analysis: Theory and Application*, 1 ed., New York, John Willey & Sons.

LAHTONEN R., 1985, “Zinc and cadmium concentrations in whole tissue and in separated epithelium and stroma from human benign prostatic hypertrophic glands”, *Prostate*, v. 6, pp. 177-183.

LEE C., BUSHMAN W., 1995, “Prostatic duct biology”, *Prospectives*, v. 3, n. 1, pp. 1-4.

LEE C., KOZLOWSKI J.M., GRAYHACK J.T., 1995, “Etiology of benign prostatic hyperplasia”, *The Urologic clinics of North America*; v. 22, n. 2, pp. 237-246.

LEITÃO C. C. G., 2005, Avaliação Multielementar em Soro Humano de Indivíduos Portadores de Leucemia Mielóide Crônica por SRTXF. Tese de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil..

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.

LIMA G.P.A, 2001, “Pode um modelo de homogeneização por fatores ser melhor que um modelo de regressão? resposta pelo coeficiente de homogeneidade do modelo!”, *Congresso Brasileiro de Engenharia de Avaliações e Perícias*. Guarapari (ES), 14 a 21 de outubro.

LOPEZ-BELTRAN A., MIKUZ G., LUQUE R.J., *et al.*, 2006, “Current practice of Gleason grading of prostate carcinoma”, *Virchows Archiv : an international journal of pathology Links*, v. 448, pp. 111-118.

MAFRA D., COZZOLINO S. M. F., 2004, “Importância do zinco na nutrição humana”, *Revista de Nutrição*, v. 17, pp. 79-87.

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.

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.

MAPEZYŃSKA A., KULPA J., LENKO J., 1983, “The concentration of zinc in relation to fundamental elements in the diseases of human prostate”, *International urology and nephrology*, v. 15, pp. 257.

MCCULLOUGH D.L., 1988. 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.

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., 1988. "Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma", *The American journal of surgical pathology*, v.12, pp.897.

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

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

MENDONÇA V. L. E LOPES S., 2003, "Uma Organela no Núcleo Celular". Disponível on line: <http://www.uol.com.br/cienciahoje/chdia/n857>. Acesso em: 29/06/2008.

MINERAIS. Disponível on line: <http://www.br-business.com.br/port/minerais.htm>. Acesso em: 29/06/2008.

MOSTOFI F.K., 1975, "Grading of prostatic carcinoma", *Cancer chemotherapy reports*, v. 59, pp.111-117.

MOSTOFI F.K, SESTERHENN I., SOBIN L.H., 1980, "Histological typing of prostate tumors". In: Mostofi FK, *International Histological Classification of Tumors*, n. 22, 1-26, Geneva, World Health Organization.

MURPHY G.P., GAETA J.F., PICKREN J., *et al.*, 1980, "Current status of classification and staging of prostate cancer", *Cancer*, v. 45, pp. 1889-1895.

NASCIMENTO FILHO, V. F., 1999, "Técnicas analíticas nucleares de fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF) e por reflexão total (TXRF)". Disponível on line em: [http://fap01.if.usp.br/~tabacnik/FAP5844/edxrf_txrf-virgilio\(1999\).doc](http://fap01.if.usp.br/~tabacnik/FAP5844/edxrf_txrf-virgilio(1999).doc). Acesso em: 10/09/2007.

NCI. Disponível on line em: <http://www.cancer.gov>. Acesso em: 15/05/2008

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.

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

OLIVEIRA. L. C. M., 2000, “X Rays Fluorescence Spectroscopy”. Disponível on line: <http://www.dsif.fee.unicamp.br/~furio/IE607A/XRF.pdf>. Acesso em: 15/11/2007.

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, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

OLIVEIRA R.W.M., 2004, Avaliação da qualidade das águas do ribeirão jacuba empregando a Fluorescência De Raios X Por Reflexão Total com Radiação Síncrotron (SR-TXRF). M.Sc., Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

ONCOGUIA. Disponível online em: <http://www.oncoguia.com.br/>. Acesso em: 15/05/2008.

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.*, “Global cancer statistics, 2002”, *CA: a cancer journal for clinicians*, v.55, p.74, 2005.

PEREZ, C.A., BRADY, L. W., 1997, ***Principles and Practice of Radation Oncology***. 3ed, Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers.

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.

RUSSELL, D.W., WILSON J.D., 1994. “Steroid 5 alpha-reductase: two genes/twoenzymes” *Annual review of biochemistry*, v. 63, pp. 25-61.

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.

SANDSTRÖM B., 1997, “Bioavailability of zinc”, *European journal of clinical nutrition*, v. 51, pp.17-19.

SCHRAUZER G.N., WHITE D.A., SCHNEIDER C.J., 1977, “Cancer mortalitycorrelation studies—IV: Associations with dietary intakes and blood levels of certain trace elements, notably Se-antagonists”, *Bioinorganic chemistry*, v. 7, pp. 35-56.

SCHROEDER H.A., 1960, “Possible relationships between trace metals and chronic diseases”, In: Seven M.J., Johnson L.A., *Metal-binding in medicine*. pp. 59–65, Philadelphia, J.B. Lippincott Company.

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, pp. 914–921.

SIEGEL S., 1975, *Estatística nao-parametrica: para as ciencias do comportamento*. Sao Paulo, Mcgraw-Hill.

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.

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.

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.

STRELI C., WOBRAUSCHEK P., MEIRER F., *et al.*, 2008, “Synchrotron radiation induced TXRF”, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 23, pp. 792–798.

SZCKUREK E. I., BJORNSSON C. S., TAYLOR C.G., 2001, “Dietary zinc deficiency and repletion modulate metallothionein immunolocalization and concentration in small intestine and liver of rats”, *The Journal of nutrition*, v. 131, pp. 2132-2138.

TOLEDO G.L., 1995. *Estatística basica*. 2 ed, São Paulo, Atlas

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.

TRIOLA, M.F., 1999. *Introdução a estatística*. 7 ed, Rio de Janeiro, LTC.

URO PATOLOGIAS. Disponível on line em: http://www.urologia-mg.com.br/uro_pat_homem_pros.htm. Acesso em: 03/11/2008.

UTZ D. C., FARROW G.M., 1969, “Pathologic differentiation and prognosis of prostatic carcinoma”, *The journal of the American Medical Association*, v. 209, pp. 1701-1703.

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*, n. 170, p. 2258-2262.

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.

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

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.

World Health Organization. Disponível online em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>. Acesso em: 15/05/2008.

WU T., SEMPOS C. T., FREUDENHEIM J. L., *et al.*, 2004, “Serum Iron, Copper and Zinc Concentrations and Risk of Câncer Mortality in US Adults”, *Annals of epidemiology*, v. 14, pp. 195-201.

YAMAN M., ATICI D., BAKIRDERE S., *et al.*, 2005, “Comparison of Trace Metal Concentrations in Malign and Benign Human Prostate”, *Journal of medicinal chemistry*, v. 48, pp. 630-634.

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.

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, pp.229-234.

A.1 – FORMAÇÃO DE UM TUMOR

O corpo é constituído por muitos tipos de células, e estas são formadas por três partes: a membrana celular, que é a parte mais externa da célula; o citoplasma, que constitui o corpo da célula; e o núcleo, que contém os cromossomos que por sua vez são compostos de genes. Os genes são arquivos que guardam e fornecem instruções para a organização das estruturas, formas e atividades das células no organismo (ABRALE, 2008). Toda a informação genética encontra-se inscrita nos genes, numa "memória química" - o ácido desoxirribonucleico (DNA). É através do DNA que os cromossomos passam as informações para o funcionamento da célula (INCA, 2008).

Estas células se reproduzem através de um processo chamado divisão celular. Em condições normais, esse processo é ordenado e controlado e é responsável pela formação, crescimento e regeneração dos tecidos saudáveis do corpo (ONCOGUIA, 2008). Ao tornarem-se células velhas ou danificadas, elas morrem e são substituídas por novas células. No entanto, por vezes, este processo ordenado ocorre de forma irregular. O material genético (DNA) de uma célula pode ser danificado ou alterados, produzindo mutações que afetam o crescimento e a divisão celular normal. (NCI, 2008). O aparecimento de mutações no DNA ocorre em todos os seres vivos, em um processo que é fundamental para a evolução e diversidade das espécies. Muitas destas mutações não implicam em mudanças detectáveis na atividade metabólica, e passam despercebidas. Outras mutações podem determinar a morte celular, e por consequência, também não são detectáveis. Apenas um pequeno número de mutações que ocorrem em genes específicos pode determinar vantagens e um crescimento desordenado das células (INCA, 2008).

Quando as células acumulam mutações em um número elevado, elas não morrem quando deveriam e novas células são produzidas quando o organismo não precisa delas. As células extras criam uma massa de tecido determinando assim o aparecimento de um tumor (NCI, 2008). Este pode ser "benigno" ou "maligno". A figura A.1 mostra a ilustração do crescimento de um tumor.

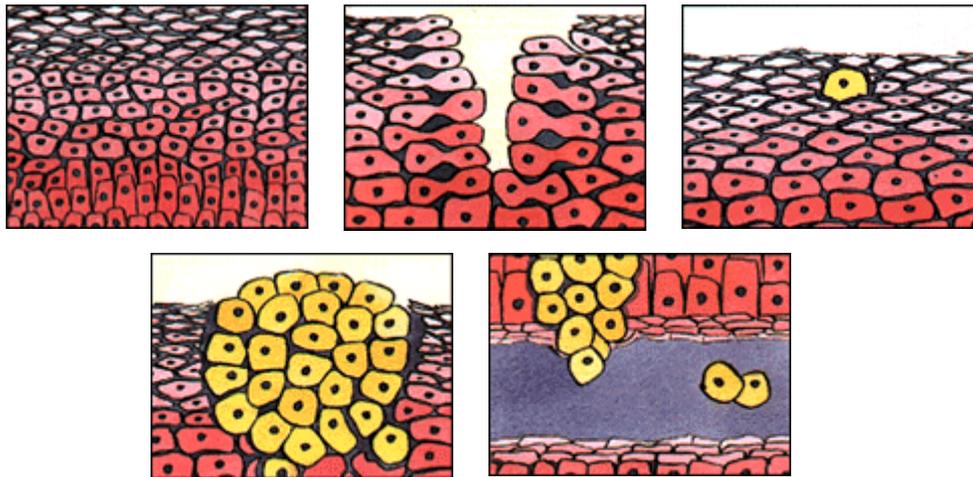


Figura A.1. Ilustração do crescimento de um tumor (NCI, 2008).

- Tumor Benigno – as células deste tumor crescem lentamente e são diferenciadas (semelhantes às do tecido normal) (ONCOGUIA, 2008), geralmente podem ser removidos e, na maioria dos casos, eles não retornam. Mais importante ainda é que as células de tumores benignos não se espalham para outras partes do corpo e são raramente fatais (DHSS, 2008).

- Tumor Maligno – as células deste tumor crescem rapidamente, têm um aspecto indiferenciado e possuem a capacidade de invadir estruturas próximas e espalhar-se para diversas regiões do organismo. Estes tumores são considerados câncer (ONCOGUIA, 2008).

As mutações podem ser resultadas de fatores internos como, hormônios ou o metabolismo de nutrientes dentro das células ou de fatores externos como, tabaco, substâncias químicas e luz solar. Estas mutações não hereditárias são chamadas mutações somáticas (ACS, 2008).

A.2 - CÂNCER

A.2.1 – FORMAÇÃO DO CÂNCER

O processo de carcinogênese, ou seja, de formação de câncer, em geral se dá lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa prolifere e dê

origem a um tumor visível. Esse processo passa por vários estágios antes de chegar ao tumor. São eles:

- Estágio de Iniciação - É o primeiro estágio da carcinogênese. Nele as células sofrem o efeito dos agentes cancerígenos ou carcinógenos que provocam modificações em alguns de seus genes. Nesta fase as células se encontram, geneticamente alteradas, porém ainda não é possível se detectar um tumor clinicamente. Encontram-se "preparadas", ou seja, "iniciadas" para a ação de um segundo grupo de agentes que atuará no próximo estágio.

- Estágio de Promoção - É o segundo estágio da carcinogênese. Nele, as células geneticamente alteradas, ou seja, "iniciadas", sofrem o efeito dos agentes cancerígenos classificados como oncopromotores. A célula iniciada é transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual. Para que ocorra essa transformação, é necessário um longo e continuado contato com o agente cancerígeno promotor. A suspensão do contato com agentes promotores muitas vezes interrompe o processo nesse estágio. Esses agentes cancerígenos são demonstrados em alguns tumores como causa e efeitos, sendo o mais conhecido a nicotina contida no cigarro que aumenta em 12 vezes as chances de câncer de pulmão. Em outros tipos de câncer, essa identificação de causa e efeito ainda não foi definida, por essa razão as causas da doença são ainda um grande objeto de estudo no campo da Oncologia.

- Estágio de progressão - É o terceiro e último estágio e se caracteriza pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas. Nesse estágio o câncer já está instalado, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença (ABRALE, 2008).

O período de tempo que o câncer está escondido é chamado de "período latente". O período latente esta, normalmente, em uma faixa de 10 a 30 anos. O longo período latente torna difícil estudar as causas do câncer (DHSS, 2008).

A.2.2 - CATEGORIAS

Existem vários tipos de câncer, e eles são agrupados em categorias mais amplas. As principais categorias de câncer são:

- Carcinoma - câncer que começa no epitélio ou nos tecidos que cobrem órgãos internos.
- Sarcoma - câncer que começa no osso, cartilagem, gordura, músculo, vasos sanguíneos, ou de outro tecido conjuntivo.
- Leucemia - câncer que começa no sangue que tem formação na medula óssea e provoca um aumento anormal de células do sangue a ser produzidos e entrar no sangue.
- Linfoma e mieloma - cânceres que começam nas células do sistema imunitário.
- Sistema nervoso central - cânceres que começam nos tecidos do cérebro e medula espinhal. (NCI, 2008).

A.2.3 - ORGANIZAÇÃO

A organização descreve a extensão ou expansão da doença na hora do diagnóstico. É essencial para determinar a escolha da terapia. A fase de um câncer está baseada no tamanho do tumor primário, o local e se ele se estendeu para outras áreas do corpo. Vários sistemas distintos são usados para classificar tumores. O TNM organiza o sistema avaliando os tumores de três modos: extensão do tumor primário (T), ausência ou presença de envolvimento de nodo de linfa regional (N), e ausência ou presença de metástases distante (M). Uma vez o T, N, e M são determinados, uma fase de I, II, III, ou IV é nomeada com fase I o estágio de doença prematura e fase IV o estágio de doença avançada. Um sistema diferente de organização (em *situ*, local, regional, e distante) é usado para análise descritiva e estatística de dados de registro de tumor. Se as células de câncer só estiverem presentes na camada de células onde eles desenvolveram e não se estenderam, a fase está em *situ*. Se células de câncer estenderam além da camada original de tecido, o câncer é invasivo (ACS, 2008).

A.2.4 - CAUSAS

As causas de câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural, As causas internas

são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, estão ligadas à capacidade de se defender das agressões externas. Esses fatores causais podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais.

Todo fenótipo celular é devido a uma interação entre o meio ambiente e seu respectivo genótipo. As neoplasias não fazem exceção e assim temos dois tipos de agentes causadores: aqueles que afetam a estrutura genética e aqueles que afetam o citoplasma e a membrana celular de modo permanente (INCA, 2008).

De todos os casos, 80% a 90% dos cânceres estão associados a fatores de risco. O risco de câncer aumenta à medida que mais "fatores de risco" estão presentes, por exemplo, É mais provável, aproximadamente 23 vezes, que fumantes masculinos desenvolvam câncer do pulmão que não-fumantes, assim o risco relativo de fumantes é de 23. Também depende do estado geral de saúde, idade e histórico familiar. Por exemplo, mulheres que têm em primeiro-grau relativo (a mãe, irmã, ou filha) uma história de câncer de mama têm cerca de duas vezes o risco de desenvolver câncer de mama comparando às mulheres que não têm histórico familiar (ABRALE; ACS; DHSS, 2008). Os principais fatores de riscos são:

- Tabagismo - Fumar tabaco, ou utilizar outros produtos do tabaco, e a exposição regular ao fumo do tabaco são conhecidos por causar vários tipos de câncer. Fumar provoca entre 85% e 90% de todos os cânceres de pulmão.

- Dieta - Existe uma ligação entre uma dieta rica em gordura e câncer de cólon, útero e próstata. Alguns estudos indicam que também pode haver uma associação com o câncer de mama. Estar com excesso de peso ou obesidade também está ligado a vários tipos de câncer. Por outro lado, alimentar-se de uma dieta saudável, o que inclui cinco a nove porções de frutas e vegetais por dia, bem como o consumo de fibra de grãos, podem ajudar a proteger contra alguns tipos de câncer.

- Exposição ao sol - Radiação ultravioleta do sol, e também proveniente de lâmpadas de camas de bronzamento artificial, causa danos na pele e podem causar câncer de pele.

- Alcoolismo - Beber grandes quantidades de bebidas alcoólicas aumenta o risco de câncer de mama, boca, garganta, esôfago e laringe. Esses riscos aumentam ainda mais se a pessoa for fumante.

- Exposição em seu ambiente - Sendo exposta a metais, produtos químicos / pesticidas no seu ambiente doméstico ou profissional podem aumentar o risco de câncer. Amianto, níquel, cádmio, urânio, rádio, cloreto de vinila, benzidene e benzeno são exemplos bem conhecidos de todos os agentes cancerígenos no local de trabalho.

- Radiação - Exposição demasiada a certos tipos de radiação pode aumentar o risco de câncer. Para reduzir as chances de câncer, médicos e dentários utilizam raios X ajustados para absorver a menor dose de radiação possível. Exposição demasiada nas residências a rádio podem aumentar o risco de câncer do pulmão, especialmente em fumantes.

- Vírus - Alguns cânceres, nomeadamente câncer de colo do útero em mulheres, são causadas por vírus. Apesar de o vírus que leva ao câncer ser transmitidos de uma pessoa para outra, o câncer em si não é contagioso. Câncer nem sempre ocorre quando o vírus é transmitido, e apenas alguns vírus são conhecidos por causar câncer (DHSS, 2008).

A.2.5 – ESTIMATIVAS

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo. No ano de 2007 houve 7,9 milhões de mortes (cerca de 13% de todas as mortes). É esperado que este número continue crescendo, com um valor estimado em 12 milhões de mortes em 2030 (NCI). Para o ano de 2008 estima-se que aproximadamente 565.650 americanos morram de câncer, mais de 1.500 pessoas por dia. O Câncer é a segunda maior causa de morte no EUA sendo responsável por 1 em cada 4 mortes. A tabela 3.1 mostra as estimativas do número de mortes s por câncer nos EUA em 2008 (ACS, 2008).

Tabela A.1. Estimativas, para o ano 2008, do número de mortes s de câncer nos EUA, (ACS, 2008).

<i>Masculino</i>		<i>Feminino</i>	
Localização primária	Estimativa de mortes	Localização primária	Estimativa de mortes
Pulmão e brônquios	90,81	Pulmão e brônquios	71,03
Próstata	28,66	Mama	40,48
Cólon e reto	24,26	Cólon e reto	25,7
Pâncreas	17,5	Pâncreas	16,79
Fígado	12,57	Ovário	15,52
Leucemia	12,46	Linfoma	9,37
Esôfago	11,25	Leucemia	9,25
Bexiga urinária	9,95	Colo do útero	7,47
Linfoma	9,79	Fígado	5,84
Rim e sistema renal	8,1	Cérebro e sistema nervoso	5,65
Todos os locais	294,12	Todos os locais	271,53

Nos Estados Unidos é esperado diagnosticar aproximadamente 1.437.180 novos casos de câncer em 2008 (ACS, 2008). No Brasil, as estimativas para o ano de 2008, válidas também para o ano de 2009, apontam que ocorrerão 466.730 casos novos de câncer (INCA). As tabelas 3.2 e 3.3 mostram a estimativa de novos casos por tipos de câncer para homens e mulheres nos Estados Unidos e Brasil respectivamente. A figura A1 mostra a distribuição de novos casos por região do Brasil.

Tabela A.2. Estimativas, para o ano 2008, do número de novo casos s de câncer nos EUA, (ACS, 2008).

<i>Masculino</i>		<i>Feminino</i>	
Localização primária	Estimativa de novos casos	Localização primária	Estimativa de novos casos
Próstata	186.320	Mama	182.460
Pulmão e brônquios	114.690	Pulmão e brônquios	100.330
Cólon e reto	77.250	Cólon e reto	71.560
Bexiga	51.230	Colo do útero	40.100
Linfoma	35.450	Linfoma	30.670
Pele melanoma	34.950	Tiróide	28.410
Rim e sistema renal	33.130	Pele melanoma	27.530
Cavidade oral e faringe	25.310	Ovário	21.650
Leucemia	25.180	Rim e sistema renal	21.260
Pâncreas	18.770	Leucemia	19.090
Todos os locais	745.180	Todos os locais	692.000

Tabelas A.3. Estimativas, para o ano 2008, do número de novos casos de câncer no Brasil, (INCA, 2008).

<i>Masculino</i>		<i>Feminino</i>	
Localização primária	Estimativa de novos casos	Localização primária	Estimativa de novos casos
Próstata	49.530	Mama	49.400
Traquéia, Brônquio e Pulmão.	17.810	Traquéia, Brônquio e Pulmão.	9.460
Cólon e Reto	12.490	Cólon e Reto	14.500
Estômago	14.080	Estômago	7.720
-	-	Colo do Útero	18.680
Cavidade Oral	10.380	Cavidade Oral	3.780
Esôfago	7.900	Esôfago	2.650
Leucemias	5.220	Leucemias	4.320
Pele melanoma	2.950	Pele melanoma	2.970
Pele não melanoma	55.890	Pele não melanoma	59.120
Outras Localizações	55.610	Outras Localizações	62.270
Todos os locais	231.860	Todos os locais	234.870

Homens

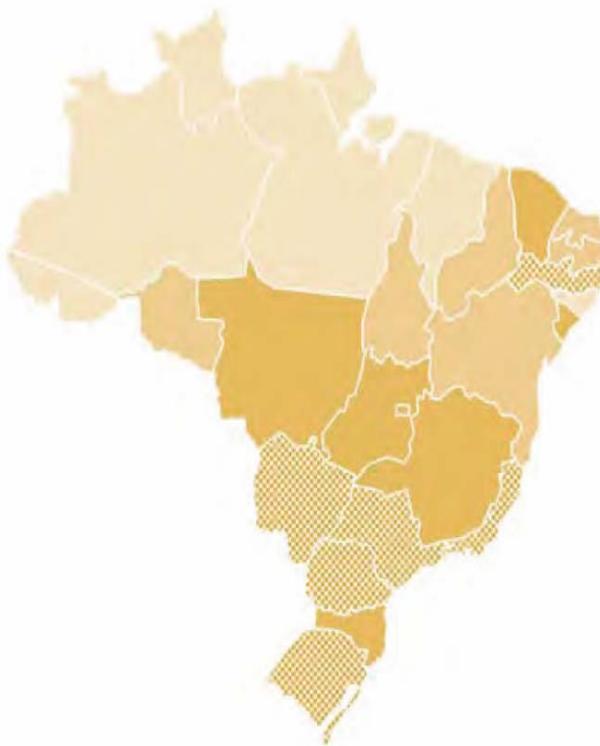
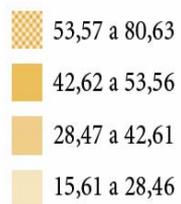


Figura A.2. Distribuição de novos casos por região do Brasil (INCA, 2008).

APÊNDICE B

Neste apêndice são apresentados os gráficos das distribuições de frequências por elemento para os grupos HPB, câncer e normal.

B.1 - DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DAS AMOSTRAS DE PRÓSTATA COM HPB.

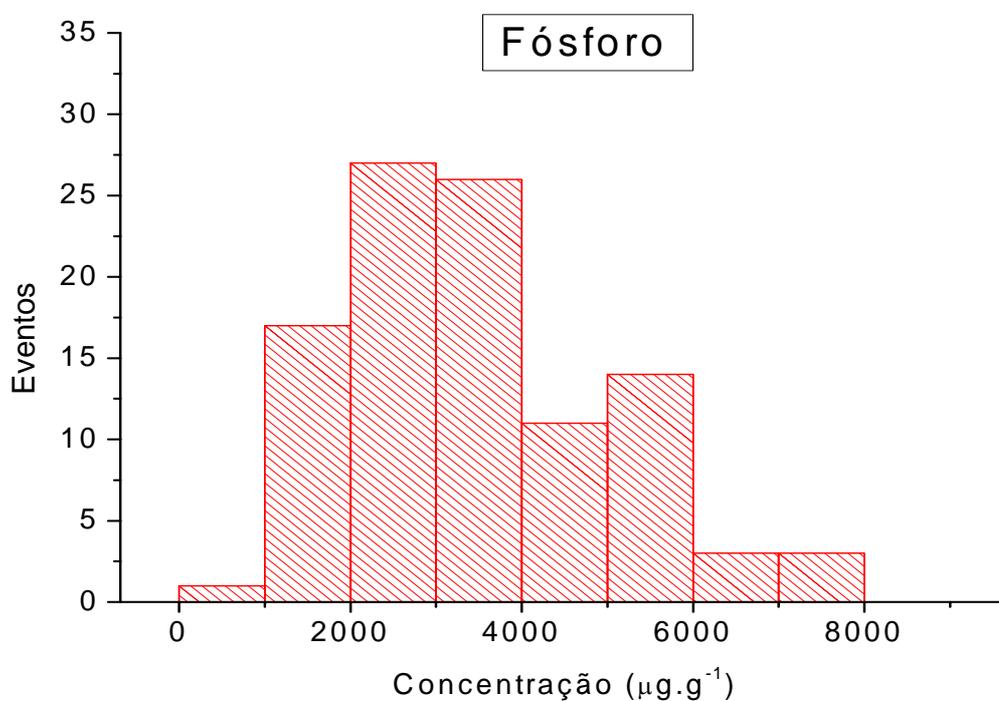


Figura B.1. Distribuição de frequência de fósforo em amostras de próstata com HPB.

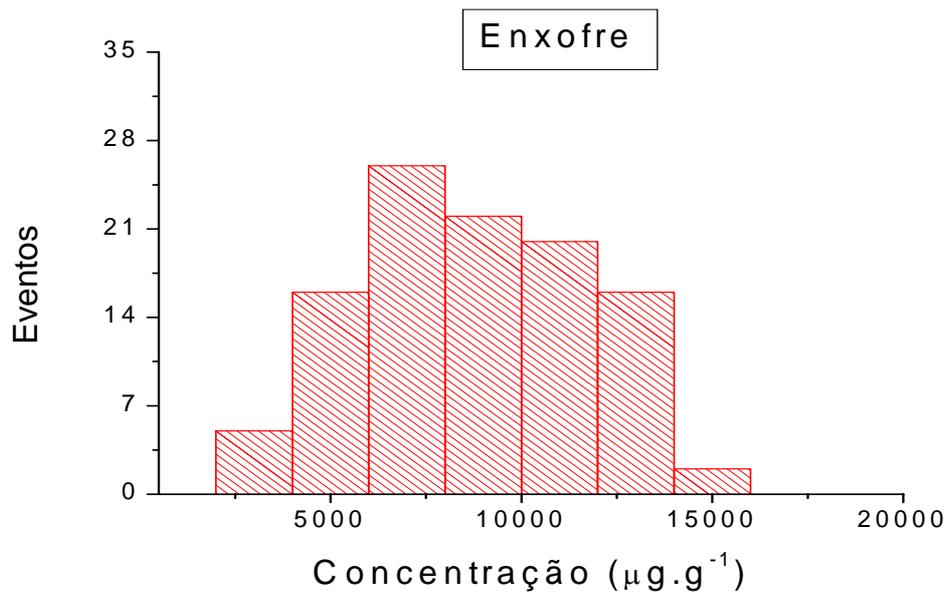


Figura B.2. Distribuição de frequência de enxofre em amostras de próstata com HPB.

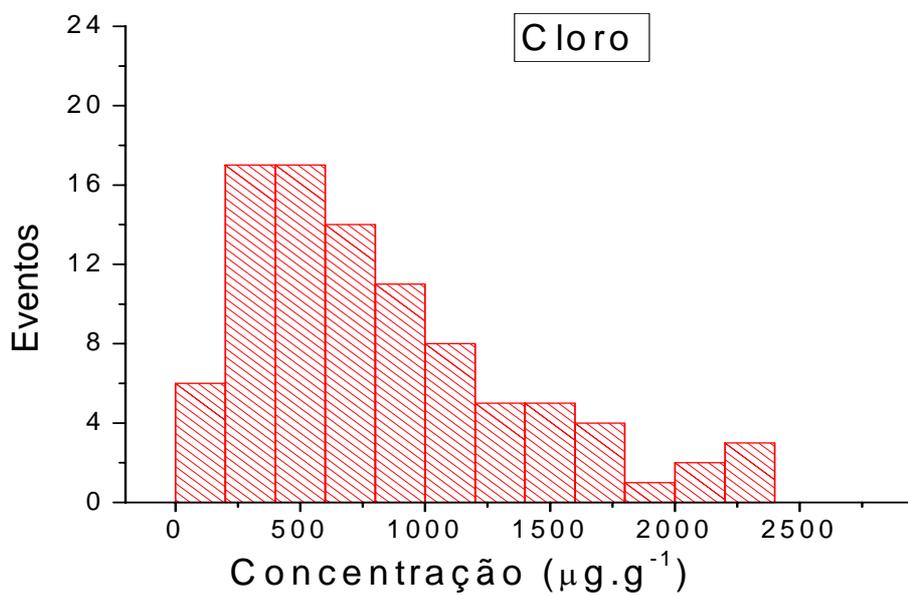


Figura B.3. Distribuição de frequência de cloro em amostras de próstata com HPB.

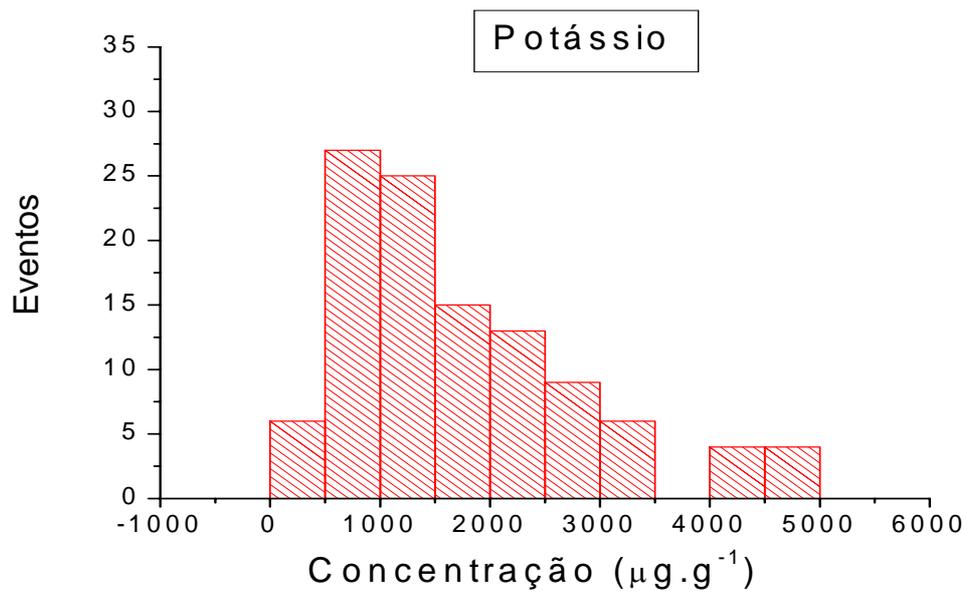


Figura B.4. Distribuição de freqüência de potássio em amostras de próstata com HPB.

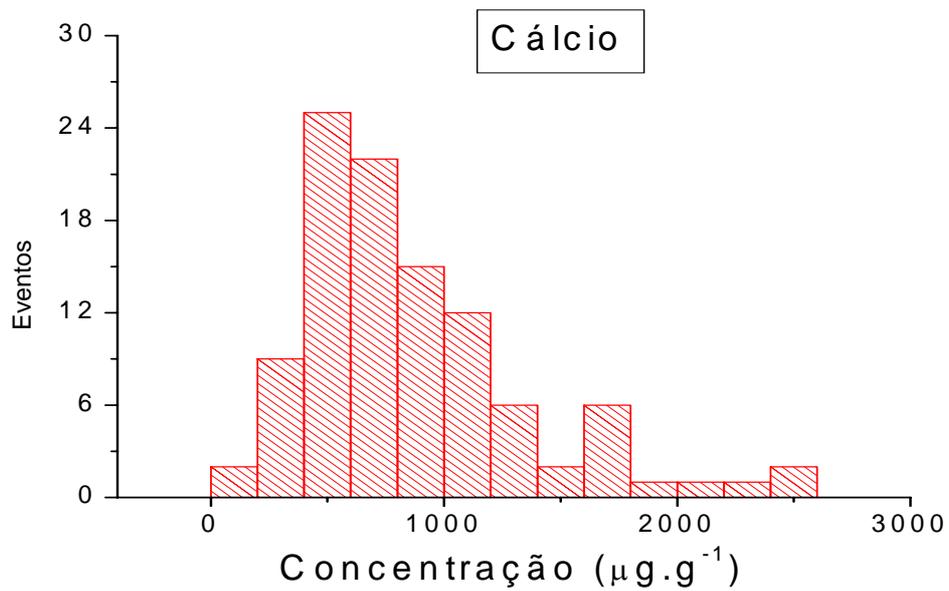


Figura B.5. Distribuição de freqüência de cálcio em amostras de próstata com HPB.

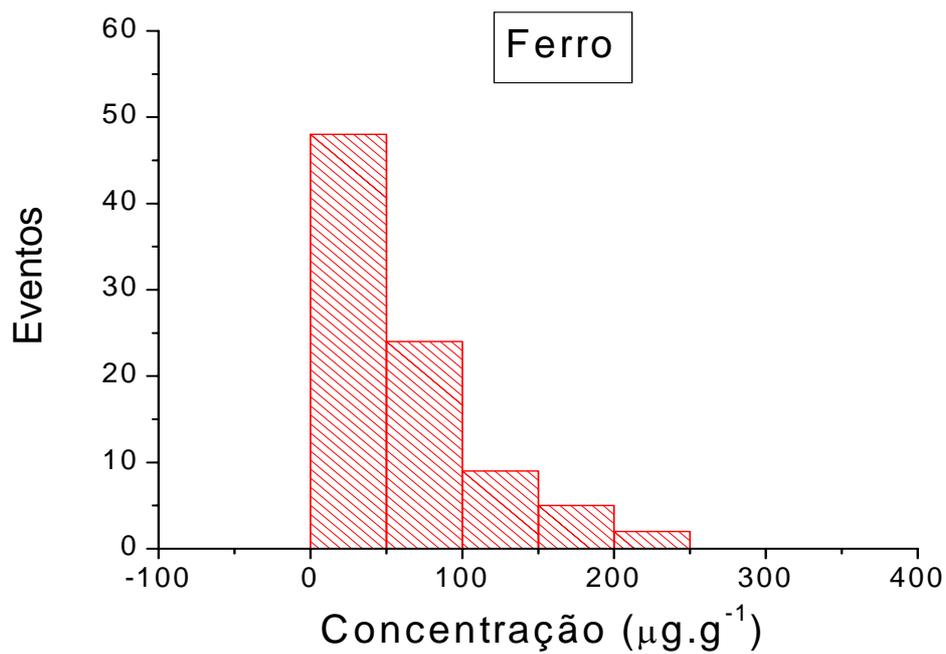


Figura B.6. Distribuição de frequência de ferro em amostras de próstata com HPB.

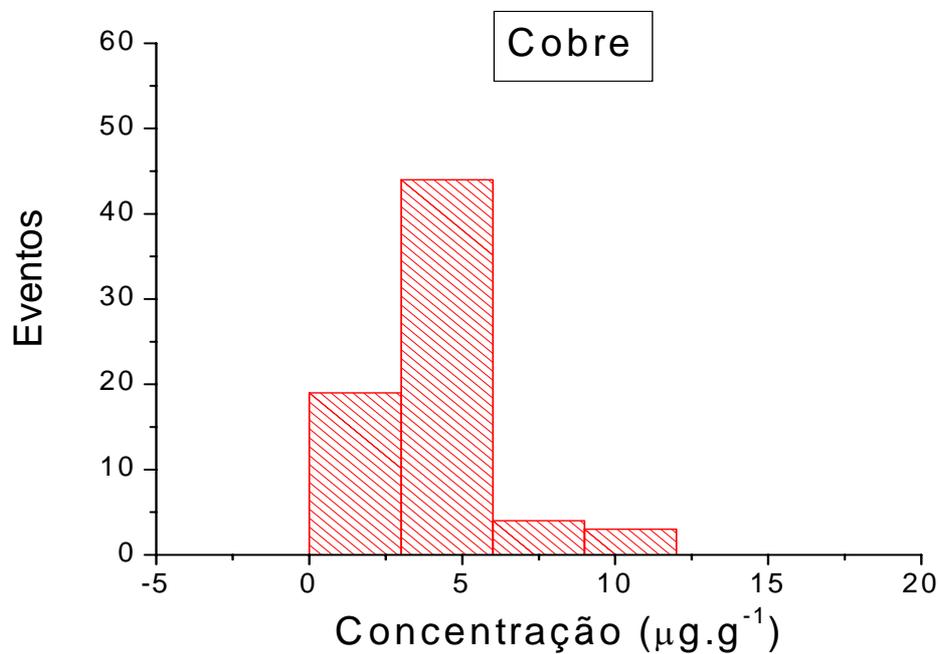


Figura B.7. Distribuição de frequência de cobre em amostras de próstata com HPB.

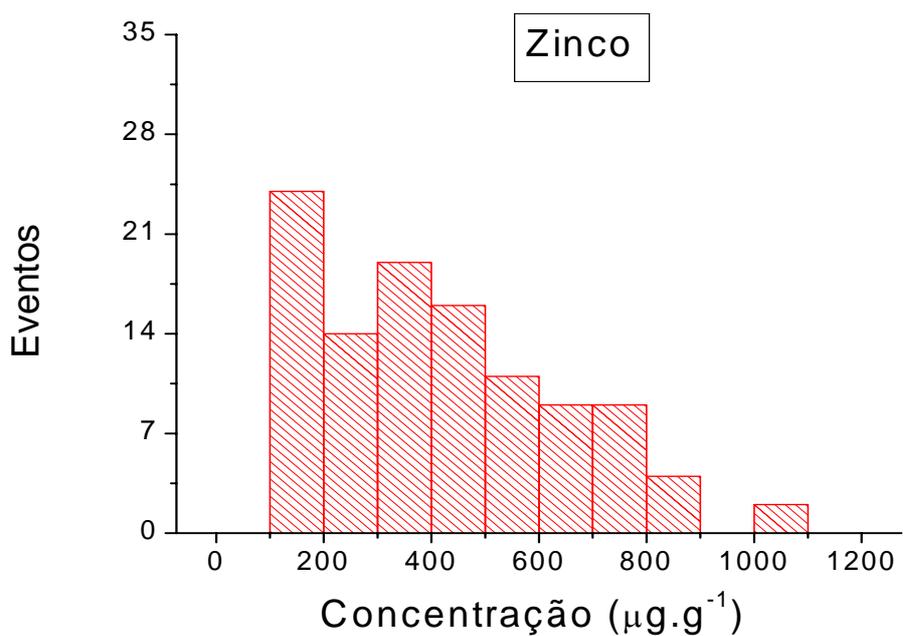


Figura B.8. Distribuição de frequência de zinco em amostras de próstata com HPB.

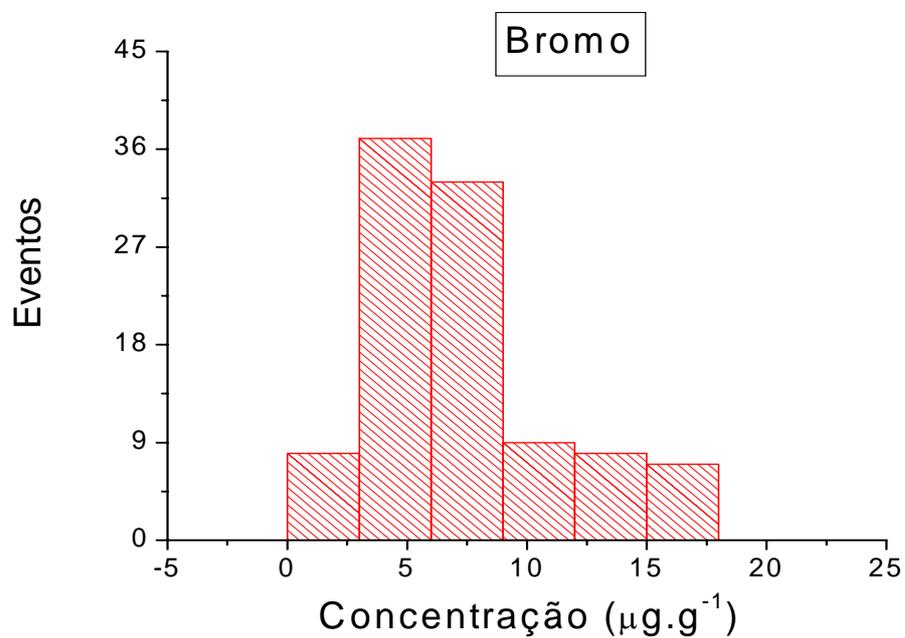


Figura B.9. Distribuição de frequência de bromo em amostras de próstata com HPB.

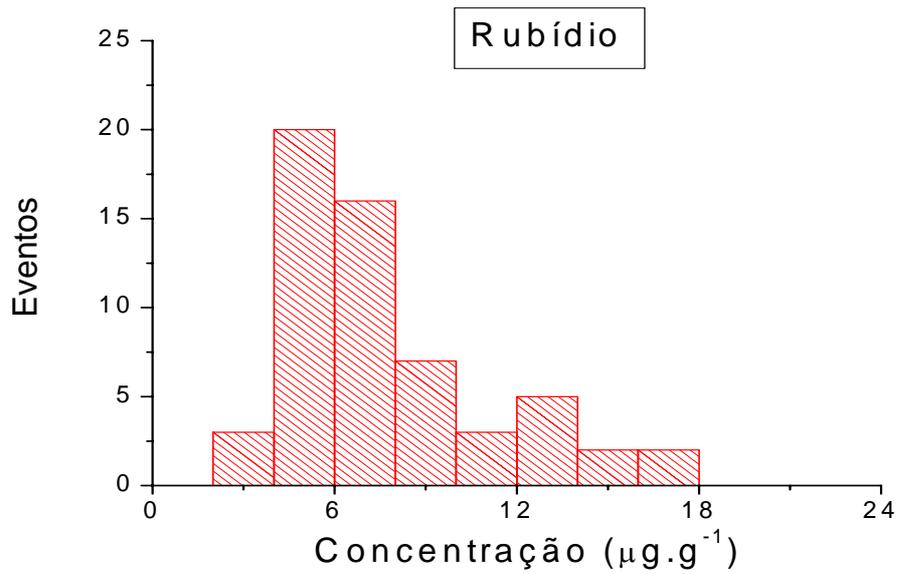


Figura B.10. Distribuição de frequência de cloro em amostras de próstata com HPB.

B.2 - DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DAS AMOSTRAS DE PRÓSTATA COM CÂNCER.

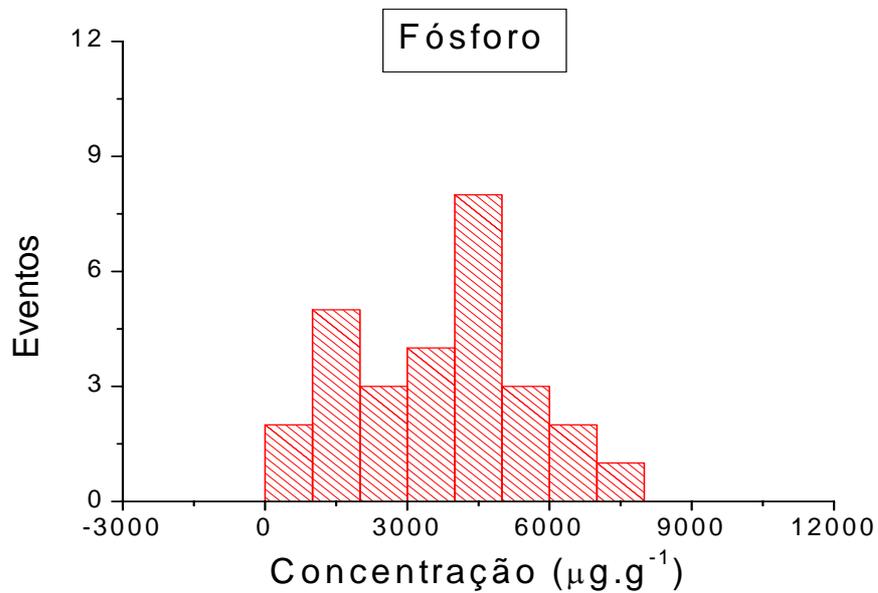


Figura B.11. Distribuição de frequência de fósforo em amostras de próstata com câncer.

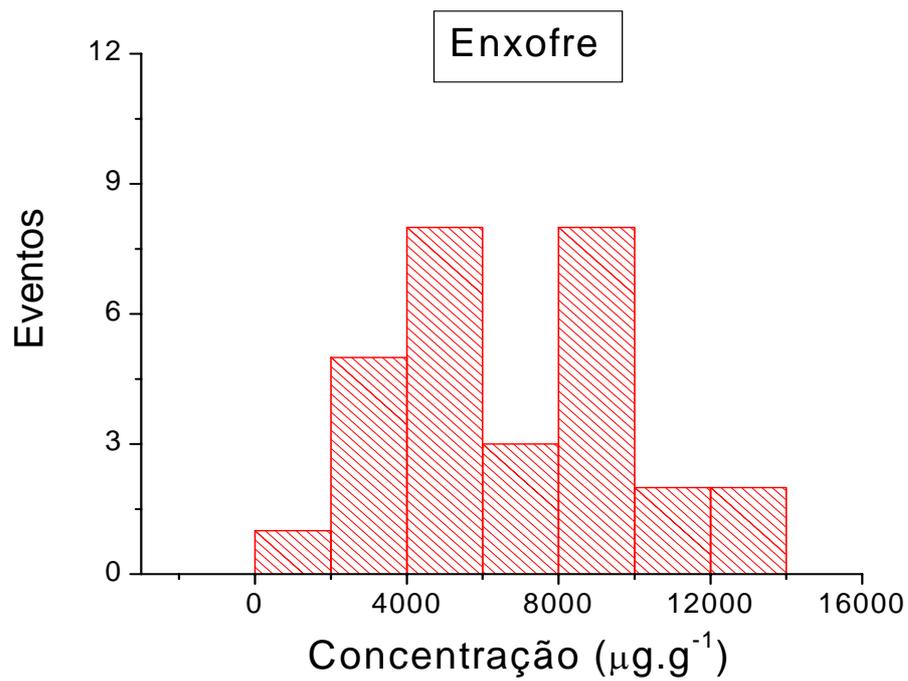


Figura B.12. Distribuição de frequência de enxofre em amostras de próstata com câncer.

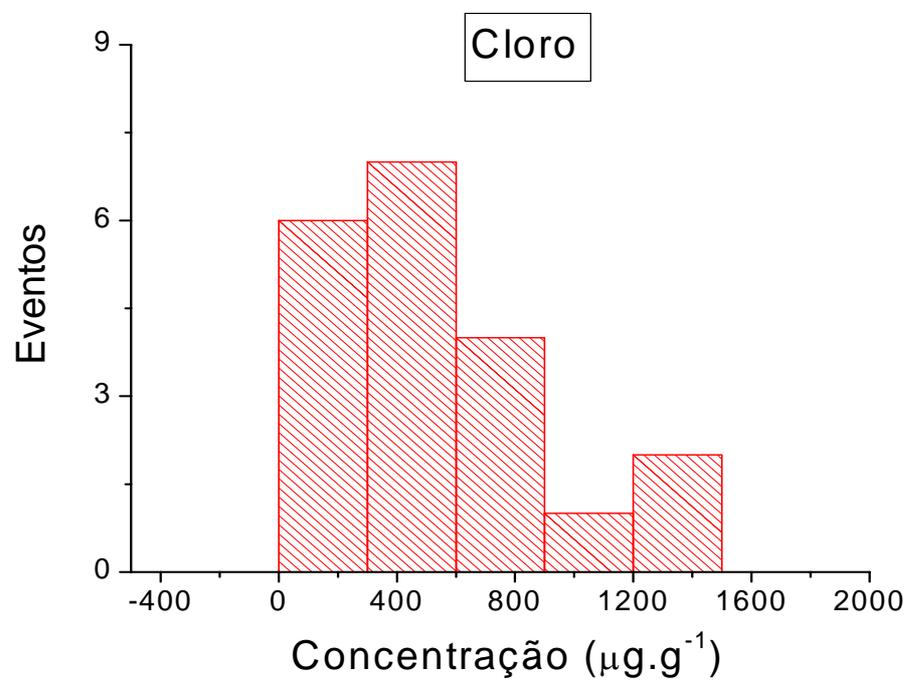


Figura B.13. Distribuição de frequência de cloro em amostras de próstata com câncer.

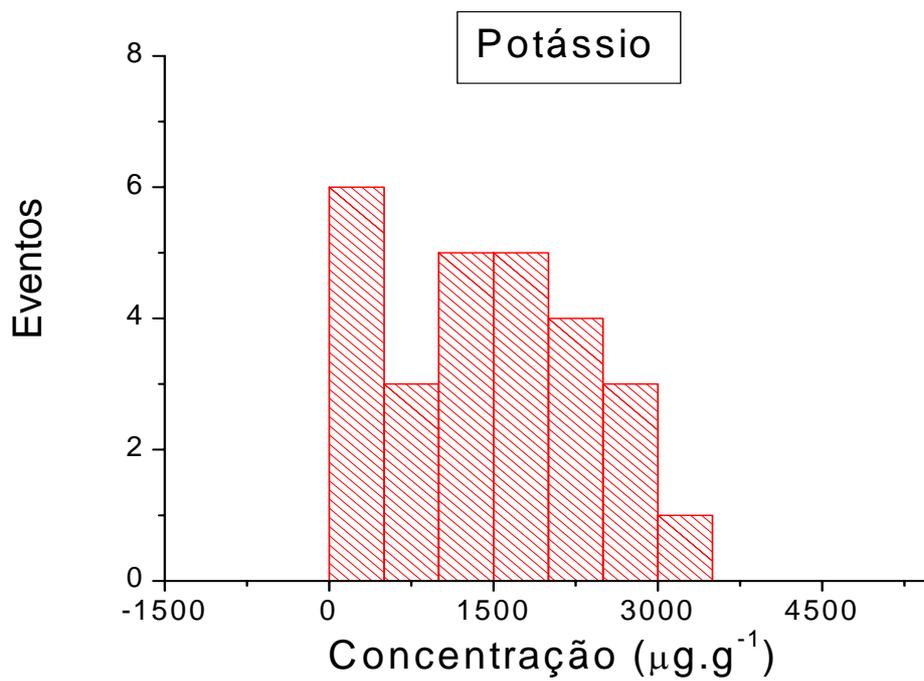


Figura B.14. Distribuição de frequência de potássio em amostras de próstata com câncer.

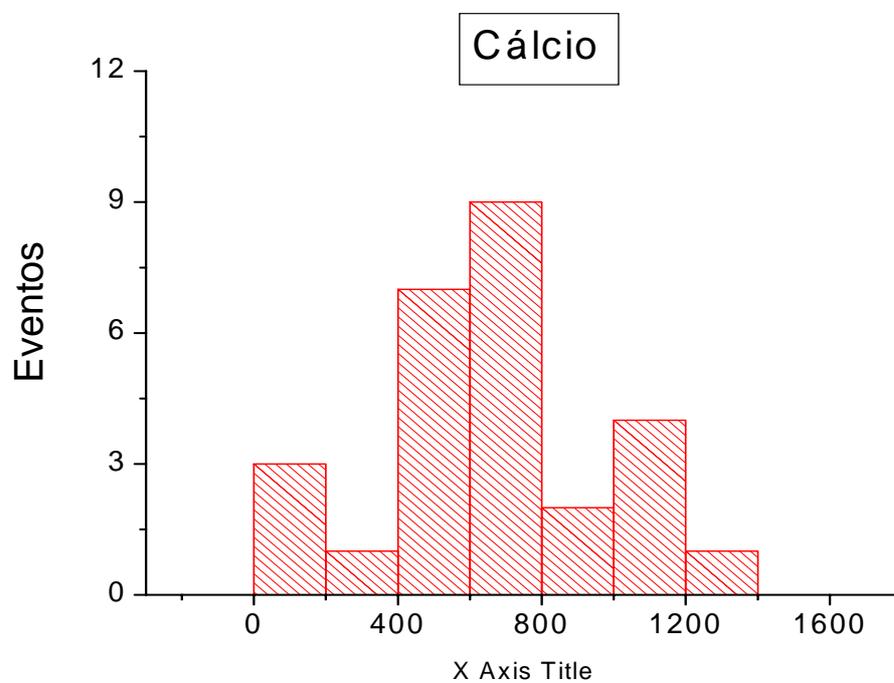


Figura B.15. Distribuição de frequência de cálcio em amostras de próstata com câncer.

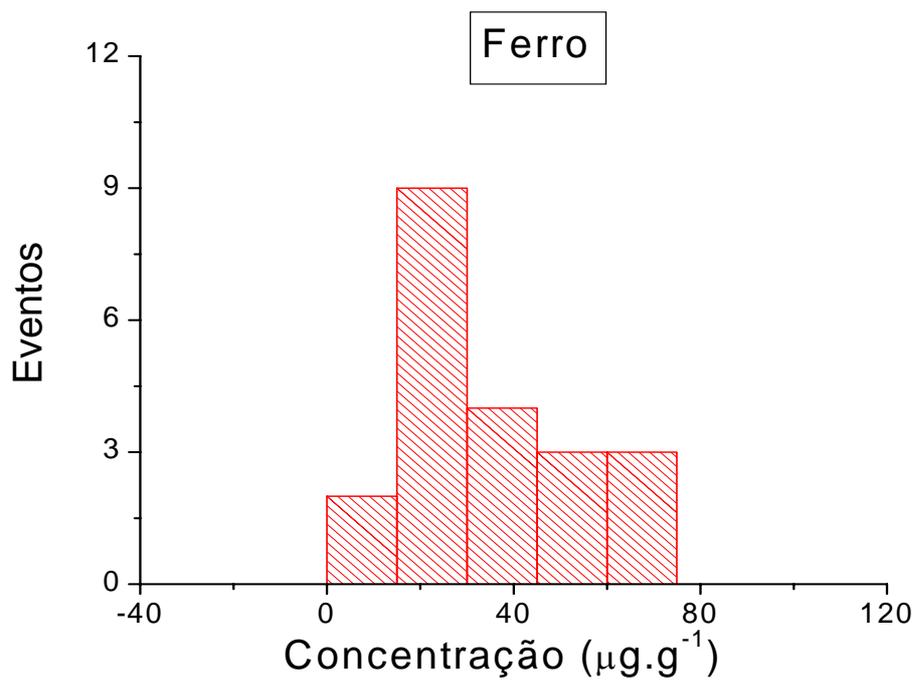


Figura B.16. Distribuição de frequência de ferro em amostras de próstata com câncer.

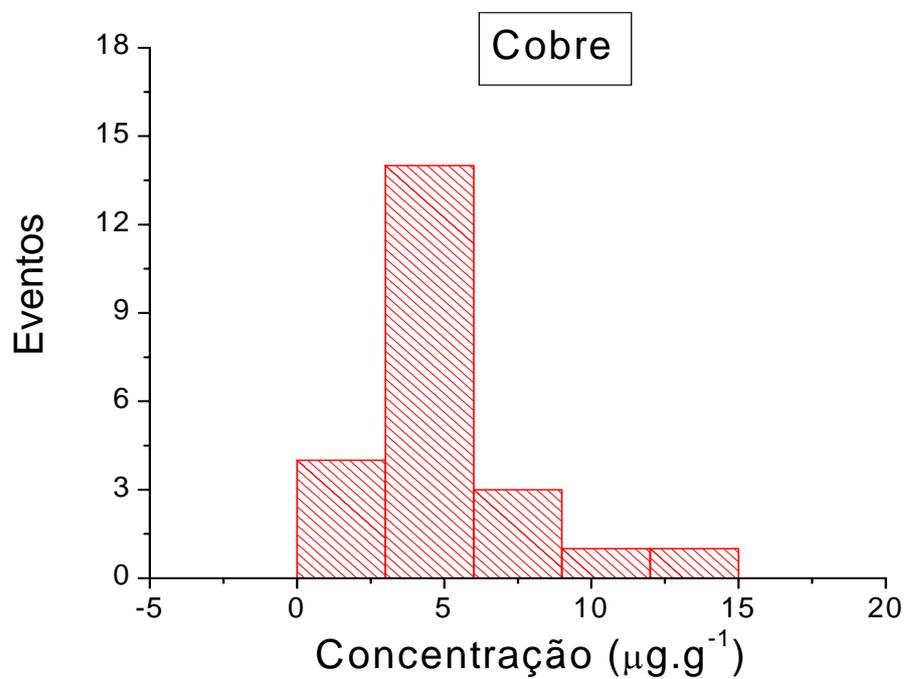


Figura B.17. Distribuição de frequência de cobre em amostras de próstata com câncer.

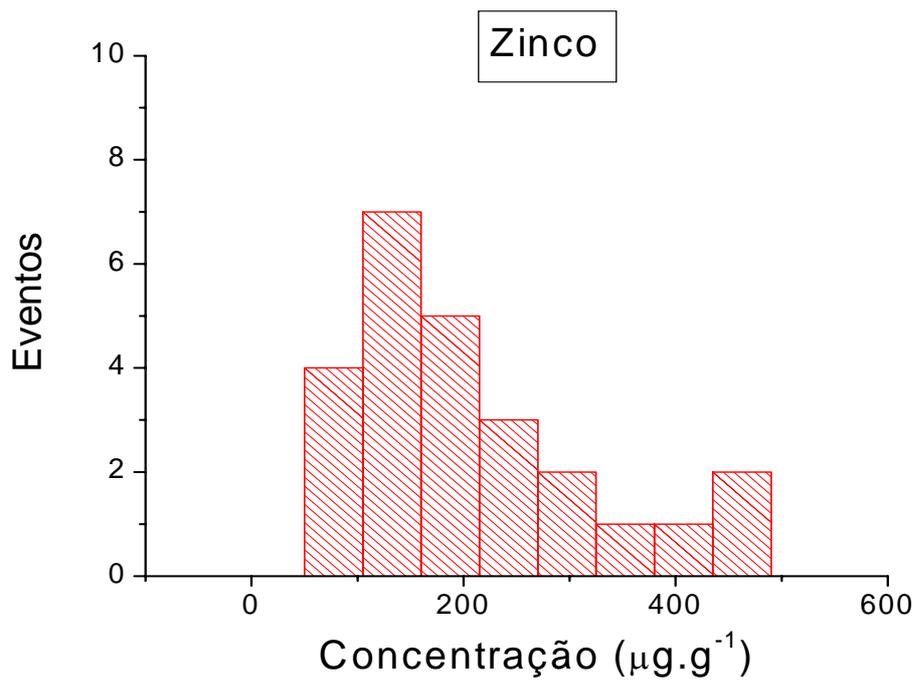


Figura B. 18. Distribuição de freqüência de zinco em amostras de próstata com câncer.

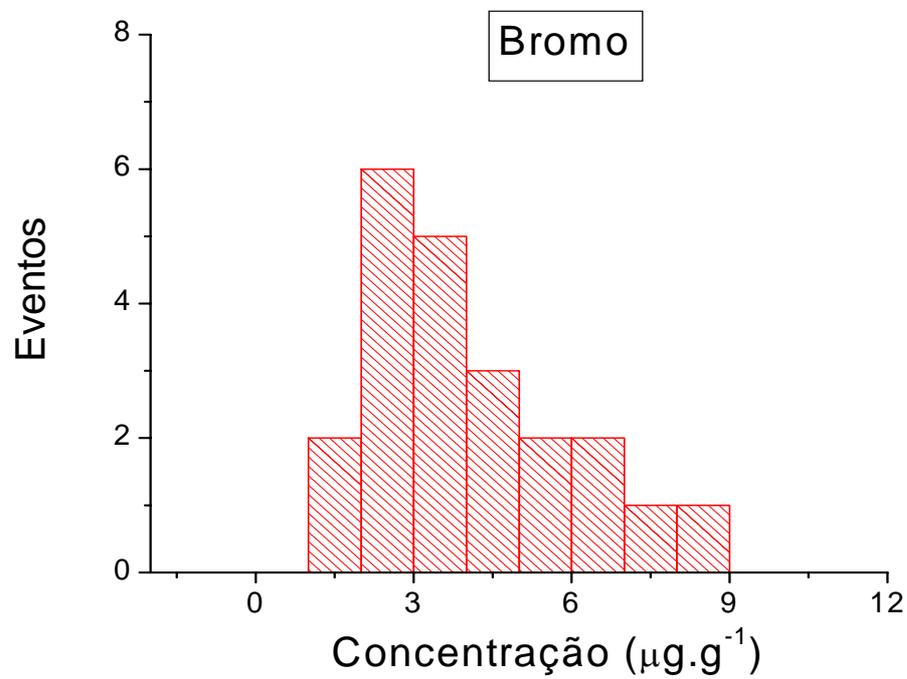


Figura B. 19. Distribuição de freqüência de bromo em amostras de próstata com câncer.

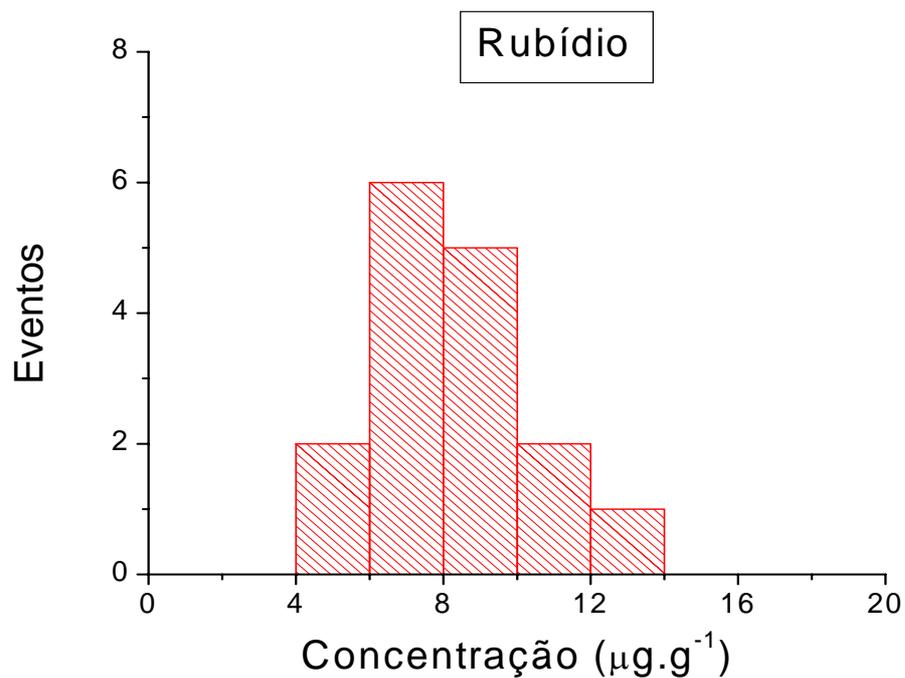


Figura B.20. Distribuição de frequência de rubídio em amostras de próstata com câncer.

B.3 - DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DAS AMOSTRAS DE PRÓSTATA NORMAIS.

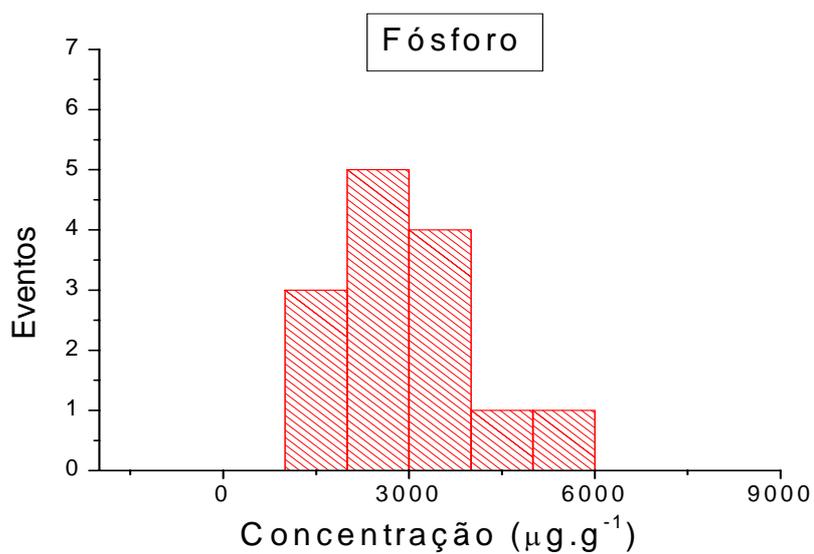


Figura B.21. Distribuição de frequência de fósforo em amostras de próstata normal.

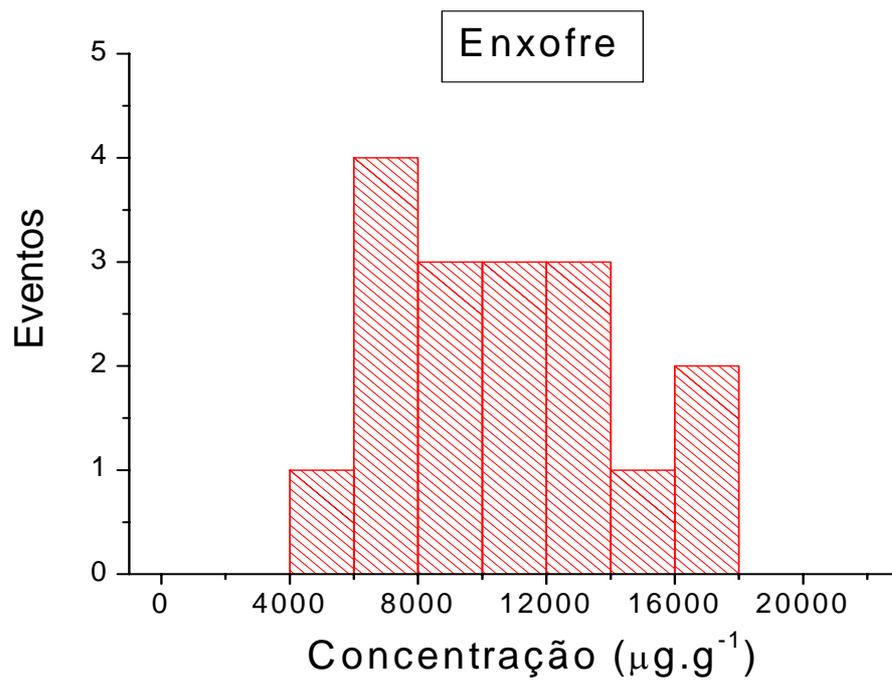


Figura B.22. Distribuição de frequência de enxofre em amostras de próstata normal.

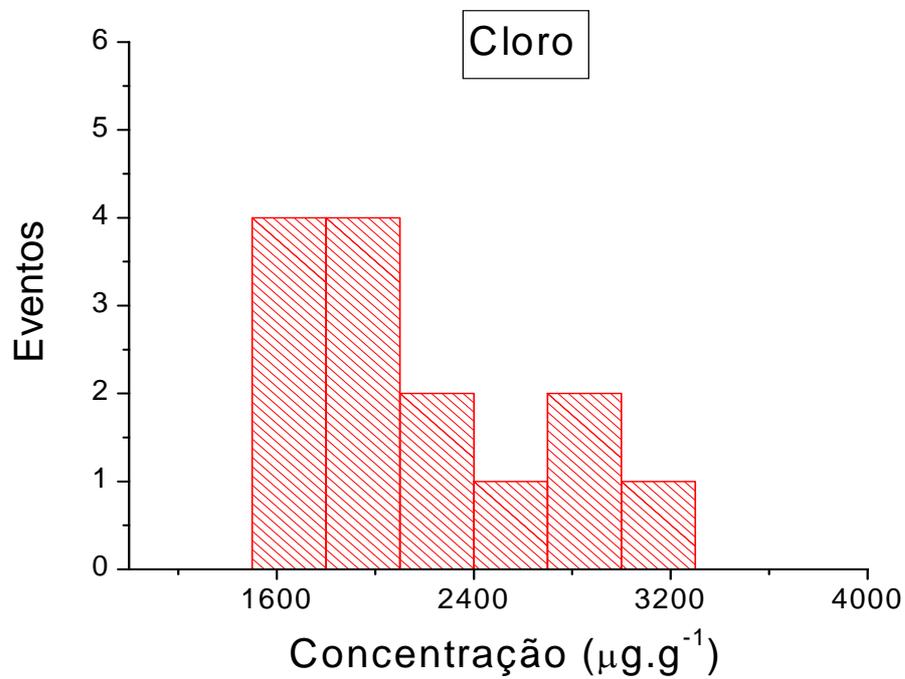


Figura B.23. Distribuição de frequência de cloro em amostras de próstata normal.

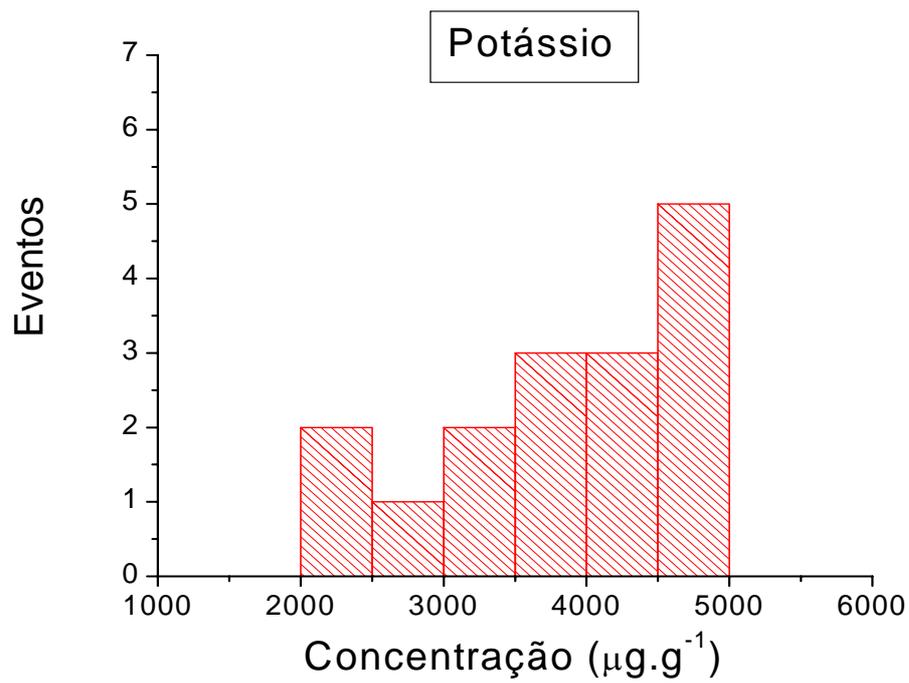


Figura B.24. Distribuição de frequência de potássio em amostras de próstata normal.

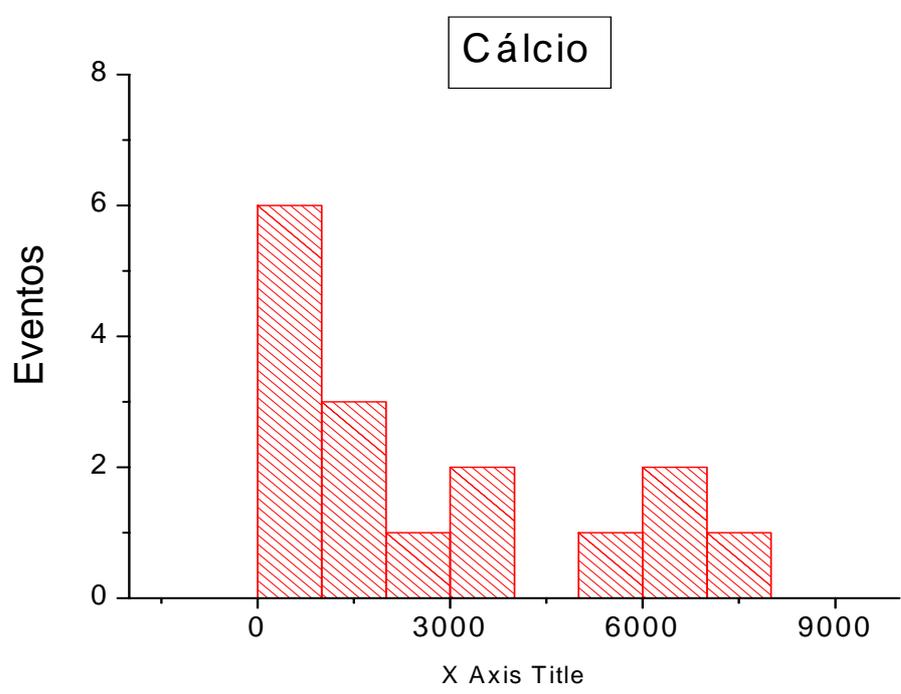


Figura B.25. Distribuição de frequência de cálcio em amostras de próstata normal.

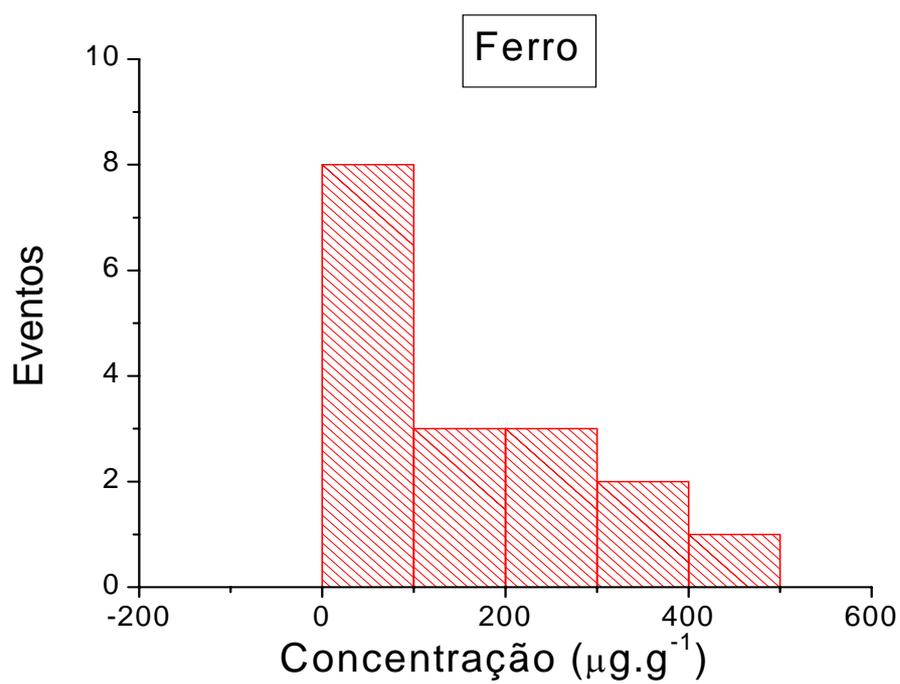


Figura B.26. Distribuição de frequência de ferro em amostras de próstata normal.

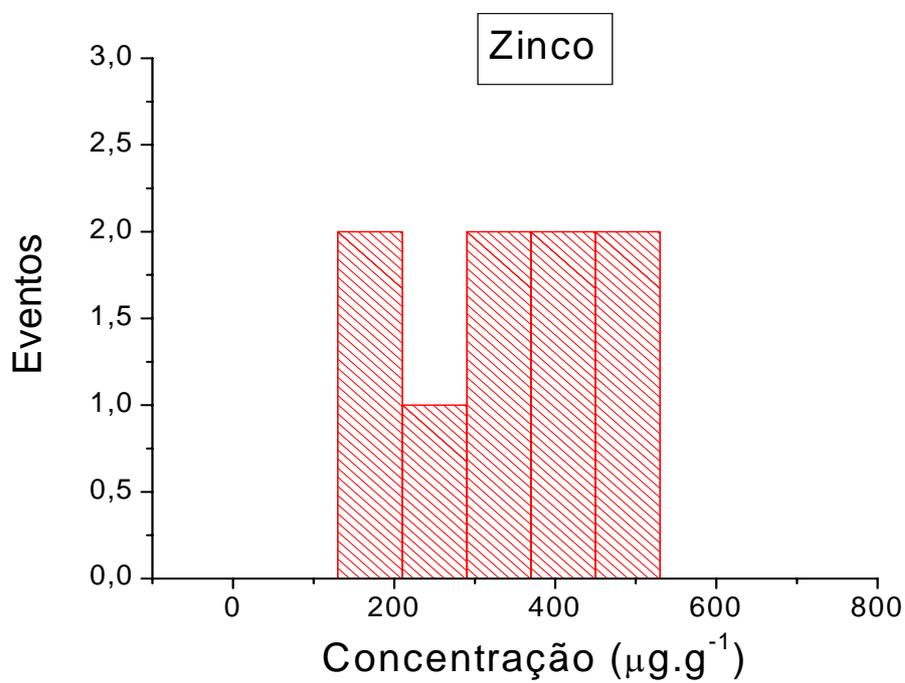


Figura B.27. Distribuição de frequência de zinco em amostras de próstata normal.

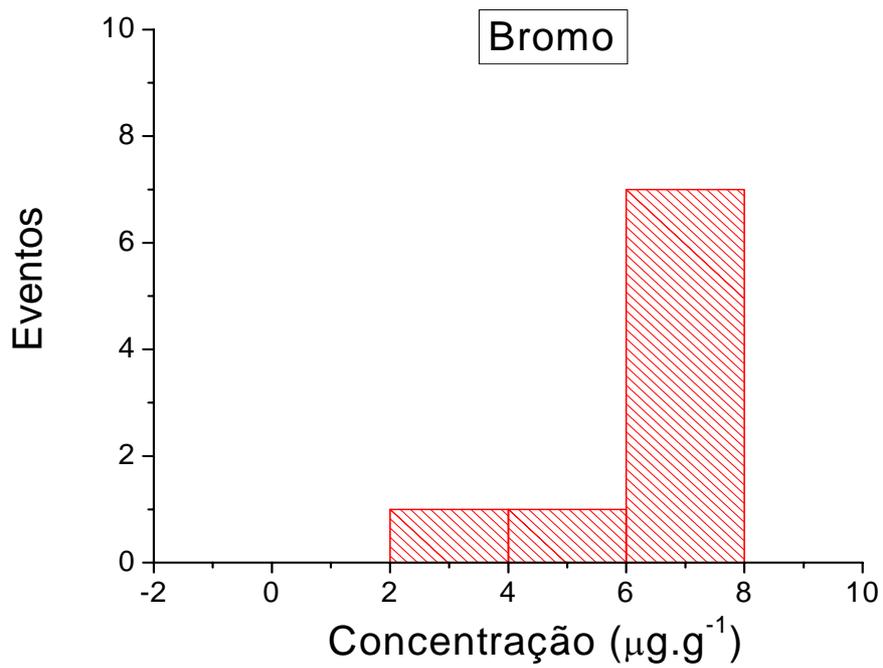


Figura B.28. Distribuição de frequência de bromo em amostras de próstata normal.

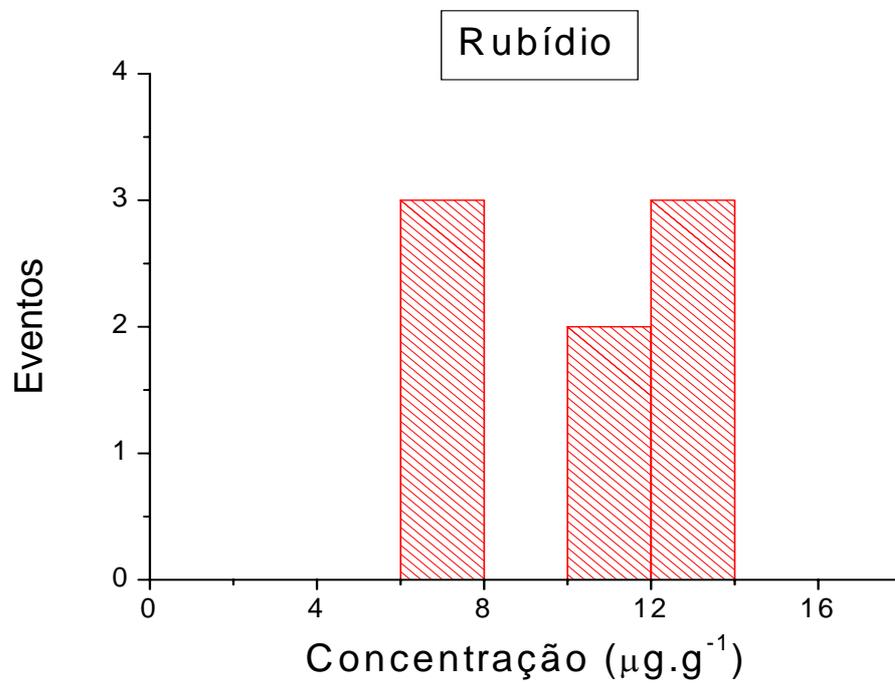


Figura B.29. Distribuição de frequência de rubídio em amostras de próstata normal.

APÊNDICE C

C.1 – DISTRIBUIÇÕES DE FREQUÊNCIAS

As distribuições de frequências podem ser simétricas ou assimétricas. Elas são ditas simétricas quando a média, mediana e moda são iguais, ou seja, apresentam um mesmo valor, ou ainda, coincidem num mesmo ponto. E são assimétricas quando a média, mediana e a moda recaem em pontos diferentes da distribuição, isto é, apresentam valores diferentes, sendo que o deslocamento desses pontos pode ser para a direita ou para a esquerda (TOLEDO, 1995; BUNCHAFT, 1997). A figura C.1 mostra três tipos de distribuições onde: \bar{X} = média, \tilde{X} = mediana e Mo = moda.

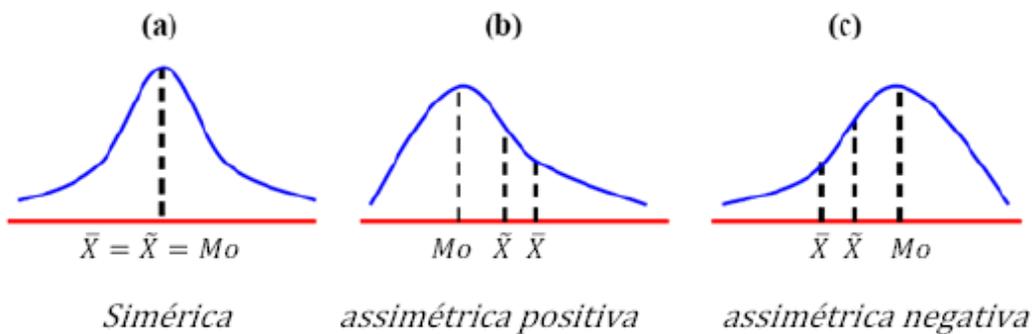


Figura C.1. Tipos de distribuições (AUREA, 2008).

C.1.1 – CARACTERÍSTICAS DE UMA DISTRIBUIÇÃO.

C.1.1.1 - MEDIDAS DE TENDÊNCIA CENTRAL.

As medidas de tendência central indicam onde se concentram a maioria dos dados. As medidas são:

Média: é a média aritmética de uma distribuição de dados, ela fornece um único número que fornece um resumo aproximado da distribuição, mas não informa sobre a maneira como os dados estão distribuídos, em alguns casos ela não é considerada a

melhor medida de posição para um conjunto de dados, por exemplo, em uma distribuição assimétrica.

- *Mediana*: é o valor situado no centro da distribuição de freqüências estando os valores dos dados ordenados de forma crescente, ou seja, a mediana é o valor que ocupa a posição equidistante dos extremos, dividindo o conjunto em duas partes iguais, 50% dos dados tomam valores menores ou iguais ao valor da mediana e os 50% restantes acima. Ela é a medida mais útil em uma distribuição assimétrica.

- *Moda*: é o valor do dado de maior freqüência numa distribuição. Ela pode não existir ou pode ter mais de um valor (TOLEDO, 1995; BUNCHAFT, 1997).

C.1.1.2 - MEDIDAS DE POSIÇÃO.

As medidas de posição têm por objetivo indicar onde é o ponto de corte para uma certa posição. As medidas mais utilizadas são:

- *Quartil*: é a separação dos dados em 4 partes iguais. Quartis: Q1 - primeiro quartil; Q2 - segundo quartil e Q3 - terceiro quartil. A figura A.2 mostra a divisão em quartis,

- *Decil*: é a separação dos dados em 10 partes iguais. Decis: D1 - primeiro decil; ...; D9 - nono decil,

- *Percentil*: é a separação dos dados em 100 partes iguais. Percentis: P1 - primeiro percentil; ...; P99 - percentil 99 (TOLEDO, 1995; BUNCHAFT, 1997).

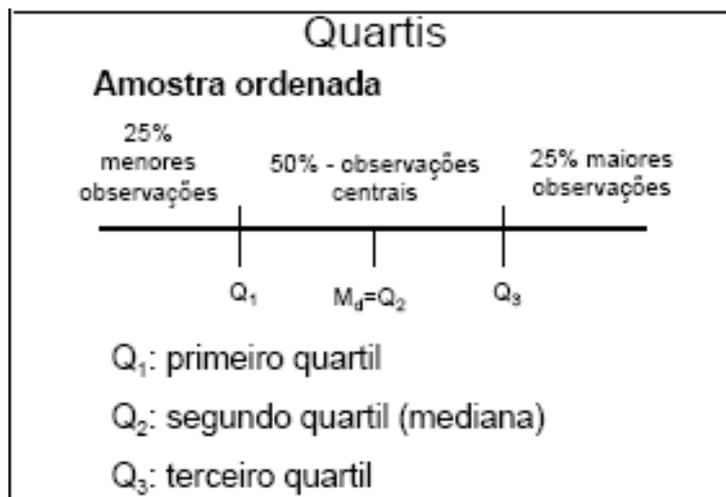


Figura A.2. Divisão em quartis (EDNALDO, 2008).

C.1.1.3 - MEDIDAS DE DISPERSÃO.

As medidas de dispersão medem o grau de variabilidade ou dispersão dos dados, as principais medidas são:

- Amplitude: ela mede a distância entre o menor valor máximo e mínimo, ela é uma estatística rudimentar, pois embora dá uma noção de dispersão ela não diz qual é sua natureza. A amplitude interquartil, ou comprimento da caixa é a distância entre o primeiro e terceiro quartil, é muito útil para detectar valores extremos, e é muito usado no diagrama de BOX-PLOT.
- Desvio médio: é a média aritmética dos valores absolutos dos desvios dos valores da variável em relação à média,
- Variância: é a medida estimada ou calculada que determina a variação dos valores entre si, ou seja, quanto menor este valor menor será a diferença entre os valores dos elementos do conjunto de dados.
- Desvio padrão: O desvio padrão é o afastamento atribuído ao acaso, ou seja, o erro amostral, que o conjunto de dados contém.
- Coeficiente de variação: É uma medida de dispersão relativa. Ele expressa o desvio padrão que obteríamos se a média representasse o índice 100. É definida como o

quociente entre o desvio padrão e a média, multiplicado por 100, para expressar porcentagem (TOLEDO, 1995; BUNCHAFT, 1997).

C.2 – DISTRIBUIÇÃO NORMAL.

A distribuição normal é um exemplo de distribuição simétrica. O traçado gráfico da distribuição normal parece o contorno de um sino. A curva de distribuição normal ou simplesmente curva normal é caracterizada por dois parâmetros: a média e o desvio padrão (ou a variância). O ponto máximo da função ocorre no valor médio (situado ao centro da curva, que é simétrica), a distância entre ele e cada um dos pontos em que muda a direção da curvatura, à esquerda e a direita da média corresponde ao valor do desvio padrão (CAMPOS, 1976; TRIOLA, 1999).

C.2.1 - OS PARÂMETROS DA DISTRIBUIÇÃO NORMAL.

Qualquer conjunto de dados numéricos pode-se calcular a média, porém, desvio-padrão, somente nas distribuições normais, pois por definição, desvio-padrão é o ponto de inflexão da curva normal. São eles em número de dois e simétricos em relação à média da distribuição. Portanto, distribuições assimétricas jamais podem ter desvio-padrão porque, mesmo que tenham pontos de inflexão, como possuem muitas outras curvas matemáticas, eles dificilmente seriam simétricos em relação à média (CAMPOS, 1976; TRIOLA, 1999).

C.3 - ANÁLISE ESTATÍSTICA.

C.3.1 – ESCOLHA DO TESTE ESTATÍSTICO

Dentre os inúmeros testes e técnicas estatísticas que se apresentam no contexto de um trabalho de pesquisa, é natural um certo grau de desorientação inicial quanto à identificação daqueles que são ou não aplicáveis a cada situação. Para se poder realizar a escolha adequada, é importante considerar algumas condições. Estas condições são:

- Número de variáveis: O número de grupos distintos analisados (Um ou mais),

- Relações entre amostras: Refere-se a duas ou mais amostras serem ou não pareadas, ou seja, consistirem ou não das mesmas entidades ou de entidades relacionadas,

- Classificação da variável: Qualitativa ou quantitativa,

Qualitativa: Podem ser nominal quando classificam fenômenos, exemplos: gênero: (masculino e feminino), raça (branco, negro, etc.) e podem ser ordinal quando classificam o sentido de direção ou hierarquia, por exemplo: o estágio de uma doença (Estágio 1, 2, 3) o grau de severidade de um tumor (Grau I, II, III) e etc,

Quantitativa: podem ser discreta ou contínua. Discreta quando é contada ou numerada, e só admitem números inteiros, por exemplo levantamento do número de filhos, idade, etc. Contínua quando os dados são medidos, por exemplo: altura, peso, temperatura, etc,

- Dependência entre variáveis: A existência de relação entre as variáveis, serem associadas ou independentes entre si,

- Distribuição de frequência: paramétrica (distribuição normal) ou não-paramétrica (distribuição livre) (SIEGEL, 1975).

C.3.1.1 – TESTES PARAMÉTRICOS.

Os testes estatísticos podem ser divididos em dois grandes grupos, conforme fundamentem ou não os seus cálculos na premissa de que a distribuição de frequência é normal, as variâncias são homogêneas, os efeitos dos fatores de variação são aditivos e os erros independentes. Se tudo isso ocorrer, é provável que a distribuição seja aceitavelmente simétrica, terá apenas um ponto máximo, centrado no intervalo de classe onde está a média da distribuição, e o seu histograma de frequências terá um contorno que seguirá aproximadamente o desenho em forma de sino da curva normal. O cumprimento desses requisitos condiciona, pois a primeira escolha do pesquisador, uma vez que, se forem preenchidos, ele poderá utilizar as estatísticas paramétricas, cujos testes são em geral mais poderosos do que os da estatística não paramétrica, e conseqüentemente devem ter a preferência do investigador, quando o seu emprego for permitido (CAMPOS, 1976; TRIOLA, 1999).

C.3.1.2 - TESTES NÃO-PARAMÉTRICOS.

Para a utilização de testes não-paramétricos, supõe-se que a distribuição de seus dados experimentais não seja normal ou que ele não tenha elementos suficientes para poder afirmar que seja. Na dúvida quanto a essa informação, nada impede que se opte pelo uso da estatística não-paramétrica. As estatísticas não paramétricas, também chamadas de distribuição livre, são aquelas utilizadas quando os dados que estão sendo analisados não atendem aos pressupostos associados às técnicas paramétricas de análise. O que não se pode fazer é argumentar em termos de desvios ou erros padrões, embora possa perfeitamente fazê-lo pura e simplesmente em termos de médias. A principal desvantagem dos procedimentos não paramétricos é o menor poder das estatísticas em comparação aos equivalentes paramétricos e as vantagens sobre o paramétrico são: aplica-se a amostra pequena ($n < 30$); dispensa-se suposição da distribuição da população; aplica-se a dados nominal e ordinal; permite empregar amostras heterogêneas ou oriundas de populações diferentes; e possuem maior simplicidade do ponto de vista de cálculo (SIEGEL, 1975).

C.3.2 - COMPARAÇÕES ENTRE AMOSTRAS.

As tabelas 1 e 2 indicam os testes estatísticos que podem ser aplicados para a comparação entre os parâmetros de dois ou mais grupos de dados.

Tabela C.1. Testes estatísticos para a comparação entre os parâmetros de grupos de dados com distribuição paramétrica.

Número de Amostras	Tipo de Relação	Escala Numérica	Análises Aplicáveis
Duas	Pareadas	Contínua	Teste <i>t</i> de <i>Student</i> Pareado
Duas	Não Pareadas	Contínua	Teste <i>t</i> de <i>Student</i>
Três ou Mais	Pareadas	Contínua	ANOVA <i>c</i> / Medidas Repetidas
Três ou Mais	Não-Pareadas	Contínua	ANOVA <i>c</i> / Grupos Independentes

Tabela C.2. Testes estatísticos para a comparação entre os parâmetros de grupos de dados com distribuição não paramétrica.

Número de Amostras	Tipo de Relação	Escala Numérica	Análises Aplicáveis
Duas	Pareadas	Ordinal, Contínua	Teste de Friedman, Sign-Test, Wilcoxon <i>Matched-Pairs Test</i>
Duas	Pareadas	Nominal Dicotômica*	Teste de McNemar
Duas	Não Pareadas	Ordinal, Contínua	Teste Mann-Whitney U, Wald-Wolfowitz <i>Runs Test</i> , Kolmogorov-Smirnov <i>Two-Sample Test</i>
Duas	Não Pareadas	Nominal	Teste de Qui-Quadrado (Homogeneidade)
Três ou Mais	Pareadas	Ordinal, Contínua	ANOVA de Friedman
Três ou Mais	Pareadas	Nominal	Teste Q de Cochran
Três ou Mais	Não-Pareadas	Ordinal, Contínua	ANOVA de Kruskal-Wallis

* Variável com apenas dois valores ou duas categorias (variável binária).