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

ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DE ZINCO EM CÉLULAS TUMORAIS PROSTÁTICAS DU145 UTILIZANDO MICROFLUORÊSCENCIA DE RAIOS X

Karolynne de Araujo Marins José Rocha

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 Engenharia Nuclear.

Orientador(es): Ricardo Tadeu Lopes
Roberta Gama Leitão

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2016

ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DE ZINCO EM CÉLULAS TUMORAIS PROSTÁTICAS DU145 UTILIZANDO MICROFLUORÊSCENCIA DE RAIOS X

Karolynne de Araujo Marins José Rocha

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.

Examinada por:

_____
Prof. Ricardo Tadeu Lopes, D.Sc.

_____
Prof. Roberta Gama Leitão, D.Sc.

_____
Prof. Luiz Eurico Nasciutti, D.Sc.

_____
Prof. Marcelino José dos Anjos, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL
FEVEREIRO DE 2016

Rocha, Karolynne de Araujo Marins José

Análise da Distribuição de Zinco em Células Tumorais Prostáticas DU145 Utilizando Microfluorescência de Raios X / Karolynne de Araujo Marins José Rocha. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2016.

XIII, 73 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: Ricardo Tadeu Lopes

Roberta Gama Leitão

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Nuclear, 2016.

Referências Bibliográficas: p. 68-73.

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

Aos meus pais Sônia e Ubiratan

Ao meu marido Thiago Rocha

A minha afilhada Alice

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por sempre iluminar meu caminho.

Ao meu marido, Thiago Rocha, pelo apoio incondicional, por seu amor e por acreditar em meus objetivos. Obrigada pelas inúmeras vezes que me acolheu e disse que tudo daria certo, esta vitória é nossa! Você é meu porto seguro, minha vida, meu melhor amigo, meu amor.

Aos meus pais, pelo exemplo de vida e caráter, pela educação que me deram e pelo apoio que sempre expressam quanto aos meus objetivos, mesmo que isso possa adiar por um breve momento o sonho de serem avós.

Ao professor Ricardo Tadeu Lopes, por sua orientação e auxílio para tornar este trabalho possível.

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

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

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

A amiga Eliane Barros, pelos conhecimentos compartilhados, pela disponibilidade de sempre, apoio científico e emocional durante este trabalho, obrigada pelas inúmeras vezes em que me ensinou, por todos os testes que me acompanhou e por todas as dúvidas que sanou.

A amiga Maria Aparecida, pela recepção no Labic, por todo o conhecimento compartilhado e ajuda durante todo o trabalho.

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

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

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

ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DE ZINCO EM CÉLULAS TUMORAIS PROSTÁTICAS DU145 UTILIZANDO MICROFLUORÊSCENCIA DE RAIOS X

Karolynne de Araujo Marins José Rocha
Fevereiro/2016

Orientadores: Ricardo Tadeu Lopes
Roberta Gama Leitão

Programa: Engenharia Nuclear

O câncer é um problema de saúde pública mundial, e sua incidência no mundo cresceu 20% na última década. Os objetivos deste trabalho foram analisar o comportamento celular em esferoides de células tumorais prostáticas, linhagem celular DU145, e em células prostáticas normais, linhagem celular RWPE-1, após a suplementação com Cloreto de Zinco e as possíveis implicações na patogênese dessa doença, avaliar a organização do citoesqueleto celular através da microscopia de fluorescência, analisar viabilidade celular através do ensaio colorimétrico de citotoxidade (MTT). As medidas de intensidade de zinco foram realizadas utilizando a técnica de microfluorescência de raios X (μXRF) na linha de luz XRF do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas, Brasil. Nos esferoides da linhagem celular DU145 submetidos aos tratamentos com Cloreto de Zinco por 24 horas observou-se um aumento significativo na intensidade intracelular de zinco em relação ao controle. Após 48 horas de tratamento, uma queda nesta intensidade nos dois primeiros tratamentos e um aumento no terceiro tratamento foram observados. Já nos esferoides da linhagem celular RWPE-1 observou-se um aumento significativo em todos os tratamentos realizados, em ambos os períodos analisados. As análises de MTT não demonstraram alteração significativa após os tratamentos. Finalmente, o ensaio de imunofluorescência permitiu avaliar a organização do citoesqueleto e o fenótipo celular, através da identificação dos filamentos de citoqueratina e vimentina.

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

ANALYSIS OF ZINC DISTRIBUTION IN CELLS TUMOR PROSTATIC DU145 USING MICRO X RAYFLUORESCENCE

Karolynne de Araujo Marins José Rocha

February/2016

Advisors: Ricardo Tadeu Lopes

Roberta Gama Leitão

Department: Nuclear Engineering

Cancer is a worldwide public health problem, and its incidence in the world grew by 20% in the last decade. The objectives of this study were to analyze the behavior of cells in spheroids of prostate tumor cells, cell line DU145, and normal prostate cells, RWPE- 1 cell line, after supplementation with zinc chloride and the possible implications in the pathogenesis of this disease, evaluate the organization of cytoskeleton cell by fluorescence microscopy, analyze cell viability through colorimetric cytotoxicity assay (MTT). Zinc intensity measurements were performed using the microfluorescence technique of X-rays (μXRF) on line XRF National Laboratory Light Synchrotron Light (LNLS), in Campinas, Brazil. In spheroids cell line DU145 subjected to treatment with zinc chloride for 24 hours there was a significant increase in intracellular zinc intensity compared to control. After 48 hours of treatment, this intensity drop in the first two treatments and an increase in the third treatment were observed. Already in the spheroids RWPE-1 cell line was observed a significant increase in all treatments carried out in both the periods. The MTT analysis showed no significant change after treatment. Finally, immunofluorescence assay allowed to evaluate the organization of the cytoskeleton and cellular phenotype, through the identification of cytokeratin and vimentin filaments.

ÍNDICE

CAPÍTULO I 1

INTRODUÇÃO 1

CAPÍTULO II 3

ESTADO DA ARTE 3

II.1 Ação do zinco na Próstata. 3

II.2 Análise de amostras biológicas utilizando µXRF 6

CAPÍTULO III 9

FUNDAMENTOS TEÓRICOS 9

III.1 A Próstata 9

III.2 Câncer de Próstata 12

III.3 O Papel do Zinco no Câncer de Próstata 13

III.4 A Cultura de Células 14

III.5 Cultura em Três Dimensões (3D) 15

III.6 Fluorescência de Raios X 16

III.7 Excitação dos Elementos 18

III.8 A Emissão de Fluorescência de Raios X 22

III.9 Microfluorescência de Raios X (µXRF) 24

III.10 Radiação Síncrotron 27

III.11 Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) 27

CAPÍTULO IV 29

MATERIAIS E MÉTODOS 29

IV.1 Obtenção e Preparo dos Esferóides Celulares. 29

IV.2 Análise por µXRF 31

IV.3 Análise da Viabilidade Celular 32

IV.4 Análise da Organização do Citoesqueleto Celular e do Fenótipo Celular ... 33

CAPÍTULO V 35

RESULTADOS E DISCUSSÃO 35

V.1 Resultados da Análise dos Esferóides Celulares da Próstata através da µXRF 35

V.2 Resultados da Análise da Organização do Citoesqueleto Celular e do Fenótipo Celular 48
V.3 Resultados dos Ensaios de Viabilidade Celular 57
V.4 Discussão 62
CAPÍTULO VI 65
CONCLUSÃO 65
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA 68

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Ilustração da localização anatômica da próstata 9

Figura 3.2: Ilustração da seção transversal da localização da próstata 10

Figura 3.3: Modelo esquemático da distribuição das três zonas glandulares prostáticas histologicamente distintas 11

Figura 3.4: Esquemático do Efeito Fotoelétrico 18

Figura 3.5: Transições de níveis de energias 23

Figura 3.6: Representação esquemática do efeito Auger 24

Figura 3.7: Esquema simplificado da análise por μXRF 25

Figura 3.8: Representação esquemática da obtenção de uma imagem 26

Figura 3.9: Foto Panorâmica do Anel no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron 28

Figura 4.1: Placa contendo 96 poços com fundo em U utilizada para a cultura dos esferoides 30

Figura 4.2: Esquema experimental 32

Figura 4.3: Estrutura de um anticorpo 33

Figura 5.1: Espectro de XRF do esferoide RWPE-1 suplementado com 150 μM durante 24 horas 35

Figura 5.2: Imagens resultantes dos mapas bidimensionais da intensidade de Zn em esferoides DU145 com tratamento durante 24 horas 36

Figura 5.3: Imagens resultantes dos mapas bidimensionais da intensidade de Zn em esferoides DU145 com tratamento durante 48 horas 37

Figura 5.4: Imagens resultantes dos mapas bidimensionais da intensidade de Zn em esferoides RPWE-1 com tratamento durante 24 horas 38

Figura 5.5: Imagens resultantes dos mapas bidimensionais da intensidade de Zn em esferoides RPWE-1 com tratamento durante 48 horas 39

Figura 5.6: Comparação da intensidade de Zn em esferoides celulares de DU145 para os tratamentos com $ZnCl_2$ durante 24 horas 40

Figura 5.7: Comparação da intensidade de Zn em esferóides celulares de DU145 para os tratamentos com $ZnCl_2$ durante 48 horas 41

Figura 5.8: Comparação da intensidade de Zn em esferóides celulares de RWPE-1 para os tratamentos com $ZnCl_2$ durante 24 horas 42

Figura 5.9: Comparação da intensidade de Zn em esferóides celulares de RWPE-1 para os tratamentos com $ZnCl_2$ durante 48 horas 43

Figura 5.10: Comparação da intensidade de Zn em esferóides celulares de DU145 entre os períodos de 24 e 48 horas 44

Figura 5.11: Comparação da intensidade de Zn em esferóides celulares de RWPE-1 entre os períodos de 24 e 48 horas 45

Figura 5.12: Comparação da intensidade de Zn entre os esferóides celulares de DU145 e RWPE-1 no período de 24 horas 46

Figura 5.13: Comparação da intensidade de Zn entre os esferóides celulares de DU145 e RWPE-1 no período de 48 horas 47

Figura 5.14: Imagens representativas dos controles negativos da imunofluorescência .48

Figura 5.15: Caracterização imunocitoquímica dos esferóides de células DU145. Imunomarcação com anticorpo anti-citoqueratina humana (vermelho) 49

Figura 5.16: Caracterização imunocitoquímica dos esferóides de células DU145. Imunomarcação com anticorpo anti-vimentina humana (vermelho) 50

Figura 5.17: Caracterização imunocitoquímica dos esferóides de células DU145. Imunomarcação com anticorpo anti-citoqueratina humana (vermelho) 51

Figura 5.18: Caracterização imunocitoquímica dos esferóides de células DU145. Imunomarcação com anticorpo anti-vimentina humana (vermelho) 52

Figura 5.19: Caracterização imunocitoquímica dos esferóides de células RWPE-1. Imunomarcação com anticorpo anti-citoqueratina humana (vermelho) 53

Figura 5.20: Caracterização imunocitoquímica dos esferóides de células RWPE-1. Imunomarcação com anticorpo anti-vimentina humana (vermelho) 54

Figura 5.21: Caracterização imunocitoquímica dos esferóides de células RWPE-1. Imunomarcação com anticorpo anti-citoqueratina humana (vermelho) 55

Figura 5.22: Caracterização imunocitoquímica dos esferóides de células RWPE-1. Imunomarcação com anticorpo anti-vimentina humana (vermelho) 56

Figura 5.23: Viabilidade celular dos esferoides estabelecidos a partir das células tumorais DU145 57

Figura 5.24: Viabilidade celular dos esferoides estabelecidos a partir das células tumorais DU145 58

Figura 5.25: Viabilidade celular dos esferoides estabelecidos a partir das células tumorais RWPE-1 60

Figura 5.26: Viabilidade celular dos esferoides estabelecidos a partir das células tumorais RWPE-1 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições experimentais 31

Tabela 2: Comparação do Controle com Tratamentos DU145-24h 40

Tabela 3: Comparação do Controle com Tratamentos DU145-48h 41

Tabela 4: Comparação do Controle com Tratamentos RWPE-1-24h 42

Tabela 5: Comparação do Controle com Tratamentos RWPE-1-48h 43

Tabela 6: Comparação entre períodos de tratamento (24 e 48 horas) DU145 44

Tabela 7: Comparação entre períodos de tratamento (24 e 48 horas) RWPE-1 45

Tabela 8: Comparação entre os esferóides celulares de DU145 e RWPE-1 no período de 24 horas 46

Tabela 9: Comparação entre os esferóides celulares de DU145 e RWPE-1 no período de 48 horas 47

Tabela 10: Comparação do Controle com Tratamentos MTT DU145 24 horas 58

Tabela11: Comparação do Controle com Tratamentos MTT DU145 48 horas 59

Tabela 12: Comparação do Controle com Tratamentos MTT RWPE-1 - 24 horas 60

Tabela 13: Comparação do Controle com Tratamentos MTT RWPE-1 - 48 horas 61

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Esta dissertação visa analisar o comportamento celular em culturas celulares em três dimensões (esferóides) de células tumorais prostáticas, linhagem celular de câncer de próstata andrógeno independente DU145, e em células epiteliais prostáticas normais, linhagem celular prostática normal RWPE-1, após a suplementação de Cloreto de Zinco ($ZnCl_2$) e suas possíveis implicações na patogênese dessa doença, avaliando a organização do citoesqueleto celular através da microscopia de fluorescência e a viabilidade celular através do ensaio colorimétrico de citotoxidade (MTT).

O câncer é um problema de saúde pública mundial, e sua incidência no mundo cresceu 20% na última década. No Brasil, o câncer de próstata é a segunda neoplasia maligna mais comum entre os homens (atrás apenas do câncer de pele não melanoma). Em valores absolutos, é o sexto tipo mais comum no mundo e o mais prevalente em homens, representando cerca de 10% do total de cânceres. Sua taxa de incidência é cerca de seis vezes maior nos países desenvolvidos em comparação aos países em desenvolvimento. A estimativa de novos casos de câncer de próstata no Brasil em 2014 é de 68.800, que corresponde a 70,42 casos novos a cada 100 mil habitantes (INCA, 2014).

A técnica de cultivo celular é uma importante ferramenta permite a manutenção de células vivas em laboratório independente do organismo que as originou. A utilização desta técnica possibilitou a melhor compreensão dos mecanismos moleculares da célula e tem permitido importantes avanços científicos no que se refere, por exemplo, a produção de vacinas e a biologia da célula tumoral. O cultivo celular em 3D avançou em diversas linhas de pesquisa tornando-se um modelo bastante utilizado em ensaios radiológicos e quimioterápicos. O diferencial da cultura em 3D é permitir que as células explorem as 3-dimensões do espaço, como ocorre *in vivo*, aumentando assim as interações com o ambiente e entre as células (AMARAL; MACHADO-SANTELLI, 2011).

O zinco, um elemento traço essencial, está envolvido em muitos processos celulares, o que o caracteriza como um componente importante para a viabilidade das células. A concentração intracelular de zinco está correlacionada com o destino da

célula, isto é, com a proliferação, diferenciação ou apoptose. Em relação ao carcinoma prostático, ele pode inibir o crescimento das células tumorais, devido à indução de parada do ciclo celular e/ou apoptose. A insuficiência de zinco tem sido associada com o desenvolvimento de muitos tumores, e, inversamente, o tratamento com zinco inibe o desenvolvimento do tumoral nestes casos. Assim, o zinco mostra forte atividade anti-proliferativa em diferentes linhagens de células tumorais humanas, incluindo as células tumorais da próstata (CHEN *et al*., 2013 e LIN *et al*., 2009). No entanto, o mecanismo pelo qual o zinco inibe a proliferação das células tumorais ainda não é bem compreendido (BANUDEVI *et al*., 2010).

Informações qualitativas e quantitativas precisas sobre a distribuição e interação de elementos biologicamente significativos são vitais para compreender o papel destes elementos em amostras de origem industriais, geológicas, arqueológicas, biológicas e ambientais. A Microfluorescência de Raios X (μXRF) permite o mapeamento dos elementos biologicamente importantes desde a escala nanométrica até submicrométrica com elevada sensibilidade e danos desprezíveis à amostra (MAJUMDAR *et al*., 2012).

O objetivo principal do presente trabalho é obter a distribuição de Zinco em amostras de esferóides celulares estabelecidos a partir das linhagens celulares DU145 e RWPE-1, através da técnica de microfluorescência de raios X com radiação Síncrotron e, avaliar o comportamento celular após o tratamento com $ZnCl_2$.

Os objetivos específicos são:

- Obter os mapas bidimensionais para as intensidades de Zinco em cada um dos esferóides;
- Verificar a viabilidade celular dos esferóides submetidos ao tratamento com cloreto de zinco ($ZnCl_2$);
- Avaliar a organização do citoesqueleto celular, bem como o fenótipo celular através da identificação dos filamentos de citoqueratina e vimentina, por microscopia de confocal.

CAPÍTULO II

ESTADO DA ARTE

II.1 Ação do zinco na Próstata.

O zinco é um elemento traço importante em várias circunstâncias fisiológicas e bioquímicas. Nos seres humanos, as células epiteliais prostáticas normais acumulam os mais altos níveis de zinco, (3 a 7 vezes mais) do que qualquer dos demais tecidos moles do corpo. Estudos anteriores demonstraram que o acúmulo de um elevado nível de zinco na próstata está associado a duas funções principais: a produção de citrato e ao crescimento prostático normal. Essa característica exclusiva do tecido prostático é mantida na hiperplasia prostática benigna. No entanto, no câncer de próstata as células epiteliais normais, acumuladoras de zinco, são transformadas em células malignas, que não acumulam zinco. Assim a perda da capacidade original do tecido prostático de manter os níveis intracelulares normais de zinco pode ser um fator importante para o desenvolvimento e progressão do câncer de próstata. Até agora, não foi determinado o mecanismo exato subjacente aos níveis reduzidos de zinco observados no câncer de próstata (CHEN *et al*., 2013 e LIN *et al*., 2009).

A capacidade das células epiteliais prostáticas para acumular zinco é devido, pelo menos em parte, à expressão e a atividade do transportador de zinco, ZIP1. No câncer de próstata, para evitar os efeitos antitumorais do zinco, as células prostáticas malignas exibem, muitas vezes, um silenciamento do gene ZIP1 e, consequentemente, uma depleção de zinco intracelular. Devido a isso, ZIP1 foi considerado um gene supressor tumoral no câncer da próstata. Além disso, semelhantes efeitos supressores de tumor do zinco já foram identificados em diversos outros tipos tumorais (FRANKLIN; COSTELLO, 2007).

Em SLIWINSKI *et al*. (2009), analisaram a cito e genotoxicidade do sulfato de zinco ($ZnSO_4$) em linfócitos humanos normais e em células cancerosas mielóide humana em presença de zinco e de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Neste trabalho, o zinco em concentrações no intervalo de 10 e 1000 µM diminui viabilidade e induz danos aos DNA das células cancerosas e, especialmente em baixas concentrações, os efeitos do zinco foram ainda mais pronunciados nas células tumorais do que em células

normais. Observou-se uma diferença fundamental entre a ação do zinco, na presença de (H_2O_2), em condições fisiológicas normais e em células de câncer. Os resultados sugerem que o zinco pode proteger as células normais contra ações cito e genotóxicas do H_2O_2 que danificam o DNA, e aumentar as ações que danificam o DNA em células cancerosas, o que indica a dupla ação deste elemento de acordo com as células alvo e, que o zinco pode ser útil na terapia do câncer.

Em YAN; HARDIN; HO (2010), avaliaram os efeitos anti-proliferativos do zinco em células cancerosas da próstata (PC-3), de hiperplasia benigna da próstata (HBP) e de células não cancerosas (BPH-1). Células PC-3 e BPH-1 foram tratadas com zinco (0-250 µM) durante 24 e 48 h, e o crescimento e a viabilidade celular foram examinados. A resposta diferencial ao zinco em células PC-3 e BPH-1 sugere que o zinco pode desempenhar um papel importante na regulação do crescimento celular e a apoptose em células de câncer de próstata e hiperplasia. Neste estudo, nas células BPH-1 o zinco diminui o número de células e a viabilidade, o que foi associado ao aumento da apoptose. Nas células PC-3, altas concentrações de zinco diminuíram o número total de células e viabilidade. Em geral, esse estudo demonstrou que o zinco exerce efeitos anti-proliferativos em ambos tipos celulares, benigno e maligno, na hiperplasia prostática benigna e, em células tumorais PC-3. Sugerindo ainda que os efeitos do zinco podem ser mais potentes antes da transformação maligna. Neste contexto, os estudos indicam que a perda da capacidade de acúmulo de zinco pelas células epiteliais prostáticas alterar a sua função metabólica, resultando em um aumento da atividade m-aconitase, citrato de oxidação e o aumento da produção de trifosfato de adenosina (ATP). Sugerindo, assim, que restabelecimento níveis elevados de zinco nas células cancerosas pode restaurar as condições celulares normais e, eventualmente, controlar a proliferação e induzir a apoptose.

Em CHEN *et al*. (2013), buscando compreender melhor a biologia das células tumorais prostáticas, reportaram a detecção de sensibilidade a apoptose em células tumorais prostáticas tratadas com zinco e *sorafenib* e investigaram a expressão e a função de *Livin* (um membro da família de proteínas inibidoras de apoptose) na apoptose induzida por zinco em células de câncer de próstata.

Em FRANKLIN (2014), caracterizou o câncer de próstata como uma doença maligna "ZIP1 deficiente" e um tratamento ionóforo de zinco (como por exemplo, Clioquinol), para aumentar os níveis intracelulares de zinco foi considerado plausível. Assim, a análise experimental consistiu no emprego da linhagem celular PC3 para

determinar se o tratamento com o ionóforo clioquinol (5-cloro-7-iodo-8-quinolinol) poderia aumentar a absorção e o acúmulo de zinco e, se isto poderia resultar o controle da proliferação celular. De fato, os resultados demonstraram o aumento no acúmulo de zinco e inibição da proliferação celular. Como ainda não existem relatos considerando o câncer uma doença ZIP1 deficiente, para mimetizar esta situação no câncer de próstata humano, células da linhagem celular PC3 foram xenotransplantadas em animais com o objetivo de desenvolver tumores ectópicos ZIP1 deficientes. Ao longo do período de tratamento (5 semanas), o clioquinol suprimiu o crescimento tumoral por ~ 85%; e diminuiu de forma semelhante o peso dos tumores em ~ 78%. . Estas considerações evidenciam a importância de se perseguir e desenvolver pesquisas adicionais para uma abordagem de tratamento com zinco para o câncer de próstata.

Em FRANKLIN *et al*. (2015), provas convincentes de que hZIP1 é um transportador funcionalmente importante e responsável pela rápida absorção e acúmulo de zinco em células prostáticas normais foram mostradas. Apesar de o zinco ser essencial para a função normal de todas as células, por ser um importante fator para muitas enzimas e proteínas celulares, apenas recentemente começou-se a compreender os mecanismos de absorção celular do zinco por células de mamíferos. A existência de um processo rápido de transporte e absorção zinco tem sido relatada para as linhagens de células prostáticas humanas, como por exemplo, para as linhagens tumorais prostáticas LNCaP e PC-3. Nestes casos, o transportador hZIP1 (SLC39A1) foi identificado hZIP1 (SLC39A1) como possível um transportador possível de zinco, responsável pela absorção e acúmulo de zinco nestas células. Diferentes trabalhos já demonstraram que as células que super expressam hZIP1 apresentam taxas de crescimento lento do que o controle citomegalovírus (CMV). Ainda neste trabalho, o tratamento com 15 µM de $ZnCl_2$ resultou numa diminuição no número de células após 24h (aproximadamente 50%) e 72 h (aproximadamente 70%) em relação ao controle (CMV). Demonstrou-se também uma correlação entre o aumento da expressão de hZIP1 e os efeitos celulares de absorção e acúmulo de zinco, bem como de indução de apoptose mitocondrial. Portanto, a relação negativa entre a super expressão da proteína transportadora de zinco e o crescimento celular é consistente com um acúmulo de zinco mediado por hZIP1.

II.2 Análise de amostras biológicas utilizando µXRF

A microfluorescência de Raios X (µXRF) é uma ferramenta para a moderna análise de composição elementar de vários tipos de amostras. Uma vantagem importante desta técnica é que o feixe primário pode ser focado para um tamanho muito pequeno, o que permite a análise de pequenas características estruturais. Uma vez que menos energia é depositada na amostra, como resultado da excitação dos raios X em relação a partículas de elétrons ou fontes de excitação carregadas, danos térmicos para as amostras e os problemas associados à perda de elementos voláteis e alterações químicas são evitados. Estas características oferecem uma capacidade de aplicação na análise multielementar não destrutiva simultânea de pequenas áreas geológicas e ambientais e amostras orgânicas (LANKOSZ *et al*., 2004).

Análise elementar precisa é de crescente importância em muitas áreas de investigação científica. A técnica de microfluorescência de Raios X (µXRF) é uma ferramenta muito poderosa que permite o desempenho do rastreio da análise elementar ao nível de micrometros. Na literatura é possível encontrar uma vasta gama de aplicações desta técnica analítica. Ao longo dos últimos anos, observou-se um crescente interesse na utilização de µXRF em investigações médicas. Isso resulta do fato de que este método permite a investigação de mudanças na composição elementar no nível de uma única célula, isto é particularmente importante tendo em vista que os processos bioquímicos normais e patológicos seguem uma micro e submicro escala. Além disso, há fortes evidências de que metais ou íons metálicos selecionados estão intimamente associados com a etiologia ou manifestação de muitas doenças. A análise elementar quantitativa de tecidos patologicamente alterados podem lançar alguma luz sobre os processos que conduzem à degeneração das células no caso das doenças selecionadas (CHWIEJ *et al*., 2005).

Em Al-ebraheem *et al*. (2010), utilizaram a técnica de microfluorescência de raios X para determinar a localização e as respectivas concentrações dos elementos Zn, Cu, Fe e Ca em câncer de colo retal primário e metástases hepáticas de colo retais secundárias.

Em Guerra *et al*. (2010), analisaram dentes de leite utilizando a técnica de µXRF, para determinar a distribuição elementar de chumbo e cálcio, em diferentes regiões dos dentes incisivos primários de crianças que vivem em uma área notoriamente contaminada (Santo Amaro da Purificação, Bahia ,Brasil). Concluíram que um elevado

nível significativo de Pb foi observado na superfície do esmalte. Além disso, a intensidade da razão Pb / Ca diminuiu a partir da superfície do esmalte para circumpulpal dentina. A análise de mapeamento micro de distribuição de chumbo fornece uma metodologia para caracterizar as vias através das quais o nível chumbo está envolvido no esmalte e pode esclarecer como os níveis de chumbo no esmalte superficial estão relacionadas com o fundo ambiental.

Em Cardoso *et al*. (2011), caracterizaram o estado pluripotente de células tronco através da análise da distribuição de elementos traço usando técnica de µXRF. Detectaram os elementos P, S, Cl, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu e Zn. O Cl não foi considerado no estudo, tendo em vista que seu comportamento não seguiu um padrão. Os elementos Cr e Mn também não foram considerados devido aos seus baixos níveis de distribuição. Os resultados mostraram aumento de elementos metálicos de conteúdo e padrão de polarização elementar consistente de P e S em ambas as células tronco pluripotentes, humanas e de camundongo, indicando que a diferenciação neural e polarização elementar estão fortemente correlacionados.

Em Gasperini *et al*. (2011), investigaram a distribuição mineral de osso em amostras com nano hidroxiapatitae (HA) e em esferas HA, especialmente a distribuição espacial na arquitetura de um osso. O objetivo deste estudo era avaliar a distribuição elementar do Cálcio. O maior pico da µXRF foi de Cálcio e em as amostras de osso compostas por HA é esperado encontrar valores altos para concentração de Ca.

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

Em Rak *et al*. (2014), utilizaram a técnica de µXRF para criar mapas de distribuição quantitativa dos elementos P, S K e Ca em amostras fúngicas.

Em Leitão *et al*. (2015) foi investigado a distribuição de zinco em esferóides celulares de hiperplasia prostática benigna e câncer e foram analisadas as diferentes respostas ao tratamento com zinco utilizando micro fluorescência de raios X e concluiu que diferentes respostas ao tratamento com zinco sugerem que existem diferentes mecanismos de acumulação de zinco em células tumorais.

CAPÍTULO III

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

III.1 A Próstata

A próstata é uma glândula pequena localizada na porção inferior do abdômen, logo abaixo da bexiga e à frente do reto (Figura 3.1 e 3.2). Ela envolve a porção inicial da uretra, tubo pelo qual a urina armazenada na bexiga é eliminada, e produz parte do sêmen, líquido espesso que contém os espermatozóides, liberados durante o ato sexual (FUSCALDI, 2012).

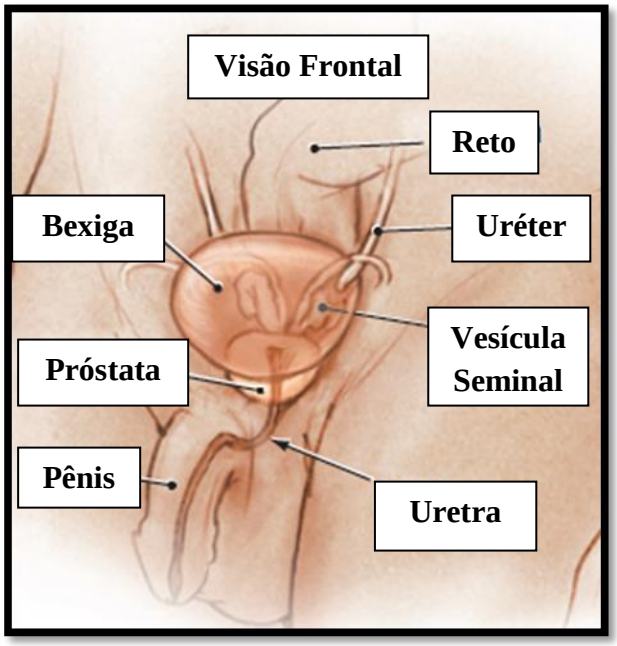


Figura 3.1 – Ilustração da localização anatômica da próstata (ZELLER, 2006).

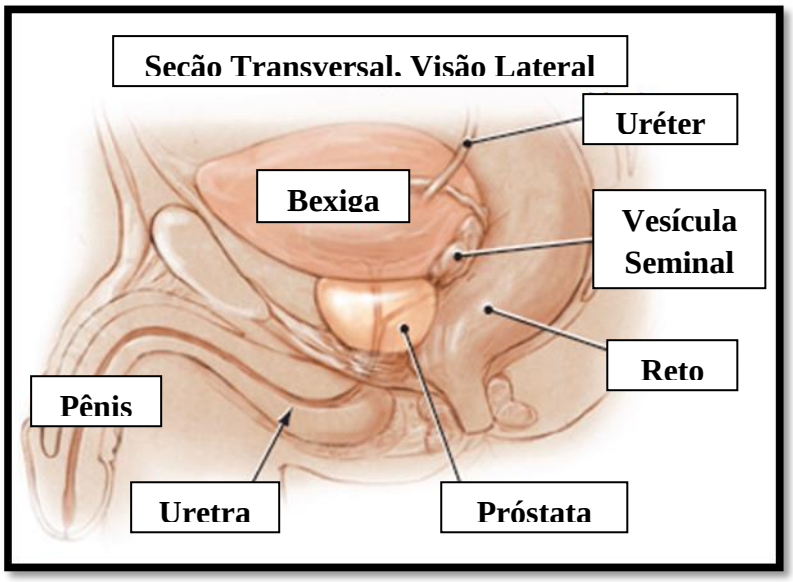


Figura 3.2 – Ilustração da seção transversal da localização da próstata. Observe que a porção inicial da uretra, a uretra prostática, perfura-a longitudinalmente da base ao ápice (ZELLER, 2006)

Histologicamente a próstata é composta por tecido epitelial glandular, tecido conjuntivo e tecido muscular liso (OLIVEIRA, 2013).

A próstata é responsável pela produção e armazenamento do líquido prostático, um fluido incolor com pH médio de 6,6 que contribui com uma série de proteínas e elementos químicos que aparentemente não são essenciais para a fertilização, mas que podem otimizar as condições deste processo (HAYWARD; CUNHA, 2000). O citrato, presente no líquido prostático e cuja concentração na ejaculação é de 500 a 1000 vezes maior do que no plasma, está relacionado à capacidade de coagulação e de liquefação do sêmen e, ainda, devido ao seu efeito tampão ajuda a neutralizar os efeitos nocivos do ambiente ácido vaginal sobre a motilidade espermática. A maior parte deste citrato é formada pelas células epiteliais secretoras prostáticas, a partir de ácido aspártico e glicose. Assim, as altas concentrações dentro da glândula decorrem, em parte, de um mecanismo de regulação intrínseco de suas mitocôndrias que impede a oxidação do composto quando ele é formado, portanto sua taxa de síntese excede a taxa de oxidação (COSTELLO; FRANKLIN, 1998). Outro elemento encontrado em grande quantidade no líquido seminal é o zinco, que assim como o citrato é secretado primariamente pela próstata, sendo a glândula o local do organismo onde há a maior concentração do íon (OLIVEIRA, 2013).

Foi publicado por McNeal (1988) o conceito de anatomia zonal da próstata. De acordo com este conceito foram identificadas quatro zonas distintas (Figura 3.3). A zona periférica que representa 70% do volume prostático no adulto jovem, a zona central representando 25% deste volume e, a zona de transição que constitui 5% do volume prostático. Cerca de 60 a 70% dos carcinomas de próstata têm origem na zona periférica, 10 a 20% na zona de transição e 5 a 10% na zona central (LEZE, 2011 e LEITÃO, 2013).

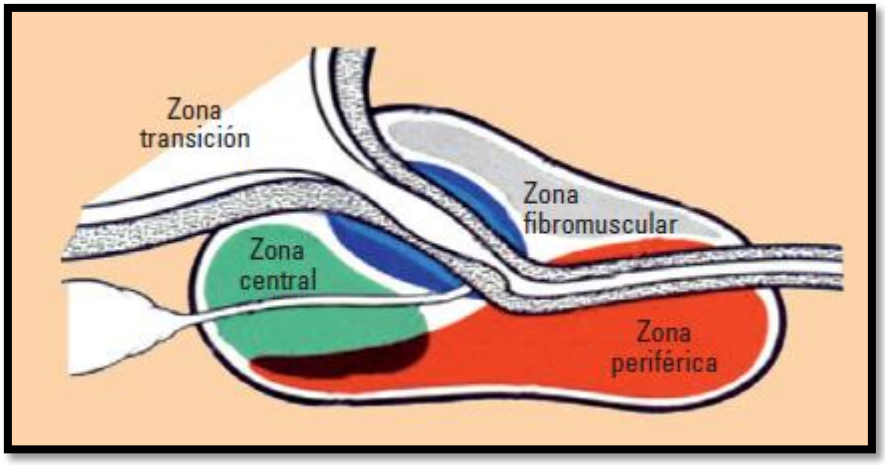


Figura 3.3 – Modelo esquemático da distribuição das três zonas glandulares prostáticas histologicamente distintas, nas quais há uma variação na quantidade de estroma e de epitélio (MARTÍNEZ *et al*., 2013).

Os níveis de zinco e citrato na zona periférica prostática normal são 3-10 e 30-50, respectivamente, maior do que o encontrado em outros tecidos moles. A concentração comparativa de zinco e citrato no fluido prostático em relação ao plasma sanguíneo são de aproximadamente 75 e 1000 vezes, respectivamente, mais elevada do que a encontrada no plasma (FRANKLIN *et al*., 2015).

Uma das principais funções da próstata é a alta produção e secreção de citrato que é efetuada devido ao acúmulo característico de zinco pelas células epiteliais da próstata. A reação chave responsável por este acúmulo de citrato é a atividade mitocondrial limitante da enzima m-aconitase, que exclusivamente minimiza a oxidação de citrato em células da próstata. Esta atividade resulta dos efeitos inibitórios de zinco sobre a enzima. Isto evita a oxidação de citrato através do ciclo de Krebs, de modo que ele se acumula para secreção como um componente principal de fluido prostático. Portanto, o citrato é um produto final do metabolismo intermediário, em células da

próstata. Em praticamente todas as outras células de mamíferos, o citrato é um intermediário crítico que é oxidado através do ciclo de Krebs para a produção de trifosfato de adenosina (ATP). A inibição da m-aconitase é letal para a maioria das células de mamíferos, por conseguinte, a ligação de zinco citrato é única para estas células da próstata (FRANKLIN *et al*., 2015).

III.2 Câncer de Próstata

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

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

O PSA, antígeno prostático específico é uma enzima (uma glicoproteína) com algumas características de marcador tumoral ideal, embora ainda controverso como uma ferramenta de diagnóstico, tem sido bem utilizado na detecção de CaP desde que foi introduzido no início de 1980. Na década seguinte, PSAD foi introduzido, que é calculado como nível sérico de PSA por volume da próstata. Baseia-se na premissa de

que CaP liberta PSA no soro do paciente, em maior proporção do que o aumento esperado explicado em volume em hiperplasia, resultando em maior PSAD em pacientes com CaP do que aqueles com HBP. O PSAD foi popularizado em meados dos anos 1990, mas foi abandonado devido à dificuldade em medir o volume estimado da próstata. (AL-KHALIL *et al*., 2015)

O câncer é um problema de saúde pública mundial, e sua incidência no mundo cresceu 20% na última década. No Brasil, o câncer de próstata é o segunda neoplasia maligna mais comum entre os homens (atrás apenas do câncer de pele não melanoma). Em valores absolutos, é o sexto tipo tumoral mais comum no mundo e o mais prevalente em homens, representando cerca de 10% do total de cânceres. Sua taxa de incidência é cerca de seis vezes maior nos países desenvolvidos em comparação aos países em desenvolvimento. A estimativa de novos casos de câncer de próstata no Brasil em 2014 foi de 68.800, que corresponde a 70,42 casos novos a cada 100 mil habitantes (INCA, 2014)

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

III.3 O Papel do Zinco no Câncer de Próstata

Uma das funções fisiológicas da próstata normal é o acúmulo de níveis muito elevados de zinco e citrato. Estes componentes desempenham um papel essencial na reprodução. A célula epitelial luminal da próstata evoluiu para realizar a função de acumular e secretar zinco e citrato. Assim, estas células foram adaptadas para acomodar níveis de zinco intracelulares que seriam tóxicos para outras células. A capacidade de acúmulo de zinco pelas células epiteliais é alcançada através da atividade de proteínas transportadoras de zinco, que são membros da família de transportadores ZIP, codificadas por genes relacionados SLC39. A hZIP1, é um membro da família ZIP e tem sido reportada como sendo a principal transportadora de zinco em células epiteliais da próstata. Uma vez na mitocôndria, o zinco inibe a oxidação terminal pelas células da próstata (FRANKLIN *et al*., 2015).

A insuficiência de zinco tem sido associada com o desenvolvimento de muitos tumores, o zinco mostra forte atividade anti-proliferativa em diferentes linhagens de células tumorais humanas, incluindo as células tumorais da próstata. Entretanto, o mecanismo pelo qual o zinco inibe a proliferação das células tumorais ainda não é bem compreendido (BANUDEVI *et al*., 2010).

O câncer de próstata envolve a transformação das células epiteliais normais em células epiteliais malignas, que não acumulam zinco (CHEN *et al*., 2013). A proteína ZIP1 foi identificada como um importante transportador para o acúmulo de zinco em células epiteliais da próstata, sendo, assim, uma candidata lógica para explicar a incapacidade da célula neoplásica em acumular zinco. Evidências recentes sugerem que a regulação negativa da expressão hZIP1, bem como a perda de função desse transportador resulta na perda da capacidade de acúmulo de zinco, o que leva a uma diminuição da inibição de m-aconitase e oxidação terminal. Assim, ZIP1 pode ser um gene supressor de tumor no câncer da próstata (FRANKLIN *et al*., 2015).

III.4 A Cultura de Células

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

papel no estudo da biologia celular e no desenvolvimento de tratamentos de doenças degenerativas (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

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

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

A linhagem celular é formada à medida que a cultura primária é imortalizada. As linhagens celulares também guardam as características do tecido de origem e possuem alta capacidade de expansão. Assim, linhagens celulares são muito utilizadas em pesquisas, pois podem ser mantidas em cultura por um grande período de tempo (quando comparado às células primárias) e ainda retém grande parte das características do tecido de origem. Muitas linhagens celulares podem ser propagadas sem perder suas características por muitas passagens (LEITÃO, 2013).

III.5 Cultura em Três Dimensões (3D)

Leighton em 1951 já percebia as limitações do cultivo em monocamadas, pois este sistema de cultivo não reproduz a arquitetura 3D do tecido *in vivo*, não prevê a toxidade órgão-específica, a sinalização mecânica e bioquímica e a comunicação célula-célula em um microambiente tridimensional (LEITÃO, 2013).

Estudos envolvendo a terapia radiológica foram uma das primeiras linhas de pesquisa bastante exploradas por meio de cultivo celular em 3D. As diferenças entre o ambiente 2D e 3D, foram mostradas principalmente no que se refere à resistência das células, e direcionaram esta abordagem experimental para diversas linhas de pesquisa,

como os estudos relacionados à radiação ionizante, a geração de radicais livres, inibição da respiração celular e toxicidade preferencial em regiões de hipóxia. Outra importante aplicação dos esferóides envolve testes de sensibilidade a drogas. Inicialmente, estes testes eram aplicados empregando a cultura de células crescidas em monocamada, todavia, percebeu-se que o efeito de algumas concentrações de drogas não tinham equivalência *in vivo* aos valores encontrados na cultura 2D. Neste sentido, crescentes evidências têm mostrado que células arranjadas em esferóides, principalmente as localizadas no interior destes agregados celulares, são mais resistentes a agentes citotóxicos do que as células em cultura 2D. (AMARAL, 2010).

Alguns aspectos relevantes da cultura em 3D:

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

III.6 Fluorescência de Raios X

A fluorescência de raios X está associada à emissão de radiação eletromagnética devido às transições de elétrons entre diferentes orbitais. Este fenômeno está relacionado ao modelo quântico da estrutura atômica. Na teoria quântica, o elétron é representado por uma função de onda $\psi(x, y, z)$. O quadrado do módulo da função de onda do elétron $|\psi|^2$dá a probabilidade de se encontrar o elétron numa certa região do espaço próximo do núcleo (EISBERG e RESNIK, 1988). Esta região é conhecida como o orbital, e representa a região do espaço, onde se tem grande probabilidade de encontrar um determinado elétron. Segundo este modelo, enquanto o elétron permanece num orbital, ele não ganha e nem perde energia. Quando ocorre um salto quântico, o elétron faz uma transição entre dois estados diferentes. Como estados diferentes estão associados a energias diferentes, os saltos quânticos são acompanhados com a emissão

de radiação eletromagnética. Os elétrons são caracterizados pelos seus estados quânticos, e a estes estados quânticos estão associados quatro números quânticos: o número quântico principal n (é um número positivo inteiro); o número quântico orbital l (pode ter qualquer valor inteiro entre 0 e n-1); o número quântico magnético m (pode ter $2l + 1$ valores inteiros possíveis entre -l e +l) e o número quântico spin s (pode assumir apenas os valores +1/2 e –1/2) (COSTA, 2003).

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

No processo de interação, efeito fotoelétrico, pode ocorrer à ionização dos elementos, e como consequência, os elementos (átomos) emitem linhas espectrais com energias características cujas intensidades estão relacionadas com a concentração do elemento na amostra. A figura 3.4 mostra o processo do efeito fotoelétrico.

Quando um elemento de uma amostra é excitado, este tende a ejetar os elétrons dos seus orbitais e, como consequência, elétrons dos níveis mais afastados podem realizar um salto quântico para preencher a vacância produzida. Cada transição eletrônica constitui uma perda de energia para o elétron, e esta energia é emitida na forma de um fóton de raios X de energia característica e bem definida para cada elemento. Assim, de modo resumido, a análise por fluorescência de raios X consiste de três fases: excitação dos elementos que constituem a amostra, dispersão dos raios X característicos emitidos pela amostra e detecção desses raios X (LACHANCE e CLAISSE, 1995; ANJOS, 2000a).

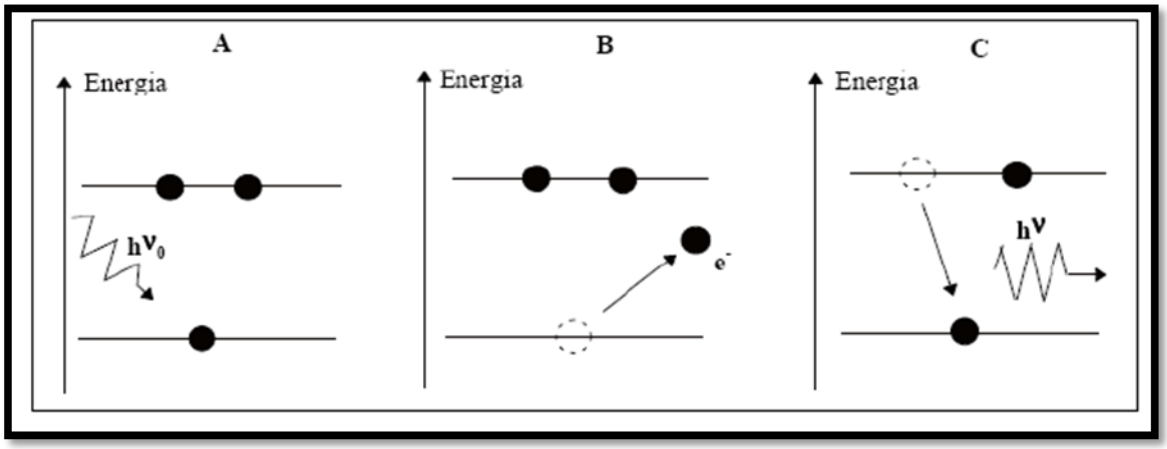


Figura 3.4 - Esquemático do Efeito Fotoelétrico - (**A**) O fóton incidente chega ao átomo, (**B**) Um elétron de orbital mais interno é ejetado deixando uma vacância, (**C**) Um elétron de orbital mais energético ocupa a vacância emitindo fluorescência.

III.7 Excitação dos Elementos

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

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

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

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

Onde:

E = energia de ligação eletrônica (J);

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

e = carga elétrica do elétron = 1,60.10^{-19}C;

Z = número atômico do elemento emissor dos raios X;

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

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

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

n = nº quântico principal do nível eletrônico (n = 1 para o nível K, n = 2 para o nível L, etc).

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

$$E=2,18.10^{-18}\,\frac{(Z-b)^2}{n^2} \qquad (2)$$

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

Para que a transição entre dois estados quânticos ocorra é necessário que um elétron seja ejetado do átomo. Logo, a energia da radiação que excita o átomo, deve ser igual ou superior à energia de ligação do elétron ao átomo, no caso no exemplo anterior, EK. De forma análoga, para que elétrons da camada L sejam ejetados, gerando o espectro de energia das linhas L,a energia de radiação incidente deve ser igual ou superior às energias de ligação, neste caso chamadas de EL1, EL2 e EL3. Em espectrometria de raios X, sabe-se que os estados quânticos estão associados a níveis de

energias. Estes níveis de energia não dependem apenas dos dois números quânticos *n* e *l*, mas também de outro número quântico *j*, que representa a soma vetorial de *l* e *s*, com a restrição que *j* não pode ser negativo.

$$j = l+s \tag{3}$$

Assim, j somente assumirá os seguintes valores:

$$j = l \pm \frac{1}{2} \tag{4}$$

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

$$n_{e-} = 2j+1 \tag{5}$$

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

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

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

A energia dos fótons emitidos será igual à diferença entre os dois estados quânticos envolvidos. Por exemplo: a transição entre um elétron do subnível L3 para o nível K, resulta na emissão de fótons chamada K-L3. A energia deste fóton é expressa como:

$$E_{K\text{-}M_3} = E_K - E_{M_3} \tag{6}$$

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

Nível	Subnível	Números quânticos			Número máximo de elétrons
		n	l	j	
K		1	0	1/2	2
L	L_1	2	0	1/2	2
	L_2	2	1	1/2	2
	L_3	2	1	3/2	4
M	M_1	3	0	1/2	2
	M_2	3	1	1/2	2
	M_3	3	1	3/2	4
	M_4	3	2	3/2	4
	M_5	3	2	5/2	6
N	N_1	4	0	1/2	2
	N_2	4	1	1/2	2
	N_3	4	1	3/2	4
	N_4	4	2	3/2	4
	N_5	4	2	5/2	6
	N_6	4	3	5/2	6
	N_7	4	3	7/2	8

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

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

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

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

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

III.8 A Emissão de Fluorescência de Raios X

A fração da radiação incidente que leva a emissão de uma determinada linha de raios X característicos é determinada por uma probabilidade de excitação que é produto de três outras probabilidades (PEREIRA, 2003 e COSTA, 2003):

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

Onde:

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

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

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

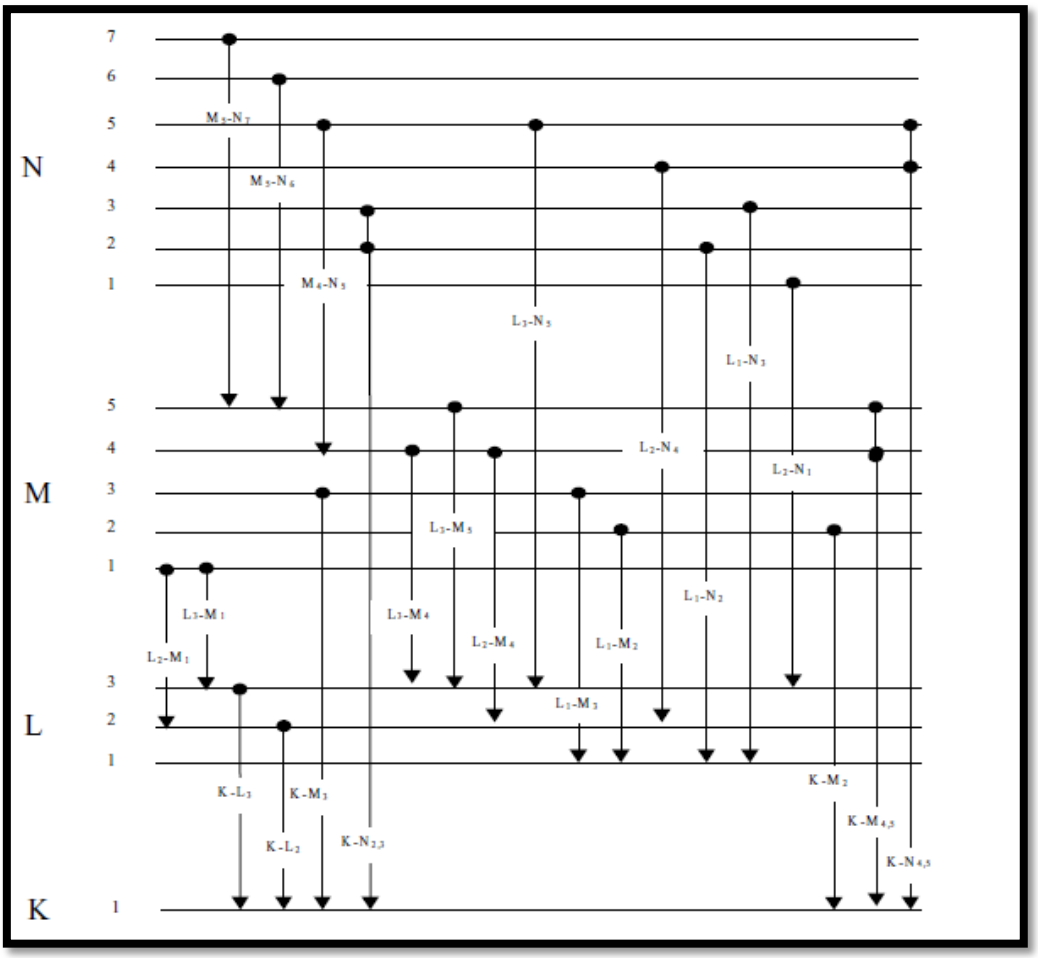


Figura 3.5 - Transições de níveis de energias (ANJOS, 2000a)

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:

$$\omega = \frac{n_s}{n_p} \tag{9}$$

$$n_p = n_s + n_A \tag{10}$$

Onde:

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

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

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

A figura 3.6 representa esquematicamente o efeito Auger para um modelo clássico do elemento magnésio (Mg).

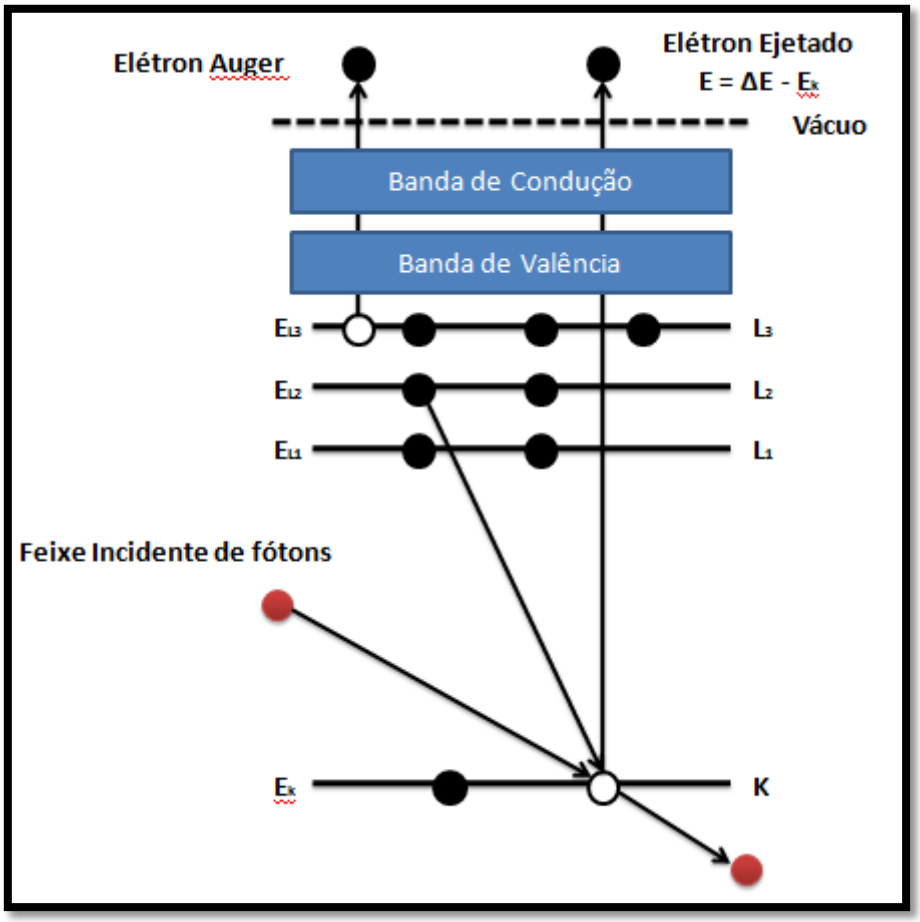


Figura 3.6 - Representação esquemática do efeito Auger.

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

III.9 Microfluorescência de Raios X (µXRF)

A Microfluorescência de raios X (µXRF) é uma variante da XRF diferenciando-se principalmente nas dimensões e geometria do feixe. É baseada na excitação localizada de uma área microscopicamente pequena (na ordem de µm) na superfície de uma amostra, fornecendo informações da distribuição espacial de elementos majoritários e minoritários no material de estudo. Por esse motivo a µXRF é uma

técnica bastante atrativa para a análise local e para o mapeamento elementar em vários tipos de materiais (BERNASCONI *et al*., 1994).

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

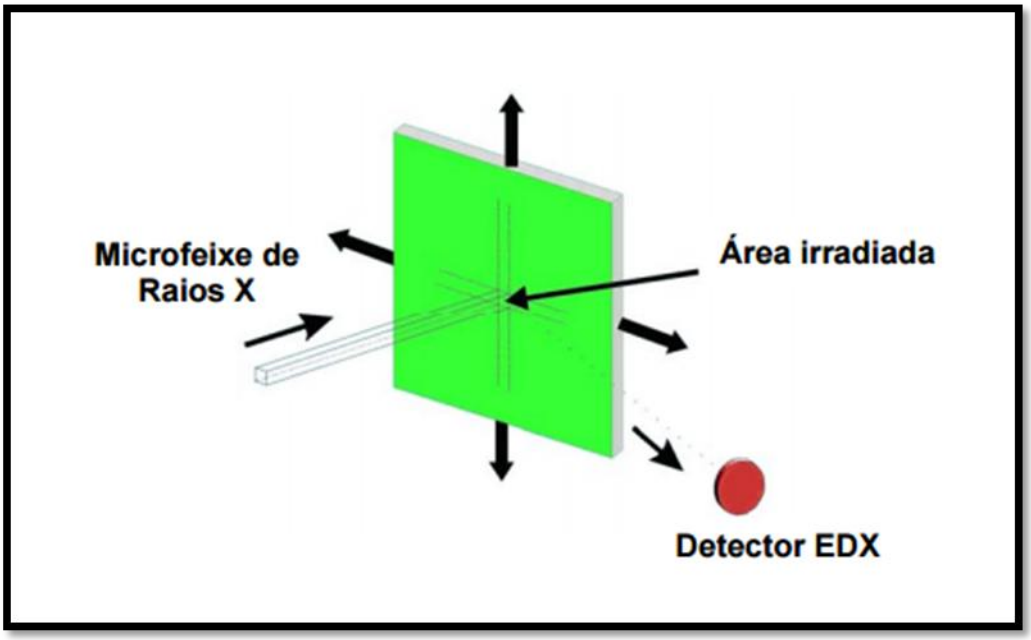


Figura 3.7 – Esquema simplificado da análise por µXRF (MELO JÚNIOR, 2007)

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

a) Informação pontual - Fornece uma rápida comparação de materiais heterogêneos através da análise de apenas uma área da amostra;

b) Perfil - É uma análise sequencial de vários pixels (áreas) alinhados ou verticalmente ou horizontalmente que fornece informação a respeito da homogeneidade da amostra;

c) Mapas elementares - É uma combinação de vários perfis que possui uma matriz com linhas e colunas que permite analisar a composição de uma superfície inteira (HAVRILLA,1997). Fornece imagens coloridas onde às variações das cores mostram as diferentes intensidades relativas do elemento químico presente da amostra (LEITÃO, 2013).

Um esquema da obtenção de uma imagem é representado na figura 3.8.

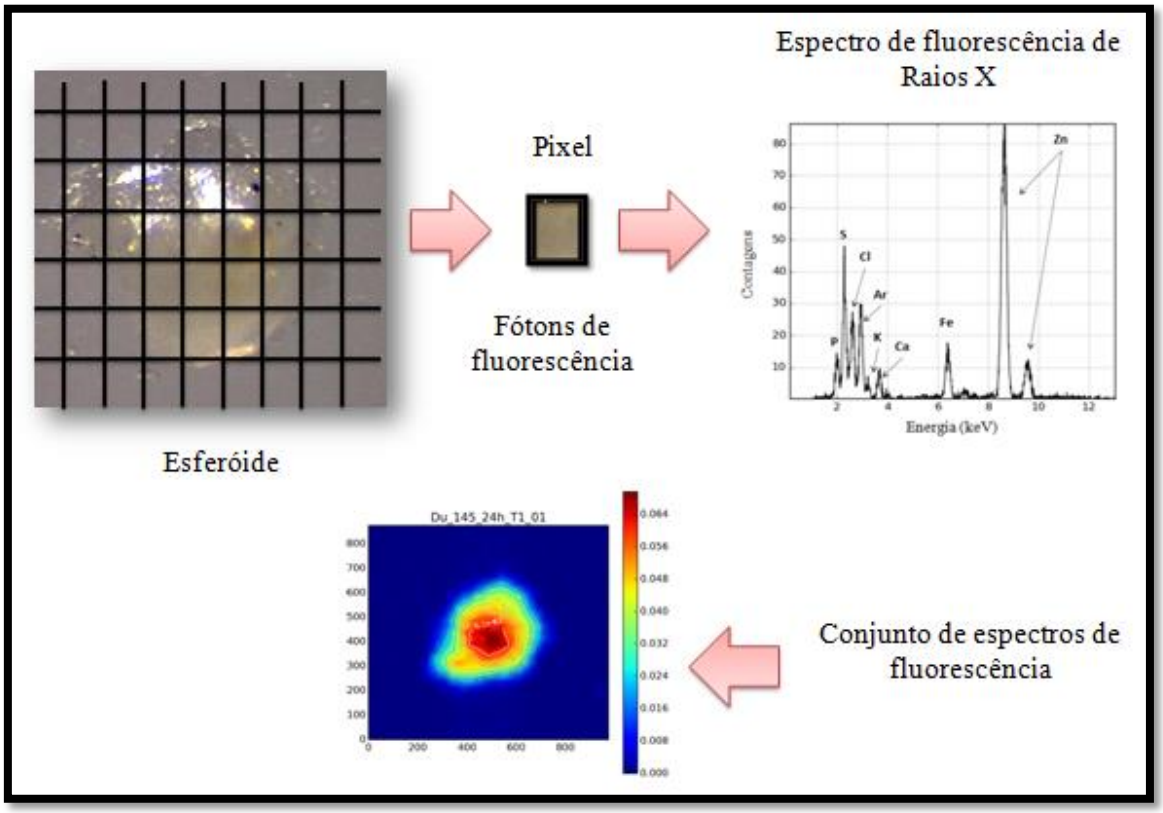


Figura 3.8 - Representação esquemática da obtenção de uma imagem.

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

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

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

III.10 Radiação Síncrotron

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

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

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

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

A utilização de uma fonte de radiação síncrotron permite alcançar limites de detecção mais baixos do que quando se utiliza um tubo de raios X de alta potência (KLOCKENKAMPER, 1996 e CASTRO, 2001).

III.11 Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS)

Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, localizado em Campinas, S.P., (LNLS) opera a única fonte de Luz Síncrotron da América Latina. Projetado e construído com tecnologia brasileira, o LNLS foi inaugurada em 1997, com instalações abertas para a comunidade científica e empresarial em todo o país e no exterior (LNLS, 2014), tem como objetivo fomentar o desenvolvimento científico e tecnológico, colocando ao alcance de pesquisadores do Brasil e do exterior infraestrutura de luz síncrotron, microscópios eletrônicos de alta resolução, microscópios de varredura de ponta e espectrômetros de ressonância magnética nuclear. No LNLS existem quinze estações experimentais de luz que oferecem ótimas condições para os cientistas realizarem pesquisas com nível de competitividade mundial. A operação do LNLS é feita pela ABTLuS para o CNPq e para o Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) (LEITÃO,

2009). A figura 3.9 mostra uma panorâmica do anel e a disposição da linha de XRF no LNLS.

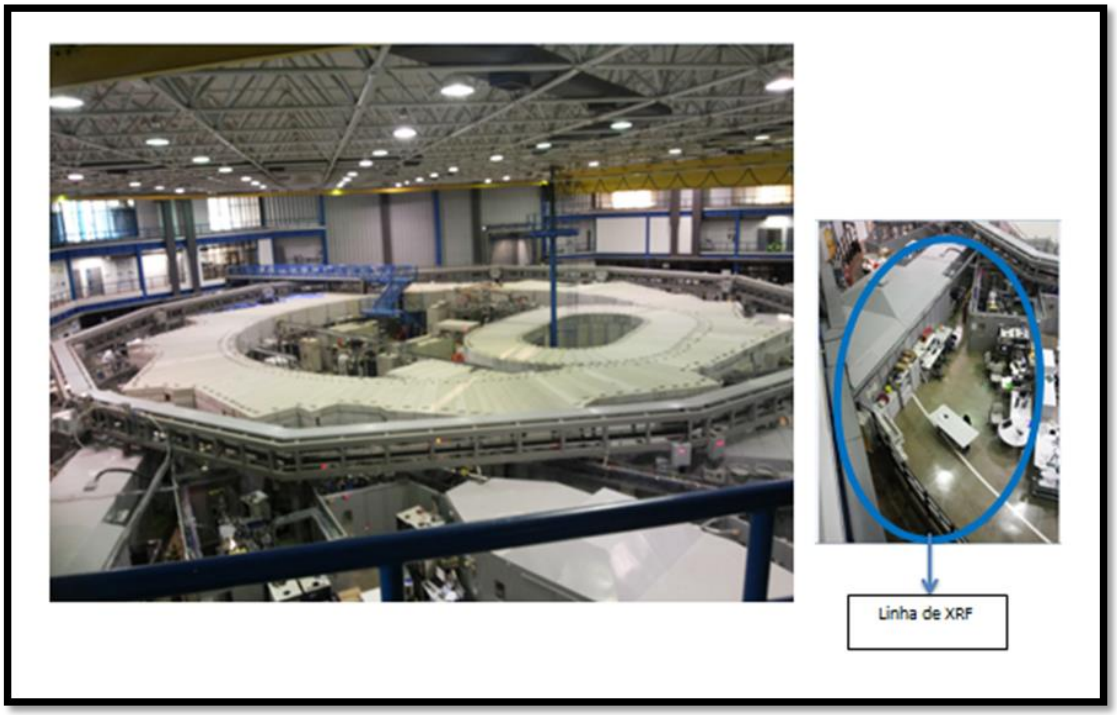


Figura 3.9 – Foto Panorâmica do Anel no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.

CAPÍTULO IV

MATERIAIS E MÉTODOS

IV.1 Obtenção e Preparo dos Esferóides Celulares.

Os esferóides celulares foram estabelecidos a partir da linhagem celular tumoral prostática humana DU145, uma linhagem celular andrógeno independente, com baixo potencial metastático, bem como a partir da linhagem celular epitelial prostática humana normal imortalizada, RWPE-1.

Para o estudo do câncer de próstata foram desenvolvidos, no decorrer dos anos, diversos modelos experimentais *in vivo*. Entre os modelos animais pode-se citar: os murinos transgênicos, os camundongos com imunodeficiência severa combinada, os modelos xeno e o cão. Além dos modelos *in vivo*, muitos modelos de cultura celular já foram desenvolvidos, murinos e humanos, a partir de culturas primárias (finitas) ou linhagens celulares (permanentes) de CaP. A possibilidade de se trabalhar com células de CaP humanas em cultura é uma grande vantagem, principalmente pela maturidade adquirida das quatro principais linhagens: a não tumoral, RWPE-1, e as três tumorais, LNCaP, PC3 e DU145 (MOROZ, 2013).

A linhagem epitelial prostática normal RWPE-1 foi estabelecida a partir da imortalização de uma cultura primária de epitélio prostático sadio, não tumoral, de um indivíduo adulto de 54 anos, por pesquisadores da Universidade Estadual do Michigan, do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos da America. Após a obtenção desta cultura primária, foi realizado procedimento de engenharia celular, com o uso de cópia simples do vírus do papiloma humano (HPV – *humanpapilloma vírus*), para a imortalização e obtenção da linhagem celular RWPE-1 (MOROZ, 2013). E a linhagem tumoral prostática DU145 foi estabelecida a partir de uma lesão metastática prostática isolada do sistema nervoso central.

A linhagem celular DU145 foi escolhida e empregada neste estudo devido ao fato de ser uma linhagem celular bem estabelecida independente de andrógeno e por possuir as características de um câncer agressivo.

As linhagens celulares foram mantidas rotineiramente em meios de cultura (mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes

essenciais para o crescimento celular) apropriados, RPMI com 10% Soro Fetal Bovino (SFB), para linhagem DU145, e Queratinócito – SFM (KSF9), para as células de linhagem RWPE-1. A cultura foi mantida rotineiramente em estufa, à 37ºC, em uma atmosfera de 5% de CO_2.

Os esferoides celulares foram estabelecidos a partir do cultivo de 2 x 10^4 células/poço em placas de 96 poços (de 0,5 cm diâmetro cada), com fundo em U (Figura 4.1). Os poços foram previamente recobertos por uma película de gel agarose 1% (utilizado para evitar a aderência das células ao fundo do poço). Após serem plaqueadas, as células foram mantidas em meio de cultura apropriado para cada tipo de célula, em estufa, à 37ºC, em uma atmosfera de 5% de CO_2. O tempo suficiente para formação dos esferóides foi de dois a quatro dias de cultivo.

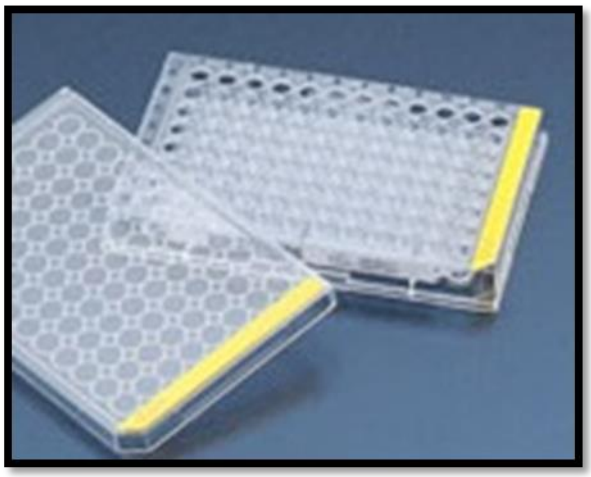


Figura 4.1 – Placa contendo 96 poços com fundo em U utilizada para a cultura dos esferóides.

Após 12 dias em cultura, os esferóides foram tratados com cloreto de zinco e mantidos em cultura (com o tratamento) durante um período de 24 horas e 48 horas.

As soluções para o tratamento foram obtidas utilizando o meio de cultura RPMI com 10% SFB, para as células DU145, e o meio de cultura Queratinócito – SFM (KSF9), para as células normais RWPE-1. Ambos os meios de cultivo foram suplementados com as soluções de cloreto de zinco ($ZnCl_2$) nas 4 diferentes concentrações: 0, 50 µM, 100 µM e 150 µM.

Para a análise por µXRF, após os 12 dias de cultura e os períodos dos tratamentos, os esferóides foram fixados em paraformaldeído 4,0% por 30 minutos, em seguida lavados 3 vezes com solução tampão fosfato (PBS) 0,1M, pH 7,4 e ao final

mantidos em PBS até o momento da análise. No momento da análise os esferóides foram lavados com água Milli-Q e depositados em filme ultralene de 4 μm de espessura e em seguida postos para secar a temperatura ambiente.

IV.2 Análise por μXRF

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

As amostras foram excitadas utilizando um feixe branco com 25 μm de extensão na vertical e 12 μm na horizontal logrado por um sistema de micro foco KB. Foram realizados passos de 25 μm na horizontal e na vertical, correspondendo a um pixel de 25 μm x 25 μm.

Para a detecção dos raios X característicos emitidos por cada pixel foi utilizado um detector Silicon Drift com resolução de 165 eV em 5,9 keV posicionado a 90^0 com relação ao feixe incidente. A tabela 1 mostra as condições experimentais e a figura 4.1 mostra o arranjo experimental.

Tabela 1 - Condições experimentais

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

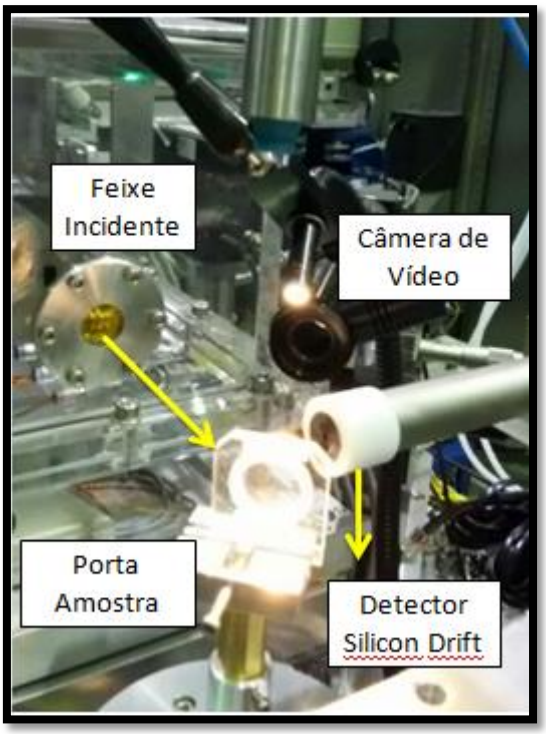


Figura 4.2 – Esquema experimental.

IV.3 Análise da Viabilidade Celular

A viabilidade ou a sobrevivência celular foi avaliada utilizando o ensaio colorimétrico de MTT (brometo de 3 - [4, 5-dimetil-2y] -2, 5 diphenyltertrazolio). Este teste avalia a capacidade de a enzima desidrogenase succínica reduzir o substrato MTT a cristais de formazan na mitocôndria, ou seja, avalia a capacidade das células ditas viáveis reduzirem metabolicamente o MTT. O sal MTT é um composto hidrossolúvel que apresenta coloração amarelo-pálido e os cristais de formazan são compostos de coloração azul escuro, não solúvel em água (MOSMANN, 1983). O formazan foi extraído através da adição de dimetilsulfóxido (DMSO), um solvente apropriado. Para este ensaio foi utilizado o mesmo protocolo de cultura mencionado anteriormente para estabelecimento dos esferoides. Após o período de tratamento (24 e 48h) os esferóides foram transferidos dos poços das placas de cultura para eppendorfs e o meios de cultivo com os tratamentos descartados. Em seguida, os esferóides foram incubados em uma solução de MTT (5µg/mL) por 3 horas a 37°C ao abrigo da luz. Após a incubação, a solução de MTT foi removida e foram adicionados 200 µL de DMSO para solubilizar o formazan. A formação de formazan foi medida em 570 nm usando um espectrofotômetro. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

IV.4 Análise da Organização do Citoesqueleto Celular e do Fenótipo Celular

A imunocitoquímica ou imunofluorescência é uma técnica importante que utiliza anticorpos marcados com fluoróforo para detectar antígenos celulares específicos. O anticorpo é um complexo de proteínas que inicia uma resposta imunitária contra um antígeno alvo. A organização básica de um anticorpo inclui dois domínios funcionais que, em conjunto, se assemelham a letra Y (Figura 4.3, esquerda). O domínio Fab (fragmento contendo o local de ligação ao antígeno) faz os braços do Y, o final de cada braço é uma região variável responsável pela ligação ao antígeno. O domínio Fc (fragmento que cristaliza) compreende a cauda do Y, a qual as células efetoras imunes, proteínas, e outros anticorpos reconhecem. Esta estrutura única permite a detecção direta ou indireta de antígenos, utilizando um único anticorpo marcado com fluoróforo ou por meio da ligação de um anticorpo secundário marcado com fluoróforo criado contra o domínio de Fc, respectivamente (ODELL; COOK, 2013).

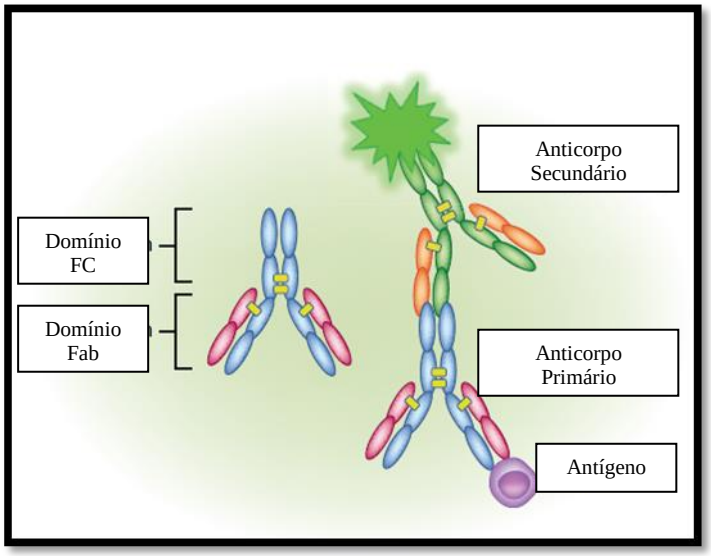


Figura 4.3 – Estrutura de um anticorpo (ODELL; COOK, 2013).

Para a análise da organização do citoesqueleto celular, bem como do fenótipo celular utilizou-se os anticorpos primários monoclonais: anti-citoqueratina humana (Dako Clone – MNF 116 1/100), um marcador tipicamente epitelial que reconhece as proteínas de queratina que compõem os filamentos intermediários encontrados no citoesqueleto das células epiteliais, tendo em vista que as células prostáticas utilizadas neste trabalho são de origem epitelial; e o anticorpo anti-vimentina humana (Sigma

1/200), um típico marcador de células de origem mesenquimal, empregado com o objetivo de avaliar se o processo de transição epitélio mesenquimal estaria ativado, tendo em vista que este processo representa um importante passo durante a progressão tumoral.

Para a realização da imunofluorescência, o meio de cultura foi removido dos poços e as células fixadas com etanol gelado (-20°C) por vinte minutos em temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram lavadas por três vezes com PBS (tampão fosfato-salino) e, então, incubadas em uma solução de 50 nM de NH_4Cl por 30 minutos. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com PBS/BSA 5%, Tween 0.05 %, Triton 0,1% e Gelatina 0,1% e as ligações inespecíficas do anticorpo secundário com PBS/Normal Goat Serum 10%. Realizados os bloqueios, as células foram novamente lavadas com PBS e incubadas com os anticorpos primários acima mencionados *overnight*. No dia seguinte, as células foram lavadas com PBS por três vezes e, novamente incubadas com 50 µL/lamínula de PBS/BSA 5 %, Tween 0.05 %, Triton 0,1% e Gelatina 0,1% por 30 minutos em câmara úmida em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram novamente lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário Alexa 546 (1/300) Goat anti-mouse, marcado com fluoróforo, por duas horas. Os núcleos celulares foram marcados por cinco minutos com DAPI, 50µL/lâmina, (4’,6’-diamidino-2phenylindole dihydrochloride, Santa Cruz Biotechnology). Ao final, as células foram lavadas com água destilada e as lamínulas montadas sobre lâminas histológicas com N-propilgallato (Sigma), antes de serem analisadas e fotografadas por meio de microscopia de fluorescência.

CAPÍTULO V

RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1 Resultados da Análise dos Esferóides Celulares da Próstata através da µXRF

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

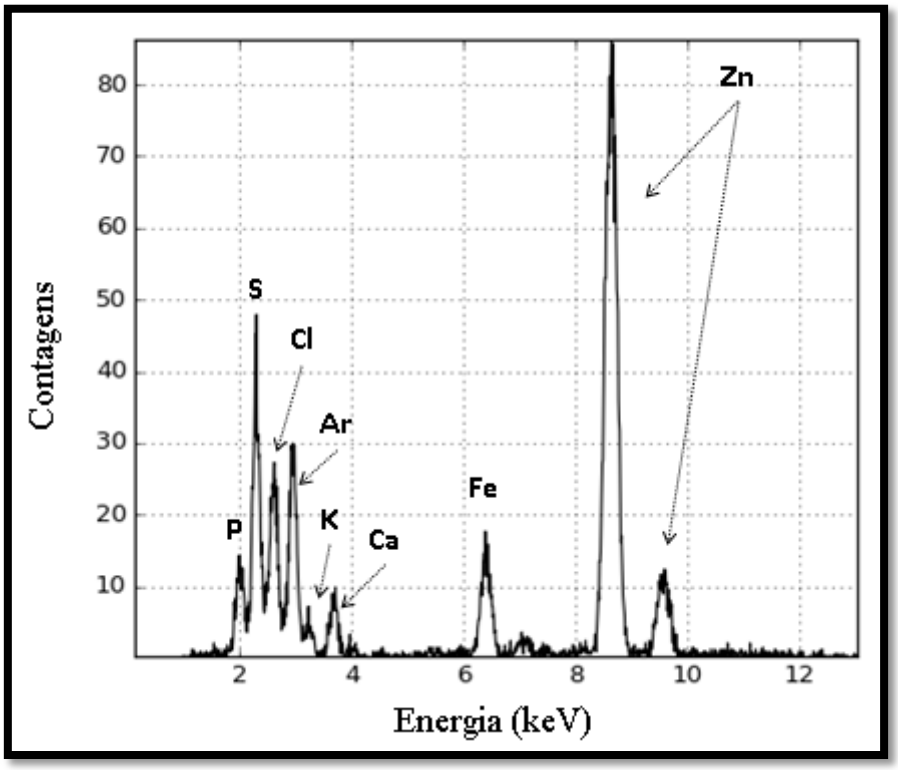


Figura 5.1 – Espectro de XRF do esferoide RWPE-1 suplementado com 150 µM durante 24 horas.

Observa-se que elemento Ar está presente no espectro, tendo em vista que o experimento foi realizado em atmosfera normal e a atmosfera possui aproximadamente 1,0 % de Ar. Apesar dos elementos P, S, Cl, Ar, K, Ca, Fe e Zn, terem sido detectados

apenas o Zinco é de interesse neste estudo e, portanto somente mapas bidimensionais de Zn foram obtidos.

A seguir, na figura 5.2, temos as imagens resultantes dos mapas bidimensionais da intensidade de Zinco nos esferóides da linhagem DU145 (CaP) suplementados com 0 µM, 50 µM, 100 µM e 150 µM de Cloreto de Zinco durante 24 horas. A escala de cores retrata a intensidade do Zinco nos esferoides, onde o vermelho reproduz a área em que esta intensidade é maior.

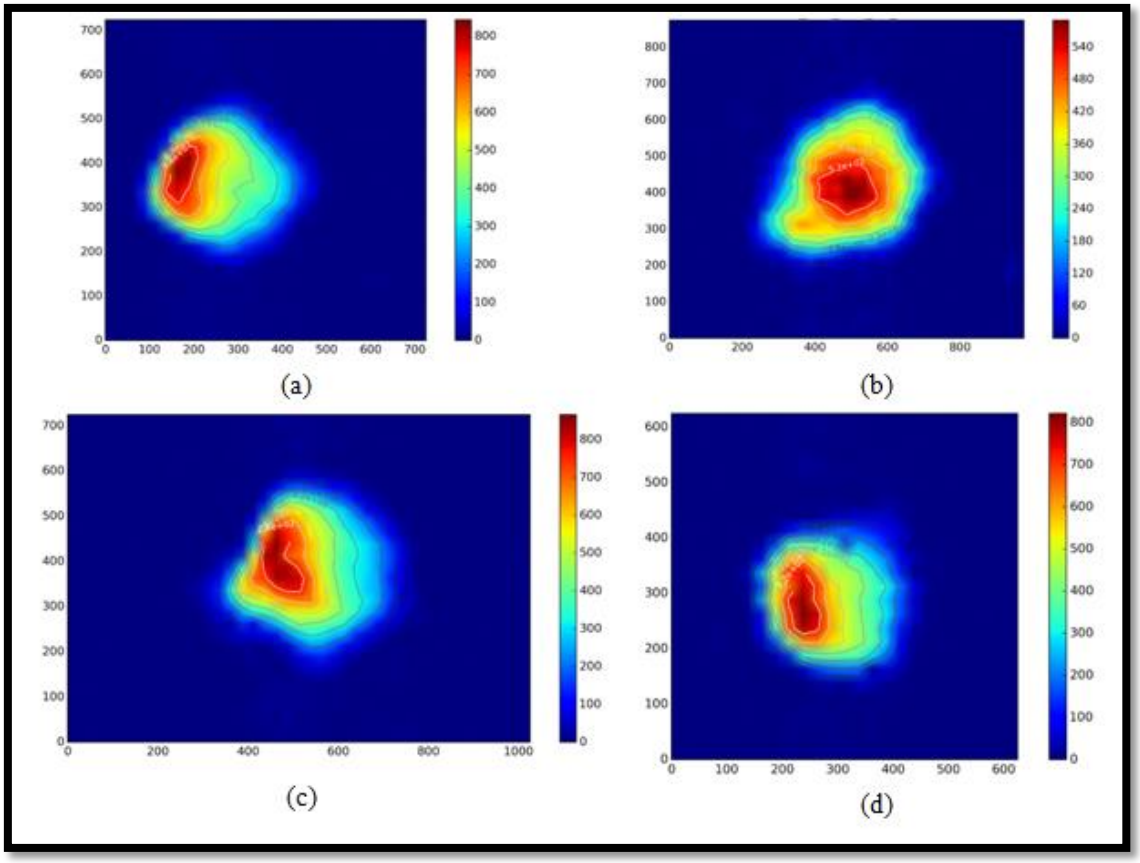


Figura 5.2 – Imagens resultantes dos mapas bidimensionais da intensidade de Zn em esferoides DU145 com tratamento durante 24 horas de (a) 0 µM; (b) 50 µM; (c) 100 µM; (d) 150 µM.

Em prosseguimento, na figura 5.3, observa-se as imagens resultantes dos mapas bidimensionais da intensidade de Zinco nos esferoides da linhagem DU145 suplementados com 0 µM, 50 µM, 100 µM e 150 µM de Cloreto de Zinco durante 48 horas.

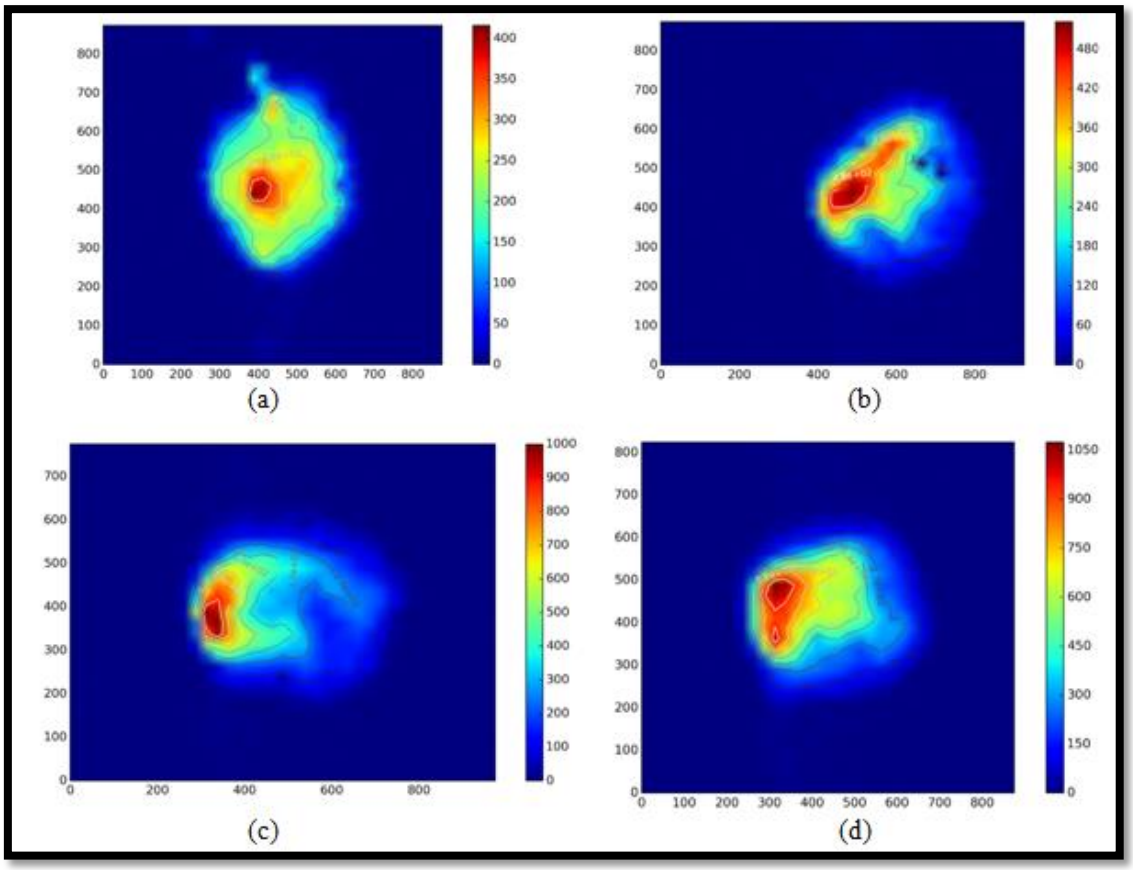


Figura 5.3 – Imagens resultantes dos mapas bidimensionais da intensidade de Zn em esferoides DU145 com tratamento durante 48 horas de (a) 0 µM; (b) 50 µM; (c) 100 µM; (d) 150 µM.

Foi possível observar que a intensidade de zinco dos esferóides deste tipo celular, DU145, foi maior no centro e que sua geometria é próxima à esférica.

A seguir, na figura 5.4, temos as imagens resultantes dos mapas bidimensionais da intensidade de Zinco nos esferóides da linhagem RWPE-1 suplementados com 0 µM, 50 µM, 100 µM e 150 µM de Cloreto de Zinco durante 24 horas.

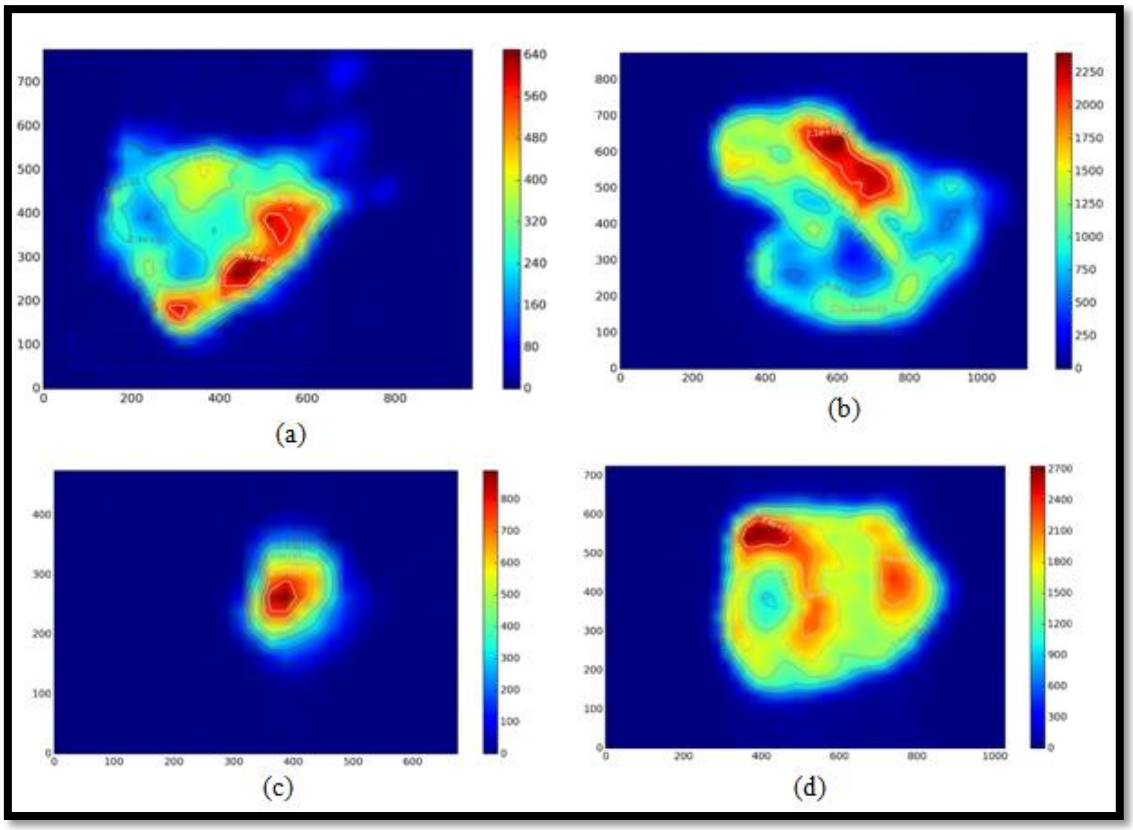


Figura 5.4 – Imagens resultantes dos mapas bidimensionais da intensidade de Zn em esferoides RPWE-1 com tratamento durante 24 horas de (a) 0 µM; (b) 50 µM; (c) 100 µM; (d) 150 µM.

Em prosseguimento, na figura 5.5, observa-se as imagens resultantes dos mapas bidimensionais da intensidade de Zinco nos esferóides da linhagem RPWE-1 suplementados com 0 µM, 50 µM, 100 µM e 150 µM de Cloreto de Zinco durante 48 horas.

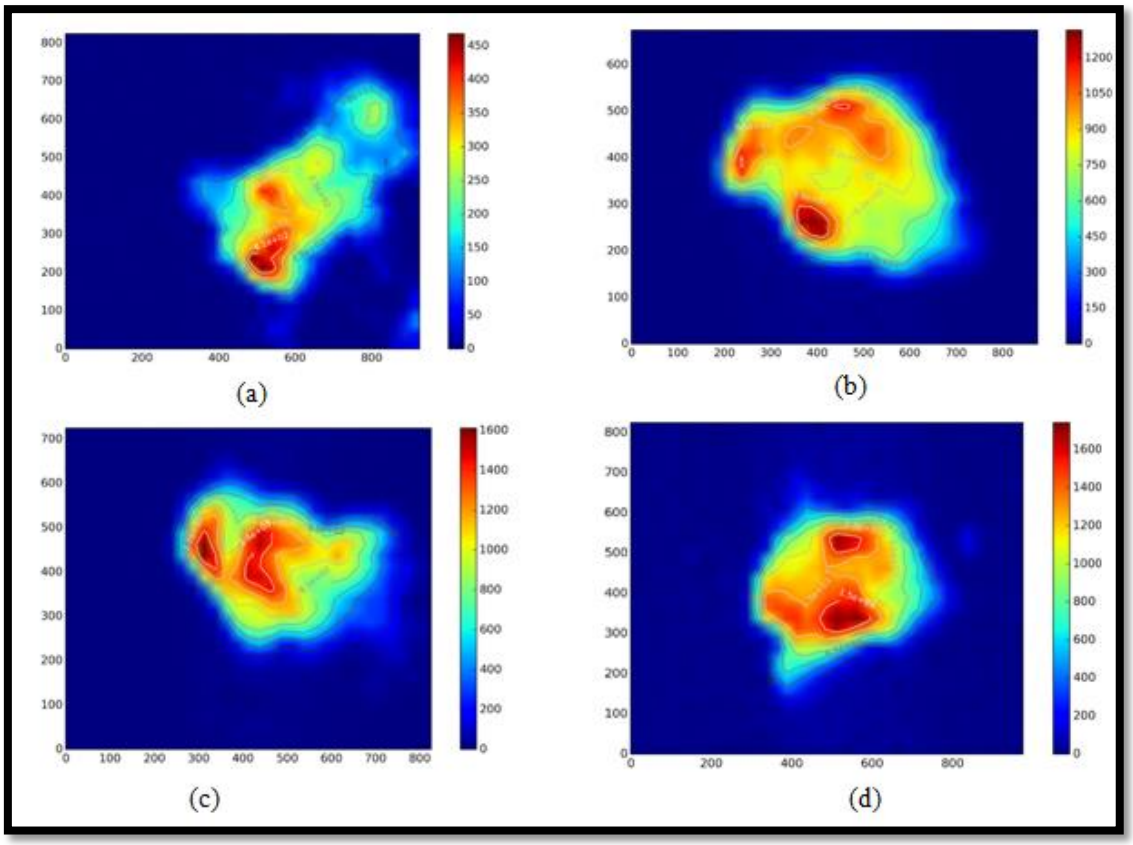
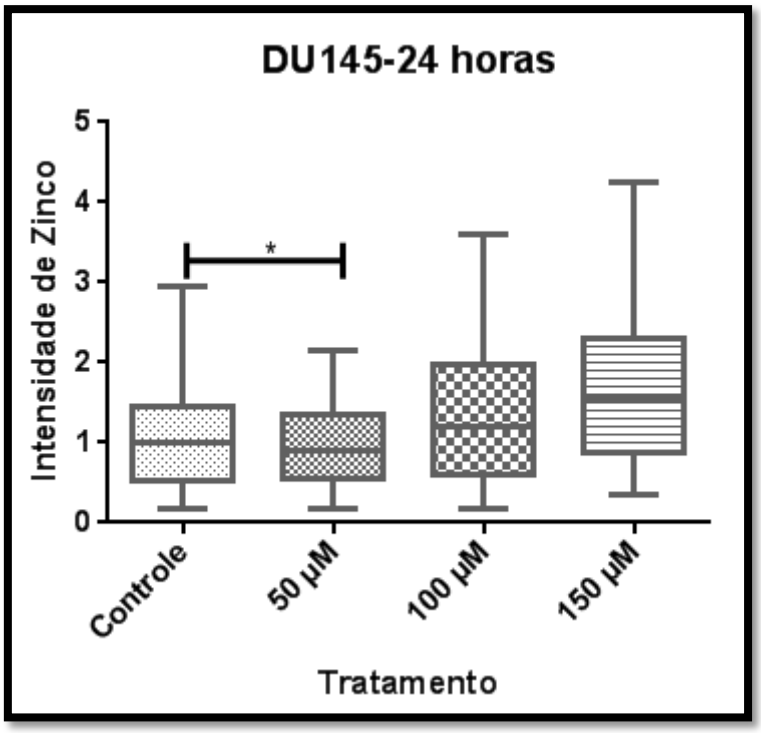


Figura 5.5 – Imagens resultantes dos mapas bidimensionais da intensidade de Zn em esferoides RPWE-1 com tratamento durante 48 horas de (a) 0 µM; (b) 50 µM; (c) 100 µM; (d) 150 µM.

Foi possível observar que a intensidade de zinco dos esferóides deste tipo celular, RPWE-1, em alguns casos se deu próximo a borda e que sua geometria não é regular, notou-se também que no tratamento por 48 horas a intensidade de zinco se deu de forma mais heterogênea por todo o esferoide.

Para o tratamento dos dados foi utilizado o programa GraphPad Prism 6. Em todos os gráficos os dados dos tratamentos (50 µM, 100 µM, 150 µM) foram normalizados pelo valor da mediana do controle (0 µM). Para análise estatística foi utilizado o teste não paramétrico de múltiplas comparações Kruskal-Wallis com significância de P = 0,05.

A figura 5.6 mostra o gráfico referente às comparações das intensidades de Zinco nos esferóides celulares de DU145 para cada tratamento durante 24 horas.



* Não significativos

Figura 5.6 – Comparação da intensidade de Zn em esferóides celulares de DU145 para os tratamentos com $ZnCl_2$ durante 24 horas.

Tabela 2 – Comparação do Controle com Tratamentos DU145-24h.

Comparações	Diferença Médias	Significante?	Valor de P
Controle x 50 µM	7,89E+01	Não	0,0853
Controle x 100 µM	-2,01E+02	Sim	< 0,0001
Controle x 150 µM	-4,38E+02	Sim	< 0,0001
50 µM x 100 µM	-2,80E+02	Sim	< 0,0001
50 µM x 150 µM	-5,17E+02	Sim	< 0,0001
100 µM x 150 µM	-2,37E+02	Sim	< 0,0001

Foi observado que ocorreu um aumento significante na intensidade de zinco comparando os tratamentos com o controle, com exceção do tratamento de 50 µM em que a intensidade se manteve; na comparação entre os tratamentos observou-se também um aumento significante.

A figura 5.7 mostra o gráfico referente às comparações das intensidades de Zinco nos esferóides celulares de DU145 para cada tratamento durante 48 horas.

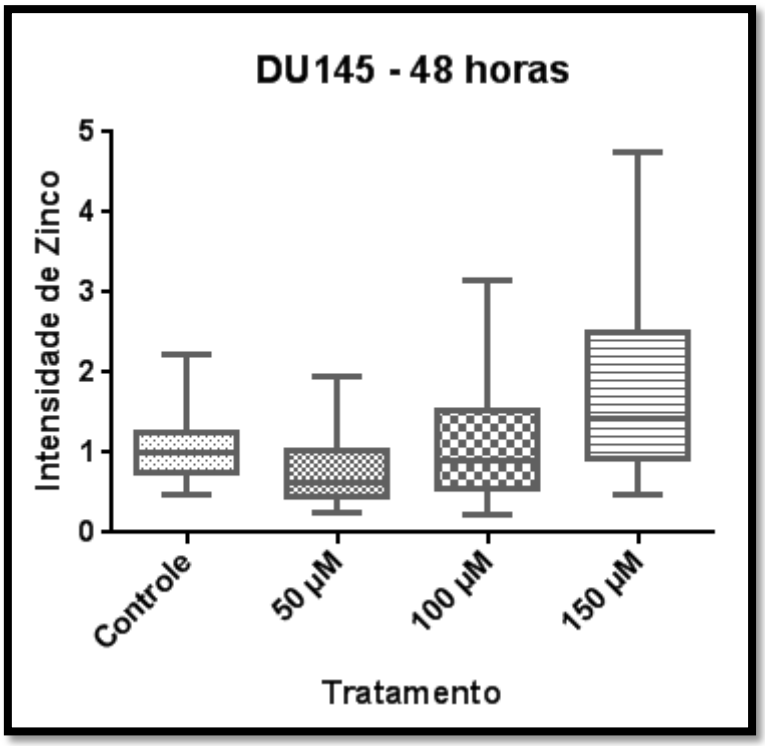


Figura 5.7 – Comparação da intensidade de Zn em esferóides celulares de DU145 para os tratamentos com $ZnCl_2$ durante 48 horas.

Tabela 3 – Comparação do Controle com Tratamentos DU145-48h.

Comparações	Diferença Médias	Significante?	Valor de P
Controle x 50 µM	5,27E+02	Sim	< 0,0001
Controle x 100 µM	1,08E+02	Sim	0,0444
Controle x 150 µM	-4,70E+02	Sim	< 0,0001
50 µM x 100 µM	-4,19E+02	Sim	< 0,0001
50 µM x 150 µM	-9,97E+02	Sim	< 0,0001
100 µM x 150 µM	-5,77E+02	Sim	< 0,0001

Observando-se a comparação dos tratamentos com o controle, houve uma queda significante no tratamento de 50 µM e de 100 µM e um aumento significante no tratamento de 150 µM. Na comparação entre os tratamentos ocorreu um aumento significativo.

A figura 5.8 mostra os gráficos referentes às comparações das intensidades de Zinco nos esferóides celulares de RWPE-1 para os tratamentos informados durante 24 horas.

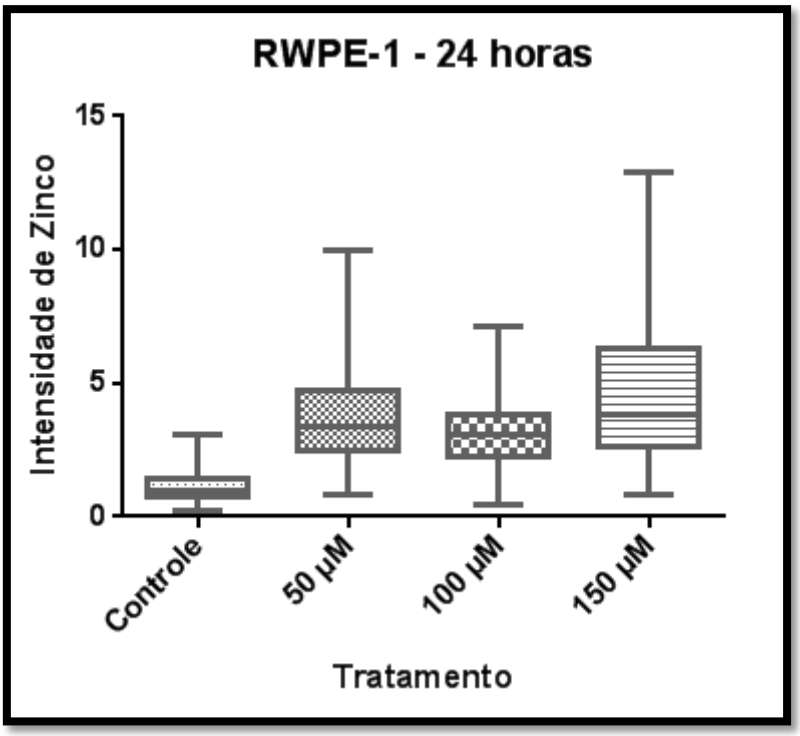


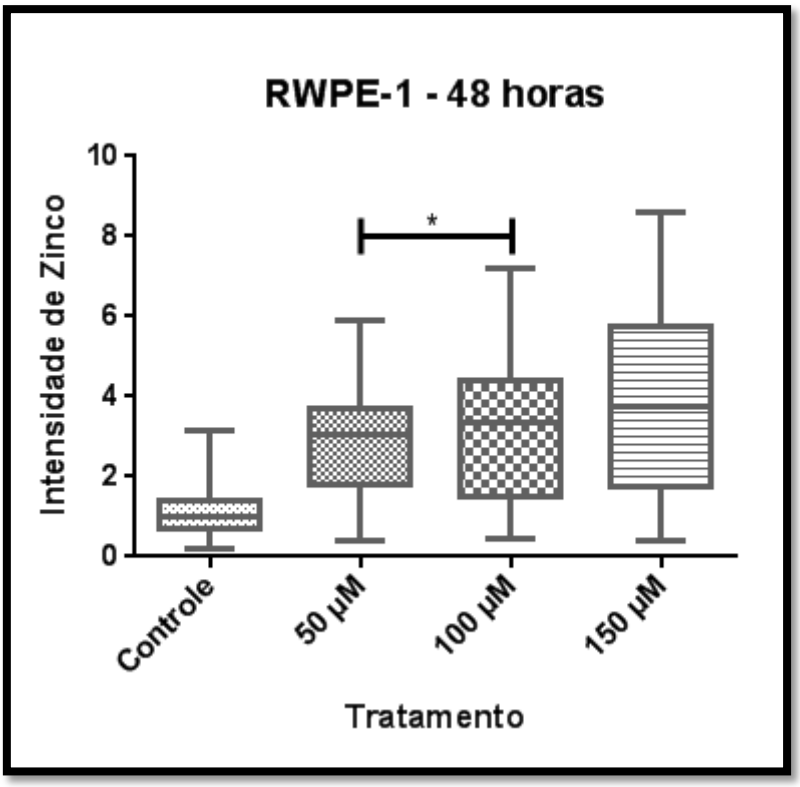
Figura 5.8 – Comparação da intensidade de Zn em esferóides celulares de RWPE-1 para os tratamentos com $ZnCl_2$ durante 24 horas.

Tabela 4 – Comparação do Controle com Tratamentos RWPE-1-24h.

Comparações	Diferença Médias	Significante?	Valor de P
Controle x 50 µM	-3,18E+03	Sim	< 0,0001
Controle x 100 µM	-2,61E+03	Sim	< 0,0001
Controle x 150 µM	-3,59E+03	Sim	< 0,0001
50 µM x 100 µM	5,61E+02	Sim	< 0,0001
50 µM x 150 µM	-4,11E+02	Sim	< 0,0001
100 µM x 150 µM	-9,72E+02	Sim	< 0,0001

Foi observado um aumento significante na intensidade de zinco comparando os tratamentos com o controle, na comparação entre os tratamentos observou-se também um aumento significante, com exceção da comparação entre os tratamentos de 50 µM e 100 µM.

A figura 5.9 mostra o gráfico referente às comparações das intensidades de Zinco nos esferóides celulares de RWPE-1 para os tratamentos informados durante 48 horas.



* Não significativos

Figura 5.9 – Comparação da intensidade de Zn em esferóides celulares de RWPE-1 para os tratamentos com $ZnCl_2$ durante 48 horas.

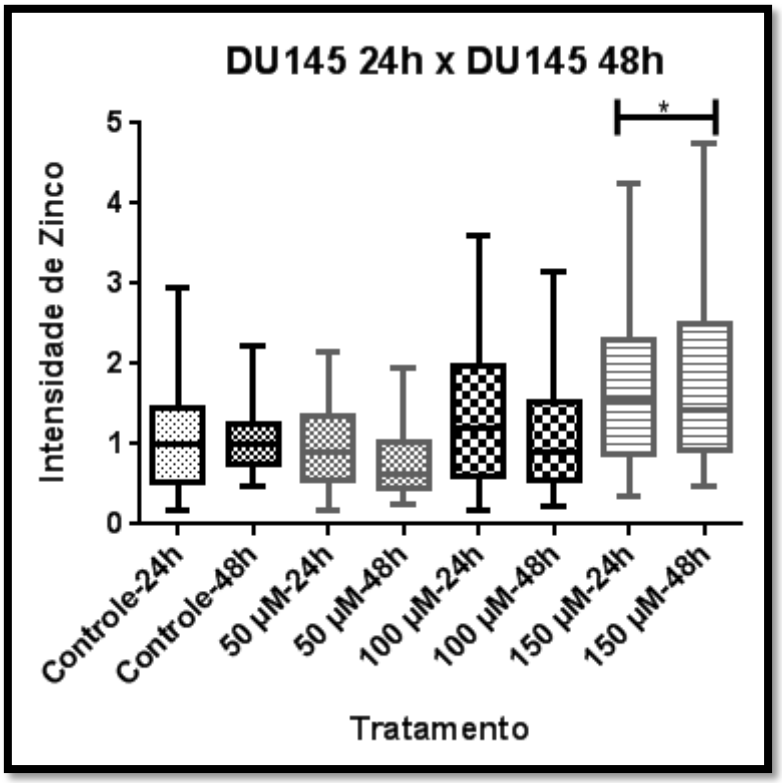
Tabela 5 – Comparação do Controle com Tratamentos RWPE-1-48h.

Comparações	Diferença Médias	Significante?	Valor de P
Controle x 50 µM	-1,33E+03	Sim	< 0,0001
Controle x 100 µM	-1,44E+03	Sim	< 0,0001
Controle x 150 µM	-1,65E+03	Sim	< 0,0001
50 µM x 100 µM	-1,13E+02	Não	0,1975
50 µM x 150 µM	-3,25E+02	Sim	< 0,0001
100 µM x 150 µM	-2,12E+02	Sim	0,0018

Foi observado que ocorreu um aumento significante na intensidade de zinco comparando os tratamentos com o controle e na comparação entre os tratamentos, com exceção da comparação entre os tratamentos de 50 µM e 100 µM em que a intensidade de zinco manteve-se constante.

Para análise estatística das comparações a seguir foi utilizado o teste t - Mann-Whitney não paramétrico com significância de P = 0,05.

Em prosseguimento a figura 5.10 mostra graficamente o comportamento celular dos esferóides de DU145 analisando os períodos de tratamento (24 e 48 horas).



* Não significativos

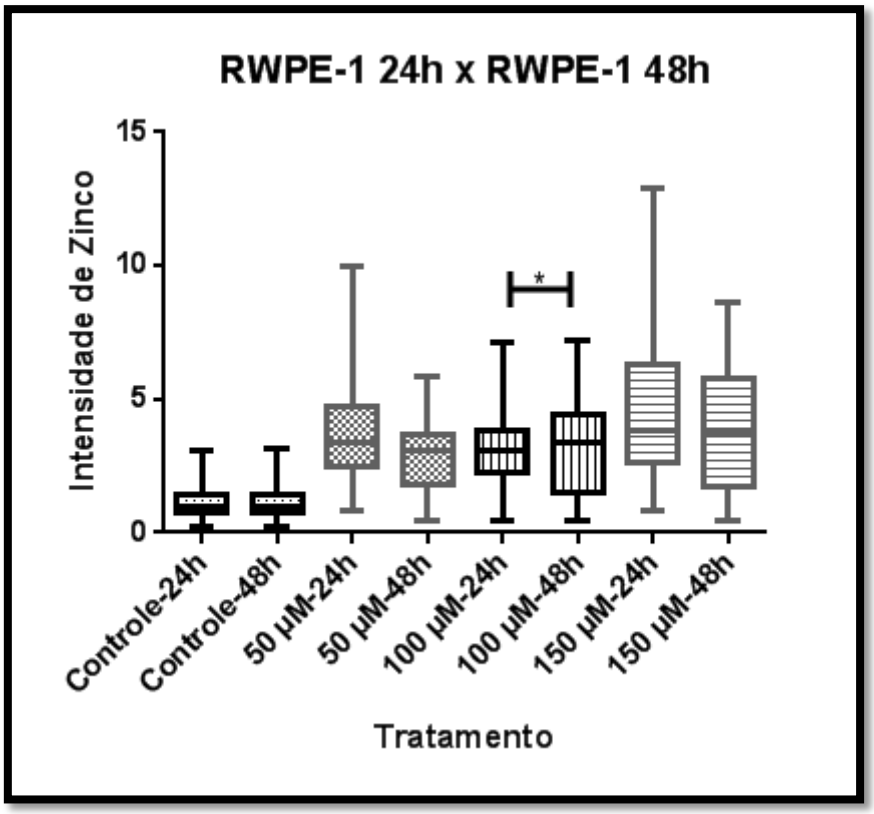
Figura 5.10 – Comparação da intensidade de Zn em esferóides celulares de DU145 entre os períodos de 24 e 48 horas.

Tabela 6 – Comparação entre períodos de tratamento (24 e 48 horas) DU145.

Comparações	Diferença Médias	Significante?	Valor de P
50 µM 48h x 24h	-2,79E-01	Sim	< 0,0001
100 µM 48h x 24h	-3,08E-01	Sim	< 0,0001
150 µM 48h x 24h	-1,20E-01	Não	0,1864

Observou-se que os esferóides de DU145 continuaram a perder a capacidade de acumular zinco mesmo dobrando o período de tratamento, com exceção do tratamento de 150 µM que se manteve constante.

A seguir, a figura 5.11 mostra graficamente o comportamento celular dos esferóides de RWPE-1 analisando os períodos de tratamento (24 e 48 horas).



* Não significativos

Figura 5.11 – Comparação da intensidade de Zn em esferóides celulares de RWPE-1 entre os períodos de 24 e 48 horas.

Tabela 7 – Comparação entre períodos de tratamento (24 e 48 horas) RWPE-1.

Comparações	Diferença Médias	Significante?	Valor de P
50 µM 48h x 24h	-3,50E-01	Sim	< 0,0001
100 µM 48h x 24h	2,40E-01	Não	0,0581
150 µM 48h x 24h	-2,00E-02	Não	0,4540

Observou-se que os esferóides de RWPE-1 mantiveram sua intensidade de zinco ao dobrar o período de tratamento, com exceção da comparação entre os tratamentos de 50 µM que a intensidade diminuiu.

A seguir, a figura 5.12 mostra explicitamente a comparação entre os esferóides de DU145 e RWPE-1 quando submetidas aos tratamentos mencionados durante 24 horas.

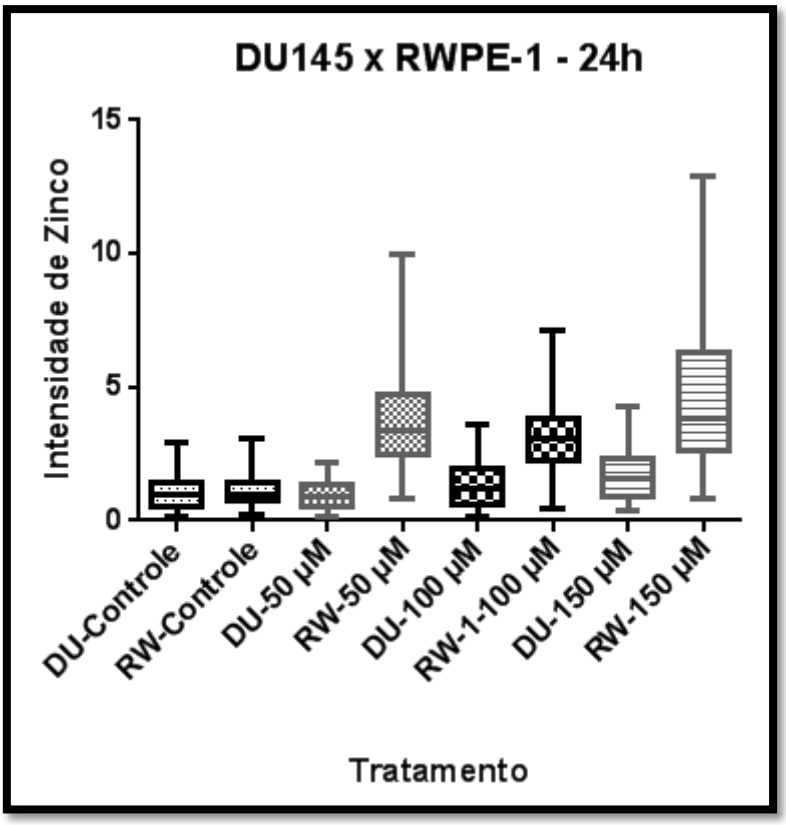


Figura 5.12 – Comparação da intensidade de Zn entre os esferóides celulares de DU145 e RWPE-1 no período de 24 horas.

Tabela 8 – Comparação entre os esferóides celulares de DU145 e RWPE-1 no período de 24 horas

Comparações	Diferença Médias	Significante?	Valor de P
50 µM RW x DU	2,49E+00	Sim	< 0,0001
100 µM RW x DU	1,90E+00	Sim	< 0,0001
150 µM RW x DU	2,25E+00	Sim	< 0,0001

Observou-se que os esferóides de RWPE-1 acumularam uma intensidade maior de zinco do que os esferóides de DU145.

A seguir, a figura 5.13 mostra explicitamente a comparação entre os esferóides de DU145 e RWPE-1 quando submetidas aos tratamentos mencionados durante 48 horas.

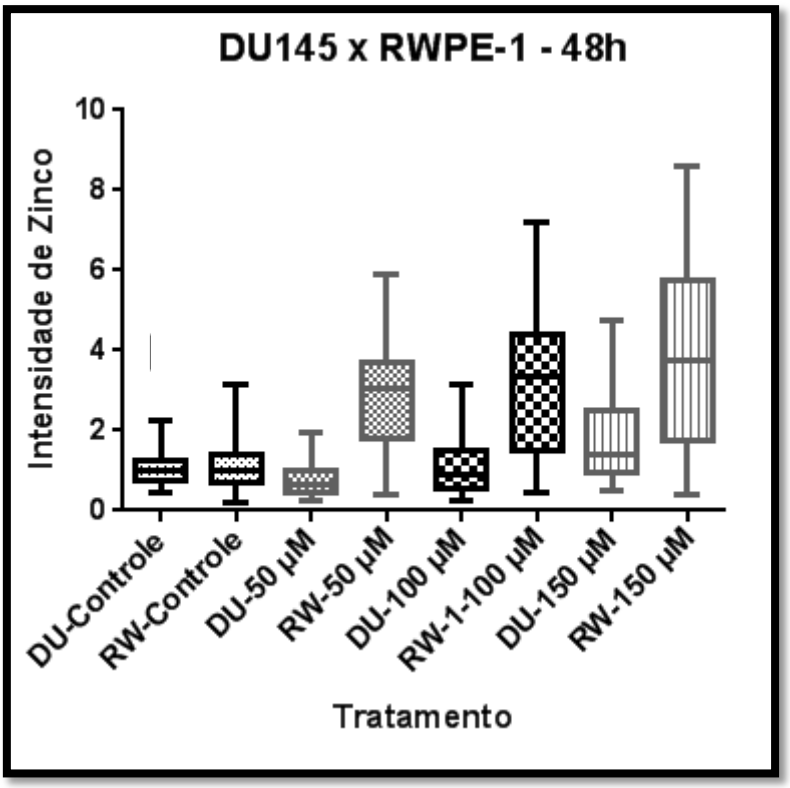


Figura 5.13 – Comparação da intensidade de Zn entre os esferóides celulares de DU145 e RWPE-1 no período de 48 horas.

Tabela 9 – Comparação entre os esferóides celulares de DU145 e RWPE-1 no período de 48 horas.

Comparações	Diferença Médias	Significante?	Valor de P
50 µM RW x DU	2,42E+00	Sim	< 0,0001
100 µM RW x DU	2,45E+00	Sim	< 0,0001
150 µM RW x DU	2,35E+00	Sim	< 0,0001

Observou-se que os esferóides de RWPE-1 acumularam uma intensidade maior de zinco, enquanto os esferóides de DU145 continuaram a perder a capacidade de acumular zinco.

V.2 Resultados da Análise da Organização do Citoesqueleto Celular e do Fenótipo Celular

Para melhor caracterizar morfologicamente os esferoides celulares estabelecidos, foram realizados ensaios de imunofluorescência. Na figura 5.14 observam-se as imagens do controle negativo constituído das células de DU145 e RWPE-1 submetidas aos tratamentos com Cloreto de Zinco durante 24 e 48 horas, mas com a omissão do anticorpo primário durante a realização da imunofluorescência. Portanto, nestas imagens, não se visualiza a marcação positiva (vermelha) do anticorpo secundário Alexa 546, o que permite considerar que as marcações mostradas a seguir ocorreram especificamente devido ao reconhecimento por parte do anticorpo secundário dos anticorpos primários utilizados.

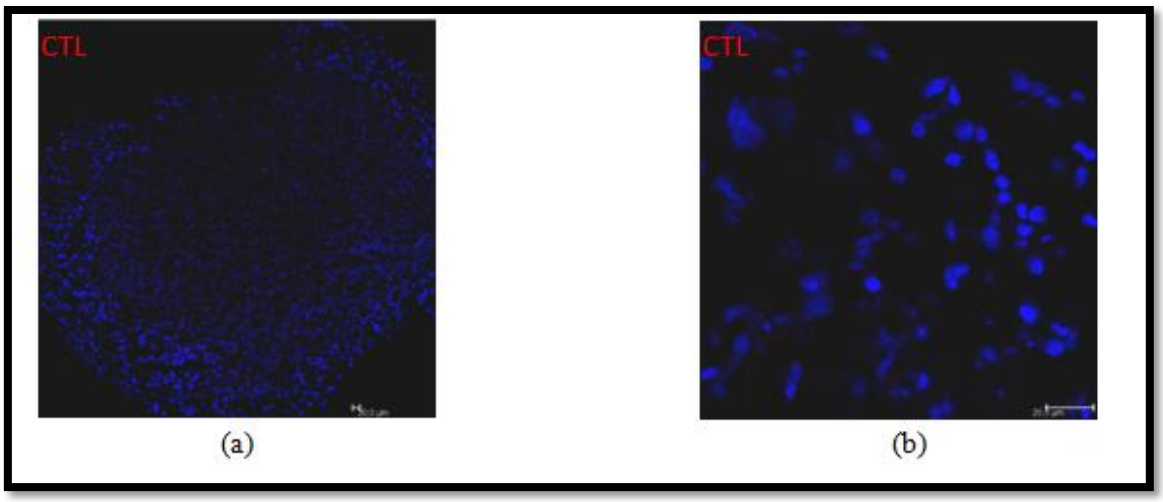


Figura 5.14 – Imagens representativas dos controles negativos da imunofluorescência. (a) Controle Negativo DU145; (b) Controle Negativo RWPE-1; experimentos independentes, realizados em duplicata. DAPI (marcação nuclear-azul) Barra de escala 20µm.

Avaliou-se a expressão e a distribuição da citoqueratina, um típico marcador epitelial, nos esferoides de células DU145 tratados com Cloreto de Zinco (0µM - controle, 50 µM, 100 µM e 150 µM) por 24 (figura 5.15) e 48 (figura 5.17) horas. Em todas as condições avaliadas, especialmente nas células localizadas na porção mais central dos esferoides, pode-se observar uma marcação positiva para citoqueratina (vermelho), sugerindo que estas células sejam fenotipicamente epiteliais.

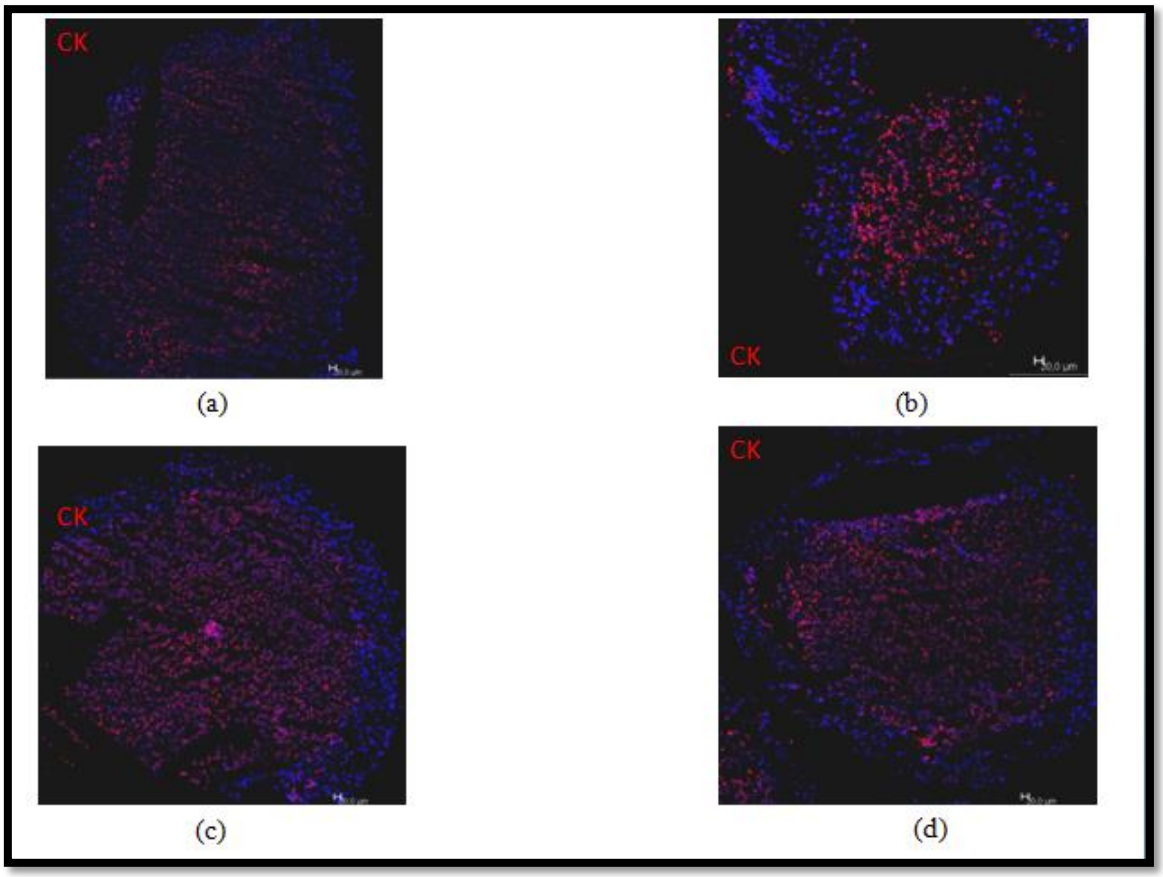


Figura 5.15 – Caracterização imunocitoquímica dos esferóides de células DU145. Imunomarcação com anticorpo anti-citoqueratina humana (vermelho). Os esferoides foram tratados por 24 horas com diferentes soluções de Cloreto de Zinco: (a) 0µM situação controle; (b) 50 µM; (c) 100 µM; (d) 150 µM; experimentos independentes, realizados em duplicata; DAPI (marcação nuclear-azul);Barra de escala 20µm.

Avaliou-se também a expressão e a distribuição do marcador mesenquimal vimentina nos esferoides decélulas DU145 tratados com Cloreto de Zinco (0µM - controle, 50 µM, 100 µM e 150 µM) por 24 (figura 5.16) e 48 (figura 5.18) horas. Pode-se observar, após 24 horas de tratamento, marcação positiva para vimentina (vermelho) apenas no controle (0µM). Transcorridas 48 horas de tratamento, marcação positiva para vimentina (vermelho) pode ser também observada no tratamento de com 50 µM de Cloreto de Zinco. Juntos, estes resultados sugerem que os tratamentos com Cloreto de Zinco (especialmente 100 µM e 150 µM), de alguma forma, inibem a ativação do processo de transição epitélio mesenquimal.

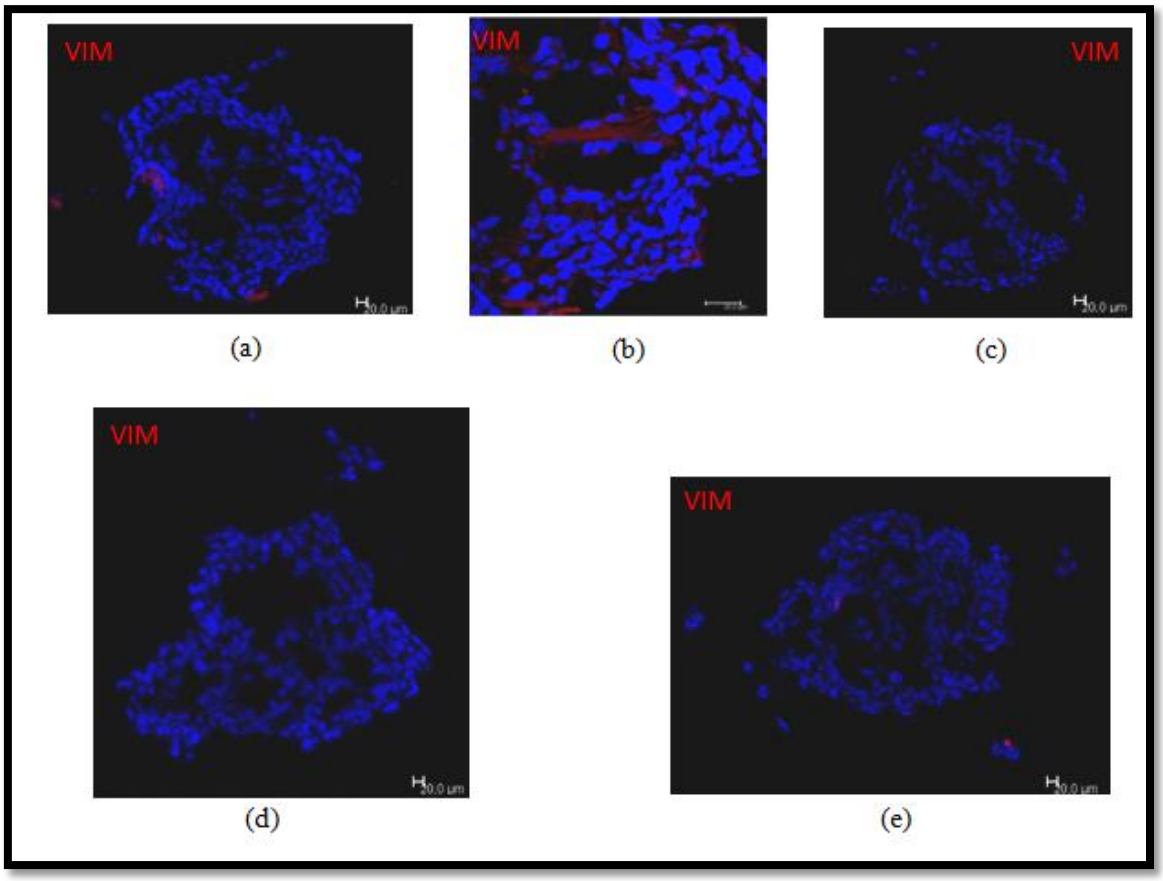


Figura 5.16 – Caracterização imunocitoquímica dos esferóides de células DU145. Imunomarcação com anticorpo anti-vimentina humana (vermelho). Os esferoides foram tratados por 24 horas com diferentes soluções de Cloreto de Zinco: (a) 0 µM (aumento 10X); (b) 0 µM (aumento 63X); (c) 50 µM; (d) 100 µM; (e) 150 µM; experimentos independentes, realizados em duplicata; DAPI (marcação nuclear-azul); Barra de escala 20µm.

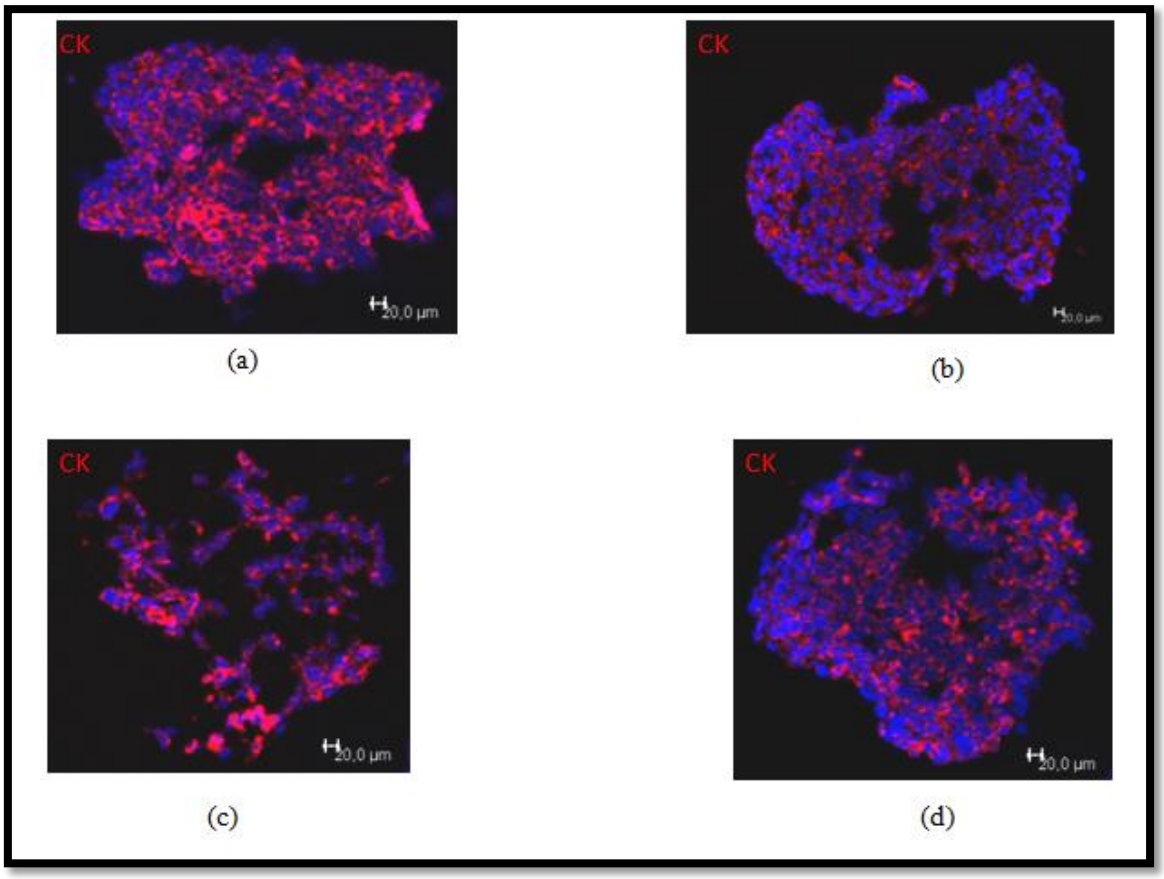


Figura 5.17 – Caracterização imunocitoquímica dos esferóides de células DU145. Imunomarcação com anticorpo anti-citoqueratina humana (vermelho). Os esferoides foram tratados por 48 horas com diferentes soluções de Cloreto de Zinco: (a) 0µM situação controle; (b) 50 µM; (c) 100 µM; (d) 150 µM; experimentos independentes, realizados em duplicata; DAPI (marcação nuclear-azul); Barra de escala 20µm.

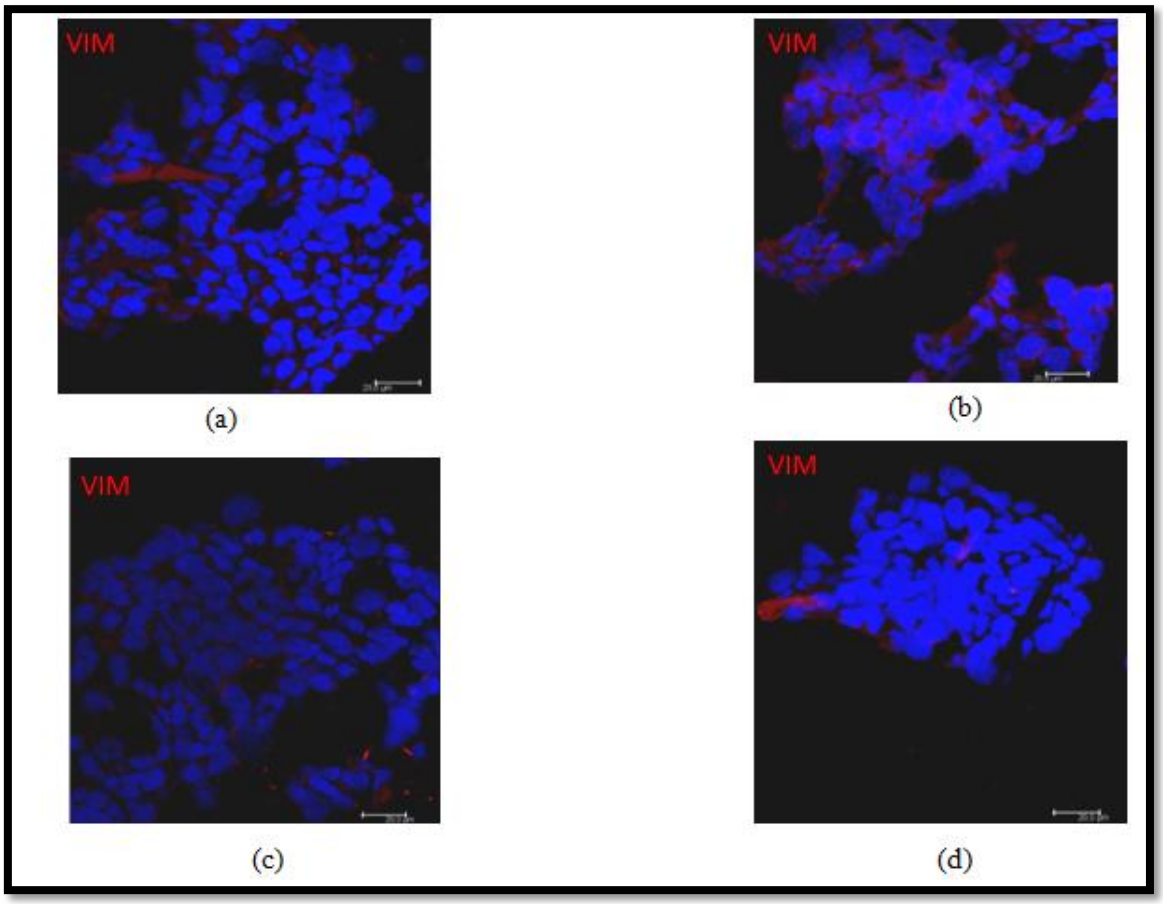


Figura 5.18 – Caracterização imunocitoquímica dos esferóides de células DU145. Imunomarcação com anticorpo anti-vimentina humana (vermelho). Os esferoides foram tratados por 48 horas com diferentes soluções de Cloreto de Zinco: (a) 0 µM (aumento 10X); (b) 0 µM (aumento 63X); (c) 50 µM; (d) 100 µM; (e) 150 µM; experimentos independentes, realizados em duplicata; DAPI (marcação nuclear-azul); Barra de escala 20 µm.

Avaliou-se também a expressão e a distribuição da citoqueratina nos esferoides de células epiteliais prostáticas normais RWPE-1 tratados com Cloreto de Zinco (0µM - controle, 50 µM, 100 µM e 150 µM) por 24 (figura 5.19) e 48 (figura 5.21) horas. Como previamente observado nos esferoides de células DU145, em todas as condições avaliadas pode-se notar uma marcação positiva para citoqueratina (vermelho), porém observou-se uma marcação difusa, abrangendo as regiões centrais e periféricas destes esferóides.

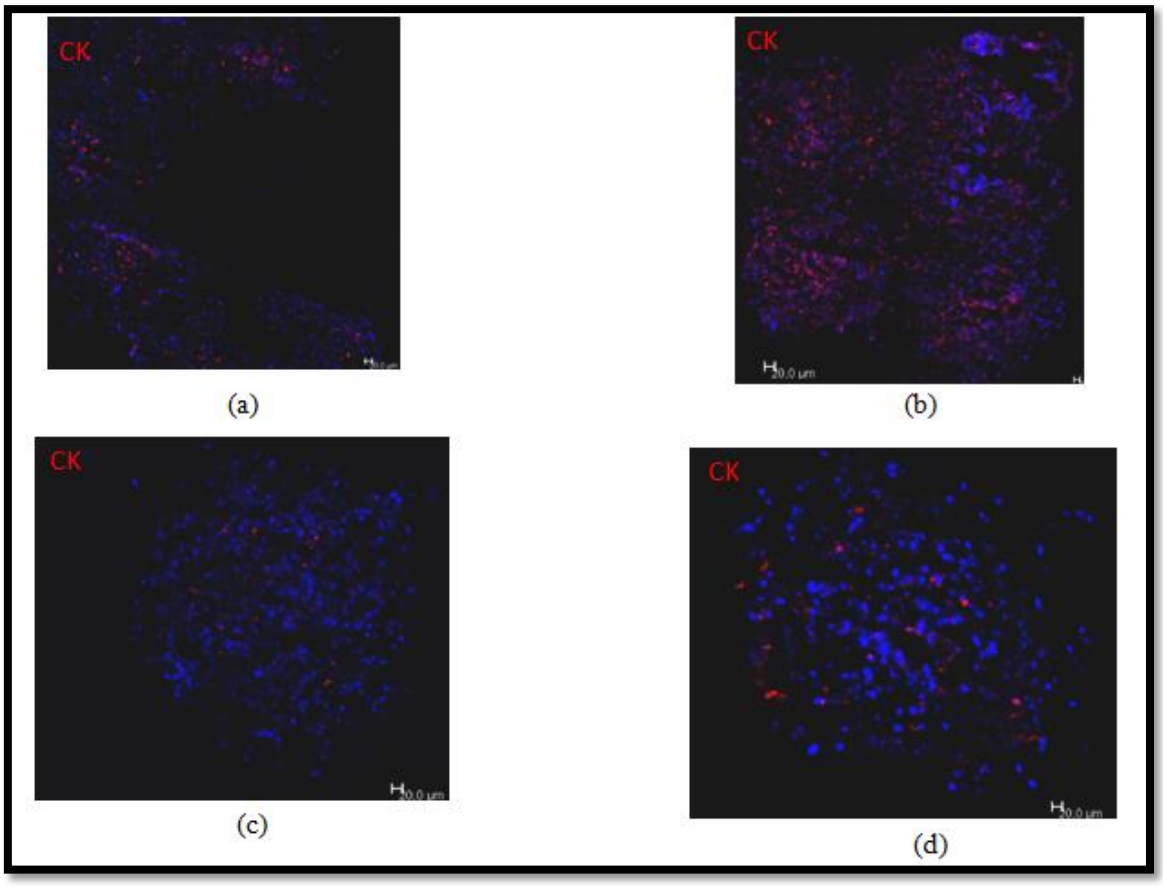


Figura 5.19 – Caracterização imunocitoquímica dos esferóides de células RWPE-1. Imunomarcação com anticorpo anti-citoqueratina humana (vermelho). Os esferoides foram tratados por 24 horas com diferentes soluções de Cloreto de Zinco: (a) 0µM situação controle; (b) 50 µM; (c) 100 µM; (d) 150 µM; experimentos independentes, realizados em duplicata; DAPI (marcação nuclear-azul); Barra de escala 20µm.

Avaliou-se ainda a expressão e a distribuição de vimentina (marcador mesenquimal) nos esferoides de células RWPE-1 tratados com Cloreto de Zinco (0µM - controle, 50 µM, 100 µM e 150 µM) por 24 (figura 5.20) e 48 (figura 5.22) horas. Todavia, nestes casos foi observada marcação positiva para vimentina em nenhuma das condições avaliadas. Juntos, estes resultados sugerem que estas células sejam, de fato, fenotipicamente epiteliais

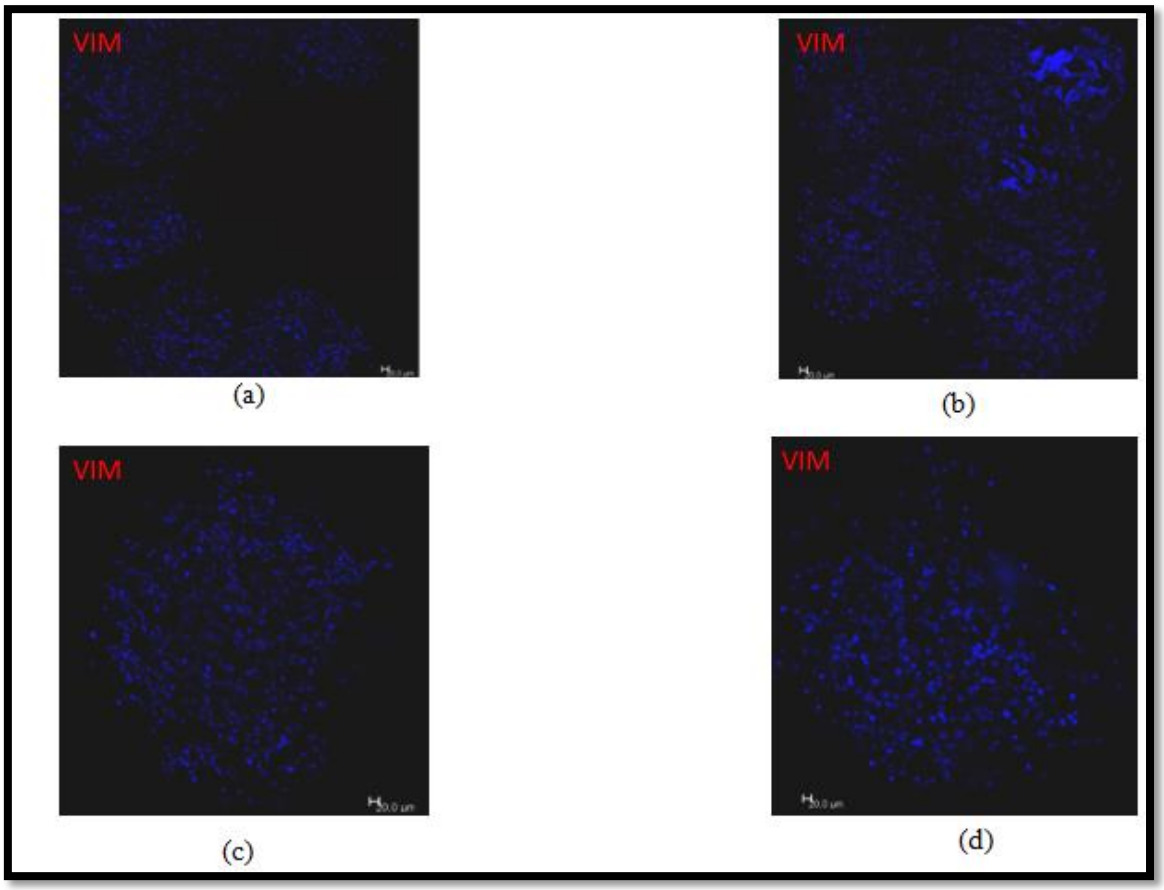


Figura 5.20 – Caracterização imunocitoquímica dos esferóides de células RWPE-1. Imunomarcação com anticorpo anti-vimentina humana (vermelho). Os esferoides foram tratados por 24 horas com diferentes soluções de Cloreto de Zinco: (a) 0µM situação controle; (b) 50 µM; (c) 100 µM; (d) 150 µM; experimentos independentes, realizados em duplicata; DAPI (marcação nuclear-azul); Barra de escala 20µm.

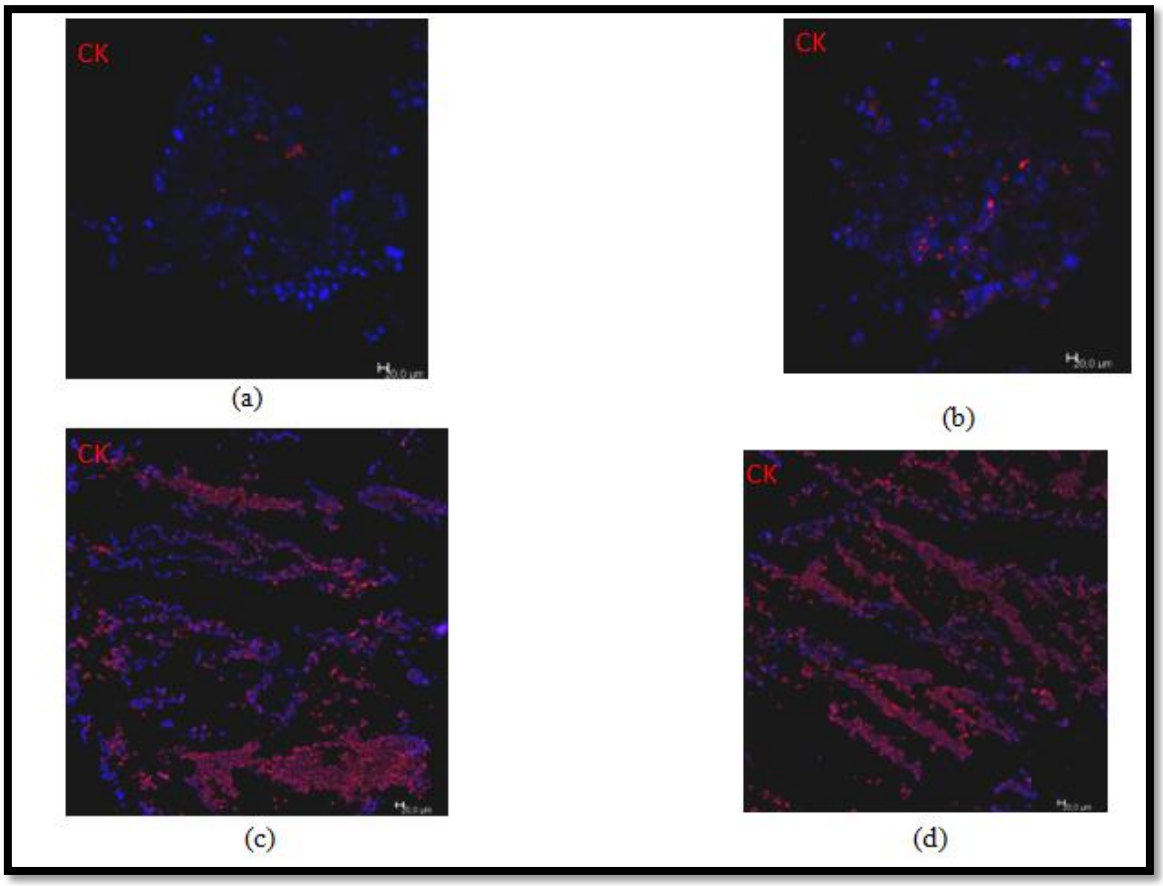


Figura 5.21 – Caracterização imunocitoquímica dos esferóides de células RWPE-1. Imunomarcação com anticorpo anti-citoqueratina humana (vermelho). Os esferoides foram tratados por 48 horas com diferentes soluções de Cloreto de Zinco: (a) 0µM situação controle; (b) 50 µM; (c) 100 µM; (d) 150 µM; experimentos independentes, realizados em duplicata; DAPI (marcação nuclear-azul);Barra de escala 20µm.

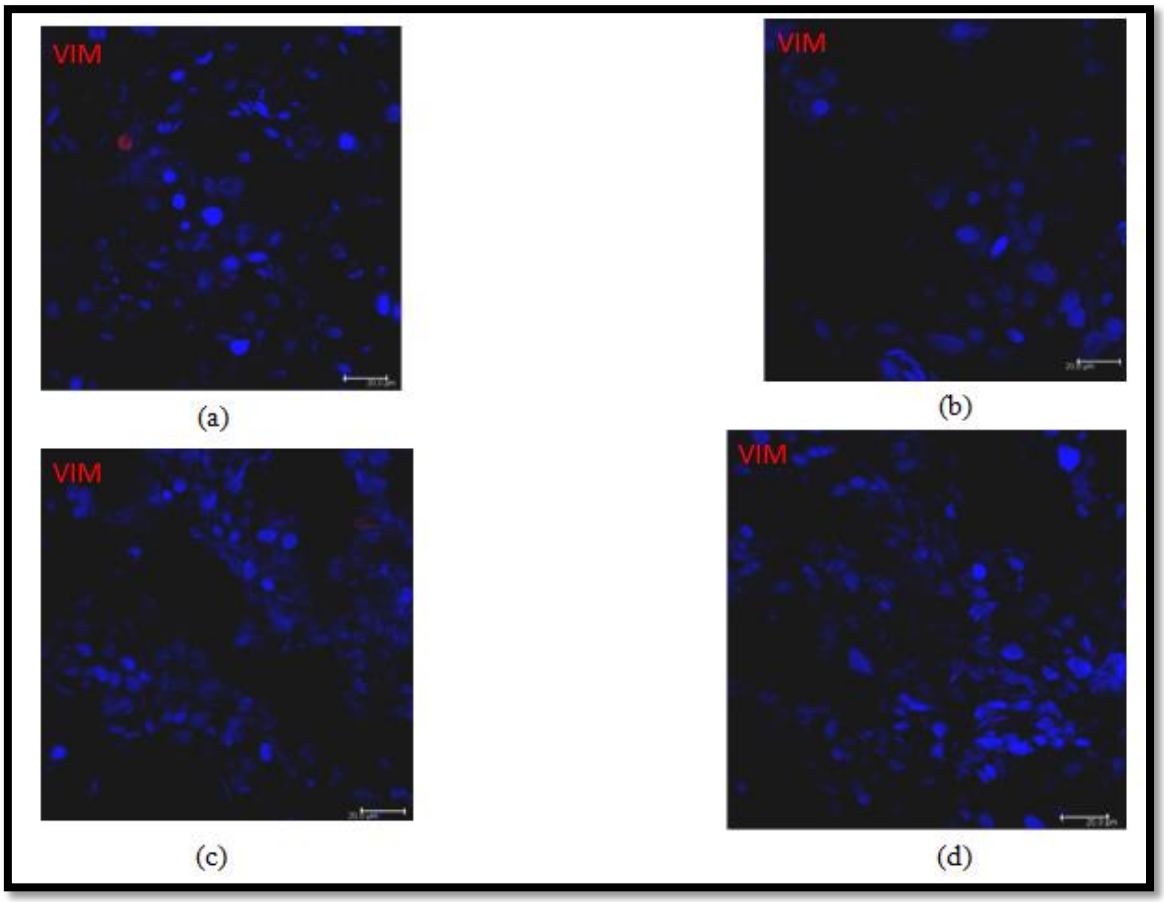


Figura 5.22 – Caracterização imunocitoquímica dos esferóides de células RWPE-1. Imunomarcação com anticorpo anti-vimentina humana (vermelho). Os esferoides foram tratados por 48 horas com diferentes soluções de Cloreto de Zinco: (a) 0µM situação controle; (b) 50 µM; (c) 100 µM; (d) 150 µM; experimentos independentes, realizados em duplicata; DAPI (marcação nuclear-azul);Barra de escala 20µm.

V.3 Resultados dos Ensaios de Viabilidade Celular

Para avaliar a viabilidade celular dos esferoides estabelecidos a partir das células tumorais DU145 e das células epiteliais normais RWPE-1 nas diferentes condições avaliadas, foi realizado um ensaio colorimétrico de MTT, que se baseia na capacidade das células viáveis reduzirem metabolicamente o sal de MTT a cristais de formazan. Os resultados foram lidos em um espectrofotômetro, onde foram considerados os valores de absorbância como indicadores da viabilidade celular. Para análise estatística dos resultados destes ensaios foi utilizado o teste paramétrico de múltiplas comparações One Way ANOVA com significância de P = 0,05.

A seguir, na figura 5.23 temos os gráficos resultantes dos ensaios de viabilidade celular dos esferóides da linhagem celular DU145, submetidos ao tratamento, por 24 horas, com as diferentes concentrações de Cloreto de Zinco informadas anteriormente. Como pode ser observado (figura 5.23 e tabela 10), a viabilidade celular não foi alterada nos diferentes tratamentos em relação ao controle.

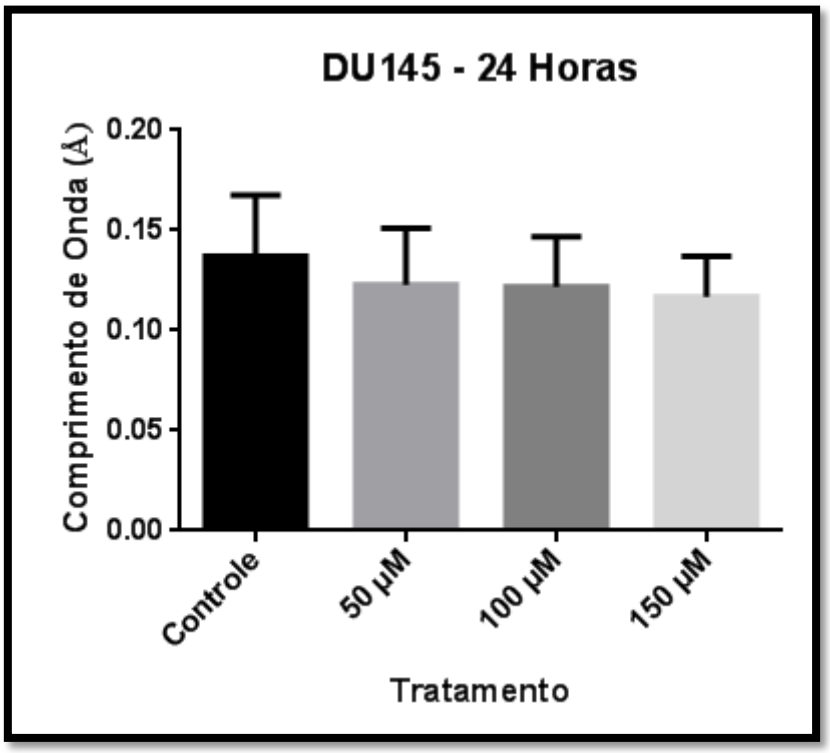


Figura 5.23 – Viabilidade celular dos esferoides estabelecidos a partir das células tumorais DU145. Os esferoides foram tratados por 24 horas com diferentes soluções de Cloreto de Zinco: 0 µM situação controle, 50 µM, 100 µM e 150 µM. A viabilidade celular dos esferoides foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de MTT.

Tabela 10 – Comparação do Controle com Tratamentos MTT DU145 24 horas.

Comparações	Diferença Médias	Significante?	Valor de P
Controle x 50 µM	1,42E-02	Não	0,9133
Controle x 100 µM	1,51E-02	Não	0,8935
Controle x 150 µM	2,03E-02	Não	0,7453
50 µM x 100 µM	9,00E-04	Não	> 0,9999
50 µM x 150 µM	6,12E-03	Não	0,9970
100 µM x 150 µM	5,22E-03	Não	0,9985

Na figura 5.24 observam-se os gráficos representativos dos ensaios de viabilidade celular dos esferóides da linhagem celular DU145, submetidos ao tratamento, por 48 horas, com as diferentes concentrações de Cloreto de Zinco já informadas. Como previamente observado após os tratamentos por 24 horas, os tratamentos por 48 horas também não alteraram a viabilidade celular em relação ao controle (figura 5.24 e tabela 11).

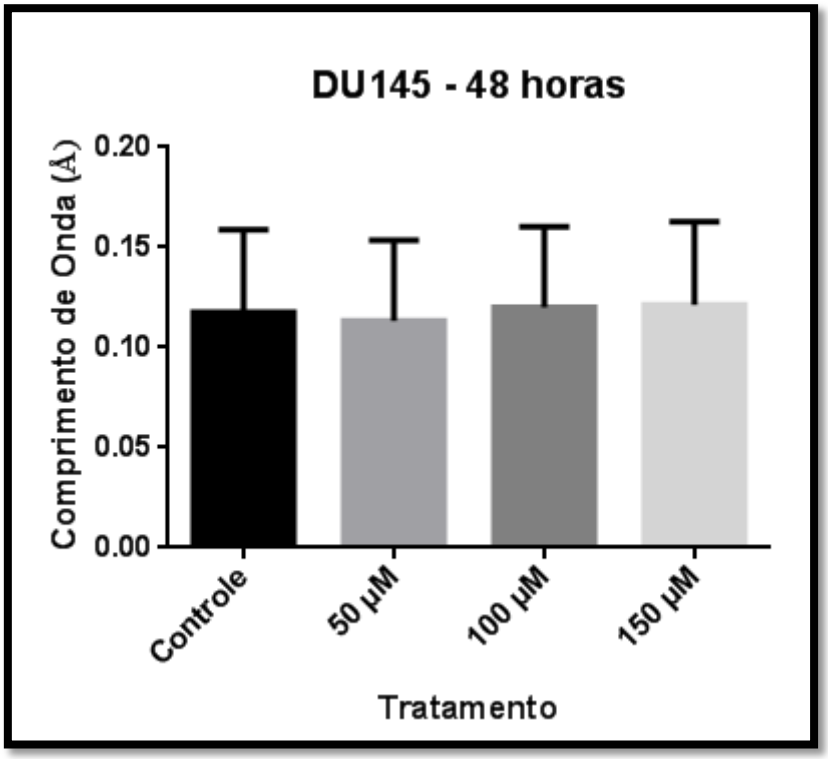


Figura 5.24 – Viabilidade celular dos esferoides estabelecidos a partir das células tumorais DU145. Os esferoides foram tratados por 48 horas com diferentes soluções de Cloreto de Zinco: 0 µM- situação controle, 50 µM, 100 µM e 150 µM. A viabilidade celular dos esferoides foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de MTT.

Tabela 11 – Comparação do Controle com Tratamentos MTT DU145 48 horas.

Comparações	Diferença Médias	Significante?	Valor de P
Controle x 50 µM	4,33E-03	Não	0,9998
Controle x 100 µM	-2,56E-03	Não	0,9999
Controle x 150 µM	-3,78E-03	Não	0,9998
50 µM x 100 µM	-6,89E-03	Não	0,9996
50 µM x 150 µM	-8,11E-03	Não	0,9985
100 µM x 150 µM	-1,22E-03	Não	> 0,9999

Nas figuras 5.25 e 5.26 observam-se os gráficos representativos dos ensaios de viabilidade celular dos esferóides de células epiteliais normais RPWE-1, submetidos ao tratamento, por 24 e 48 horas, respectivamente, nas mesmas condições informadas anteriormente. Como previamente observado para os esferóides das células tumorais DU145, os resultados do ensaio de MTT não foram significativos, o que permite concluir que a viabilidade celular não foi alterada, independente do tratamento nos dois tipos celulares analisados, portanto as células estão viáveis (figura 5.25 e 5.26 e tabelas 12 e 13).

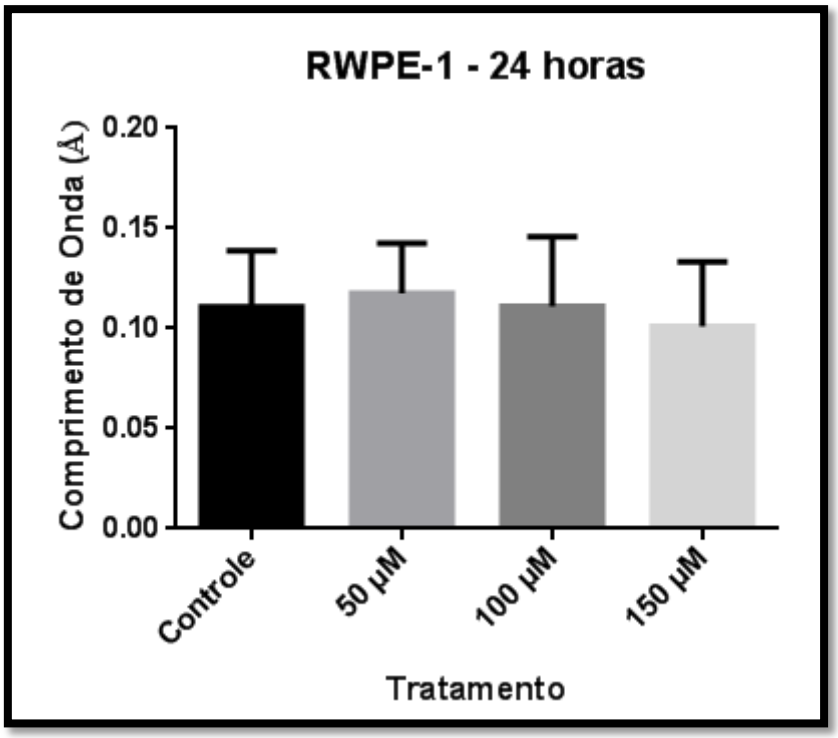


Figura 5.25 – Viabilidade celular dos esferoides estabelecidos a partir das células tumorais RWPE-1. Os esferoides foram tratados por 24 horas com diferentes soluções de Cloreto de Zinco: 0 µM- situação controle, 50 µM, 100 µM e 150 µM. A viabilidade celular dos esferoides foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de MTT

Tabela 12 – Comparação do Controle com Tratamentos MTT RWPE-1 - 24 horas.

Comparações	Diferença Médias	Significante?	Valor de P
Controle x 50 µM	-6,67E-03	Não	0,9976
Controle x 100 µM	-2,22E-04	Não	> 0,9999
Controle x 150 µM	9,72E-03	Não	0,9883
50 µM x 100 µM	6,45E-03	Não	0,9982
50 µM x 150 µM	1,64E-02	Não	0,9102
100 µM x 150 µM	9,94E-03	Não	0,9871

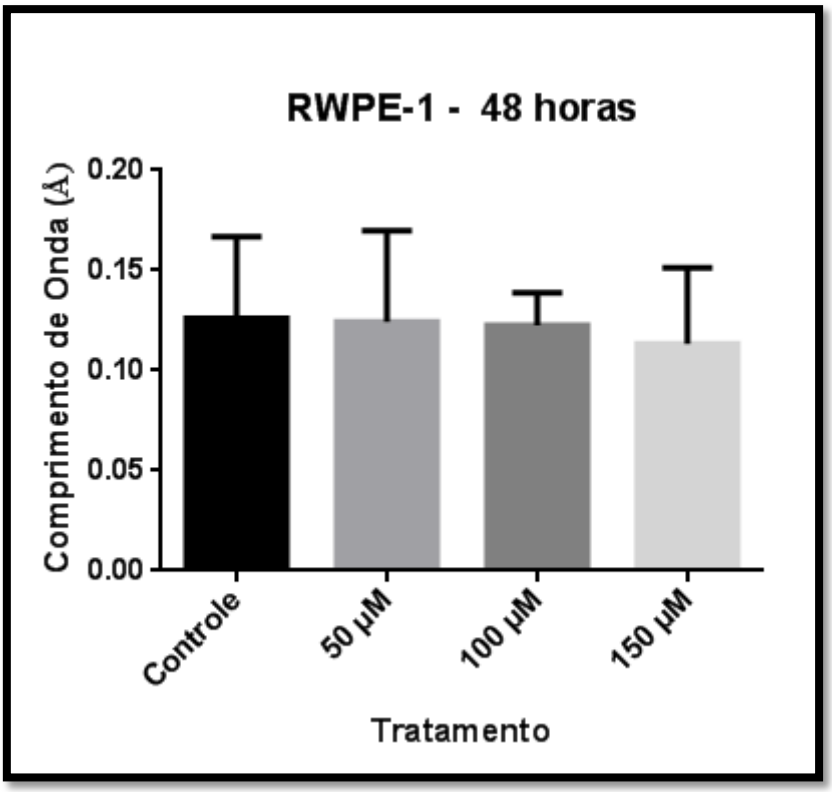


Figura 5.26 – Viabilidade celular dos esferoides estabelecidos a partir das células tumorais RWPE-1. Os esferoides foram tratados por 48 horas com diferentes soluções de Cloreto de Zinco: 0 µM- situação controle, 50 µM, 100 µM e 150 µM. A viabilidade celular dos esferoides foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de MTT.

Tabela 13 – Comparação do Controle com Tratamentos MTT RWPE-1 - 48 horas.

Comparações	Diferença Médias	Significante?	Valor de P
Controle x 50 µM	1,88E-03	Não	> 0,9999
Controle x 100 µM	3,61E-03	Não	0,9998
Controle x 150 µM	1,28E-02	Não	0,9844
50 µM x 100 µM	1,73E-03	Não	> 0,9999
50 µM x 150 µM	1,09E-02	Não	0,9924
100 µM x 150 µM	9,17E-03	Não	0,9963

V.4 Discussão

Neste trabalho a técnica de microfluorescência de raios X com radiação Síncrotron (µSRXRF) foi utilizada para analisar esferóides estabelecidos a partir de duas linhagens celulares epiteliais prostáticas: esferóides de células tumorais prostáticas DU145 e de células normais prostáticas RPWE-1. Optou-se por utilizar linhagens celulares estabelecidas, pois estas células mantêm as características do tecido de origem e possuem maior capacidade de proliferação do que a cultura primária.

A análise dos dados obtidos através da técnica de µXRF permitiu verificar que a intensidade de zinco diminuiu nas células tumorais apesar da suplementação e do tempo de tratamento, enquanto nas células normais esta intensidade aumenta de acordo com a suplementação e de acordo com o tempo de tratamento. A técnica µXRF também permitiu notar que célula tumoral perde sua capacidade de acumular zinco mesmo quando o tempo de tratamento é dobrado.

O zinco é um elemento traço importante em várias circunstâncias fisiológicas e bioquímicas. A principal função da próstata é a alta produção e secreção de citrato que é efetuada devido ao acúmulo único de zinco pelas células epiteliais prostáticas (FRANKLIN *et al*., 2015). Nos seres humanos, as células epiteliais de próstata normais acumulam os mais altos níveis de zinco, até 3 a 7 vezes maior do que em qualquer dos tecidos moles do corpo. A perda da capacidade original da próstata de manter os níveis intracelulares normais de zinco pode ser um fator importante para o desenvolvimento e progressão do câncer de próstata (CHEN *et al*., 2013 e LIN *et al*., 2009). Assim, a compreensão do mecanismo que permite a redução da intensidade intracelular de zinco em células tumorais prostáticas é fundamental para o entendimento da progressão deste câncer e para fundamentação de um tipo de tratamento baseado neste elemento traço.

Para melhor entender o fenômeno que estava ocorrendo realizou-se os testes de viabilidade celular que permitiu observar que a viabilidade da célula não estava sendo influenciada pela suplementação, ou seja, a célula estava viável metabolicamente.

Os ensaios de imunofluorescência permitiram observar que os esferoides de células tumorais DU145 submetidos aos tratamentos durante 24 horas concentram as células fenotipicamente epiteliais no centro dos esferóides, mesma região na qual uma maior intensidade de zinco foi observada. Observou-se ainda que a célula epitelial pode estar adquirindo características fenotípicas de uma célula mesenquimal, tendo em vista que a proteína marcadora mesenquimal, a vimentina, foi encontrada expressa nos

esferóides de células tumorais DU145 na condição controle e, após 48 horas de tratamento também na condição de tratamento com50µM de Cloreto de Zinco. Sugerindo, desta forma, que o tratamento com Cloreto de Zinco (especialmente 100 µM e 150 µM), de alguma forma, inibe a ativação do processo de transição epitélio mesenquimal, um evento característico da progressão tumoral.

Estudos anteriores demonstram que a transição epitélio-mesenquimal (EMT) é um importante evento na progressão do câncer. Em Silva Neto (2008), examinaram o padrão de expressão de marcadores da EMT *in vivo* e determinaram a ocorrência e o significado clínico destes eventos em uma série de carcinomas de bexiga. Os supostos marcadores da EMT, definidos dentro de um painel de linhagens celulares de tumores uroteliais de bexiga, foram analisados *in vivo* e estão frequentemente associados a tumores de alto grau e a estágios mais avançados da doença.

Em Teng *et al*. (2013), investigaram os mecanismos moleculares de células do fígado com a expressão HBx sobre a EMT usando análise de Western blot e ensaio Transwell para avaliar a expressão da proteína relacionada com a EMT e mobilidade celular. Os resultados mostraram que a expressão HBx afetou a expressão de proteínas relacionadas com o EMT e a mobilidade celular de células do câncer de fígado (MHCC97) e células do fígado (HL-7702), *in vitro* ou *in vivo*.

Em Bernaudo *et al*. (2016), estudaram o câncer epitelial de ovário (EOC), tendo em vista que tem a maior taxa de mortalidade entre doenças malignas ginecológicas. Ciclina G2 é uma ciclina não convencional que atua de modo a opor-se a progressão do ciclo celular. Mecanicamente, G2 ciclina foi encontrada para suprimir a EMT, como demonstrado pela regulação diferencial de vários genes EMT, como caracol, Slug, vimentina e E-caderina. Em conjunto, resultados demonstram que ciclina G2 tem efeitos tumor-supressor potentes em inibir EOCs por EMT através atenuando a sinalização de Wnt / β-catenina.

Em Ishikawa *et al*. (2016), consideraram um passo inicial da patogênese é a EMT de células epiteliais de pigmento retinal. aB-cristalina. Assim, aB-cristalina é um importante regulador da EMT.

Em Zhou *et al*. (2015), consideraram a EMT um evento essencial na progressão do câncer de mama no sentido metástase.

Em Sun *et al*. (2016), a fibrose pulmonar idiopática (PIF) é uma doença pulmonar crônica fatal caracterizada pela acumulação anormal de população de fibroblastos e a deposição de matriz extracelular. Cada vez mais provas apoiam que a

EMT de células epiteliais alveolares é um processo crítico na patogênese da PIF. Portanto, o estudo do mecanismo que leva as células tumorais da próstata a perderem a capacidade de acumular zinco, tendo em vista que não está ocorrendo morte celular e o estudo da transição fenotípica epitélio-mesenquimal que ocorre nos casos mais agressivos são de extrema importância para o entendimento desta patogênese.

CAPÍTULO VI

CONCLUSÃO

As medidas deste trabalho foram realizadas na linha de luz XRF do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas, Brasil, utilizando um feixe branco com 25 μm de extensão na vertical e 12 μm na horizontal e um detector Silicon Drift posicionado a 90^0 com relação ao feixe incidente sendo capaz de detectar os elementos: P, Ar, S, Cl, K, Ca, Fe, e Zn.

Nos esferóides de DU145 24 horas ocorreu um aumento significante na intensidade de zinco comparando os tratamentos com o controle, com exceção do tratamento de 50 μM em que a intensidade se manteve; na comparação entre os tratamentos observou-se também um aumento significante.

Nos esferóides de DU145 48 horas, na comparação dos tratamentos com o controle, houve uma queda significante no tratamento de 50 μM e de 100 μM e um aumento significante no tratamento de 150 μM. Na comparação entre os tratamentos ocorreu um aumento significativo.

Nos esferóides da linhagem RWPE-1 24 horas ocorreu um aumento significante na intensidade de zinco comparando os tratamentos com o controle, na comparação entre os tratamentos observou-se também um aumento significante, com exceção da comparação entre os tratamentos de 50 μM e 100 μM.

Nos esferóides da linhagem RWPE-1 48 horas ocorreu um aumento significante na intensidade de zinco comparando os tratamentos com o controle e na comparação entre os tratamentos, com exceção da comparação entre os tratamentos de 50 μM e 100 μM em que a intensidade de zinco manteve-se constante.

A comparação dos resultados da intensidade de zinco entre os períodos em que os esferóides de DU145 ficaram submetidos aos tratamentos nos permitiu observar que estes esferóides continuaram a perder a capacidade de acumular zinco mesmo dobrando o período de tratamento com exceção do tratamento de 150 μM que se manteve constante. Nos esferóides de RWPE-1 observou-se que a intensidade de zinco foi mantida ao dobrar o período de tratamento, com exceção da comparação entre os tratamentos de 50 μM que a intensidade diminuiu.

A comparação DU145 24 horas com DU145 48 horas mostrou que estes esferóides continuaram a perder a capacidade de acumular zinco mesmo dobrando o período de tratamento com exceção do tratamento de 150 µM que se manteve constante.

Nos esferóides de RWPE-1 observou-se que a intensidade de zinco foi mantida ao dobrar o período de tratamento, com exceção da comparação entre os tratamentos de 50 µM que a intensidade diminuiu.

Os resultados da comparação entre os esferóides de DU145 e RWPE-1 24 horas nos permitiram observar que os esferóides de RWPE-1 acumularam uma intensidade maior de zinco do que os esferóides de DU145.

Durante o período de 48 horas, os esferóides de RWPE-1 acumularam uma intensidade maior de zinco, enquanto os esferóides de DU145 continuaram a perder a capacidade de acumular zinco.

Os resultados do ensaio de imunofluorescência mostraram que os filamentos de citoqueratina foram marcados independente do tipo celular dos esferóides e dos tratamentos, os filamentos de vimentina foram marcados apenas nas células de DU145 24 horas controle e DU145 48 horas controle e tratamento de 50µM.

Os resultados do ensaio de MTT não foram significativos, o que nos permite concluir, que a viabilidade da célula não foi alterada independente do tratamento nos dois tipos celulares analisados, o que nos permitiu concluir que não estava ocorrendo apoptose celular.

Os resultados mostraram que a técnica µSRXRF é eficiente na análise de esferóides celulares fornecendo informações importantes sobre a composição elementar destas culturas em três dimensões e pode ser usada em conjunto com outras técnicas na caracterização de amostras biológicas.

Como sugestão para trabalhos futuros que podem completar esse estudo pode-se indicar:

a) Aumentar a concentração dos tratamentos;
b) Analisar o silenciamento do transportador de zinco ZIPI;
c) Analisar a influência do tratamento com cloreto de zinco em células tumorais andrógeno dependentes;
d) Estudar a transformação de célula epitelial em célula mesenquimal em caso de câncer agressivo;
e) Analisar a influência do tratamento com cloreto de zinco em outros elementos químicos;

f) Analisar a morte celular;

g) Analisar a proliferação celular.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AL-EBRAHEEM, A. et al. Distribution of Ca, Fe, Cu and Zn in primary colorectal cancer and secondary colorectal liver metastases. **Nuclear Instruments And Methods In Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment,** [sol.], v. 619, n. 1-3, p.338-343, jul. 2010. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.nima.2009.10.069.

AL-KHALIL, Shadi et al. Interactions between benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate cancer in large prostates: a retrospective data review. **Int Urol Nephrol,** [s.l.], p.1-7, 21 nov. 2015. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s11255-015-1146-2.

ALVES, Emanuele Amorim; GUIMARÃES, Anna Christina Rosa. Cultivo celular. In: MOLINARO, Etelcia Moraes; CAPUTO, Luzia Fátima Gonçalves; AMENDOEIRA, Maria Regina Reis. **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde.** Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/fundação Oswaldo Cruz, 2010. Cap. 5. p. 215-253.

AMARAL, Jônatas Bussador do. **Células MCF-7 com Modelo 3D no Estudo do Câncer de Mama Humano.** 2010. 137 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia Celular e Tecidual, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

ANJOS, Marcelino José dos. **Análises de Solos Agrícolas por Fluorescência de Raios X por Dispersão em Energia**. 2000. Tese (Doutorado) - Coppe/UFRJ, Rio de Janeiro, 2000.

BANUDEVI, Sivanantham et al. Effect of zinc on regulation of insulin-like growth factor signaling in human androgen-independent prostate cancer cells. **Clinica Chimica Acta,** [s.l.], v. 411, n. 3-4, p.172-178, fev. 2010. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.cca.2009.10.023.

BATTISTI, Vanessa et al. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS QUE DEGRADAM NUCLEOTÍDEOS DA ADENINA EM PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA. **Revista Contexto & SaÚde,** Santa Maria, v. 10, n. 9, p.92-95, dez. 2010.

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

BERNAUDO, S et al. Cyclin G2 inhibits epithelial-to-mesenchymal transition by disrupting Wnt/β-catenin signaling.**Oncogene,** [s.l.], 15 fev. 2016. Nature Publishing Group. DOI: 10.1038/onc.2016.15.

BOHIC, Sylvain et al. Synchrotron-induced X-ray microfluorescence on sigle cells. **Nuclear Instruments And Methods In Physics Research.** Grenoble Cedex, p. 728-733. jan. 2001.

BULÉON, Alain et al. Tracking sulfur and phosphorus within single starch granules using synchrotron X-ray microfluorescence mapping. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - General Subjects,** [s.l.], v. 1840, n. 1, p.113-119, jan. 2014. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.08.029.

CARDOSO, Simone C. et al. Synchrotron Radiation X-Ray Microfluorescence Reveals Polarized Distribution of Atomic Elements during Differentiation of Pluripotent Stem Cells. **Plos One,** [s.l.], v. 6, n. 12, p.1-10, 16 dez. 2011. Public Library of Science (PLoS). DOI: 10.1371/journal.pone.0029244.

CASTRO, Antonio Rubens Britto de. Synchrotron Light and its Applications. **Physicae 2,** Campinas, p.31-41, 2001.

CHEN, X. et al. Zinc sensitizes prostate cancer cells to sorafenib and regulates the expression of Livin. **Acta Biochimica Et Biophysica Sinica,** [s.l.], v. 45, n. 5, p.353-358, 21 fev. 2013. Oxford University Press (OUP). DOI: 10.1093/abbs/gmt017.

CHWIEJ, Joanna et al. Preparation of tissue samples for X-ray fluorescence microscopy.**Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy,** [s.l.], v. 60, n. 12, p.1531-1537, dez. 2005. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.sab.2005.10.002.

COSTA, A.C.M. **Análise da Poluição Ambiental Produzida por Metais Pesados em Águas Superficiais da Baía de Sepetiba usando SRTXRF**.2003. Tese (Mestrado) - Coppe/UFRJ, Rio de Janeiro, 2003.

COSTELLO, Lc; FRANKLIN, Rb. Novel role of zinc in the regulation of prostate citrate metabolism and its implications in prostate cancer. Prostate, v. 4, n. 35, p.285-296, 1998.

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

COSTELLO, Leslie C. et al. Human prostate cancer ZIP1/zinc/citrate genetic/metabolic relationship in the TRAMP prostate cancer animal model. **Cancer Biology & Therapy,** [s.l.], v. 12, n. 12, p.1078-1084, 15 dez. 2011. Informa UK Limited. DOI: 10.4161/cbt.12.12.18367.

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

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

FENG, Pei et al. Direct effect of zinc on mitochondrial apoptogenesis in prostate cells. **The Prostate,**[s.l.], v. 52, n. 4, p.311-318, 19 jul. 2002. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1002/pros.10128.

FRANKLIN, Leslie C Costello Renty B. Evidence that Human Prostate Cancer is a ZIP1-Deficient Malignancy that could be Effectively Treated with a Zinc Ionophore (Clioquinol) Approach.**Chemotherapy (los Angel),** [s.l.], v. 04, n. 03, p.1-27, 2014. OMICS Publishing Group. DOI: 10.4172/2167-7700.1000152.

FRANKLIN, R.b. et al. Human ZIP1 is a major zinc uptake transporter for the accumulation of zinc in prostate cells. **J Inorg Biochem,** Baltimore, v. 96, p.435-442, jun. 2015.

FRANKLIN, Renty B. et al. ZINC AND ZINC TRANSPORTERS IN NORMAL PROSTATE FUNCTION AND THE PATHOGENESIS OF PROSTATE CANCER. **Front Biosci.,** Baltimore, v. 10, p.2230-2239, jun. 2015.

FRANKLIN, Renty B.; COSTELLO, Leslie C. Zinc as an anti-tumor agent in prostate cancer and in other cancers. **Archives Of Biochemistry And Biophysics,**Baltimore, p.211-217, mar. 2007.

FRANKLIN, Renty B.; COSTELLO, Leslie C.. Zinc as an anti-tumor agent in prostate cancer and in other cancers. **Archives Of Biochemistry And Biophysics,** [s.l.], v. 463, n. 2, p.211-217, jul. 2007. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.abb.2007.02.033.

FRIESTINOA, Jane Kelly Oliveira et al. MORTALIDADE POR CÂNCER DE PRÓSTATA NO BRASIL: CONTEXTO HISTÓRICO E PERSPECTIVAS. **Revista Baiana de Saúde Pública,** Campinas, v. 37, n. 3, p.688-701, set. 2013.

FUSCALDI, Leonardo Lima. **EMPREGO DO PEPTÍDEO 99mTc-HYNIC-?Ala-Bombesina(7-14) NA IDENTIFICAÇÃO DE TUMOR DE PRÓSTATA DA LINHAGEM LNCaP EM MODELO EXPERIMENTAL.** 2012. 82 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

GASPERINI, F. M. et al. Bone-nanohydroxyapatite spheres interface evaluation by synchrotron radiation X-ray microfluorescence. **X-ray Spectrometry,** [s.l.], v. 41, n. 1, p.6-11, 21 dez. 2011. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1002/xrs.1376.

GUERRA, Carolina de Souza et al. X-ray fluorescence with synchrotron radiation to elemental analysis of lead and calcium content of primary teeth. **Applied Radiation And Isotopes,** [s.l.], v. 68, n. 1, p.71-75, jan. 2010. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.apradiso.2009.08.005.

HAYWARD, Simon W.; CUNHA, Gerald R.. THE PROSTATE: DEVELOPMENT AND PHYSIOLOGY. **Radiologic Clinics Of North America,** [s.l.], v. 38, n. 1, p.1-14, jan. 2000. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/s0033-8389(05)70146-9.

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

ISHIKAWA, Keijiro et al. αB-Crystallin Regulates Subretinal Fibrosis by Modulation of Epithelial-Mesenchymal Transition. **The American Journal Of Pathology,** [s.l.], fev. 2016. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.ajpath.2015.11.014.

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

KLOCKENKAMPER, R.; VON BOHLEN, A.. Elemental Analysis of Environmental Samples by Total Reflection X-Ray Fluorescence : a Review. **X-ray Spectrometry.**Germany, p. 156-162. jan. 1996.

LACHANCE, Gerald R.; CLAISSE, Fernand. **Gerald R. Lachance (Author), Fernand Claisse (Author).** New York: John Willey & Sons, 1995.

LANKOSZ, M. et al. Research in quantitative microscopic X-ray fluorescence analysis.**Spectrochimica Acta Part B.** Chamonix Mont Blanc, p. 1517-1521. set. 2003.

LEITÃO, Catarine Canellas Gondim. **Estudo de Doenças Hematológicas Usando a Técnica de Fluorescência de Raios X com Radiação Síncrotron.** 2009. 187 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Nuclear, Coppe, U, Rio de Janeiro, 2009.

LEITÃO, R. G. et al. Study of the differential response to zinc of prostate cell spheroids using the synchrotron radiation X-ray microfluorescence technique. **X-ray Spectrometry,** [s.l.], v. 44, n. 4, p.204-208, 19 mar. 2015. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1002/xrs.2601.

LEITÃO, Roberta Gama. **DISTRIBUIÇÃO ELEMENTAR QUÍMICA EM ESFEROIDES CELULARES DE PROSTATA USANDO MICROFLUORESCÊNCIA DE RAIOS X.** 2013. 105 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Nuclear, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

LEZE, Eduardo Moussa de Jabur. **A LEPTINA REGULA A PROLIFERAÇÃO CELULAR E A APOPTOSE NA PRÓSTATA HUMANA.** 2011. 41 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Fisiocirurgia - Sistema Urogenital, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

LIN, Shu-fei et al. Profiling of zinc-altered gene expression in human prostate normal vs. cancer cells: a time course study. **The Journal Of Nutritional Biochemistry,** [s.l.], v. 20, n. 12, p.1000-1012, dez. 2009. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2008.09.004.

MAJUMDAR, Sanghamitra et al. Applications of synchrotron μ-XRF to study the distribution of biologically important elements in different environmental matrices: A review. **Analytica Chimica Acta,** [s.l.], v. 755, p.1-16, nov. 2012. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.aca.2012.09.050.

MARTÍNEZ, B. Martínez-amores et al. Actualización en cáncer de próstata. **Medicine,** Madrid, v. 26, n. 11, p.1578-1587, 2013.

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

MOROZ, Andrei. **EFEITOS DA FINASTERIDA SOBRE CULTURAS DE CÉLULAS EPITELIAIS PROSTÁTICAS NORMAIS E TUMORAIS EM DIFERENTES SISTEMAS IN VITRO.** 2013. 91 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia Geral e Aplicada, Área de Concentração Biologia Celular Estrutural e Funcional., Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

MOSMANN, Tr. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods,** v. 65, p.55-63, dez. 1983.

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

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

ODELL, Ian D; COOK, Deborah. Immunofluorescence Techniques. **J Investig Dermatol,** [s.l.], v. 133, n. 1, p.1-4, jan. 2013. Elsevier BV. DOI: 10.1038/jid.2012.455.

OLIVEIRA, Arissa Pickler. **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE QUIMIOTERÁPICOS EM FÊMURES DE RATAS WISTAR USANDO SR-µ-XRF.** 2015. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Nuclear, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

OLIVEIRA, Eliane Gouvêa de. **Estudo da interação de células tumorais prostáticas humanas DU145 com o microambiente cerebral.** 2013. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de CiÊncias Morfológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

PEREIRA, M.O. **Análise de Metais Pesados em Água e Sedimento de Fundo do Rio Paraíba do Sul por Fluorescência de Raios X com Radiação Síncrotron**.2003. Tese (Mestrado) - Coppe/UFRJ, Rio de Janeiro, 2003.

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

RAK, Margaret et al. X-ray microfluorescence (µXRF) imaging of Aspergillus nidulans cell wall mutants reveals biochemical changes due to gene deletions. **Anal Bioanal Chem,** [s.l.], v. 406, n. 12, p.2809-2816, 12 mar. 2014. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s00216-014-7726-7.

SALES, E. et al. Bone quality analysis using X-ray microtomography and microfluorescence. **Applied Radiation And Isotopes,** [s.l.], v. 70, n. 7, p.1272-1276, jul. 2012. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.apradiso.2011.11.050.

SILVA NETO, Brasil. **Identificação e Significado Prognóstico de um Perfil de Expressão da Transição Epitélio-Mesenquimal em Tumores Uroteliais de**

Bexiga. 2008. 117 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SLIWINSKI, Tomasz et al. Zinc salts differentially modulate DNA damage in normal and cancer cells.**Cell Biology International,** [s.l.], v. 33, n. 4, p.542-547, abr. 2009. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1016/j.cellbi.2009.02.004.

SUN, Hao et al. Integrated long non-coding RNA analyses identify novel regulators of epithelial-mesenchymal transition in the mouse model of pulmonary fibrosis. **J. Cell. Mol. Med.,** [s.l.], p.1-1, jan. 2016. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1111/jcmm.12783.

TENG, Jing et al. HBx-dependent activation of twist mediates STAT3 control of epithelium-mesenchymal transition of liver cells. **Journal Of Cellular Biochemistry,** [s.l.], v. 114, n. 5, p.1097-1104, 14 mar. 2013. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1002/jcb.24450.

YAN, Michelle; HARDIN, Karin; HO, Emily. Differential response to zinc-induced apoptosis in benign prostate hyperplasia and prostate cancer cells?. **The Journal Of Nutritional Biochemistry,** [s.l.], v. 21, n. 8, p.687-694, ago. 2010. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2009.04.002.

ZELLER, John L.. Prostate Cancer. **The Journal Of The American Medical Association,** Dd, v. 296, n. 19, p.1-1, nov. 2006.

ZHOU, Dan et al. Expression of pigment epithelium-derived factor is associated with a good prognosis and is correlated with epithelial-mesenchymal transition-related genes in infiltrating ductal breast carcinoma. **Oncology Letters,** [s.l.], 6 nov. 2015. Spandidos Publications. DOI: 10.3892/ol.2015.3880.