

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE FÍSICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

HENRIQUE BAUERMANN FONTELES

**IMAGEAMENTO E ANÁLISE DE CÉLULAS U87 TRATADAS COM  
CISPLATINA POR  $\mu$ -PIXE**

DISSERTAÇÃO

PORTO ALEGRE  
2022

HENRIQUE BAUERMANN FONTELES

**IMAGEAMENTO E ANÁLISE DE CÉLULAS U87 TRATADAS COM  
CISPLATINA POR  $\mu$ -PIXE**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Física da UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Física Experimental

Linha de pesquisa: Análise de amostras biológicas por feixe de íons

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luis Grande  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Coorientador: Dra. Karine Rech Begnini  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

PORTO ALEGRE  
2022

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por todo o suporte e amor que me deram ao longo desses 2 anos e meio de pós-graduação.

Agradeço a minha namorada, Iana, por ser a pessoa que me faz a mais feliz do mundo e que sempre esteve comigo em todos os momentos.

Agradeço a UFRGS por ser uma universidade pública, gratuita e de altíssima qualidade.

Agradeço a CAPES pelo fomento à pesquisa e pela bolsa de estudos recebida durante todo o Mestrado.

Agradeço ao Prof. Pedro Luis Grande por ter sido o melhor orientador possível e sempre proporcionado discussões importantes e ensinamentos relevantes.

Agradeço a Dra. Karine Begnini pela orientação e por sempre ajudar em todas as questões biológicas do trabalho.

Agradeço ao Prof. Guido Lenz por ter tido interesse no trabalho, pelas discussões e por deixar o LabSinal a disposição.

Agradeço a estudante do LabSinal Julia Marcolin por auxiliar na preparação das amostras, e contribuir ativamente para o trabalho.

Agradeço ao Prof. Johnny Ferraz Dias, que atuou praticamente como um coorientador do trabalho, ajudando e auxiliando em todos os experimentos de  $\mu$ -PIXE, bem como nas análises posteriores.

Agradeço aos Professores Luiz Gustavo Pereira, Raquel Giulian, Legna Vegas, Ricardo Papapeleo e Carla Lochims por terem aceitado participar da banca avaliadora.

Agradeço ao estudante de Doutorado Deiverti Bauer, por sempre ter ficado a disposição para auxiliar nas medidas de  $\mu$ -PIXE e fazer de tudo para que os experimentos ocorressem da melhor maneira possível.

Um agradecimento muito especial ao Laboratório de Implantação Lônica e seus funcionários Agostinho, Kovalick, Leandro e Edson que sempre tiveram boa vontade em me atender e ajudar a resolver os problemas.

Agradeço ao grupo do MEIS, por sempre terem contribuído ativamente para o trabalho com sugestões e discussões importantes.

Agradeço ao Prof. Gustavo Gil e a todos os integrantes do grupo GASP por terem contribuído com discussões relevantes para o trabalho.

Agradeço ao Júlio, Carina, Juliana, Luísa e Cunha por serem os melhores amigos que eu poderia ter.

Agradeço aos amigos do Discord pela parceria e amizade que sempre demonstraram, principalmente em tempos de pandemia.

*"You ain't gonna know unless you climb up yourself. Ain't no way to look if you don't try."  
(Kotoishi, Naru)*

## RESUMO

FONTELES, Henrique. Imageamento e Análise de Células U87 tratadas com cisplatina por  $\mu$ -PIXE. 2022. 72 f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Física, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. PORTO ALEGRE, 2022.

O estudo das propriedades e interações de drogas quimioterápicas possui um papel vital no desenvolvimento de novos tratamentos oncológicos e no aprimoramento dos que estão atualmente em uso. A cisplatina ( $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ ) e outras drogas a base de platina são medicamentos amplamente utilizados para tratar diversos tipos de câncer, incluindo testículo, ovário, pescoço, entre outros. O presente trabalho investigou a interação da cisplatina com células de glioblastoma humano da linhagem U87 a fim de descobrir se o *uptake* era distinto entre elas. Entender e estudar como se dá o *uptake* de um droga é de suma importância para a compreensão dos mecanismos de resistências associados a interação dela com as células cancerosas. As células foram tratadas com diferentes concentrações de cisplatina (10, 20 e 100  $\mu\text{M}$ ) por 24 horas. A análise foi realizada utilizando a técnica de  $\mu$ -PIXE, com um feixe de prótons de 2,2 MeV e tamanho de aproximadamente  $1,2 \times 1,2 \mu\text{m}^2$ , que forneceu informação elementar da amostra e permitiu a criação de mapas elementares 2D com resolução espacial micrométrica. Medindo os sinais do Cloro e da Platina, foi possível identificar células individuais na amostra e observar quais delas possuíram um maior *uptake* de cisplatina, respectivamente. Além disso, foi notado que na amostra de 100  $\mu\text{M}$  houve a presença de um alto sinal de Ferro correlacionando com o sinal da Platina, que não estava presente em concentrações menores de cisplatina. Tal resultado pode ser evidência de ferroptose, isto é, um tipo de morte de celular dependente de ferro, completamente independente da apoptose convencional. Estudos recentes já mostraram que a cisplatina pode induzir ferroptose caso a dose exceda um determinado limite. Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Implantação Iônica com um acelerador Tandem de 3MV. Esse trabalho também demonstrou a versatilidade e aplicabilidade da técnica de  $\mu$ -PIXE e como ela pode ser utilizada para conduzir análises e experimentos multidisciplinares.

**Palavras-chave:** Análise por Feixe de Íons. Cisplatina.  $\mu$ -PIXE. Células de Câncer.

## ABSTRACT

FONTELES, Henrique. Imaging and Analysis of U87 Cells Treated with Cisplatin by  $\mu$ -PIXE. 2022. 72 f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Física, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. PORTO ALEGRE, 2022.

The study of chemotherapy drug's properties plays a vital role in the development of new cancer-related treatments and the improvement of those currently in use. Cisplatin ( $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ ) and other platinum-based drugs are widely used medications that treat several different cancers, including, but not limited to, ovarian, testicular, and neck. The present work investigated the interaction of cisplatin with human glioblastoma U87 cells in order to find out if the uptake was distinct between them. Cells were treated with cisplatin at a concentration of 10, 20, and 100  $\mu\text{M}$  for 24 hours. The analysis was done using the  $\mu$ -PIXE technique, with a 2.2 MeV proton beam of  $1.2 \times 1.2 \mu\text{m}^2$  spot size, which gave us elemental information about the sample and allowed us to create 2D maps with micrometric spacial resolution. By measuring the chlorine and platinum signals, we were able to identify individual cells in the sample and detect which ones had a greater cisplatin uptake, respectively. Understanding the drug's uptake is crucial for unraveling the mechanisms of resistance that are involved in its interaction with cancer cells. Moreover, we noticed that the 100  $\mu\text{M}$  sample had a high iron signal correlating with the platinum signal, which was not present at lower treatment concentrations. This result could be a piece of evidence for ferroptosis, i.e. a type of iron-dependant cell death completely independent from regular apoptosis. Recent studies have already shown that cisplatin can induce ferroptosis in high treatment concentrations. All experiments were conducted at the Ion Implantation Laboratory with a 3MV Tandem accelerator. This work also highlighted the versatility and applicability of the  $\mu$ -PIXE technique and how it can be used to perform interdisciplinary analysis.

**Keywords:** Ion Beam Analysis. Cisplatin.  $\mu$ -PIXE. Cancer Cells.

## Nota de Imprensa

Pesquisadores da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) analisam como se dá a interação de um quimioterápico chamado cisplatina com células de tumor cerebral. A quimioterapia é um dos tratamentos mais utilizados para combater o câncer, e provavelmente você possui algum conhecido que infelizmente já teve que passar por esse tipo de tratamento. O diferencial da pesquisa é tentar agregar a física e seus conhecimentos experimentais para auxiliar no entendimento de como esse medicamento mata as células do tumor.

A ação antitumoral da cisplatina foi descoberta em 1965 pelo pesquisador Barnett Rosenberg e apenas 13 anos depois ela já foi aprovada para ser utilizada clinicamente em pacientes com câncer. Sua maior aplicação clínica é em câncer de testículo, onde sua eficiência pode passar de 90% caso o tumor seja descoberto com antecedência. Apesar de sua maior efetividade ser em tumores testiculares, diversos outros tipos de câncer podem ser tratados com cisplatina, como por exemplo ovário, pescoço, bexiga, etc. A gama de aplicações é tão alta que a taxa de utilização de drogas a base de platina passa de 40% de todas as quimioterapias utilizadas.

Infelizmente, a quimioterapia intrinsecamente está associada a efeitos colaterais graves. No caso da cisplatina, esses efeitos normalmente estão associados com a nefrotoxicidade, que nada mais é que o prejuízo das funções renais. Outros efeitos como queda de cabelo, desidratação corporal e náuseas também são bastante comuns. Para tentar driblar esta barreira que faz com que muitas vezes o tratamento quimioterápico tenha que ser suspenso, pesquisadores buscam alternativas para tornar o tratamento menos tóxico para os pacientes.

Com o intuito de estudar a cisplatina e sua interação com as células tumorais, físicos e biólogos se juntaram para tentar entender melhor esse problema. O Laboratório de Implantação Iônica do Instituto de Física e o Laboratório de Sinalização Celular do Instituto de Biociências cooperaram para analisar amostras celulares tratadas com cisplatina. Com uma técnica chamada de micro-PIXE, foi possível imagear células únicas e observar quais células estavam conseguindo agregar mais a molécula de cisplatina. Infelizmente, a internalização da droga por parte das células não é igual, fazendo com que algumas células internalizem satisfatoriamente e outras não. Inclusive, esse fenômeno pode estar associado com a recorrência tumoral, pois essas células que não internalizam a droga acabam não morrendo, podendo dar origem a um novo tumor mais resistente que o anterior.

Essa pesquisa rendeu a dissertação de Mestrado do estudante Henrique Fonteles, sob orientação do Prof. Pedro Grande da Física e coorientação da Dra. Karine Begnini da Biologia. É de suma importância que diferentes áreas do conhecimento, nesse caso física e biologia, conversem e troquem suas experiências e especialidades para que a pesquisa acadêmica seja cada vez mais inclusiva e diversa, trazendo frutos e conquistas para a nossa sociedade.

**Palavras-Chave:** Cisplatina. Câncer. Quimioterapia.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 – Geometria da molécula de cisplatina. . . . .  | 4  |
| Figura 2 – Estruturas químicas de outras drogas a base de platina utilizadas clinicamente. . . . .   | 4  |
| Figura 3 – Reações de aquação da cisplatina com as moléculas de água e os possíveis complexos mono e diaquosos que são formados. . . . .   | 5  |
| Figura 4 – Esquema mostrando o mecanismo de ação da cisplatina. . . . .  | 6  |
| Figura 5 – Esquema mostrando os principais mecanismos de resistência frente a cisplatina. . . . .  | 7  |
| Figura 6 – Esquema mostrando os principais passos no NER. Em A é mostrado o dano, representado pelo triângulo roxo, em B o dano é identificado pelas proteínas, em C e D ocorre o recrutamento de outras proteínas para que seja formado um complexo facilitador da remoção do dano, em E ocorre o corte na hélice onde o dano estava contido, e, por fim, em F e G o dano é efetivamente reparado. . . . .  | 10 |
| Figura 7 – Esquema mostrando a internalização de íons de ferro. A linha horizontal representa a membrana celular e o retângulo acoplado ao TRF1 o endossomo. . . . .   | 11 |
| Figura 8 – Esquema mostrando o metabolismo de íons ferro no citoplasma. . . . .  | 12 |
| Figura 9 – Esquema mostrando a síntese de GSH a partir do transportador de aminoácidos System X <sub>c</sub> <sup>-</sup> e suas funções na célula. . . . .  | 13 |
| Figura 10 – Esquema resumido do processo de ferroptose. . . . .  | 14 |
| Figura 11 – Principais interações de íons com a matéria. Em (a) ocorre espalhamento inelástico com a eletrosfera do átomo, em (b) espalhamento elástico coulombiano repulsivo com o núcleo do átomo e em (c) reação nuclear não-elástica com o núcleo do átomo alvo resultando na emissão de partículas secundárias. . . . .   | 16 |
| Figura 12 – Dependência das contribuições eletrônica e nuclear para a perda de energia total em função da energia do íon incidente. A equação de Bethe (Equação (3)) descreve bem o comportamento para altas energias. $v_1$ é a velocidade do íon, $v_0$ é a velocidade de Bohr e $z$ o número atômico do íon. As linhas tracejadas verticais delimitam a região de médias energias e $E_c$ é a energia na qual a contribuição eletrônica passa a ser mais relevante que a nuclear. . . . . | 17 |
| Figura 13 – Regimes da perda de energia eletrônica. Para íons com baixas velocidades a perda de energia é proporcional a sua velocidade (região de <i>Lindhard-Scharff</i> ), enquanto que para íons com altas velocidades a perda de energia decresce com o aumento da energia cinética (região de <i>Bethe</i> ). . . . .  | 18 |
| Figura 14 – Um feixe monoenergético com energia $E_0$ perde uma quantidade $\Delta E$ de energia ao atravessar um alvo fino de espessura $\Delta x$ . Simultaneamente, ocorre o <i>straggling</i> de energia, alargando a linha espectral em $\pm\delta\Delta E$ . . . . .   | 19 |



|   |    |
|---|----|
| Figura 15 – Transições eletrônicas possíveis entre os elétrons das camadas K e L. . . . .   | 20 |
| Figura 16 – Espectro típico de PIXE, com as contagens em função da energia dos raios X característicos gerados. A amostra em questão é um padrão utilizado para calibração do sistema. . . . .  | 21 |
| Figura 17 – Comparação entre um espectro de raios X gerado por um feixe de elétrons (esquerda) e por um feixe de prótons (direita). . . . .   | 22 |
| Figura 18 – Energia das principais transições K e L em função do número atômico do elemento químico. . . . .  | 23 |
| Figura 19 – Espectro obtido por PIXE a partir de uma amostra de ferro com um detector de Si(Li), mostrando o pico de escape. . . . .  | 24 |
| Figura 20 – Efeito de <i>Pile-Up</i> de dois pulsos independentes. . . . .  | 25 |
| Figura 21 – Mapa de Cobre da grade que é utilizada para medir a dimensão do feixe. . . . .  | 26 |
| Figura 22 – Acelerador <i>Tandetron 3 MV</i> do LII-UFRGS. . . . .  | 27 |
| Figura 23 – Esquema representativo do acelerador de partículas e as principais técnicas do laboratório. Atualmente a técnica de MeV-SIMS também está integrada ao sistema. . . . .  | 28 |
| Figura 24 – Esquema do processo de focalização do feixe na linha de microfioxe iônico. . . . .  | 29 |
| Figura 25 – Representação da focalização do feixe pela combinação de dois quadrupolos magnéticos. Em (a) é possível observar a entrada do feixe na primeira lente. Em (b) o feixe sofre a ação dos campos magnéticos, convergindo verticalmente, porém divergindo horizontalmente. Em (c), já na segunda lente, os polos estão arranados de maneira invertida, promovendo, então, em (d), a convergência no formato pontual do feixe. . . . .   | 29 |
| Figura 26 – Esquema representativo da câmara de reações da linha de microfioxe e seus detectores. . . . .   | 30 |
| Figura 27 – Esquema representativo do SDD. Em (1) os pares elétron-lacuna são criados, devido ao efeito fotoelétrico. Em (2) os elétrons são movidos até o ânodo e as lacunas até o cátodo em função da ação de um campo elétrico. A tensão $V$ , que foi gerada pela carga $Q$ acumulada é então medida. Já a carga $Q$ é calculada utilizando a relação $V = Q/C$ , onde $C$ é a capacitância do detector. Por fim, o número de elétrons gerados por um fóton é calculado, e então a energia do raio X incidente pode ser obtida. . . . . | 31 |
| Figura 28 – Reta de calibração que converte canal em energia. . . . .   | 33 |
| Figura 29 – Curva de calibração que mostra a relação entre a largura ( $\sigma$ ) dos picos e sua energia ( $E$ ). . . . .  | 34 |
| Figura 30 – Mapa das linhas K do Cobre da grade utilizada para medir o tamanho do feixe em cada dia de medida do microfioxe. . . . .  | 35 |
| Figura 31 – Espectro de PIXE apenas da lamínula de vidro para verificação de sua composição elementar. . . . .  | 38 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 32 – Espectro de $\mu$ -PIXE padrão das amostras medidas com os elementos químicos presentes indicados, nesse caso com tratamento de 10 $\mu$ M. . . . .                                   | 39 |
| Figura 33 – Ampliação do espectro de $\mu$ -PIXE para que se possa visualizar a linha M da Platina (2,05 keV) prejudicada pela linha K do Silício (1,74 keV). . . . .                             | 40 |
| Figura 34 – Foto tirada no visível das células após o tratamento com 10 $\mu$ M. Magnificação de 4 vezes. . . . .   | 41 |
| Figura 35 – Mapa elementar do Cloro mostrando as estruturas obtidas e a escala de cor que foi utilizada em todos os mapas obtidos. Mapa referente a primeira amostra de 10 $\mu$ M. . . . .       | 41 |
| Figura 36 – Mapas elementares do Sódio (a), do Cloro (b) e do Silício (c). . . . .  | 42 |
| Figura 37 – Mapas elementares do Cloro (a) e da Platina (b). . . . .  | 42 |
| Figura 38 – Mapas elementares do Cloro (a) e da Platina (b) com o filtro Gaussiano aplicado. A elipse vermelha indica a região escolhida para a varredura ampliada. . . . .                       | 43 |
| Figura 39 – Mapas elementares ampliados do Cloro (a) e da Platina (b). . . . .  | 44 |
| Figura 40 – Mapas elementares ampliados do Cloro (a) e da Platina (b) com o filtro Gaussiano aplicado. A elipse vermelha representa uma região de alta contagem de Platina não explicada. . . . . | 44 |
| Figura 41 – Mapas elementares ampliados do Cloro (a), (c) e da Platina (b), (d) da segunda amostra de 10 $\mu$ M. . . . .   | 45 |
| Figura 42 – Mapas elementares do Cloro (a), (c) e da Platina (b), (d) da amostra de 20 $\mu$ M. . . . .   | 46 |
| Figura 43 – Mapas elementares ampliados do Cloro (a), (c) e da Platina (b), (d) da amostra de 20 $\mu$ M. . . . .   | 47 |
| Figura 44 – Espectro de $\mu$ -PIXE da amostra de 20 $\mu$ M. Com um tratamento de maior dose é possível localizar a linha M da Platina (2,05 keV) sem a necessidade de ampliação. . . . .        | 48 |
| Figura 45 – Mapas elementares do Cloro (a), (c) e da Platina (b), (d) da amostra de 100 $\mu$ M. . . . .  | 49 |
| Figura 46 – Espectro de $\mu$ -PIXE da amostra de 100 $\mu$ M comparado com o da amostra de 10 $\mu$ M, com alguns elementos de interesse marcados no gráfico. . . . .                            | 50 |
| Figura 47 – Mapas elementares do Ferro (a), (c) e do Cromo (b), (d) da amostra de 100 $\mu$ M. . . . .  | 51 |
| Figura 48 – Mapa elementar do Ferro (a), da Platina (b) e do Cromo (c) da amostra de 100 $\mu$ M. . . . .   | 51 |
| Figura 49 – Mapas elementares ampliados do Cloro (a), (c) e da Platina (b), (d) da amostra de 100 $\mu$ M. . . . .  | 52 |
| Figura 50 – Espectro de $\mu$ -PIXE ampliado da amostra de 100 $\mu$ M comparado com o da amostra de 10 $\mu$ M, com alguns elementos de interesse marcados no gráfico. . . . .                   | 53 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 51 – Mapas elementares ampliados do Ferro (a), (c) e do Cromo (b), (d) da amostra de 100 $\mu\text{M}$ . . . . .   | 54 |
| Figura 52 – Mapa elementar ampliado do Ferro (a), da Platina (b) e do Cromo (c) da amostra de 100 $\mu\text{M}$ . . . . .   | 54 |
| Figura 53 – Mapas elementares ampliados do Ferro (a), (b), (c) e do Cromo (d), (e), (f), com diferentes concentrações de tratamento de cisplatina. . . . .  | 55 |
| Figura 54 – Espectro de PIXE comparando um papel filtro de éster celulose virgem com um em que o meio de cultura DMEM + Soro fetal bovino foi depositado. Os espectros foram normalizados pela carga. . . . . | 57 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 – Taxa de utilização de quimioterapia em alguns tipos de tumores. Dados referentes ao ano de 2019 nos Estados Unidos, segundo a Sociedade Americana de Câncer (ACS). Estágio faz referência a quão avançado está o tumor. . . . .          | 1  |
| Tabela 2 – Propriedades da molécula de cisplatina. . . . .  | 4  |
| Tabela 3 – Tabela mostrando todos os padrões medidos e seus respectivos canais, transições escolhidas, energias e larguras. Espaços com “-” representam ajustes que obtiveram um $R^2$ pequeno e portanto foram desconsiderados da análise. . . . . | 32 |
| Tabela 4 – Tabela mostrando a composição típica das lamínulas de vidro onde as células foram fixadas. . . . .   | 38 |

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 – INTRODUÇÃO</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 Objetivos e Justificativa                                  | 2         |
| <b>2 – Fundamentação Teórica</b>                               | <b>4</b>  |
| 2.1 Propriedades Gerais da Cisplatina                          | 4         |
| 2.2 Mecanismo de Ação  | 5         |
| 2.3 Mecanismos de Resistência                                  | 6         |
| 2.3.1 Redução da Acumulação da Droga                           | 7         |
| 2.3.2 Inativação da Cisplatina                                 | 8         |
| 2.3.3 Reparo de Danos no DNA                                   | 8         |
| 2.3.3.1 Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER)               | 9         |
| 2.4 Estudo <i>in vitro</i> Envolvendo Cisplatina               | 10        |
| 2.5 Descobertas Recentes sobre a Cisplatina                    | 11        |
| 2.5.1 Metabolismo de Ferro                                     | 11        |
| 2.5.2 Mecanismos Antioxidantes da Célula                       | 12        |
| 2.5.3 Ferroptose   | 13        |
| 2.5.4 Cisplatina e a Ferroptose                                | 14        |
| 2.6 Interação de Íons com a Matéria                            | 15        |
| 2.6.1 Perda de Energia   | 15        |
| 2.6.1.1 <i>Straggling de Energia</i>                           | 18        |
| 2.7 A Técnica de <i>Particle-Induced X-Ray Emission</i> (PIXE) | 19        |
| 2.7.1 Princípios Físicos                                       | 19        |
| 2.7.2 Espectros de PIXE  | 20        |
| 2.7.2.1 Comparação entre feixe de prótons e elétrons           | 21        |
| 2.7.2.2 A relevância dos detectores no espectro                | 22        |
| 2.7.2.3 Picos de Escape  | 23        |
| 2.7.2.4 Pile-Up  | 24        |
| 2.7.3 Vantagens e desvantagens da técnica de PIXE              | 25        |
| 2.8 A técnica de $\mu$ -PIXE                                   | 26        |
| <b>3 – MÉTODOS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS</b>               | <b>27</b> |
| 3.1 O Acelerador de Partículas                                 | 27        |
| 3.2 A linha de microfeixe do LII                               | 28        |
| 3.2.1 <i>Silicon Drift Detector</i> (SDD)                      | 30        |
| 3.3 Calibração do Sistema de $\mu$ -PIXE                       | 31        |
| 3.3.1 Calibração da Energia ( $E$ )                            | 32        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 3.3.2    | Calibração da Largura ( $\sigma$ ) . . . . .  | 33        |
| 3.4      | Experimentos de $\mu$ -PIXE . . . . .   | 34        |
| 3.4.1    | Parâmetros Experimentais do Feixe . . . . .   | 34        |
| 3.4.1.1  | Método para Medir o Tamanho do Feixe . . . . .  | 34        |
| 3.4.2    | Preparação de Amostra . . . . .   | 35        |
| 3.4.3    | Software de Aquisição de Dados OMDAQ . . . . .  | 36        |
| 3.4.4    | Características dos Experimentos . . . . .  | 37        |
| <b>4</b> | <b>– Resultados e Discussões . . . . .</b>  | <b>38</b> |
| 4.1      | Amostras de 10 $\mu$ M . . . . .  | 40        |
| 4.1.1    | Varredura inicial da Primeira Amostra . . . . .   | 40        |
| 4.1.1.1  | Varredura Ampliada da Primeira Amostra . . . . .  | 43        |
| 4.1.1.2  | Varredura Ampliada da Segunda Amostra . . . . .   | 44        |
| 4.2      | Amostra de 20 $\mu$ M . . . . .   | 45        |
| 4.2.1    | Varredura Inicial . . . . .   | 46        |
| 4.2.2    | Varredura Ampliada . . . . .  | 47        |
| 4.3      | Amostra de 100 $\mu$ M . . . . .  | 48        |
| 4.3.1    | Varredura Inicial . . . . .   | 48        |
| 4.3.2    | Varredura Ampliada . . . . .  | 52        |
| 4.3.3    | Possíveis Explicações para a Concentração Expressiva de Ferro . . . . .   | 55        |
| 4.3.4    | Possíveis Explicações para a Concentração Expressiva de Cromo . . . . .   | 57        |
| <b>5</b> | <b>– Conclusões e Perspectivas . . . . .</b>  | <b>59</b> |
| 5.1      | Perspectivas Futuras . . . . .  | 60        |
|          | <b>Referências . . . . .</b>  | <b>61</b> |
|          | <br>  |           |
|          | <b>Anexos . . . . .</b>   | <b>66</b> |
|          | <br>  |           |
|          | <b>ANEXO A – Energia dos fótons, em eV, das principais linhas de emissão das camadas K, L e M dos elementos químicos (THOMPSON et al., 2009). . . . .</b> | <b>67</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Estudar formas alternativas e mais eficientes para tratar doenças sempre vai ser alvo de muitas pesquisas ao redor do mundo. Sabe-se que o câncer está entre as principais causas de morte no mundo, na medida em que, em 2018, houve mais de 18 milhões de novos casos e quase 10 milhões de mortes, segundo a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) (IARC, 2018). No mesmo relatório, a IARC ainda menciona que um em cada cinco homens e uma em cada seis mulheres desenvolvem a doença na vida adulta, sendo que um em cada oito homens e uma em cada onze mulheres acabam falecendo como causa direta da doença. Concentrando a análise apenas no Brasil, existem dados que indicam que em 2022 haverá 625 mil novos casos de câncer, sendo o câncer de pele não melanoma o mais incidente, seguido pelos cânceres de mama, próstata, cólon e reto, pulmão e estômago (INCA, 2020).

Com base nos dados apresentados acima, percebe-se que há uma necessidade muito grande em conter o avanço dessa doença que, por muitas vezes, acaba por ser letal. Um dos tratamentos mais utilizados para tentar combater o câncer é a quimioterapia, que utiliza drogas específicas para tentar matar as células do tumor. Infelizmente, devido ao fato dos mecanismos de ação dessas drogas serem bastante inespecíficos, elas acabam também matando células saudáveis, dando origem a efeitos colaterais. A Tabela 1 abaixo apresenta a taxa de utilização de quimioterapia em alguns tipos de tumores, evidenciando que ela ainda é um dos tratamentos mais utilizados e importantes no combate ao câncer e que abrange uma gama grande de tumores.

Tabela 1 – Taxa de utilização de quimioterapia em alguns tipos de tumores. Dados referentes ao ano de 2019 nos Estados Unidos, segundo a Sociedade Americana de Câncer (ACS). Estágio faz referência a quão avançado está o tumor.

| <b>Tipo de Câncer</b> | <b>Estágio 0</b> | <b>Estágio 1</b> | <b>Estágio 2</b> | <b>Estágio 3</b> | <b>Estágio 4</b> |
|-----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Bexiga                | 33%              | 50%              | 55%              | 61%              | 60%              |
| Mama                  | –                | –                | 17%              | 63%              | 66%              |
| Cólon                 | –                | –                | 9%               | 66%              | 65%              |
| Reto                  | –                | 34%              | –                | 79%              | 78%              |
| Pulmão                | –                | –                | 18%              | 67%              | 53%              |
| Testículo             | –                | 35%              | 84%              | 93%              | Não Reportado    |
| Útero                 | –                | 26%              | 70%              | 75%              | 73%              |

Fonte: (ACS, 2019)

A cisplatina (cis-diaminodicloroplatina (II)), também conhecida como cloreto de Peyrone, fazendo alusão a primeira pessoa que a sintetizou (Michele Peyrone), e outras drogas a base de platina, são medicamentos quimioterápicos com ampla utilização clínica, capaz de tratar diversos tipos de tumores, como: ovário, testículo, pescoço, etc (GALANSKI, 2006). Sua ação antitumoral foi primeiramente descoberta em 1965, quando pesquisadores notaram sua

capacidade em inibir a divisão celular em colônias de bactérias (ROSENBERG; CAMP; KRIGAS, 1965). Esse fenômeno logo criou muito interesse na comunidade científica para transformar essa molécula em um possível medicamento quimioterápico. Em 1978, a cisplatina foi a primeira droga a base de platina aprovada clinicamente pela *Food and Drug Administration* (FDA) (GHOSH, 2019).

Infelizmente, ainda existem diversos desafios que interferem para um maior sucesso clínico na utilização dessas drogas. Esses desafios normalmente estão associados a resistência celular (intrínseca ou adquirida) frente aos medicamentos e ao severos efeitos colaterais do tratamento, como a nefrotoxicidade (MILLER et al., 2010). Portanto, é de suma importância que cada vez mais drogas quimioterápicas sejam estudadas e investigadas, para que os tratamentos sejam mais eficientes e menos deletérios para os pacientes.

As drogas a base de platina vem sistematicamente sendo alvo de diversas discussões na comunidade acadêmica. Atualmente, algumas das principais linhas de pesquisa no tema buscam estudar a combinação do tratamento convencional de cisplatina somado à radioterapia (BREZAR et al., 2020). Esse tipo de abordagem clínica é chamada de *quimiorradioterapia* ou *quimiorradiação*. Além disso, outros temas bastante recorrentes são: como conseguir internalizar a cisplatina para as células do tumor de maneira mais efetiva utilizando, por exemplo, nanopartículas (DUAN et al., 2016; GONZÁLEZ-LÓPEZ et al., 2020), ou como aumentar a eficiência do tratamento utilizando outros compostos somados à cisplatina que atuem de maneira sinérgica (ZHANG; LU, 2021). Estudos *in vitro* também são de suma importância para que novos mecanismos de ação sejam descobertos e para verificação da ação antitumoral da cisplatina em diferentes linhagens celulares. Em específico, apesar de já existirem alguns trabalhos que estudam a interação da cisplatina com as células da linhagem U87 de glioblastoma humano (CHEN et al., 2015; KUTWIN et al., 2017), ainda há espaço para que o tema seja melhor explorado e entendido. A coorientadora e o seu laboratório possuem vasta experiência no cultivo e estudo dessa linhagem, e por isso a sua escolha para o trabalho. Uma das questões que existe atualmente é saber qual o real motivo que faz com que as células sobrevivam ao tratamento, se é devido a uma menor taxa de internalização da droga, ou a uma maior eficiência em conter os danos biológicos da cisplatina.

A técnica de  $\mu$ -PIXE, por possuir resolução espacial micrométrica e fornecer informação elementar das amostras, é uma grande ferramenta para imagear e analisar células tratadas com cisplatina. Com esse nível de detalhamento, é possível inferir sobre a internalização da droga, elementos químicos que participam dos mecanismos de ação da cisplatina e morfologia das células após o tratamento.

## 1.1 Objetivos e Justificativa

Tendo em vista a conjuntura atual do câncer apresentada acima, a grande taxa de utilização da quimioterapia no combate dessa doença, e a importância de se estudar drogas a base de platina, o trabalho visa investigar, via a técnica de  $\mu$ -PIXE, a interação da cisplatina



com células de glioblastoma humano da linhagem U87 para verificar a sua internalização. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Implantação Iônica (LII) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, utilizando o acelerador de partículas Tandem de 3 MV. As amostras celulares, bem como os demais reagentes químicos e drogas quimioterápicas, foram disponibilizados pelo Laboratório de Sinalização Celular (LabSinal), também da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, coordenado pelo Prof. Dr. Guido Lenz. Pretende-se com o trabalho dar continuidade a uma tendência que o LII vem adotando nos últimos tempos de integrar outras áreas, como a biologia e a física médica, para proporcionar uma interdisciplinariedade e, assim, enriquecer a pesquisa acadêmica.

Abaixo estão listados sucintamente os principais objetivos do trabalho.

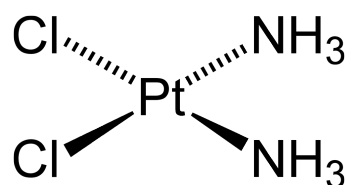
- Criar uma sistemática de análise que permita analisar células utilizando a técnica de  $\mu$ -PIXE;
- Construir mapas elementares das células tratadas com cisplatina;
- Investigar a internalização da droga medindo o sinal da platina;
- Analisar a morfologia das células após o tratamento;
- Verificar o efeito da concentração de cisplatina e do tempo de tratamento;
- Observar quais elementos químicos estão atuando nos mecanismos de ação da droga.

## 2 Fundamentação Teórica

### 2.1 Propriedades Gerais da Cisplatina

A cisplatina é um composto no qual duas aminas e dois átomos de cloro são orientados em uma configuração planar cis em torno de um íon de platina central. A molécula pode ser observada na [Figura 1](#).

Figura 1 – Geometria da molécula de cisplatina.



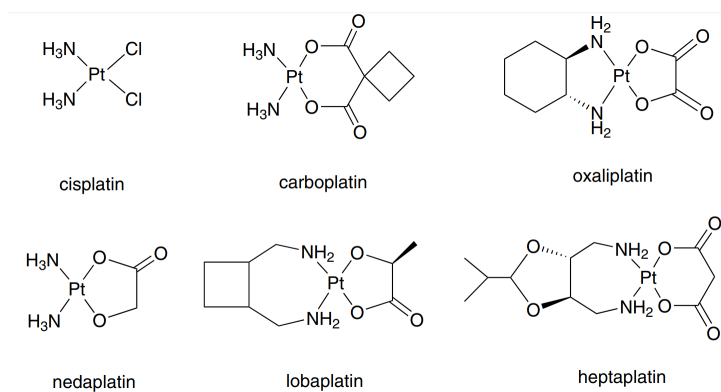
Outras propriedades importantes dessa molécula são apresentadas na [Tabela 2](#).

Tabela 2 – Propriedades da molécula de cisplatina.

|                      |   |
|----------------------|---|
| Fórmula Química      | Pt(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> |
| Peso Molecular       | 300,05 g/mol                                      |
| Densidade            | 3,7 g/cm <sup>3</sup>                             |
| Solubilidade em Água | 2,5 g/L   |

Além da cisplatina, outras drogas com platina também são utilizadas clinicamente, como mostra a [Figura 2](#). A carboplatina, por exemplo, é bastante utilizada em câncer de ovário ([SOUSA; WLODARCZYK; MONTEIRO, 2014](#)) e a oxaliplatina em tumores colorretais ([ARANGO et al., 2004](#)). Ambas as drogas são conhecidas como drogas a base de platina de segunda geração, pois foram descobertas e sintetizadas após a cisplatina.

Figura 2 – Estruturas químicas de outras drogas a base de platina utilizadas clinicamente.

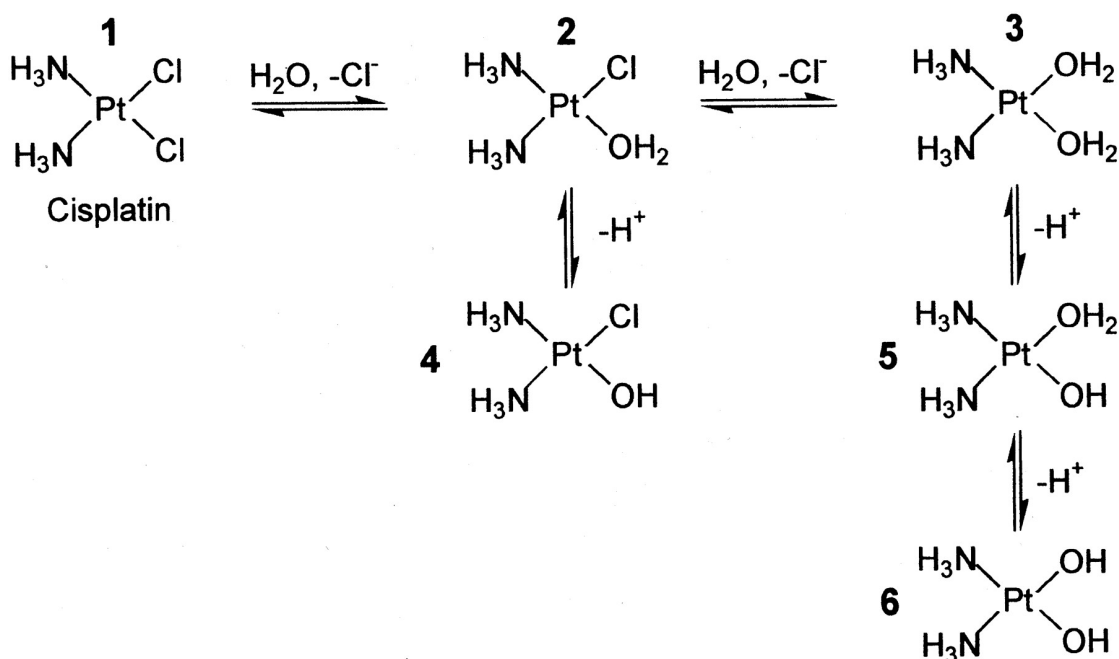


Fonte: ([DILRUBA; KALAYDA, 2016](#))

## 2.2 Mecanismo de Ação

O mecanismo de ação da cisplatina reside no fato de que quando as moléculas são internalizadas pela célula (normalmente via transporte passivo, porém alguns canais específicos também contribuem para o *uptake*<sup>1</sup> da droga, como o CTR1 (LIN et al., 2002)) elas realizam uma reação de hidrólise bastante específica com as moléculas de água presentes no citoplasma, chamada de aquação. Nessa reação, átomos de cloro são substituídos por moléculas de água, resultando na produção de complexos monoaquosos  $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2\text{H}_2\text{O}]^+$  e diaquosos  $[\text{PtOH}_2(\text{NH}_3)_2]^+ - [\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ , como mostra a Figura 3. Esses complexos ainda podem perder  $\text{H}^+$  e ficar em estado de carga neutro. Os produtos da aquação então reagem com a estrutura química do DNA, se ligando em bases nitrogenadas específicas e, portanto, interferindo no processo de replicação do DNA e levando a uma possível morte celular. Esse fenômeno é chamado de *crosslinking*, e é o principal mecanismo de dano que as moléculas de cisplatina induzem nas células. Estudos *in vitro* já demonstraram que o complexo monoaquoso de platina é mais reativo que os diaquosos em se tratando de ligação às bases nitrogenadas (DAVIES; BERNERS-PRICE; HAMBLEY, 2000). Um esquema do mecanismo de ação da cisplatina pode ser observado na Figura 4. Importante mencionar que a reação de aquação é muito mais facilitada quanto menor for a concentração de cloreto do meio, e por isso ela ocorre majoritariamente quando a cisplatina é internalizada, já que dentro da célula a concentração de cloreto varia de 4 a 12 mM e fora é de aproximadamente 100 mM.

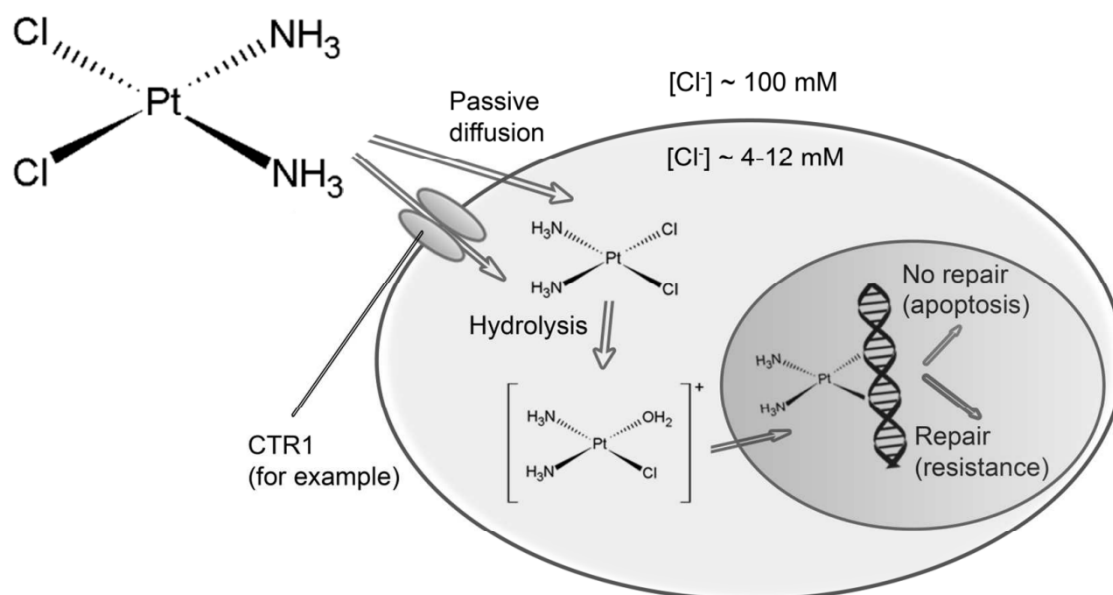
Figura 3 – Reações de aquação da cisplatina com as moléculas de água e os possíveis complexos mono e diaquosos que são formados.



Fonte: (DABROWIAK; GOODISMAN; SOUID, 2002)

<sup>1</sup>Termo em inglês utilizado para se referir a internalização da droga na célula.

Figura 4 – Esquema mostrando o mecanismo de ação da cisplatina.



Fonte: (BROWNING et al., 2017)

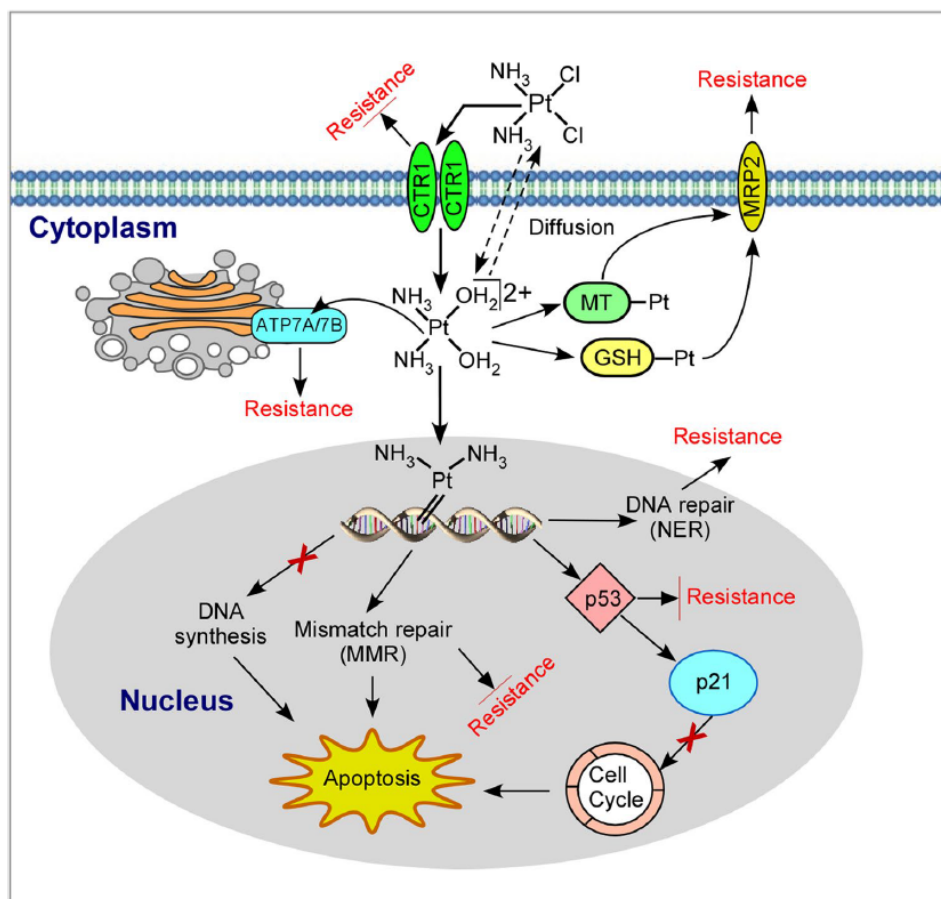
O dano induzido no DNA não é o único mecanismo pelo qual a cisplatina pode desencadear processos apoptóticos. A interação e a reação da cisplatina com outras proteínas também têm sido associada a danos celulares. Em particular, a indução de estresse oxidativo devido a produção de radicais livres durante o tratamento com cisplatina pode levar a danos e disfunções nas mitocôndrias, peroxidação lipídica, ativação de vias apoptóticas e outros efeitos deletérios (BROWNING et al., 2017). Esse também é um dos motivos pelo qual o tratamento com cisplatina possui severos efeitos colaterais. Recentes descobertas sobre novos mecanismos de ação da cisplatina, como por exemplo ferroptose, serão comentadas posteriormente nesse capítulo.

### 2.3 Mecanismos de Resistência

Apesar da cisplatina ser reconhecidamente um medicamento eficaz contra uma gama de diferentes tipos tumores, alguns estudos já mostraram que muitos pacientes não respondem ao tratamento com essa quimioterapia (GO; ADJEI, 1999). Isso acontece quando as células do tumor não morrem devido a aplicação do medicamento, podendo então desenvolver resistência contra a droga. Nesse contexto, a presença intrínseca ou aquisição da resistência celular diante da cisplatina é uma grande barreira para que a terapia seja mais eficiente (ALDOSSARY, 2019). A resistência celular advém de principalmente três fatores: redução da acumulação da droga dentro da célula, isto é, baixa taxa de internalização da molécula, ou alta taxa de efluxo, inativação das moléculas de cisplatina devido a interação com outros compostos de

dentro da célula, como por exemplo a glutationa (GSH), e mecanismos de reparo que o sistema celular possui para reparar os danos causados pela droga, principalmente no DNA. Um esquema mostrando todos os mecanismos comentados acima podem ser observados na [Figura 5](#). Cada um deles será elucidado nas seções abaixo.

Figura 5 – Esquema mostrando os principais mecanismos de resistência frente a cisplatina.



Fonte: (DILRUBA; KALAYDA, 2016)

### 2.3.1 Redução da Acumulação da Droga

A redução da acumulação da droga intracelularmente acontece devido a baixa taxa de *uptake* ou a alta taxa de efluxo. Esses dois processos refletem os principais mecanismos de tolerância frente a terapia à base de drogas de platina. Os canais de transporte presentes na membrana plasmática, como o transportador de cobre 1 ou 2 (CTR1 ou CTR2), a proteína 2 associada à resistência a múltiplas drogas (MRP2) e as duas ATPases 7A e 7B do tipo P de extrusão de cobre, são moduladores importantes no transporte de cisplatina que foram encontrados alterados ou desregulados em muitas células cancerosas malignas (PLENCHETTE; PAUL; BETTAIEB, 2017).

Já foi demonstrado que células deficientes em canais do tipo CTR1 possuem tolerância contra cisplatina (ISHIDA et al., 2002). Além disso, resultados clínicos indicam uma correlação

entre a expressão elevada de CTR1 e uma maior sobrevivência em média em pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC) tratados com agentes quimioterápicos à base de platina (cisplatina ou carboplatina). Assim, acredita-se que a regulação positiva da expressão de CTR1 ou o aumento da sua eficiência poderia representar uma estratégia interessante para melhorar a sensibilidade das células cancerosas a quimioterápicos à base de platina (PLENCHETTE; PAUL; BETTAIEB, 2017).

As ATPases do tipo P de extrusão de cobre, ATP7A e ATP7B, também participam do transporte da cisplatina. Estudos detalhados mostraram que a ATP7A sequestra a cisplatina em estruturas vesiculares impedindo a distribuição posterior da droga, enquanto que a ATP7B é responsável pelo efluxo da cisplatina. Foi relatado que esses transportadores são regulados positivamente em células cancerosas resistentes à cisplatina, e os pacientes com altos níveis de ATP7A e ATP7B tiveram sobrevida global significativamente pior (DILRUBA; KALAYDA, 2016).

### 2.3.2 Inativação da Cisplatina

Como já comentado, quando as moléculas de cisplatina são internalizadas elas sofrem uma reação de aquação, gerando complexos monoaquosos e diaquosos. Essas espécies formadas podem reagir com compostos nucleofílicos (doadores de elétrons) que estão presentes no citoplasma, como por exemplo a glutatona (GSH), metionina (Met) e outras proteínas ricas em cisteína. Com isso, ocorre um esgotamento de antioxidantes no citoplasma, resultando em estresse oxidativo para a célula. Por outro lado, esses compostos nucleofílicos atuam como neutralizadores da ação da cisplatina, limitando a quantidade de moléculas que se ligariam ao DNA, e portanto aumentando a resistência da célula frente a droga (DILRUBA; KALAYDA, 2016). Já foi observado que níveis elevados de GSH ou de GSH-S-transferase, uma enzima que participa do acoplamento da cisplatina a GSH, está presente em células resistentes à cisplatina (GALLUZZI et al., 2011). Também já foi relatado que os conjugados de platina-GSH são prontamente excretados das células pela MRP2, ou seja, essa proteína também desempenha um papel importante na resistência à cisplatina, aumentando o efluxo da droga (BORST et al., 2000).

### 2.3.3 Reparo de Danos no DNA

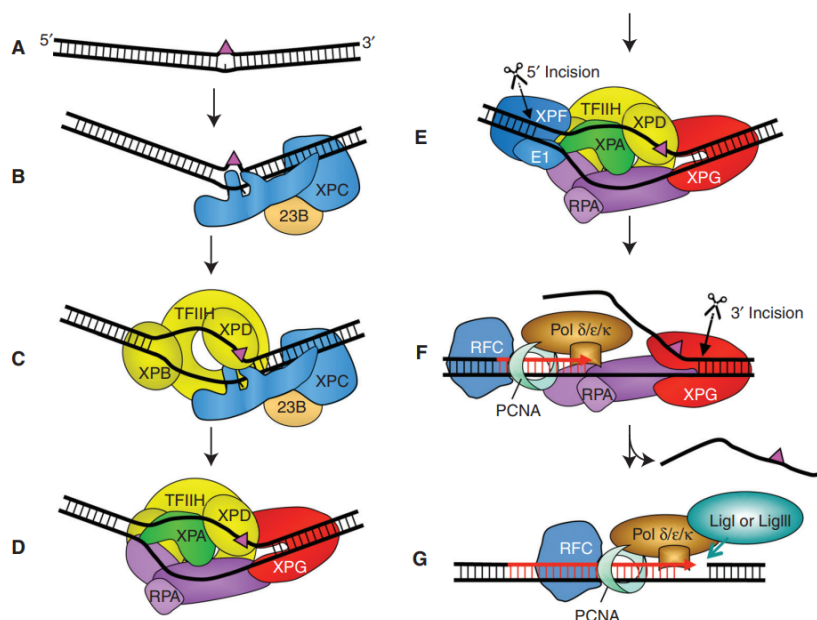
Outro mecanismo que influencia na resistência celular frente a cisplatina é o reparo dos danos causados no DNA. Dentre os vários processos, o reparo por excisão de nucleotídeos (NER) é considerado como sendo a via principal para remoção dos adutos de platina e consequentemente de reparo do dano (ROCHA et al., 2018). A importância do NER já foi demonstrada em diversos trabalhos, e os resultados apresentados mostraram que defeitos nesse mecanismo causam hipersensibilidade à cisplatina, porém, quando a integridade do NER é restaurada há um restabelecimento da sensibilidade a níveis normais (FURUTA et al., 2002). Por outro lado, um aumento na efetividade do NER leva a uma maior resistência (GALLUZZI

et al., 2011). O mecanismo de reparo de incompatibilidade do DNA (MMR) também já foi associado a resistência contra a droga. Apesar desse mecanismo não atuar nos adutos de platina, ele age para reparar outros tipos de danos no DNA e, após falhar em realizar o reparo, processos apoptóticos são iniciados. Baixa expressão ou mutação nos genes que codificam agentes que agem nesse mecanismo de reparo são constantemente documentados no contexto de resistência a cisplatina (VAISMAN et al., 1998).

#### 2.3.3.1 Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER)

O reparo por excisão de nucleotídeos (NER) é a principal via responsável pela remoção de lesões no DNA induzidas por irradiação UV, agentes ambientais externos e algumas drogas quimioterápicas (SCHARER, 2013). Esse mecanismo elimina várias lesões de DNA por uma reação do tipo "corte e remendo". Existem duas sub-vias possíveis para esse mecanismo: NER de genoma global e NER acoplado a transcrição. A primeira está associada a prevenção de mutagênese, pois esse processo investiga o genoma em busca de lesões que estão distorcendo as hélices do DNA, enquanto que a segunda investiga as lesões que estão bloqueando o processo de transcrição do DNA, e assim evitando a morte celular. Consequentemente, defeitos no NER de genoma global estão associados a pré-disposição de câncer, na medida em que defeitos no NER acoplado a transcrição causam diversas doenças, como ultra sensibilidade a radiação UV e envelhecimento precoce (MARTEIJN et al., 2014). Um esquema do NER pode ser observado na Figura 6.

Figura 6 – Esquema mostrando os principais passos no NER. Em A é mostrado o dano, representado pelo triângulo roxo, em B o dano é identificado pelas proteínas, em C e D ocorre o recrutamento de outras proteínas para que seja formado um complexo facilitador da remoção do dano, em E ocorre o corte na hélice onde o dano estava contido, e, por fim, em F e G o dano é efetivamente reparado.



Fonte: (SCHARER, 2013)

#### 2.4 Estudo *in vitro* Envolvendo Cisplatina

Antes que alguma droga seja testada em organismos vivos, é sempre importante que os seus mecanismos de ação sejam completamente avaliados em modelos *in vitro*, que na maioria dos casos são feitos com células. Os modelos *in vitro* fornecem um ponto de partida para os pesquisadores coletarem informações sobre como as células respondem à droga em um ambiente controlado e isolado. Os resultados obtidos nos experimentos *in vitro* são normalmente difíceis de serem extrapolados para algum efeito clínico, por isso o próximo passo são os estudos *in vivo* (DORNELL, 2021).

Estudos *in vitro* de cisplatina são extremamente relevantes para que se tenha melhor compreensão de como o medicamento interage com as células cancerosas. Apesar de já se ter bastante conhecimento a respeito dessa droga, e ela já ser utilizada clinicamente desde a década de 70, ainda há algumas questões em aberto sobre como se dá essa interação. Em particular, na seção seguinte, será discutido um novo mecanismo de ação que foi descoberto há apenas 4 anos. Os mecanismos celulares de defesa, apesar de também já terem sido exaustivamente estudados, ainda não estão completamente elucidados.

Doses típicas de estudos *in vitro* de cisplatina variam de 1 a 10  $\mu\text{M}$ , normalmente (JEYNES et al., 2010). Alguns trabalhos buscam extrapolar e utilizar doses mais altas para



observar se a interação é a mesma ou se diferentes fenômenos acontecem com doses extremas (TANAKA et al., 2010; LIN et al., 2021).

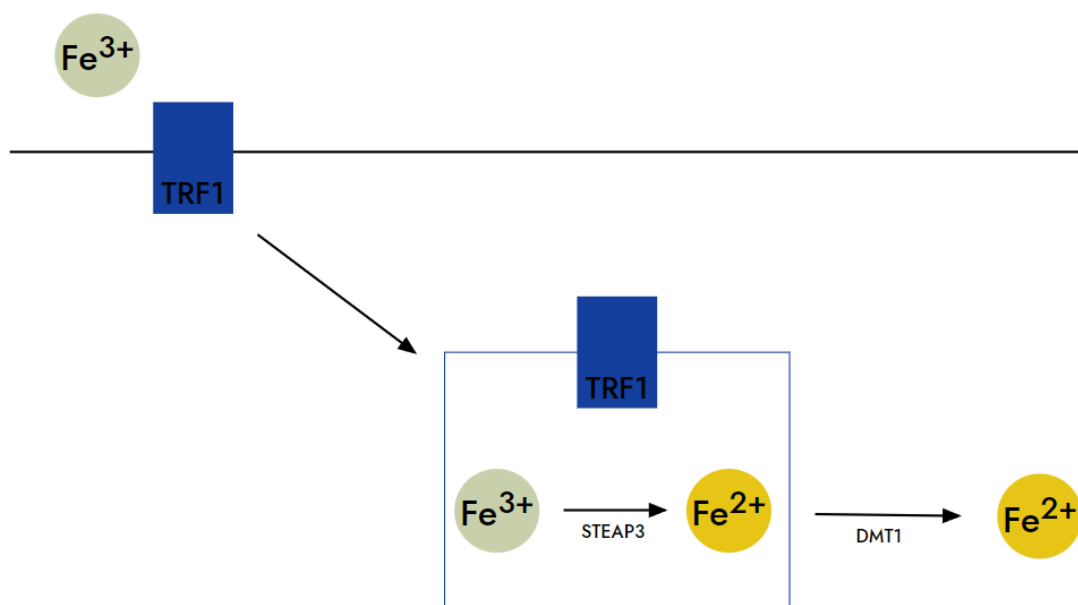
## 2.5 Descobertas Recentes sobre a Cisplatina

Por muito tempo, achava-se que os mecanismos de ação da cisplatina eram restritos a indução de apoptose na célula devido a danos no DNA, como mencionado na Seção 2.2. Porém, em 2018, um grupo de pesquisadores mostrou fortes evidências (GUO et al., 2018) que indicam que a cisplatina também induz ferroptose, um tipo de morte celular induzida por alta concentração de ferro no meio intracelular. Para que se possa compreender esse novo mecanismo de ação da droga, é necessário primeiro entender como se dá o metabolismo de ferro nas células e os danos que podem ser causado devido a essa anormalidade.

### 2.5.1 Metabolismo de Ferro

Os íons de ferro que estão no meio extracelular normalmente são internalizados pelo receptor transferrina 1 (TRF1). Ao passar por esse receptor, que possui um endossomo acoplado em sua estrutura, os íons de ferro que estavam em estado de carga 3+ passam a ficar em estado de carga 2+, devido a ação da enzima STEAP3. Posteriormente, eles são liberados do endossomo para o citoplasma com o auxílio da proteína DMT1. Esse processo é esquematizado na Figura 7 abaixo (CRICHTON, 2016).

Figura 7 – Esquema mostrando a internalização de íons de ferro. A linha horizontal representa a membrana celular e o retângulo acoplado ao TRF1 o endossomo.

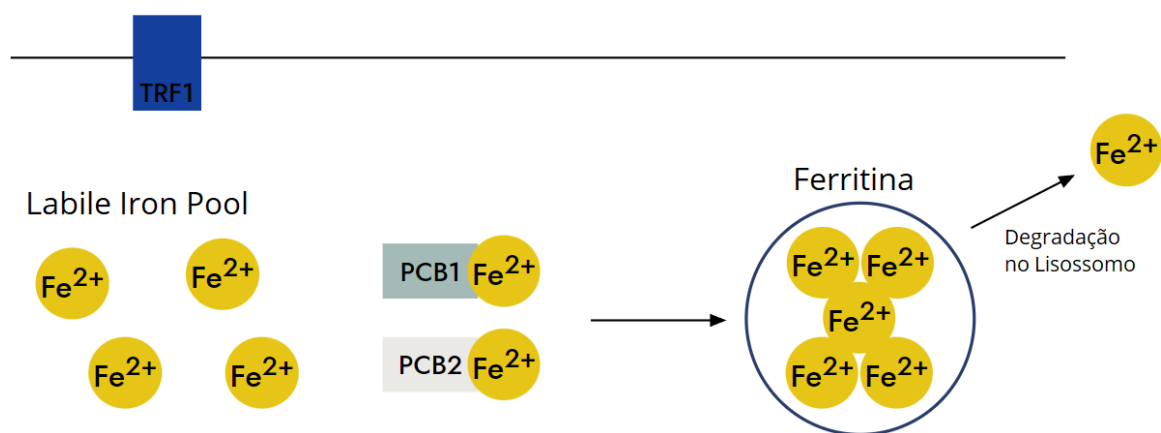


Fonte: Próprio autor

Ao ingressar no citoplasma, esse íons de ferro acabam se aglomerando no que é chamado de *labile iron pool*, um complexo extremamente reativo, capaz de participar de

diversas reações de oxirredução e, conseqüentemente, produzir espécies reativas de oxigênio (ROS), que são extremamente danosas para a célula. Para que essas reações não ocorram de maneira desenfreada, as proteínas PCB1 e PCB2 transportam esses íons de ferro até a ferritina, uma proteína que os armazena. Quando a célula necessita de ferro, a ferritina é degradada no lisossomo e os íons que estavam armazenados podem ser utilizados para algum processo celular. Caso em excesso, os íons de ferro podem ainda ser excretados para o meio extracelular pelo transportador ferroportina. A [Figura 8](#) demonstra o processo descrito acima ([CRICHTON, 2016](#)).

Figura 8 – Esquema mostrando o metabolismo de íons ferro no citoplasma.



Fonte: Próprio autor

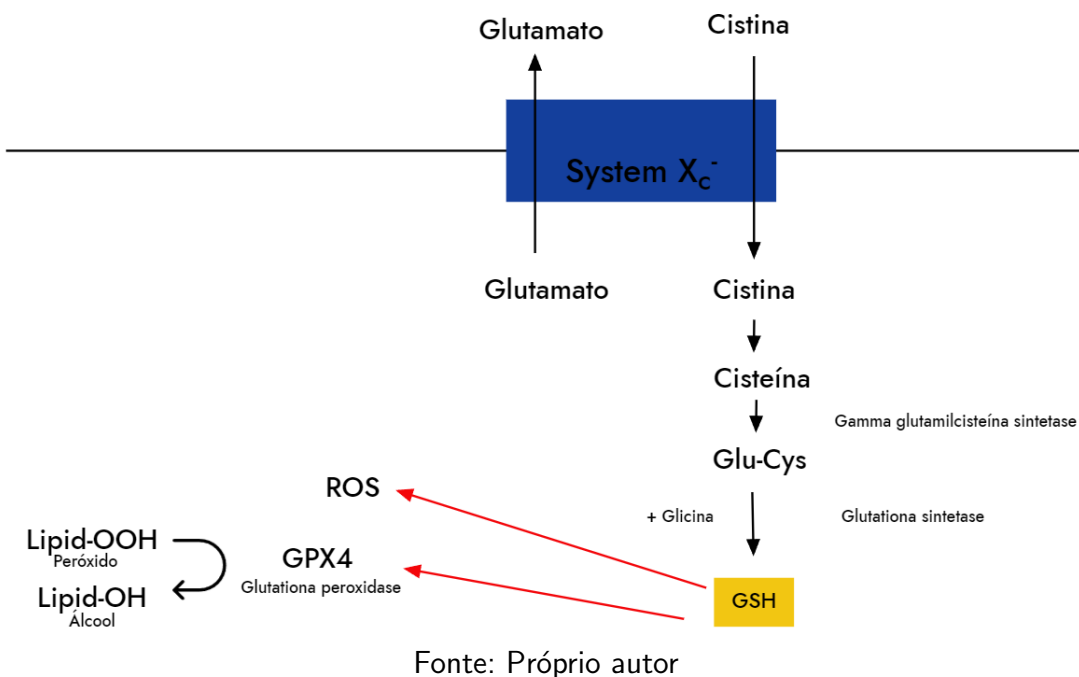
### 2.5.2 Mecanismos Antioxidantes da Célula

Como mencionado na [Subseção 2.5.1](#), os íons de ferro presentes na célula são extremamente reativos e participam ativamente de reações redox, produzindo espécies reativas de oxigênio, que, se não neutralizadas, podem causar danos irreparáveis para uma célula. Um dos mecanismos antioxidantes mais importantes que existe é o que envolve a glutathiona (GSH), uma biomolécula de alta importância para as células. A GSH é sintetizada a partir de uma cadeia de reações, que começa a partir do transportador de aminoácidos System  $X_c^-$ , onde uma molécula de cistina é trocada por uma molécula de glutamato. A cistina então é convertida para cisteína, depois para  $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteína, e por fim para GSH. A GSH ainda pode sofrer outras reações para dar origem a glutathiona peroxidase (GPX4), uma enzima essencial para que os lipídios da membrana da célula não fiquem peroxidados ([Lü et al., 2009](#)).

Como se pode perceber, a GSH possui uma dupla função na célula: neutralizar as espécies reativas de oxigênio e dar origem a GPX4, que atua na checagem dos lipídios da membrana celular. Caso os lipídios estejam peroxidados, e o sistema celular não consiga desperoxidá-los, a membrana começa a perder permeabilidade, fazendo com que, em casos

extremos, ocorra o seu rompimento e, conseqüentemente, a morte da célula. Todo esse processo pode ser observado esquematicamente na [Figura 9](#) (Lü et al., 2009).

Figura 9 – Esquema mostrando a síntese de GSH a partir do transportador de aminoácidos System X<sub>c</sub><sup>-</sup> e suas funções na célula.



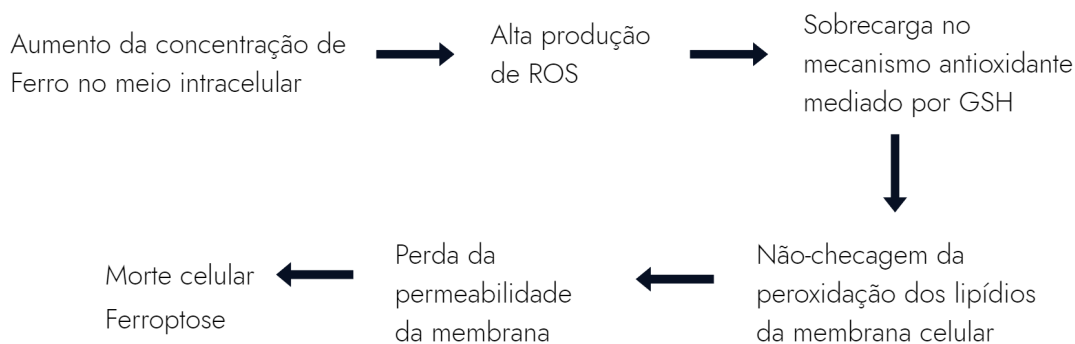
### 2.5.3 Ferroptose

A ferroptose é um processo que, como o próprio nome já remete (ferro + apoptose), induz morte celular devido a alta concentração de íons de ferro no meio intracelular. O aumento considerável de íons de ferro pode se dar por principalmente três motivos: uma alta expressão de canais TRF1, facilitando, assim, a entrada dos íons para dentro da célula; uma baixa expressão ou má formação das proteínas PCB1 e PCB2, resultando no não-armazenamento desses íons na ferritina; uma baixa expressão de canais ferroportina, dificultando a excreção dos íons em excesso para o meio extracelular (WU et al., 2020).

Caso algum dos mecanismos que promova uma maior concentração de ferro dentro da célula ocorra, mais reações de oxirredução ocorrerão e, portanto, mais espécies reativas de oxigênio serão formadas. Com essa alta produção de ROS, acontece uma sobrecarga no mecanismo antioxidante mediado por glutaciona, fazendo com que a maioria das moléculas de GSH sejam utilizadas para neutralizar os radicais livres formados, não sobrando uma quantidade significativa para se transformar em glutaciona peroxidase. Sem GPX4 suficiente, não ocorre a checagem dos lipídios da membrana plasmática, ou seja, não haverá um mecanismo de desperoxidação desse lipídios, fazendo com que a membrana perca sua permeabilidade e acabe se rompendo, dando origem a ferroptose, um tipo de morte celular completamente independente

e diferente da apoptose convencional. De maneira muito resumida, o processo de ferroptose pode ser observado abaixo, na [Figura 10](#) (WU et al., 2020).

Figura 10 – Esquema resumido do processo de ferroptose.



Fonte: Próprio autor

#### 2.5.4 Cisplatina e a Ferroptose

Em 2018, foi publicado pela primeira vez que a cisplatina era capaz de induzir ferroptose (GUO et al., 2018). Os pesquisadores mostraram que, ao silenciar uma proteína que participa ativamente do processo da ferroptose, parte da citotoxicidade da cisplatina era perdida, isto é, o número de células vivas após o tratamento era maior quando comparado com um grupo de células que não sofreu o silenciamento. Esse efeito foi observado em duas das cinco linhagens celulares analisadas. Além disso, eles revelaram que a cisplatina levou a uma diminuição na concentração de glutathiona intracelular, principalmente devido a alta afinidade que compostos a base de platina possuem com moléculas que contém o radical tiol em sua composição, como é o caso da GSH. Alta concentração de ferro também foi observada nos experimentos realizados, porém a causa desse aumento de concentração ainda é desconhecida.

Essa interação da cisplatina com a GSH é extremamente curiosa, pois até então, como mencionado na [Subseção 2.3.2](#), esse mecanismo era associado com resistência celular, devido a inativação da molécula de cisplatina. Porém, com esses novos resultados mostrando que a indução de ferroptose possui um papel considerável na citotoxicidade da droga, e que a ligação da cisplatina com a GSH causa um esgotamento dessa molécula para realizar ação antioxidante e checagem dos lipídios da membrana, tem-se um cenário dúbio, em que não se sabe até hoje ao certo se a ligação da cisplatina com a molécula de GSH é benéfica para a célula devido a inativação da droga ou maléfica devido ao esgotamento dos mecanismos antioxidantes e de checagem de peroxidação lipídica. O efeito dessa interação, seja ele benéfico ou maléfico para a célula, deve estar intrinsecamente ligado a linhagem celular, visto que a ferroptose só foi observada em algumas linhagens, que no caso do trabalho citado (GUO et al., 2018), foram de tumores pulmonar (linhagem A549) e de cólon (linhagem HCT116).

Outro ponto a se ressaltar é que todos os mecanismos de resistência que a célula possui contra a cisplatina, isto é, redução de acumulação de droga, inativação da molécula no

citoplasma e reparo de danos no DNA, afetam apenas a indução de apoptose convencional, mas não influenciam na ferroptose. Portanto, a ferroptose, entendida como uma morte celular completamente independente da apoptose, pode abrir um novo caminho para que se possa resolver o problema da resistência dos tumores frente a cisplatina, levando a tratamentos mais eficientes e menos tóxicos para os pacientes (GUO et al., 2018).

Recentemente também foi publicado um artigo de revisão mostrando como a ferroptose pode ser utilizada para tratar especificamente glioblastomas, na medida em que os atuais métodos de tratamento (cirurgia seguida de radioterapia/quimioterapia convencional) normalmente não são suficientes, fazendo com que os pacientes tenham em média de 12 a 15 meses de vida após o diagnóstico do tumor (MITRE et al., 2022). Em resumo, esse novo mecanismo de ação envolvendo ferro, que agora já foi mostrado que também é induzido pela cisplatina, pode representar um avanço nos métodos tradicionais de combate ao câncer.

## 2.6 Interação de Íons com a Matéria

Íons interagem majoritariamente por três mecanismos com a matéria: espalhamento inelástico, em que não há conservação de energia cinética, espalhamento elástico, em que há conservação de energia cinética e interações nucleares não-elásticas. Um esquema desses três mecanismos pode ser observado na [Figura 11](#). É de suma importância entender as interações que ocorrem, pois elas ditam o comportamento e a trajetória dessas partículas ao interagirem com um alvo.

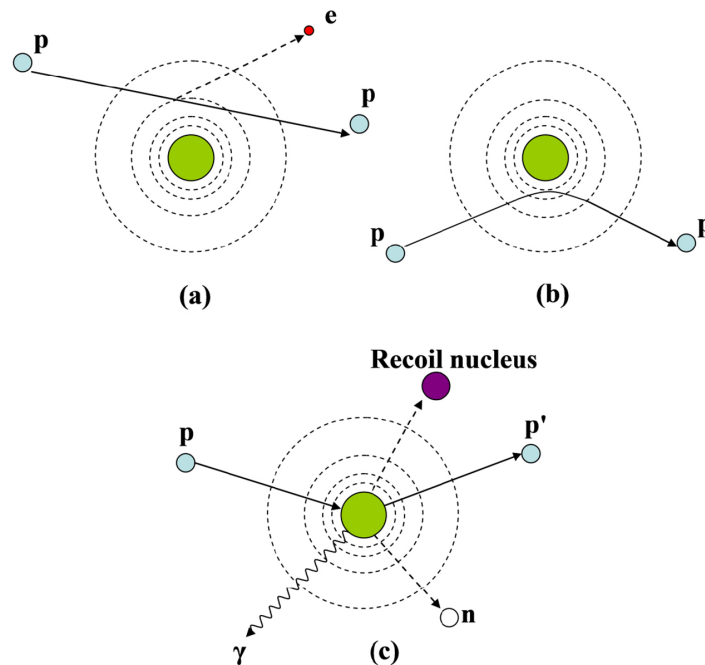
Em uma primeira aproximação, íons perdem energia cinética continuamente via espalhamentos inelásticos com os elétrons do átomo alvo. Como a massa de repouso dos íons é de, no mínimo, 3 ordens de grandeza maior que a do elétron, eles viajam em praticamente uma linha reta, sem ter sua trajetória defletida. Porém, caso se aproximem do núcleo, ocorrerá espalhamento elástico, resultando em deflexão na trajetória, pois a massa do núcleo é comparável com a massa dos íons. Essas duas interações são as mais comuns, mas ainda existe a probabilidade de ocorrer reação nuclear, isto é, os íons penetrarem no núcleo do átomo alvo e fazer com ele emita partículas (próton, deutério, trítio, nêutron, etc) e/ou radiação gama. Por fim, radiação *Bremsstrahlung*, que é a emissão de radiação eletromagnética devido ao freamento de partículas carregadas, também é possível (NEWHAUSER; ZHANG, 2015).

### 2.6.1 Perda de Energia

A perda de energia de íons na matéria é um fator determinante para se entender como se dá sua interação com o meio. Como o íon perde sua energia ( $E$ ) por unidade de distância percorrida ( $x$ ) dentro do alvo, a perda de energia em um material, que normalmente é referenciada como poder de freamento ou força de freamento, é definida como  $dE/dx$ .

Um íon energético percorrendo um material perde sua energia principalmente via dois processos considerados independentes: perda de energia nuclear e perda de energia eletrônica.

Figura 11 – Principais interações de íons com a matéria. Em (a) ocorre espalhamento inelástico com a eletrosfera do átomo, em (b) espalhamento elástico coulombiano repulsivo com o núcleo do átomo e em (c) reação nuclear não-elástica com o núcleo do átomo alvo resultando na emissão de partículas secundárias.



Fonte: (NEWHAUSER; ZHANG, 2015)

Logo, o poder de freamento pode ser separado em poder de freamento nuclear e poder de freamento eletrônico. Portanto, pode-se escrever a perda de energia total ( $S$ ), como sendo:

$$S = \left(\frac{dE}{dx}\right) = \left(\frac{dE}{dx}\right)_n + \left(\frac{dE}{dx}\right)_e = S_n + S_e, \quad (1)$$

onde o subíndice  $n$  indica a perda de energia nuclear e o subíndice  $e$  indica a perda de energia eletrônica.

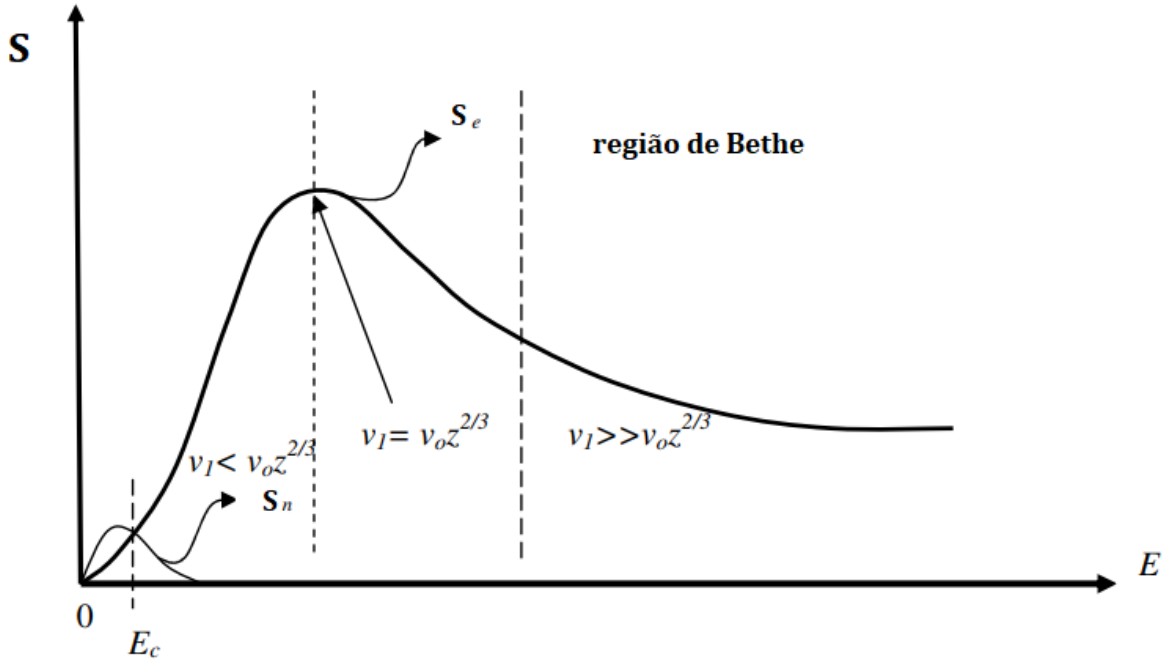
Além disso, pode-se associar o poder freamento com a densidade do material alvo ( $\rho$ ), dando origem a grandeza chamada de *Stopping Cross Section*, como mostra a [Equação \(2\)](#).

$$\frac{S}{\rho} = -\frac{1}{\rho} \frac{dE}{dx} \quad (2)$$

A independência do freamento nuclear e do freamento eletrônico sugere que o poder de freamento total seja extremamente dependente da energia do íon, ou de sua velocidade, pois a energia é praticamente toda cinética. A [Figura 12](#) mostra os dois regimes comentados em função da energia do íon e a relação com sua velocidade.

O poder de freamento nuclear domina para baixas energias, enquanto que para altas energias, o eletrônico é mais influente. A perda de energia eletrônica começa a dominar a partir da energia crítica ( $E_c$ ), alcança um máximo e decai até chegar na região de *Bethe*, que governa o comportamento para altas energias. A [Figura 13](#) mostra uma ampliação na região

Figura 12 – Dependência das contribuições eletrônica e nuclear para a perda de energia total em função da energia do íon incidente. A equação de Bethe (Equação (3)) descreve bem o comportamento para altas energias.  $v_1$  é a velocidade do íon,  $v_0$  é a velocidade de Bohr e  $z$  o número atômico do íon. As linhas tracejadas verticais delimitam a região de médias energias e  $E_c$  é a energia na qual a contribuição eletrônica passa a ser mais relevante que a nuclear.



do freamento eletrônico e a Equação (3) descreve a *stopping cross section* para altas energias (fórmula de *Bethe*).

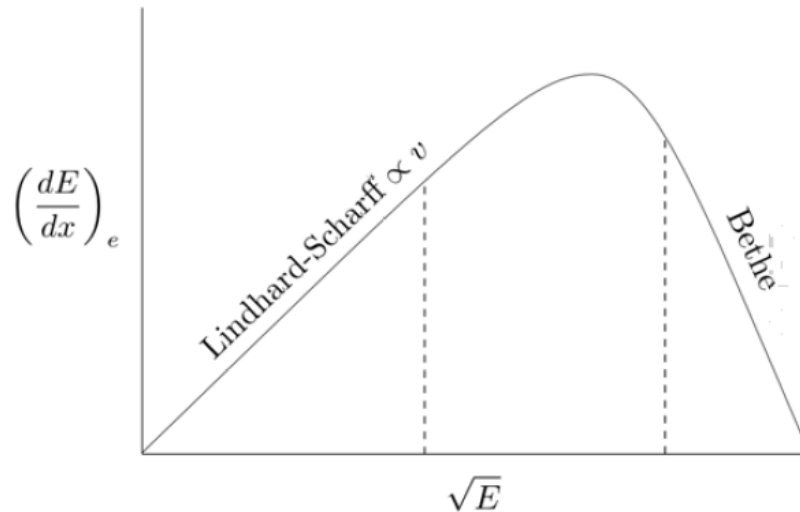
$$\frac{S}{\rho} = -\frac{dE}{\rho dx} = 4\pi N_A r_e^2 m_e c^2 \frac{Z z^2}{A \beta^2} \left[ \ln \frac{2m_e c^2 \gamma^2 \beta^2}{I} - \beta^2 - \frac{\delta}{2} - \frac{C}{Z} \right] \quad (3)$$

Onde  $N_A$  é o número de Avogadro,  $r_e$  é o raio de interação clássico do elétron,  $m_e$  é a massa do elétron,  $z$  é a carga do íon incidente,  $Z$  é o número atômico do material alvo,  $A$  é o peso atômico do material alvo,  $c$  é a velocidade da luz no vácuo,  $\beta = \frac{v}{c}$ , onde  $v$  é a velocidade do íon incidente,  $\gamma = (1 - \beta^2)^{-\frac{1}{2}}$ ,  $I$  é o potencial médio de excitação do material alvo,  $\delta$  é a correção da densidade levando em conta o efeito de blindagem dos elétrons, que é importante para altas energias e  $C$  é o fator de correção devido às camadas eletrônicas, que é importante para baixas energias, quando a velocidade do íon incidente é próxima da velocidade dos elétrons do material alvo. O físico Felix Bloch também deu uma contribuição importante para fórmula acima, mostrando que o potencial médio de excitação pode ser aproximado por

$$I = (10 \text{ eV}) \times Z \quad (4)$$

Substituindo esse valor na Equação (3), tem-se a famosa fórmula de *Bethe-Bloch*.

Figura 13 – Regimes da perda de energia eletrônica. Para íons com baixas velocidades a perda de energia é proporcional a sua velocidade (região de *Lindhard-Scharff*), enquanto que para íons com altas velocidades a perda de energia decresce com o aumento da energia cinética (região de *Bethe*).



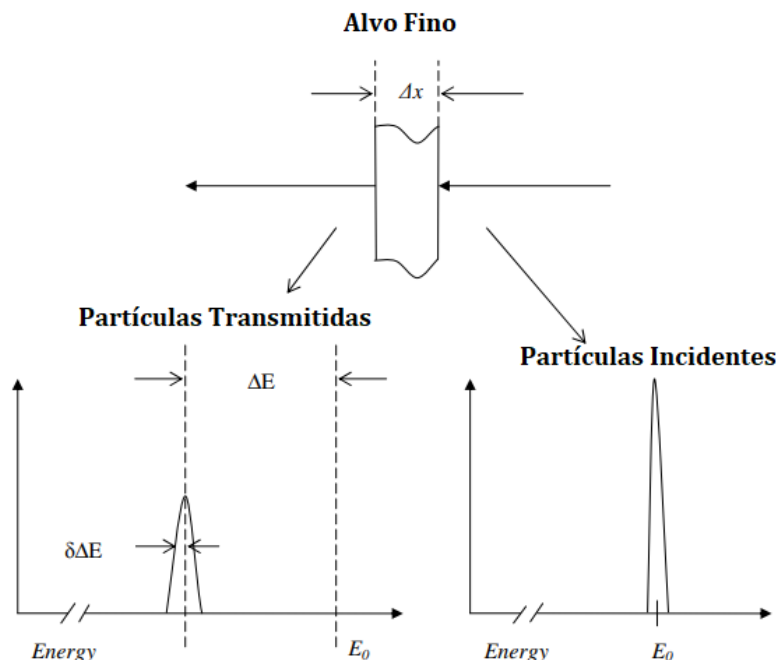
Fonte: (BACKMAN, 2012)

#### 2.6.1.1 *Stragling de Energia*

Íons energéticos penetrando em um material perdem sua energia por diversas interações com os átomos do alvo, o que acaba resultando em flutuações estatísticas. Isso implica que íons idênticos com a mesma energia inicial possuem diferentes energias finais ao atravessar uma profundidade  $\Delta x$  de um mesmo material. Logo, a quantidade de energia que o íon perdeu ( $\Delta E$ ) está sujeita a flutuações. Essa natureza discreta dos processos de perda de energia, resultando em incerteza na própria energia e na sua propagação, é conhecida como *stragling* e é retratada na Figura 5.



Figura 14 – Um feixe monoenergético com energia  $E_0$  perde uma quantidade  $\Delta E$  de energia ao atravessar um alvo fino de espessura  $\Delta x$ . Simultaneamente, ocorre o *straggling* de energia, alargando a linha espectral em  $\pm\delta\Delta E$ .



## 2.7 A Técnica de *Particle-Induced X-Ray Emission* (PIXE)

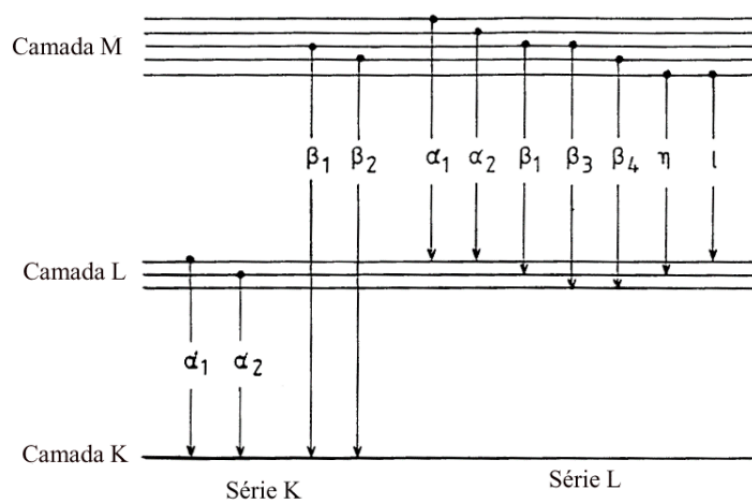
### 2.7.1 Princípios Físicos

A técnica de PIXE consiste na emissão de raios X induzidos por um feixe de partículas carregadas. Normalmente, prótons são acelerados por um acelerador de partículas com energia entre 2 a 3 MeV e incidem sobre uma amostra. A interação dos prótons com a amostra gera diversos fenômenos físicos, sendo um deles a ionização dos átomos alvo. Essa ionização é causada devido a uma grande quantidade de energia transferida para os elétrons, fazendo com que a energia de ligação seja superada e eles sejam ejetados. Tal processo gera, então, vacâncias nas camadas eletrônicas dos átomos alvo, que são preenchidas por elétrons que transicionam de camadas mais externas.

A transição eletrônica de elétrons de camadas mais externas para camadas mais internas pode ser radiativa (emissão de um fóton na faixa de energia dos raios X) ou não (emissão de um elétron Auger). Como a técnica de interesse é o PIXE e não a espectroscopia de elétrons Auger (AES), o foco será dado nas transições radiativas. Medindo os raios X provenientes das ionizações geradas é possível, portanto, identificar a composição elementar da amostra, visto que as energias das camadas eletrônicas dependem dos elementos químicos em questão e já estão tabeladas na literatura.

Nas transições radiativas, a energia do fóton emitido é igual a diferença de energia das camadas dos elétrons que participaram da transição. Para facilitar o entendimento, foram dados nomes às transições eletrônicas de acordo com as camadas. Por exemplo, se a vacância se encontra na camada K, os raios X emitidos são chamados de raios X K, e são divididos em dois grupos:  $K_{\alpha}$  (que diz respeito a um elétron da camada L que transiciona para a camada K) e  $K_{\beta}$  (que diz respeito a um elétron da camada M que transiciona para a camada K). Existe ainda um subgrupo dos raios X K ( $K_{\alpha_1}$ ,  $K_{\alpha_2}$ ,  $K_{\beta_1}$  e  $K_{\beta_2}$ ), que diz respeito a qual subcamada participou da transição, referenciada pelo subíndice. Agora, caso a vacância a ser preenchida pertença a camada L, teremos os raios X L. Como a camada L possui mais subcamadas que a camada K, os raios X L são divididos em mais componentes que os raios X K. As transições comentadas nesse parágrafo podem ser observadas esquematicamente na [Figura 15](#) (JOHANSSON et al., 1995).

Figura 15 – Transições eletrônicas possíveis entre os elétrons das camadas K e L.

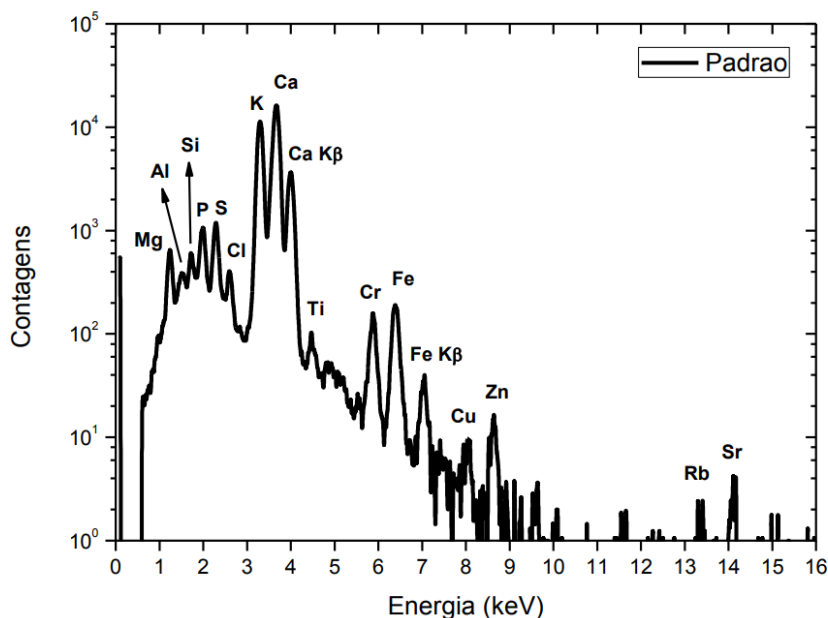


Fonte: (JOHANSSON et al., 1995)

### 2.7.2 Espectros de PIXE

Os espectros de PIXE são apresentados com a intensidade dos raios X característicos (contagens, em unidades arbitrárias) em função da sua energia (normalmente em keV). Existem diversos fatores e fenômenos que podem modificar um espectro de PIXE, que serão explicitados nas subseções seguintes. Abaixo se encontra um típico espectro de PIXE para constar como exemplo.

Figura 16 – Espectro típico de PIXE, com as contagens em função da energia dos raios X característicos gerados. A amostra em questão é um padrão utilizado para calibração do sistema.



Fonte: (NIEKRASZEWICZ, 2014)

### 2.7.2.1 Comparação entre feixe de prótons e elétrons

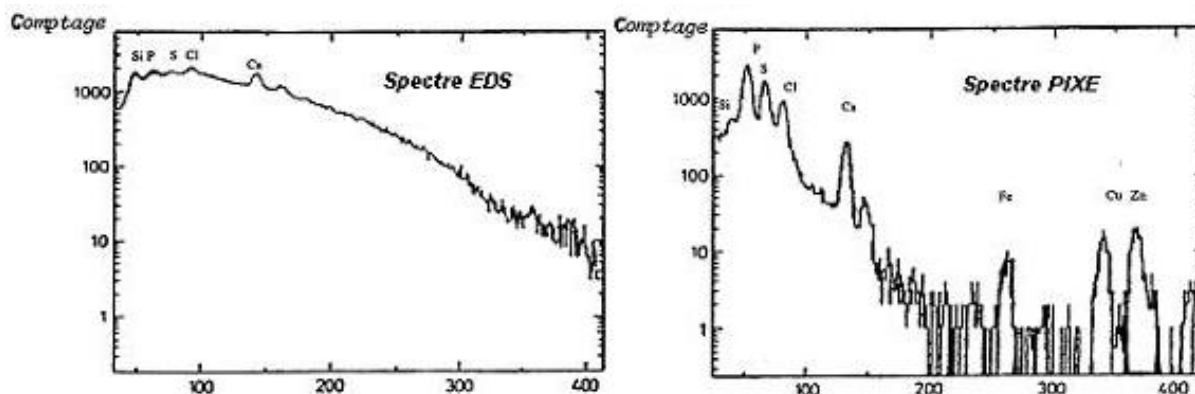
A principal diferença do PIXE quando comparado a outras técnicas semelhantes (EDS<sup>2</sup>, por exemplo) é que o feixe incidente é de prótons, e não de elétrons. Apesar do feixe de ambas as partículas perder energia majoritariamente devido a espalhamentos inelásticos com os elétrons da amostra, há algumas diferenças consideráveis entre os dois projéteis. Um feixe de prótons possui massa 1836 vezes maior do que os elétrons da amostra, enquanto que um feixe de elétrons possui massa igual. Por essa razão, em cada espalhamento os prótons perdem apenas uma pequena fração de sua energia cinética e sua trajetória praticamente não é defletida, na medida em que elétrons sofrem deflexão na trajetória em grandes ângulos e perdem uma grande fração de sua energia cinética (JOHANSSON et al., 1995).

Quando uma carga elétrica é desacelerada, radiação eletromagnética é emitida (radiação de Bremsstrahlung). Tanto em um espectro gerado por feixe de prótons, quanto de elétrons, a principal fonte de fundo é a radiação de freamento. Porém, quando comparamos os dois projéteis a diferença é bastante significativa. Em termos clássicos, a intensidade de produção de Bremsstrahlung é proporcional a raiz quadrada da desaceleração sofrida pela partícula carregada, e portanto também ao termo  $(F/m)^2$ , onde F é o módulo da força eletrostática e m a massa da partícula. Uma vez que a força sofrida é a mesma, mas as massas diferem por um fator de 1836, em uma aproximação inicial e sem muito rigor, existe  $1836^2$  vezes mais fundo em

<sup>2</sup>Do inglês, *Energy Dispersive Spectroscopy*

um espectro gerado por um feixe de elétrons do que por um feixe de prótons (JOHANSSON et al., 1995) Uma comparação entre os dois espectros pode ser observada abaixo na Figura 17.

Figura 17 – Comparação entre um espectro de raios X gerado por um feixe de elétrons (esquerda) e por um feixe de prótons (direita).



Comparison between EDS and PIXE analysis.

Fonte: (ARCANE, 2020)

Com um pouco mais de rigor, a seção de choque de produção de Bremsstrahlung para um feixe iônico é dada por:

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \frac{cA_p Z_p^2 Z^2}{E_p E_x} \left( \frac{Z_p}{A_p} - \frac{Z}{A} \right)^2 \quad (5)$$

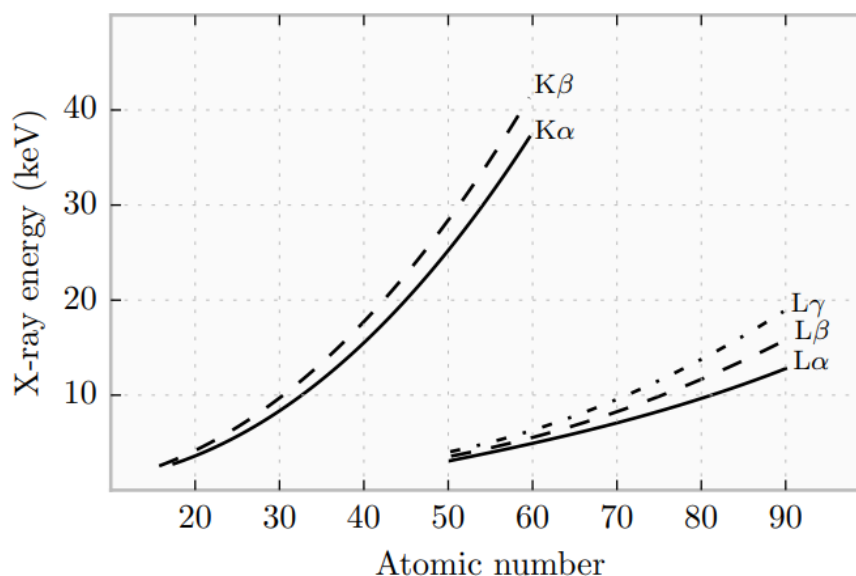
Onde  $c$  é uma constante,  $Z_p$ ,  $A_p$  e  $E_p$  são o número atômico, massa atômica e energia do projétil,  $Z$  e  $A$  referem-se ao alvo e  $E_x$  é a energia do fóton de Bremsstrahlung emitido.

### 2.7.2.2 A relevância dos detectores no espectro

Outro ponto interessante de comentar a respeito dos espectros de PIXE é que eles são extremamente sensíveis as condições experimentais, principalmente do detector de radiação. Devido a resolução em energia, transições com energias próximas acabam ficando sobrepostas em um mesmo pico, como por exemplo o dublete  $K_{\alpha_1}$  e  $K_{\alpha_2}$ . Além disso, algumas transições com baixa probabilidade de acontecerem são costumadamente não-distinguíveis do fundo de Bremsstrahlung. As linhas que podem ser observadas no espectro também são dependentes do detector, que na maioria das vezes é um detector de estado sólido de Si(Li). Esse detector possui uma eficiência intrínseca que varia com a energia, fazendo com que, apesar das seções de choque de produção de raios X característicos e regras de seleção permitirem determinadas transições, não é possível observá-las no espectro. Tal fenômeno faz com que elementos leves sejam melhor observados pelas linhas K e elementos médio-pesados e pesados pelas linhas L e

M, respectivamente. Em casos onde é necessário medir a linha K de elementos mais pesados, pode-se usar um detector de germânio hiperpuro (HPGe), em que a eficiência é mantida para energias maiores (FERRO, 2021). Abaixo (Figura 18) se encontra um gráfico mostrando como a energia dos raios X K e L variam com o número atômico. Essas curvas são de suma importância para saber quais linhas são mais adequadas para serem medidas em um determinado *setup* experimental.

Figura 18 – Energia das principais transições K e L em função do número atômico do elemento químico.

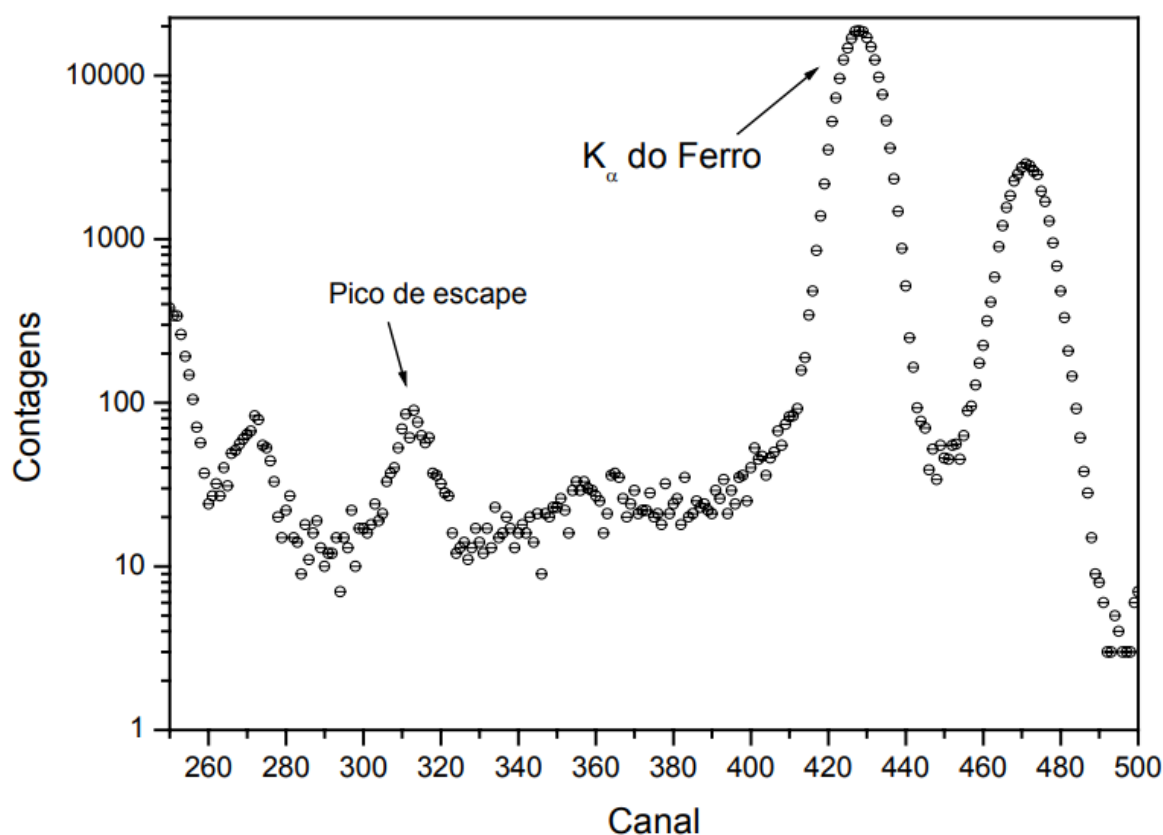


Fonte: (FERRO, 2021)

### 2.7.2.3 Picos de Escape

Picos de escape ocorrem quando um átomo de silício do detector de Si(Li) emite um raio X devido a transição de um elétron de uma camada externa para a camada K. Esse fóton emitido pode escapar do volume de detecção, resultando em um pequeno pico no espectro, com energia igual a  $E_0 - E_{Si}$ , onde  $E_0$  é a energia original do pico do elemento químico em questão e  $E_{Si} = 1,74$  keV. Como a intensidade da linha K $\beta$  do Silício é aproximadamente 3% da intensidade da linha K $\alpha$ , normalmente só o pico de escape da linha K $\alpha$  é considerado (REED; WARE, 1972). A Figura 19 demonstra como os picos de escape podem ser observados em um típico espectro de PIXE medido por um detector de Si(Li).

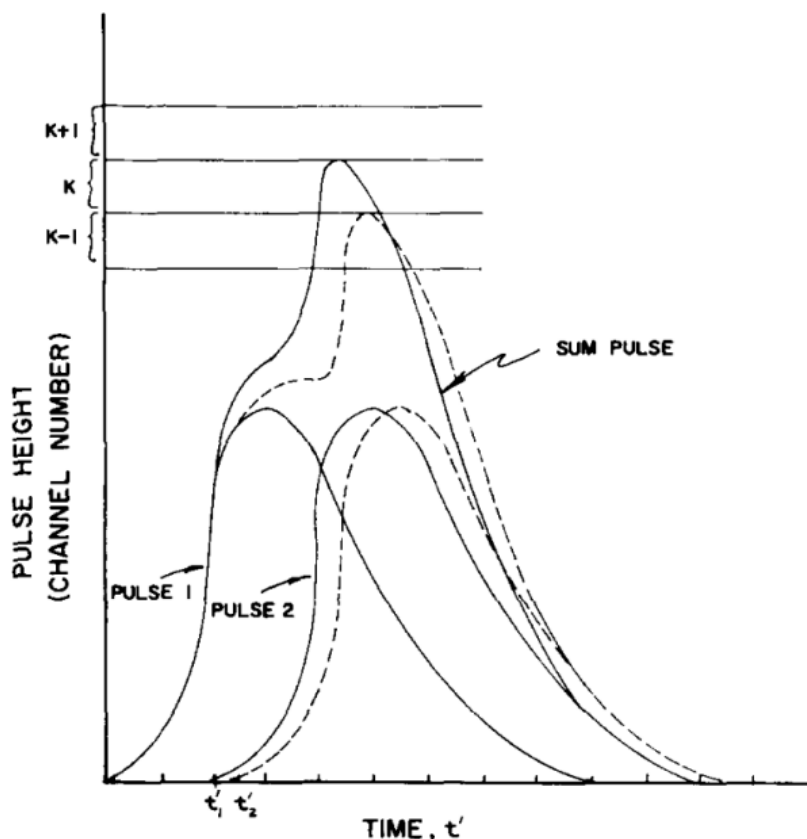
Figura 19 – Espectro obtido por PIXE a partir de uma amostra de ferro com um detector de Si(Li), mostrando o pico de escape.



Fonte: (GIULIAN, 2005)

#### 2.7.2.4 Pile-Up

Os fótons de raios X produzidos pela ionizações dos átomos alvo chegam ao detector em intervalos de tempo espaçados aleatoriamente. Deste modo, é possível que dois fótons consecutivos entrem no volume de detecção em um curto intervalo de tempo e sejam registrados como uma única contagem. Como resultado desse fenômeno, os dois eventos inicialmente independentes não são separados, causando uma distorção no espectro. Esse efeito é chamado de *Pile-Up*, e é extremamente sensível à eletrônica empregada no sistema. Normalmente os sistemas de PIXE possuem circuitos eletrônicos específicos para diminuir esse efeito e gerar os espectros mais fidedignos possíveis. Abaixo se encontra a [Figura 20](#) em que se pode observar o efeito de *Pile-Up* e como ele pode distorcer picos inicialmente independentes ([FERRO, 2021](#)).

Figura 20 – Efeito de *Pile-Up* de dois pulsos independentes.

Fonte: (WIELOPOLSKI; GARDNER, 1976)

### 2.7.3 Vantagens e desvantagens da técnica de PIXE

Depois de descrever os principais pontos da técnica de PIXE e dos espectros gerados, podemos, sucintamente, enumerar algumas das vantagens e desvantagens da técnica (LLABADOR; MORETTO, 1998).

#### Vantagens:

- Análise multi-elementar, rápida e quantitativa;
- Alta sensibilidade para a maioria dos elementos da tabela periódica. O limite de detecção mínimo está na ordem das partes por milhão (p.p.m) ou menor;
- Técnica não-destrutiva, talvez apenas com a exceção de amostras biológicas que serão irradiadas com feixe de alta corrente por um longo intervalo de tempo.

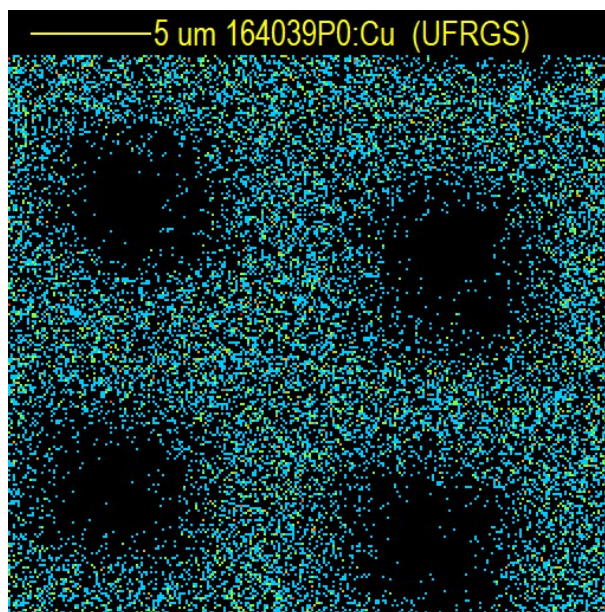
#### Desvantagens:

- Necessidade de possuir um acelerador de partículas;
- Diminuição rápida da seção de choque de produção das linhas K quando o número atômico aumenta. Para elementos com Z alto, torna-se necessário usar a detecção de linhas L que garantem seções de choque mais altas;
- Não fornece informação a respeito do ambiente químico da amostra.

## 2.8 A técnica de $\mu$ -PIXE

Em se tratando de princípios físicos, a técnica de  $\mu$ -PIXE é exatamente igual a técnica de PIXE, a única, porém importante e relevante diferença, é que o feixe de prótons incidente possui dimensão micrométrica. Dessa maneira, a resolução espacial do experimento é significativamente maior quando se trabalha com o microfeixe. Além disso, é possível, devido a um sistema de varredura, gerar mapas elementares 2D da amostra. Conforme os fatores mencionados, a técnica de  $\mu$ -PIXE se mostrou, ao longos dos anos, extremamente versátil e capaz de conduzir análises interdisciplinares de diversos campos da ciência, como: biologia, geologia, química, eletrônica, entre outros. A [Figura 21](#) mostra um exemplo do tipo de mapa que pode ser obtido em um experimento de  $\mu$ -PIXE. Outras técnicas envolvendo microfeixe também podem ser utilizadas concomitantemente com o  $\mu$ -PIXE, como por exemplo o  $\mu$ -RBS<sup>3</sup> e o STIM<sup>4</sup>, podendo deixar a análise mais completa ainda. Procedimentos experimentais de como se obter um feixe micrométrico e detalhes da linha de microfeixe iônico do LII serão comentados no [Capítulo 3](#).

Figura 21 – Mapa de Cobre da grade que é utilizada para medir a dimensão do feixe.



<sup>3</sup>Do inglês, *Rutherford Backscattering Spectrometry*

<sup>4</sup>Do inglês, *Scanning Transmission Ion Microscope*



### 3 MÉTODOS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

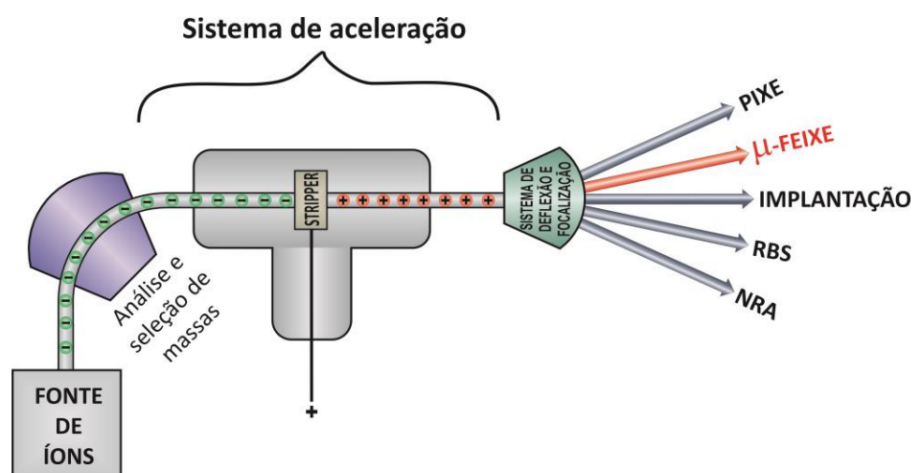
#### 3.1 O Acelerador de Partículas

Como já mencionado, os experimentos foram realizados no LII-UFRGS utilizando o acelerador de partículas *Tandem 3 MV*, que foi responsável por gerar os íons  $H^+$  incidentes na amostra. Para a obtenção desses prótons, gás hidrogênio é introduzido numa região com intenso campo magnético, onde ocorre a produção de íons  $H^-$ . Os íons gerados pela fonte são injetados no acelerador por um sistema de lentes magnéticas e fendas mecânicas, responsáveis por selecionar os íons de acordo com suas massas e direcioná-los até o terminal positivo do acelerador. Nesse caso os íons negativos são atraídos pelo potencial positivo. Já no terminal positivo, eles perdem seus elétrons em um *stripper* gasoso de gás nitrogênio, tornando-se íons  $H^+$ . Após a aceleração, um sistema de deflexão e focalização direciona-os para uma das linhas experimentais (NIEKRASZEWICZ, 2014). A pressão nas linhas do equipamento é da ordem de  $10^{-7}$  mbar, o que configura alto vácuo. Uma foto do acelerador pode ser vista na [Figura 22](#) e um esquema da produção dos íons e das técnicas disponíveis no laboratório na [Figura 23](#). O presente trabalho fez uso apenas da técnica de  $\mu$ -PIXE.

Figura 22 – Acelerador *Tandetron 3 MV* do LII-UFRGS.



Figura 23 – Esquema representativo do acelerador de partículas e as principais técnicas do laboratório. Atualmente a técnica de MeV-SIMS também está integrada ao sistema.



Fonte: (NIEKRASZEWICZ, 2014)

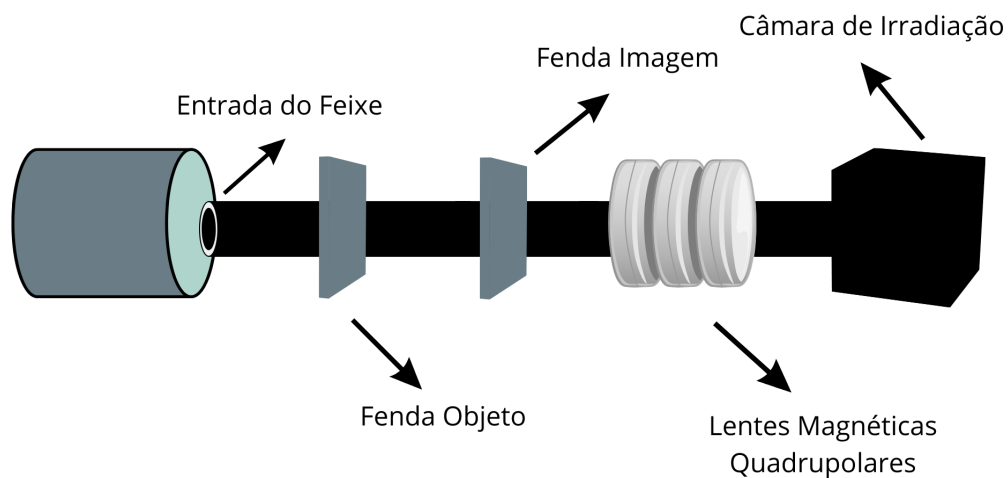
### 3.2 A linha de microfexe do LII

O microfexe é um feixe iônico com dimensões micrométricas devido a um sistema óptico de demagnificação e focalização. Para se obter um feixe com essas dimensões é necessário uma série de passos que serão descritos abaixo.

Ao entrar na linha de microfexe, o feixe de íons possui seção transversal da ordem de milímetros quadrados. A primeira etapa de redução do seu tamanho é feita na fenda objeto, que funciona como uma barreira física, limitando sua passagem. Posteriormente, ocorre uma segunda redução, na fenda imagem, que evita a passagem de feixes muito divergentes. Por fim, ainda existe uma última etapa de demagnificação que é feita por um sistema de lentes magnéticas que focalizam o feixe na dimensão desejada (NIEKRASZEWICZ, 2014). Um esquema do processo de focalização pode ser observado na Figura 24.

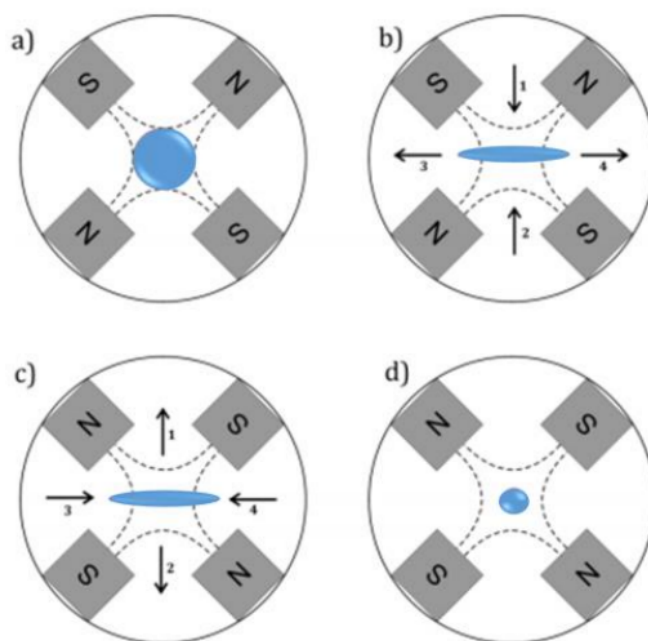
As lentes magnéticas que estão inseridas na linha de microfexe são do tipo quadrupolares. Um quadrupolo magnético é basicamente um eletroímã com quatro polos arranjados de maneira alternada ao redor da região por onde o feixe irá percorrer. Uma única lente produz uma focalização na horizontal, portanto para obter um formato pontual do feixe, é necessário uma combinação de pelo menos duas lentes quadrupolares com alternância de polaridade e intensidade. A Figura 25 mostra uma representação de focalização por meio de dois quadrupolos magnéticos.

Figura 24 – Esquema do processo de focalização do feixe na linha de microfexa iônico.



Fonte: Próprio Autor

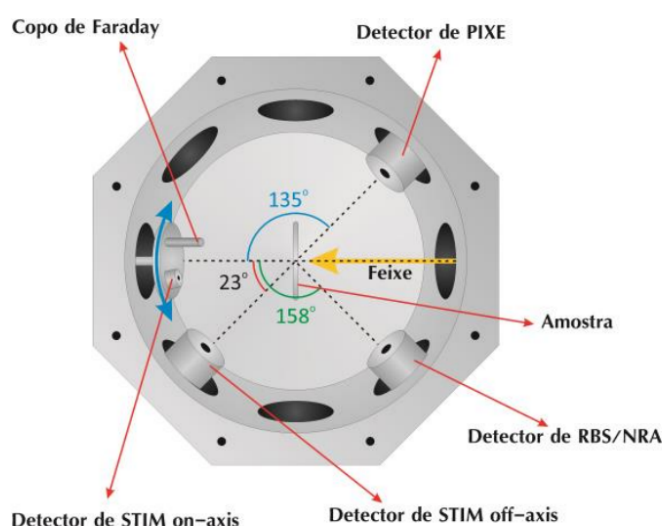
Figura 25 – Representação da focalização do feixe pela combinação de dois quadrupolos magnéticos. Em (a) é possível observar a entrada do feixe na primeira lente. Em (b) o feixe sofre a ação dos campos magnéticos, convergindo verticalmente, porém divergindo horizontalmente. Em (c), já na segunda lente, os polos estão arranjados de maneira invertida, promovendo, então, em (d), a convergência no formato pontual do feixe.



Fonte: (NIEKRASZEWICZ, 2014)

Além do sistema de focalização, outra parte essencial da linha de microfeixe é o sistema de detecção. Na câmara de irradiação existem detectores específicos para cada uma das técnicas presentes, sendo elas: PIXE, RBS/NRA e STIM. O posicionamento angular desses detectores também é de suma importância para as análises, pois o ângulo sólido é diretamente proporcional ao número de contagens que o detector registrará. A [Figura 26](#) mostra um esquema dos detectores e suas posições angulares presentes na câmara de irradiação da linha de microfeixe do LII. O detector utilizado para a técnica de  $\mu$ -PIXE é do tipo SDD<sup>1</sup> e o seu funcionamento será detalhado na [Subseção 3.2.1](#).

Figura 26 – Esquema representativo da câmara de reações da linha de microfeixe e seus detectores.



Fonte: (NIEKRASZEWICZ, 2014)

Para completar o sistema da linha de microfeixe existem módulos eletrônicos de aquisição de dados, controle e intensidade de corrente/tensão e varredura do feixe. O *software* utilizado para fazer a aquisição de dados e análise qualitativa dos espectros gerados é o OMDAQ. Já a análise quantitativa é feita com o *software* GUMAP.

### 3.2.1 Silicon Drift Detector (SDD)

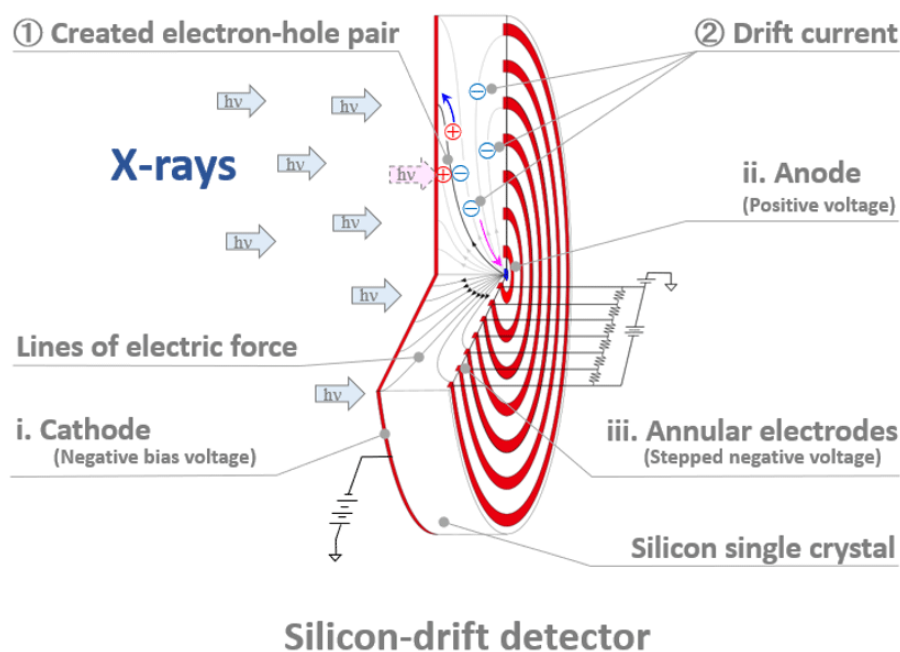
A detecção dos raios X na técnica de  $\mu$ -PIXE é feita utilizando os detectores SDD. O sensor possui área efetiva de 30 mm<sup>2</sup> e espessura de 450  $\mu$ m. Ele ainda conta com uma janela polimérica ultrafina revestida por alumínio e composta por Carbono, Nitrogênio e Oxigênio.

O princípio físico por trás da detecção é o efeito fotoelétrico, em que o fóton de raio X incidente é absorvido no bulk de Silício e gera pares elétron-lacuna. Um campo elétrico pré-estabelecido entre o contato de entrada e o ânodo de coleção de carga faz com que os

<sup>1</sup>Do inglês, *Silicon Drift Detector*

elétrons sejam transportados até o ânodo e as lacunas até o cátodo. A carga acumulada no ânodo é então convertida para tensão por um pré-amplificador, e a energia do raio X pode ser determinada através do monitoramento da magnitude da tensão após cada pulso. Importante ressaltar que a quantidade de portadores de carga gerados depende da energia do raio X incidente. Abaixo se encontra um esquema desse detector e do processo descrito acima.

Figura 27 – Esquema representativo do SDD. Em (1) os pares elétron-lacuna são criados, devido ao efeito fotoelétrico. Em (2) os elétrons são movidos até o ânodo e as lacunas até o cátodo em função da ação de um campo elétrico. A tensão  $V$ , que foi gerada pela carga  $Q$  acumulada é então medida. Já a carga  $Q$  é calculada utilizando a relação  $V = Q/C$ , onde  $C$  é a capacitância do detector. Por fim, o número de elétrons gerados por um fóton é calculado, e então a energia do raio X incidente pode ser obtida.



Fonte: (JEOL, 2020)

### 3.3 Calibração do Sistema de $\mu$ -PIXE

Os espectros gerados pela técnica de  $\mu$ -PIXE são primeiramente obtidos no formato Contagens (intensidade de determinado raio X) x Canal (uma unidade de armazenamento de dados que é proporcional a energia). Para transformar o eixo  $x$  do espectro em energia, é preciso realizar uma calibração. Uma segunda calibração que diz respeito a largura ( $\sigma$ ) dos picos também é necessária. Para calibrar o sistema, são medidos diversos padrões já conhecidos. Os procedimentos de como realizar as calibrações, bem como as curvas obtidas serão apresentados nas subseções seguintes. Abaixo se encontra uma tabela com os dados medidos dos padrões que serão utilizados na calibrações.

Tabela 3 – Tabela mostrando todos os padrões medidos e seus respectivos canais, transições escolhidas, energias e larguras. Espaços com “-” representam ajustes que obtiveram um  $R^2$  pequeno e portanto foram desconsiderados da análise.

| Elemento | Canal   | Linha        | Energia (keV) | Largura |
|----------|---------|--------------|---------------|---------|
| Mn       | 1777,55 | $K_{\alpha}$ | 5,9           | 16,23   |
| Ti       | 1389,21 | $K_{\alpha}$ | 4,51          | 15,16   |
| Ca       | 1159,92 | $K_{\alpha}$ | 3,69          | 13,52   |
| F        | 315,59  | $K_{\alpha}$ | 0,68          | 8,70    |
| K        | 1054,30 | $K_{\alpha}$ | 3,31          | 13,11   |
| Cl       | 860,33  | $K_{\alpha}$ | 2,62          | 12,27   |
| Ni       | 2220,63 | $K_{\alpha}$ | 7,48          | -       |
| Pb       | 3076,00 | $K_{\alpha}$ | 10,55         | -       |
| Cu       | 2377,98 | $K_{\alpha}$ | 8,05          | 18,85   |
| Al       | 541,21  | $K_{\alpha}$ | 1,48          | 10,60   |
| Ga       | 2718,20 | $K_{\alpha}$ | 9,25          | 19,01   |
| Ag       | 964,74  | $L_{\alpha}$ | 2,98          | 12,54   |

### 3.3.1 Calibração da Energia ( $E$ )

As grandezas canal e energia são diretamente proporcionais, portanto os dados podem ser bem ajustados por uma reta, dada pela equação abaixo:

$$Ch = A_1 + A_2 * E, \quad (6)$$

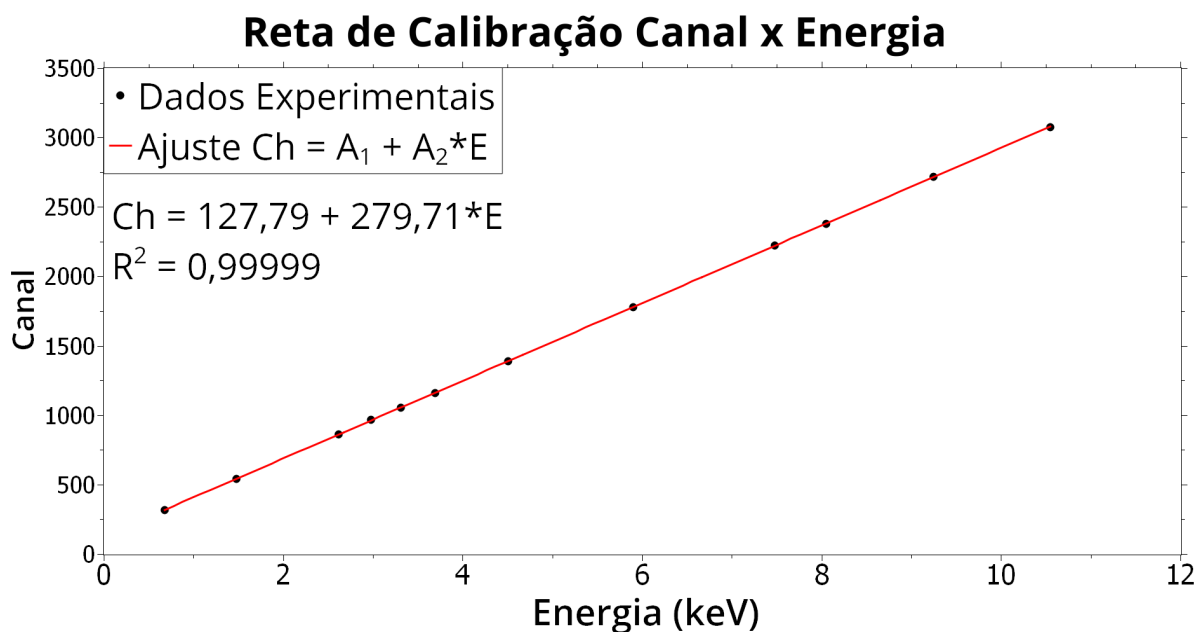
Onde  $A_1$  e  $A_2$  são os coeficientes linear e angular, respectivamente.

Com isso, pode-se plotar os pontos das colunas “Canal” e “Energia” da Tabela 3 e ajustar os dados com a Equação (6). O resultado está apresentado na Figura 28. Para ficar registrado em texto, a reta de calibração que converte canal em energia é:

$$Ch = 127,79 + 279,71 * E, \quad (7)$$

Portanto  $A_1 = 127,79$  e  $A_2 = 279,71$

Figura 28 – Reta de calibração que converte canal em energia.



### 3.3.2 Calibração da Largura ( $\sigma$ )

A segunda calibração que um espectro de PIXE necessita é a da largura ( $\sigma$ ) dos picos em função da energia. Diferentemente da calibração de Canal x Energia, nessa calibração as grandezas não são diretamente proporcionais, elas seguem a equação abaixo:

$$\sigma = \sqrt{A_4 + A_5 * E}, \text{ ou } \sigma^2 = A_4 + A_5 * E, \quad (8)$$

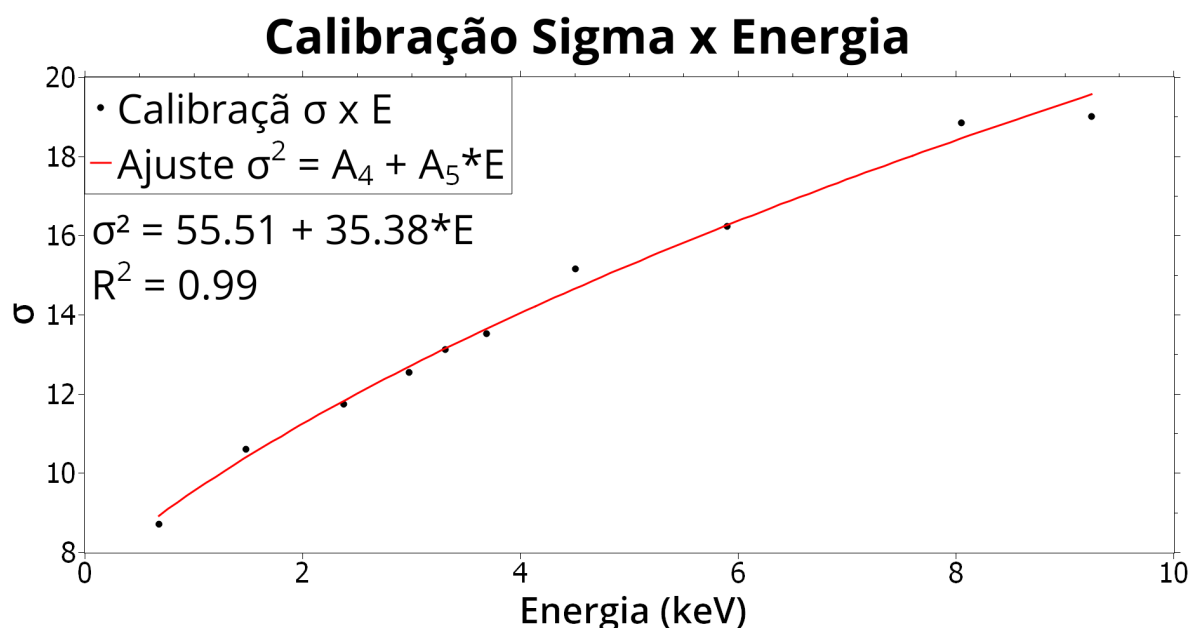
Onde  $A_4$  e  $A_5$  são os coeficientes do ajuste.

Com isso, pode-se plotar os pontos das colunas "Largura" e "Energia" da Tabela 3 e ajustar os dados com a Equação (8). O resultado está apresentado na Figura 29. Os dados da coluna "Largura" foram obtidos ajustando uma função Gaussiana em cada pico. Para ficar registrado em texto, a equação da curva que mostra a relação da largura do pico em função da energia é:

$$\sigma = \sqrt{55,51 + 35,38 * E}, \quad (9)$$

Portanto  $A_4 = 55,51$  e  $A_5 = 35,38$

Figura 29 – Curva de calibração que mostra a relação entre a largura ( $\sigma$ ) dos picos e sua energia ( $E$ ).



### 3.4 Experimentos de $\mu$ -PIXE

Todos os experimentos foram realizados utilizando o acelerador Tandem 3 MV, localizado no Laboratório de Implantação Iônica. A ideia desta seção é detalhar como foram feitos os experimentos de  $\mu$ -PIXE, fatores relevantes para a análise, preparação de amostra, e outros temas importantes para a compreensão da metodologia do trabalho.

#### 3.4.1 Parâmetros Experimentais do Feixe

Existem três parâmetros principais a respeito do feixe que devem ser levados em consideração nos dias de medida, sendo eles: energia, corrente e tamanho. Para os experimentos realizados a energia foi fixada em 2,2 MeV, pois é o padrão utilizado na linha de microfexe. Já a corrente e o tamanho do feixe variam em cada dia de medida, pois normalmente não se consegue ter total controle desses parâmetros. A corrente é monitorada por um medidor e variou de 40 a 100 pA durante os dias de medida. Já o tamanho do feixe era aproximadamente de  $1,2 \times 1,2 \mu\text{m}^2$ . O método utilizado para medir o tamanho do feixe será explicado abaixo.

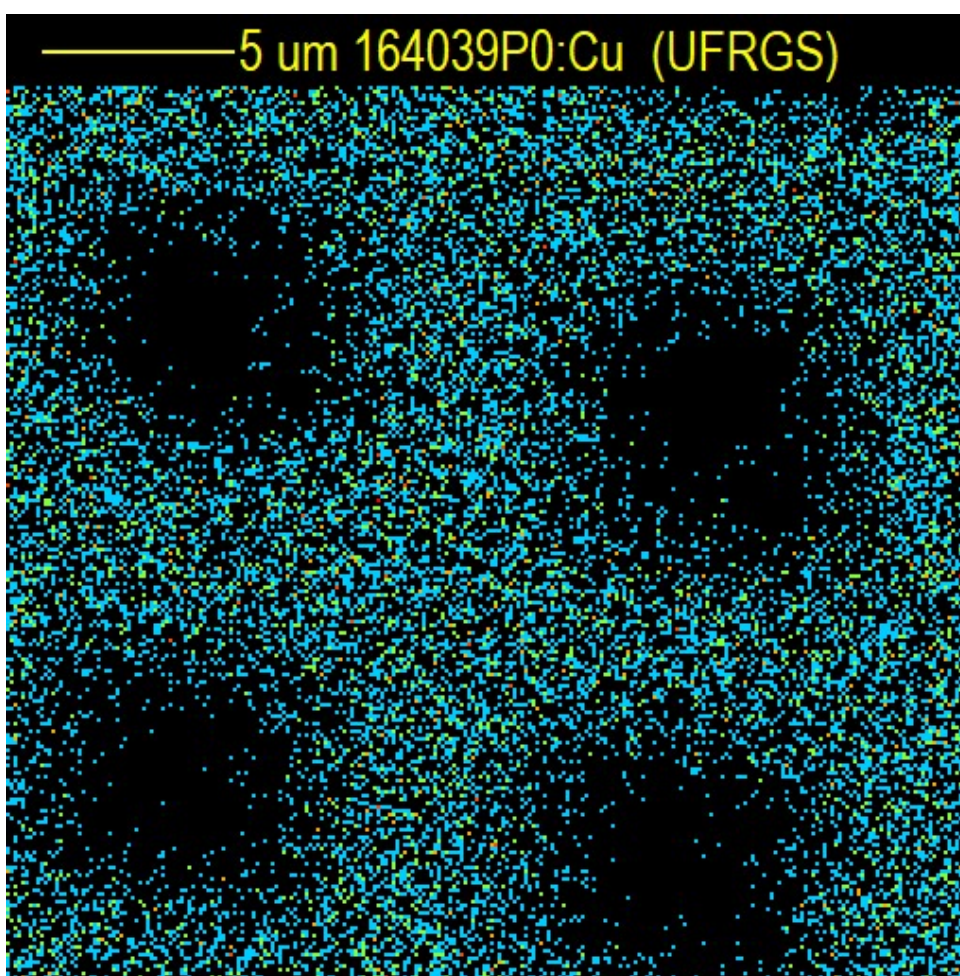
##### 3.4.1.1 Método para Medir o Tamanho do Feixe

A dimensão do feixe é um fator essencial, pois é ela que dará a resolução espacial do experimento. Portanto, é de suma importância que antes de iniciar qualquer medida seja feita uma estimativa do tamanho do feixe. O porta-amostra da linha de microfexe possui alguns artefatos acoplados a ele que servem para auxiliar nas medidas. Um desses artefatos é



uma grade de Cobre com lado de cada quadrado de aproximadamente  $7,5 \mu\text{m}$ . Assim, o que normalmente é feito, é posicionar o feixe na localização da grade e fazer uma varredura de  $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ . Somado a isso, seleciona-se no espectro as linhas K do Cobre a fim de fazer uma mapa 2D do elemento. A partir do mapa gerado, faz-se uma nova medição, agora do centro de um quadrado até outro, em ambos os sentidos (vertical e horizontal). A seguir, ajusta-se uma gaussiana em cada sentido e o tamanho do feixe é estimado a partir da diferença do ponto máximo e mínimo de cada gaussiana ajustada. A Figura 30 mostra o mapa de Cobre que é gerado quando esse procedimento é realizado corretamente.

Figura 30 – Mapa das linhas K do Cobre da grade utilizada para medir o tamanho do feixe em cada dia de medida do microfeixe.



#### 3.4.2 Preparação de Amostra

As amostras que foram medidas consistiam de células da linhagem U87 de glioblastoma humano fixadas em lamínulas de vidro. O termo fixado quer dizer que além das células estarem fixas na lamínula, elas se encontram com metabolismo celular paralisado e com estruturas

celulares preservadas. Elas não cultivadas no meio de cultura DMEM<sup>2</sup> suplementado com 10% de soro fetal bovino e ficam aderidas em recipientes propícios para cultura em uma estufa com atmosfera e temperatura controladas. O tamanho médio dessas células é de aproximadamente 12-14  $\mu\text{m}$ . O processo de preparação das amostras celulares será descrito abaixo.

Utiliza-se uma placa de 12 poços e se adiciona uma lamínula de vidro no fundo de cada poço que será utilizado. Após isso, os poços são lavados com água destilada 3 vezes e depois tratados com polilisina, adicionando cerca de 300  $\mu\text{L}$  por poço, o suficiente para cobrir o fundo dos mesmos. A polilisina é um composto que permite a adesão das células na lamínula, pois altera as cargas de superfície. Depois do tratamento com polilisina, a placa é incubada por 2 horas em uma estufa a 37° C, e posteriormente a polilisina é removida e os poços lavados mais 3 vezes com água destilada. Em seguida, o plaqueamento celular é realizado: cerca de 10.000 células da linhagem U87 de glioblastoma humano são colocadas em cada poço. Nos dias seguintes são realizados os tratamentos com cisplatina, que no caso do presente trabalho foram com 3 concentrações distintas: 10, 20 e 100  $\mu\text{M}$ , sendo o tempo de tratamento fixado em 24h para todas as concentrações. Por fim, para fixar as células na lamínula, lava-se os poços 2 vezes com PBS<sup>3</sup>, adiciona metanol a -20° C e incuba novamente por 20 minutos. Ao final do tempo, o metanol é removido e as lamínulas são lavadas mais 2 vezes com PBS e deixadas para secar no ar.

### 3.4.3 Software de Aquisição de Dados OMDAQ

O software utilizado pelo sistema do microfeixe é o OMDAQ, desenvolvido pela *Oxford Microbeams* ([MICROBEAMS, 2021](#)). Ele possui diversas funcionalidades que auxiliam na medida e permitem também realizar uma análise qualitativa. Em relação a medida, ele está conectado com o sistema de varredura, permitindo com que seja possível escolher a área da varredura, tipo de varredura, tempo de medida, entre outras características. Além disso, informações como a carga total depositada na amostra e corrente do feixe também são mostradas.

Em se tratando da análise qualitativa, o programa oferece a opção de gerar os espectros, tanto de PIXE, quanto de RBS, enquanto a medida está ocorrendo, sendo possível observar o crescimento do espectro em tempo real e quais elementos químicos estão presentes na amostra. A opção de criar mapas 2D elementares em determinadas regiões do espectro também é uma das funcionalidades mais importantes, pois assim é possível identificar regiões espaciais de interesse na amostra.

---

<sup>2</sup>Do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, é uma das variantes mais amplamente difundidas do meio Eagle. O DMEM é uma modificação do *Basal Medium Eagle* (BME) que contém quatro vezes a concentração de aminoácidos e vitaminas. Além disso, a formulação também inclui glicina, serina e nitrato férrico.

<sup>3</sup>Do inglês, *Phosphate-buffered saline*, é uma solução salina utilizada para controle de pH.

#### 3.4.4 Características dos Experimentos

Nos dias de medida foi pensado em uma sistemática padrão para tentar manter as análises o mais coerente possível. As amostras eram retiradas das placas de cultura onde estavam armazenadas e colocadas no porta amostra da linha de microfeixe. Após o vácuo de dentro da câmara estar estabilizado, o experimento podia iniciar.

A ideia era começar com uma varredura inicial de  $150 \times 150 \mu\text{m}^2$  e depois focar em uma região menor ( $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ ) para observar as células com uma magnificação maior. O tempo das varreduras iniciais foi de normalmente 60 minutos e das varreduras magnificadas de 90 minutos. Esses tempos foram escolhidos, pois demonstraram um bom nível de detalhamento para que as análises pudessem ser conduzidas satisfatoriamente.

Para mapear a estrutura celular, o elemento Cloro foi escolhido, pois ele se encontra em uma boa concentração dentro da célula (4 - 12 mM) (LODISH et al., 2000) e não se encontra em grande quantidade na composição da lamínula de vidro, fazendo com que as regiões de alta concentração de cloro indiquem localização de células. Outros elementos foram testados para cumprir o mesmo papel do Cloro, como o Sódio, porém o Sódio se encontra em alta concentração no vidro, fazendo com que os mapas tenham um fundo muito grande e a visualização fique dificultada. O segundo elemento de interesse, obviamente, é a Platina, pois vai ser ela que dará informação a respeito da internalização da cisplatina. De acordo com que os resultados forem apresentados, mais elementos de interesse serão abordados.

## 4 Resultados e Discussões

Este capítulo busca discutir e apresentar os resultados dos experimentos de  $\mu$ -PIXE realizados durante o período desse trabalho. Todas as medidas foram realizadas no Laboratório de Implantação Iônica na linha de microfeixe iônico.

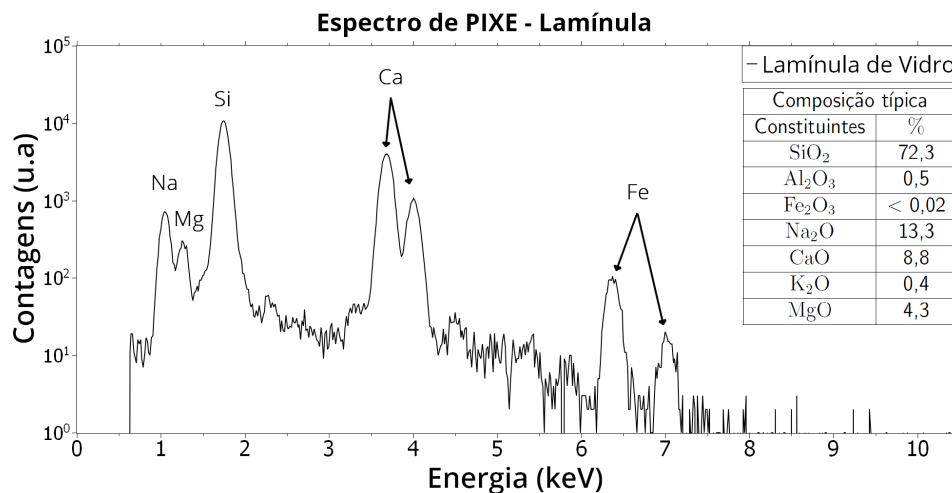
Antes de começar a mostrar os mapas elementares, é importante que se saiba como é o espectro de  $\mu$ -PIXE obtido para que se tenha entendimento dos elementos químicos presentes nas amostras. Além disso, deve-se ressaltar que, como as células estão fixadas em uma lamínula de vidro, os elementos presentes na lamínula também aparecerão no espectro. Abaixo se encontra a [Tabela 4](#) com a composição padrão das lamínulas utilizadas, para então poder ser comparada com o espectro de PIXE obtido apenas da lamínula, que também está mostrado abaixo na [Figura 31](#).

Tabela 4 – Tabela mostrando a composição típica das lamínulas de vidro onde as células foram fixadas.

| Composição típica das lamínulas de vidro utilizadas |        |
|---|--------|
| Constituintes                                       | %      |
| SiO <sub>2</sub>                                    | 72,3   |
| Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>                      | 0,5    |
| Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>                      | < 0,02 |
| Na <sub>2</sub> O                                   | 13,3   |
| CaO   | 8,8    |
| K <sub>2</sub> O                                    | 0,4    |
| MgO   | 4,3    |

Fonte: (KNITTEL, 2012)

Figura 31 – Espectro de PIXE apenas da lamínula de vidro para verificação de sua composição elementar.



É possível observar comparando a Tabela 4 com a Figura 31 que a maioria dos elementos presentes na tabela também estão no espectro, mostrando uma boa concordância da realidade com o que está sendo medido. Além disso, observando o espectro de  $\mu$ -PIXE da amostra de células tratadas com 10  $\mu$ M de cisplatina apresentado na Figura 32, percebe-se que há a presença de outros elementos que provavelmente vem do vidro, e não das células, como o Cromo e o Titânio. Devido a alta sensibilidade da técnica (1 p.p.m), elementos traço do vidro como os dois citados podem ser medidos, mas que acabaram não aparecendo na medida de PIXE pois o tempo de medida foi significativamente menor.

Como comentado na Subseção 3.4.4, os dois principais elementos de análise são o Cloro (Cl), necessário para a localizar as células e observar sua morfologia, e a Platina (Pt), que dará informação a respeito do *uptake* de cisplatina. O Cloro pode ser facilmente visto na Figura 32, devido a presença das linhas  $K_{\alpha}$  e  $K_{\beta}$  perto de 2,6 keV. Já a Platina, para ser vista, é necessário um *zoom* no espectro, pois a linha possível de ser detectada é a linha M, com energia de 2,05 keV, que acaba ficando prejudicada devido ao alto número de contagens da linha K do Silício em 1,74 keV. As energias exatas das linhas de emissão podem ser conferidas no Anexo A. A Figura 33 mostra uma ampliação do espectro da Figura 32 perto da linha M da Platina para que se consiga observá-la mais claramente.

Figura 32 – Espectro de  $\mu$ -PIXE padrão das amostras medidas com os elemento químicos presentes indicados, nesse caso com tratamento de 10  $\mu$ M.

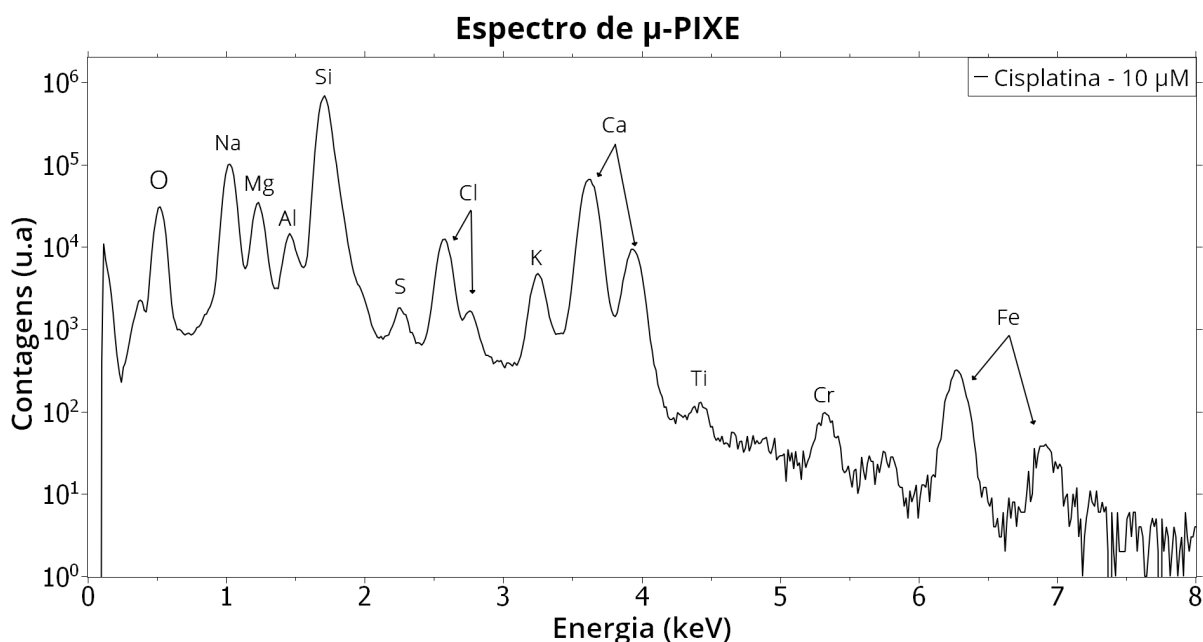
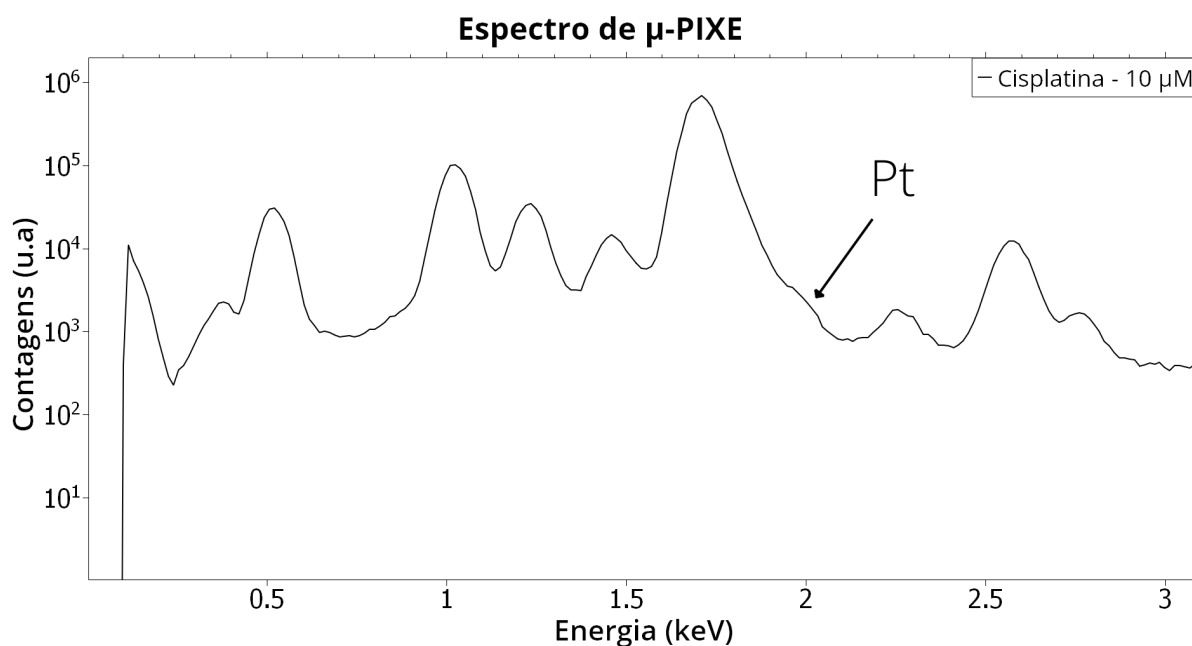


Figura 33 – Ampliação do espectro de  $\mu$ -PIXE para que se possa visualizar a linha M da Platina (2,05 keV) prejudicada pela linha K do Silício (1,74 keV).



#### 4.1 Amostras de 10 $\mu$ M

Foram medidas duas amostras celulares com concentração de tratamento de 10  $\mu$ M por 24 horas. Como comentado na [Subseção 3.4.4](#), a sistemática de análise consistia em uma varredura inicial de aproximadamente 60 minutos, seguida de uma varredura magnificada de aproximadamente 90 minutos em uma região de interesse. A [Figura 34](#) mostra uma foto tirada no visível das células após o tratamento de 10  $\mu$ M para que fique registrado.

##### 4.1.1 Varredura inicial da Primeira Amostra

O mapa do Cloro da varredura inicial pode ser observado abaixo na [Figura 35](#). O primeiro ponto a ser levantado é que claramente o mapa do Cloro está mostrando estruturas que provavelmente são as células. Para corroborar essa hipótese, os mapas do Silício e do Sódio também serão mostrados. Apesar da [Figura 34](#) não estar mostrando a mesma região da [Figura 35](#), a distribuição de células é semelhante.

Observando a [Figura 36](#), percebe-se claramente a correlação entre Cloro e Sódio, e anticorrelação entre Cloro e Silício. Esse resultado está de acordo com a realidade, pois no meio intracelular há expressiva concentração de Sódio, assim como de Cloro. Em relação ao Silício, como a sua concentração é muito maior no vidro, e as células estão fixadas na lamínula de vidro, quando os raios X característicos são gerados, parte deles é absorvido pelas células, fazendo com que nas regiões onde há células o sinal seja menos intenso, e por isso a anticorrelação. Outra evidência que indica que as estruturas são células é o tamanho delas, que, se utilizar a escala como base, percebe-se que o tamanho é parecido com o tamanho nominal das células

Figura 34 – Foto tirada no visível das células após o tratamento com 10  $\mu\text{M}$ . Magnificação de 4 vezes.

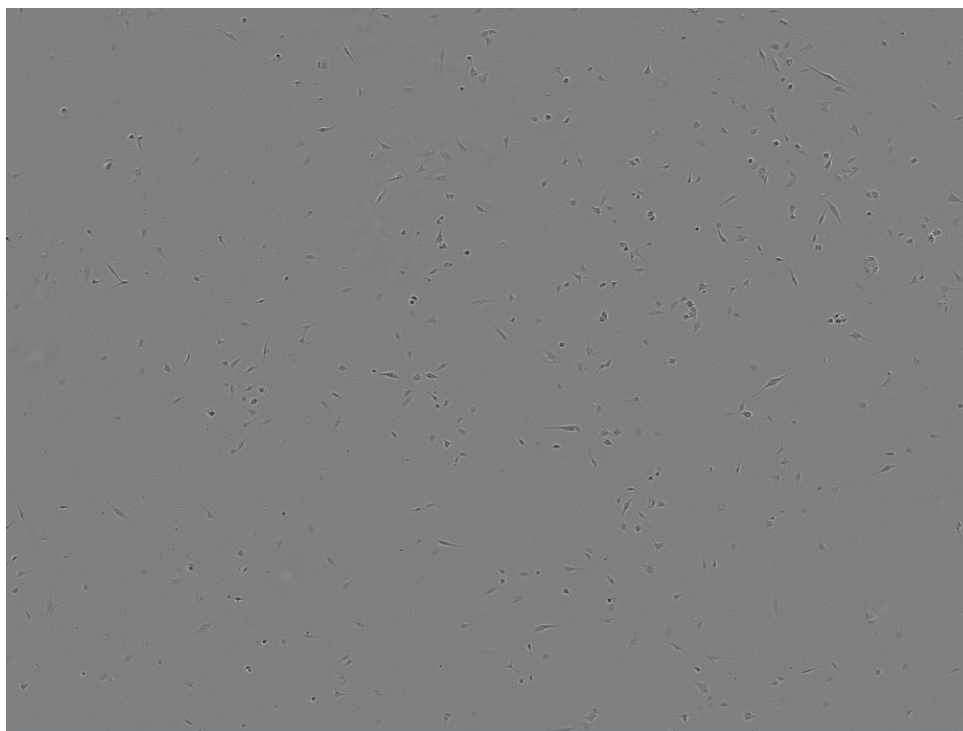
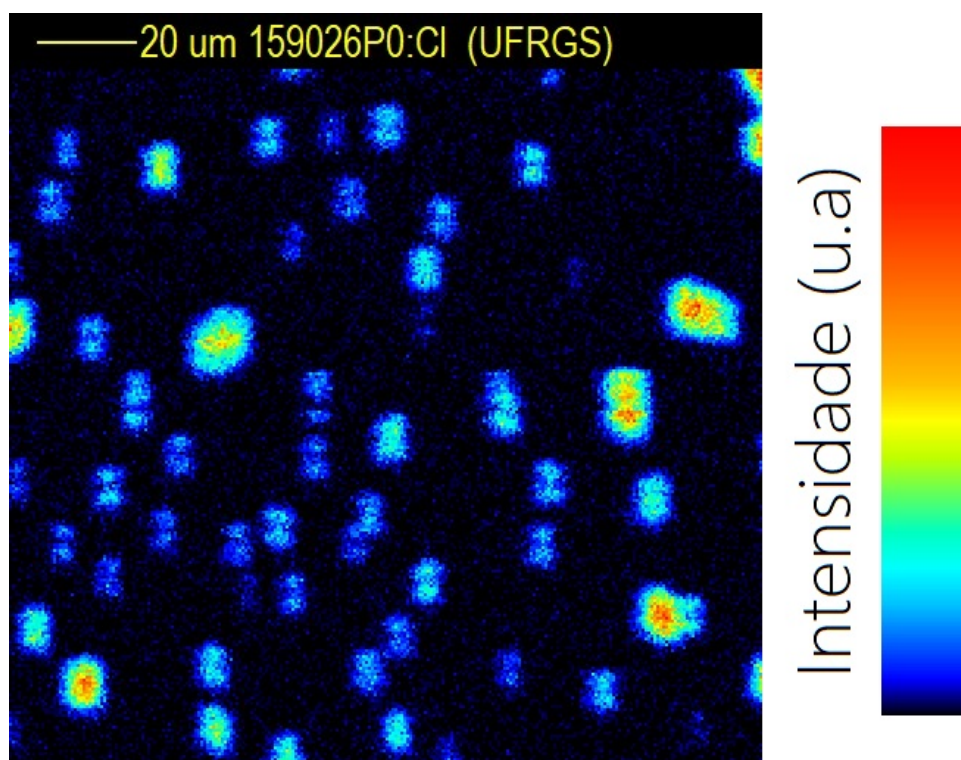
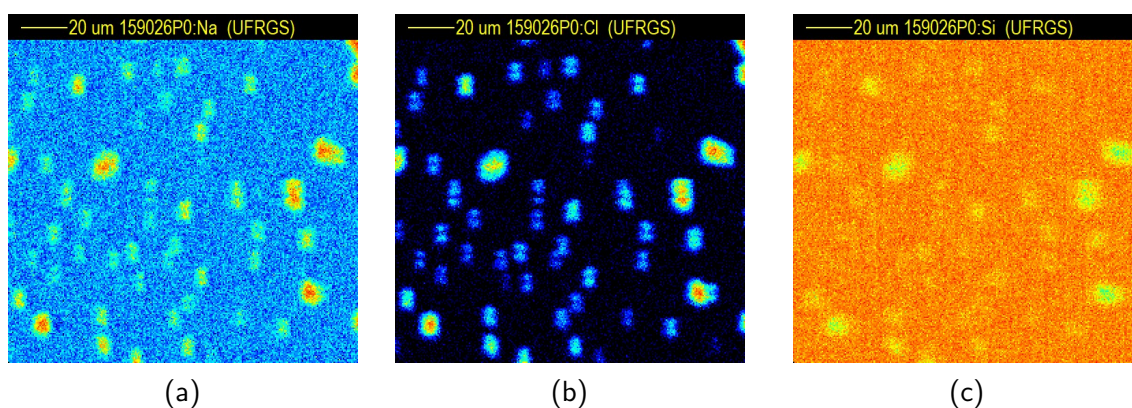


Figura 35 – Mapa elemental do Cloro mostrando as estruturas obtidas e a escala de cor que foi utilizada em todos os mapas obtidos. Mapa referente a primeira amostra de 10  $\mu\text{M}$ .



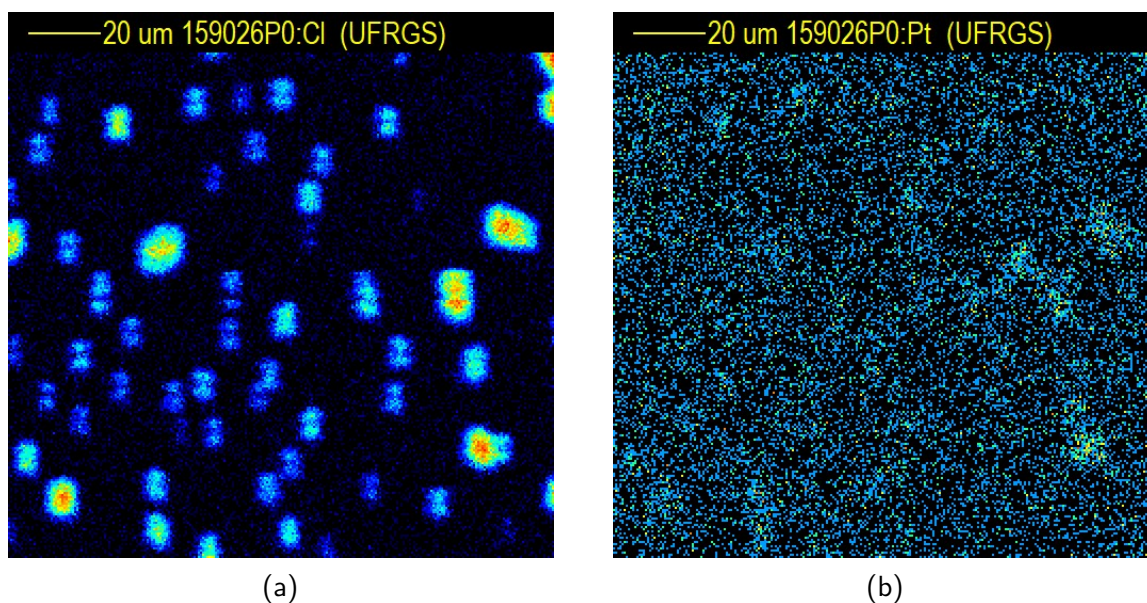
U87 (12-14  $\mu\text{m}$ ). Assim, a partir de agora, assumir-se-á que as estruturas dos mapas de Cloro que serão apresentados posteriormente dizem respeito às células fixadas nas lamínulas de vidro. A maior intensidade em algumas células do que em outras pode ser devido ao tratamento com cisplatina, isto é, células com maior intensidade provavelmente não morreram durante o tratamento e células com menor intensidade morreram.

Figura 36 – Mapas elementares do Sódio (a), do Cloro (b) e do Silício (c).



Agora, pode-se começar a analisar o sinal da Platina e comparar com as células mostradas no mapa de Cloro, como é demonstrado na [Figura 37](#). Pode-se perceber que, devido ao fato da linha M da Platina estar muito próxima no espectro da linha K do Silício, o mapa da Platina acaba ficando com um fundo referente às contagens do Silício, porém, ainda assim, é possível tirar conclusões interessantes ao comparar os dois mapas.

Figura 37 – Mapas elementares do Cloro (a) e da Platina (b).

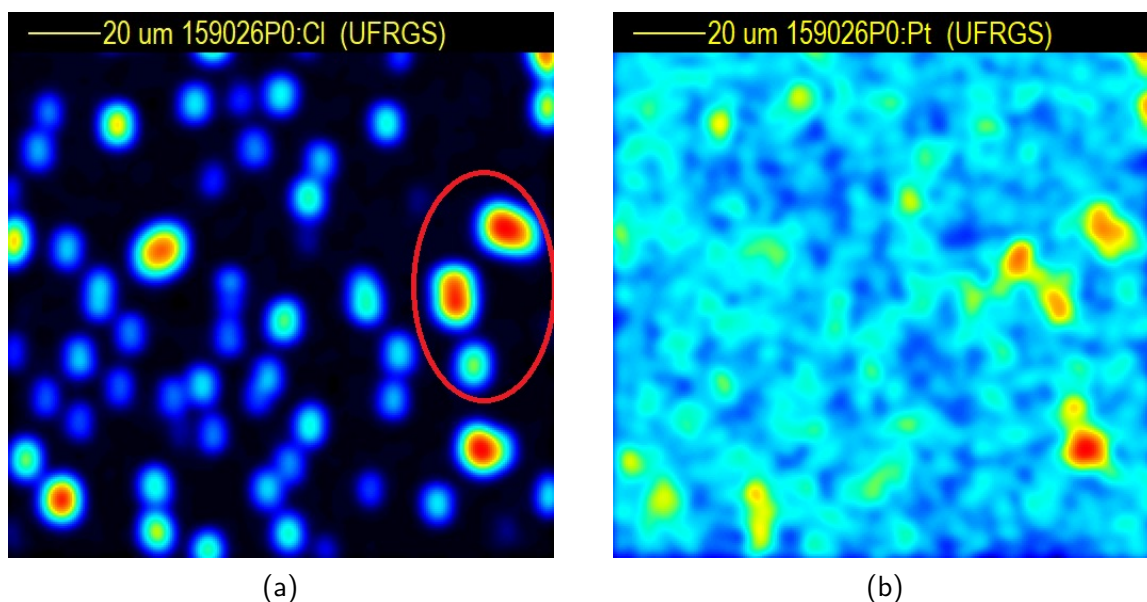


Observando atentamente a [Figura 37](#), vemos que em algumas células há forte correlação com o sinal da Platina, e em outras nem tanto ou nem há, indicando que elas internalizaram



a cisplatina de maneiras distintas. Para ficar mais fácil a visualização das correlações ou não-correlações, será aplicado um filtro Gaussiano nas imagens, como mostrado na [Figura 38](#). Esse resultado é extremamente interessante, pois ainda não se tem total certeza se a resistência à cisplatina é maior devido a uma baixa internalização da droga ou à uma alta eficiência dos mecanismos intracelulares de defesa.

Figura 38 – Mapas elementares do Cloro (a) e da Platina (b) com o filtro Gaussiano aplicado. A elipse vermelha indica a região escolhida para a varredura ampliada.



#### 4.1.1.1 Varredura Ampliada da Primeira Amostra

Como a varredura inicial já foi extremamente elucidativa, na varredura ampliada buscou-se observar as três células indicadas com uma elipse vermelha na [Figura 38](#) com uma magnificação maior, pois elas apresentavam sinais de Platina bastante distintos. O resultado está apresentado abaixo.

Na varredura ampliada pode-se ver com muito mais clareza as células e como elas internalizaram a cisplatina de maneiras diferentes. Ao aplicarmos novamente o filtro Gaussiano, essa diferença fica mais evidente ainda. Além disso, há um ponto que causou estranhamento na análise, apontado pela elipse vermelha na [Figura 40](#). Ainda não se sabe exatamente o motivo de ter aparecido uma região de alta contagem de Platina sem correlação alguma com outro elemento.

Figura 39 – Mapas elementares ampliados do Cloro (a) e da Platina (b).

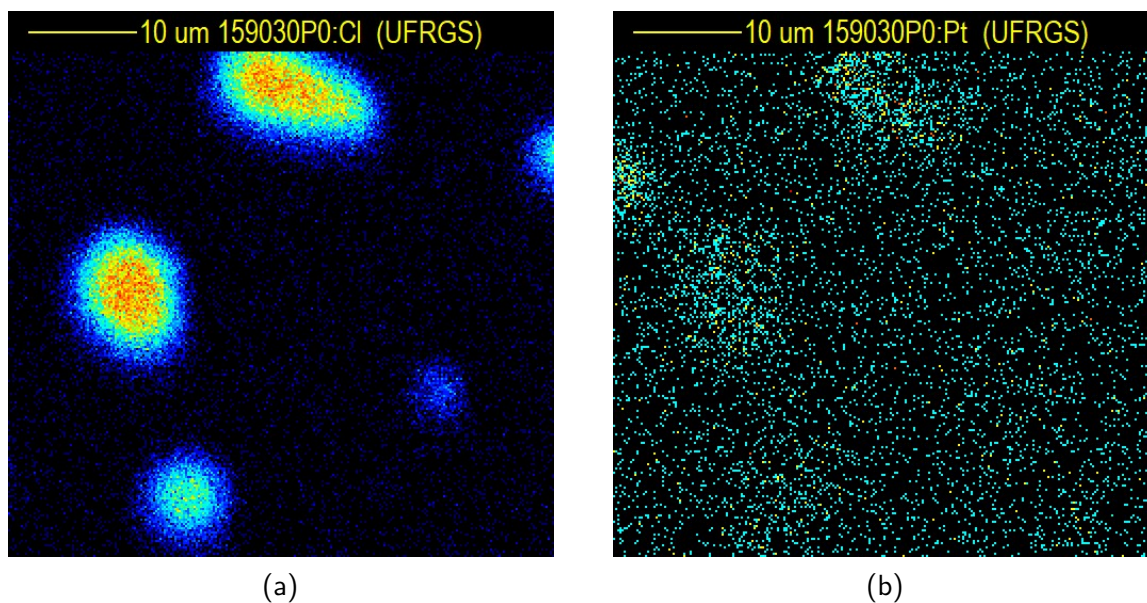
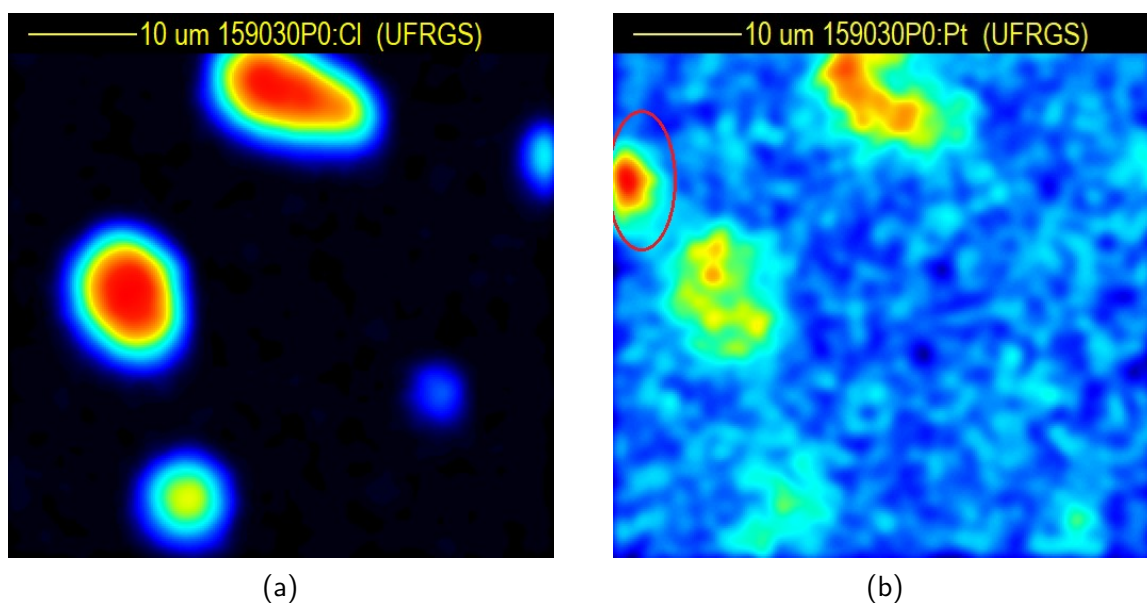


Figura 40 – Mapas elementares ampliados do Cloro (a) e da Platina (b) com o filtro Gaussiano aplicado. A elipse vermelha representa uma região de alta contagem de Platina não explicada.

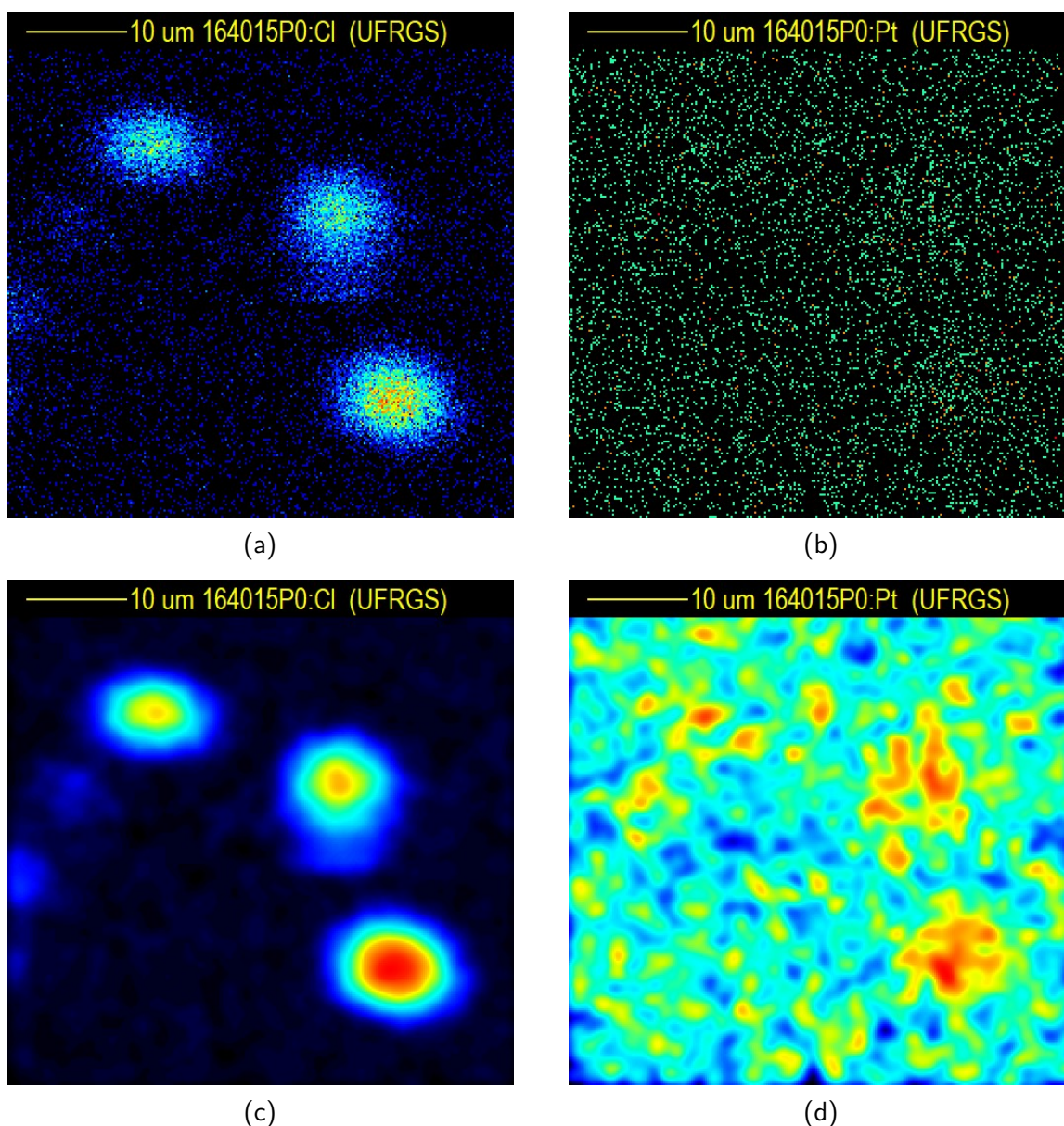


#### 4.1.1.2 Varredura Ampliada da Segunda Amostra

Na segunda amostra optou-se por apenas mostrar a varredura ampliada, pois na inicial a estatística não ficou adequada. O resultado está apresentado abaixo. Novamente, percebe-se que o mesmo padrão encontrado na primeira amostra é repetido na segunda, isto é, três células distintas com três absorções de cisplatina também distintas, mostrando que a internalização da droga depende fortemente de cada célula individualmente, apesar de, na

teoria, todas elas serem iguais e de uma mesma linhagem. Essa ainda é uma das maiores e mais curiosas questões existentes em pesquisa de ponta de câncer: por que células que na teoria são idênticas e pertencem a uma mesma linhagem celular apresentam comportamentos completamente distintos ao interagirem com uma droga quimioterápica? Infelizmente, ainda não há uma resposta para esse questionamento, mas é justamente por isso que experimentos que evidenciem esse comportamento devem ser cada vez mais conduzidos e explorados.

Figura 41 – Mapas elementares ampliados do Cloro (a), (c) e da Platina (b), (d) da segunda amostra de 10  $\mu\text{M}$ .



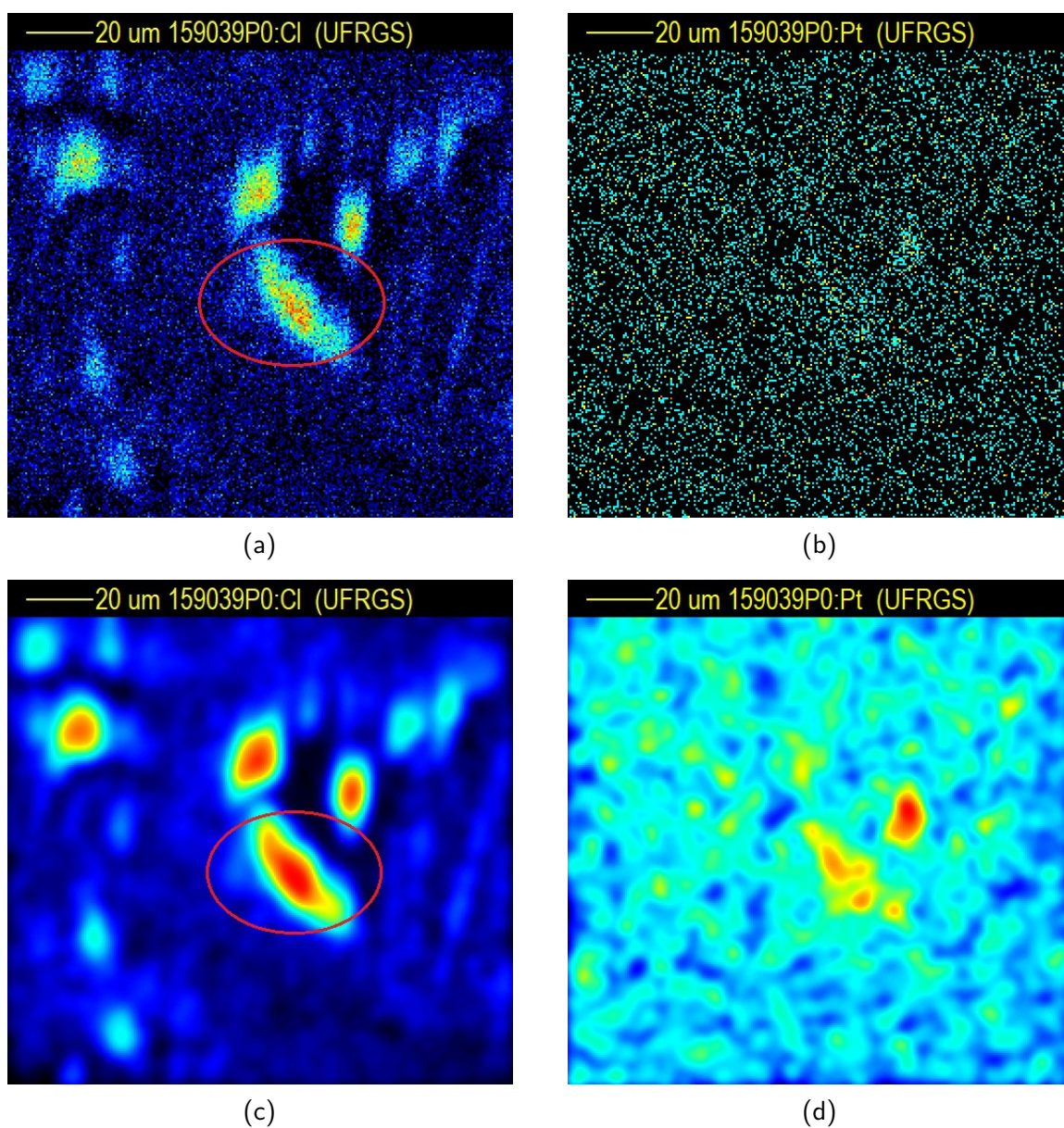
#### 4.2 Amostra de 20 $\mu\text{M}$

Foi medida uma amostra celular com concentração de tratamento de 20  $\mu\text{M}$  de cisplatina por 24 horas. Os mapas obtidos serão apresentados abaixo.

#### 4.2.1 Varredura Inicial

O mapa obtido da varredura inicial de  $150 \times 150 \mu\text{m}^2$  pode ser observado na [Figura 42](#). Comparando com o mapa mostrado na [Figura 37](#) percebe-se uma diferença marcante em relação a morfologia das estruturas do mapa de Cloro. Existem algumas hipóteses que podem explicar essa diferença na morfologia, como a simples existência de células maiores, células alongadas porque estavam migrando ou alguma aglomeração de células. A elipse vermelha na [Figura 42](#) mostra uma dessas estruturas comentadas. Além disso, novamente observa-se diferença na internalização de cisplatina, com inclusive células que não apresentam correlação alguma com o sinal da platina.

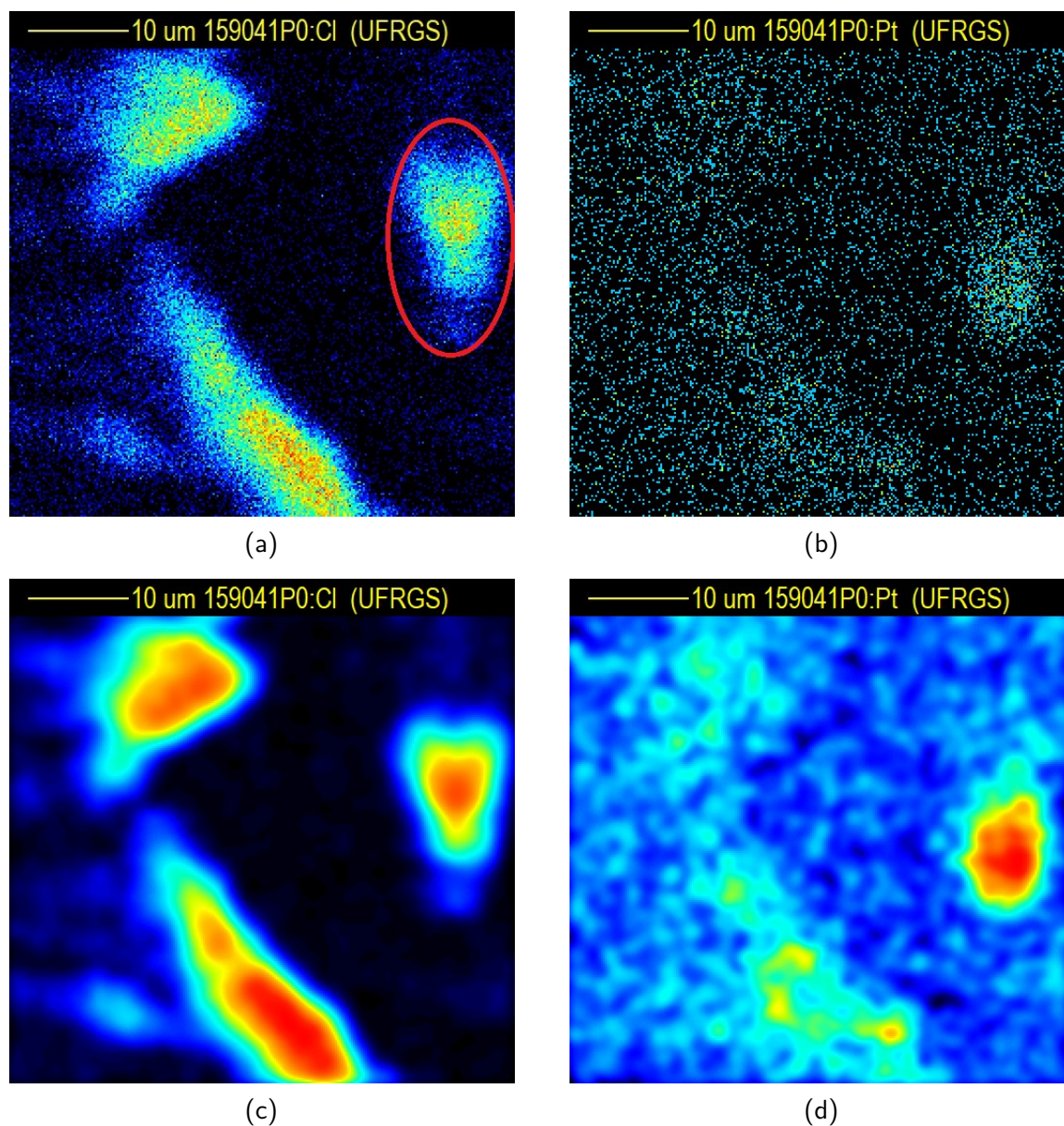
Figura 42 – Mapas elementares do Cloro (a), (c) e da Platina (b), (d) da amostra de  $20 \mu\text{M}$ .



#### 4.2.2 Varredura Ampliada

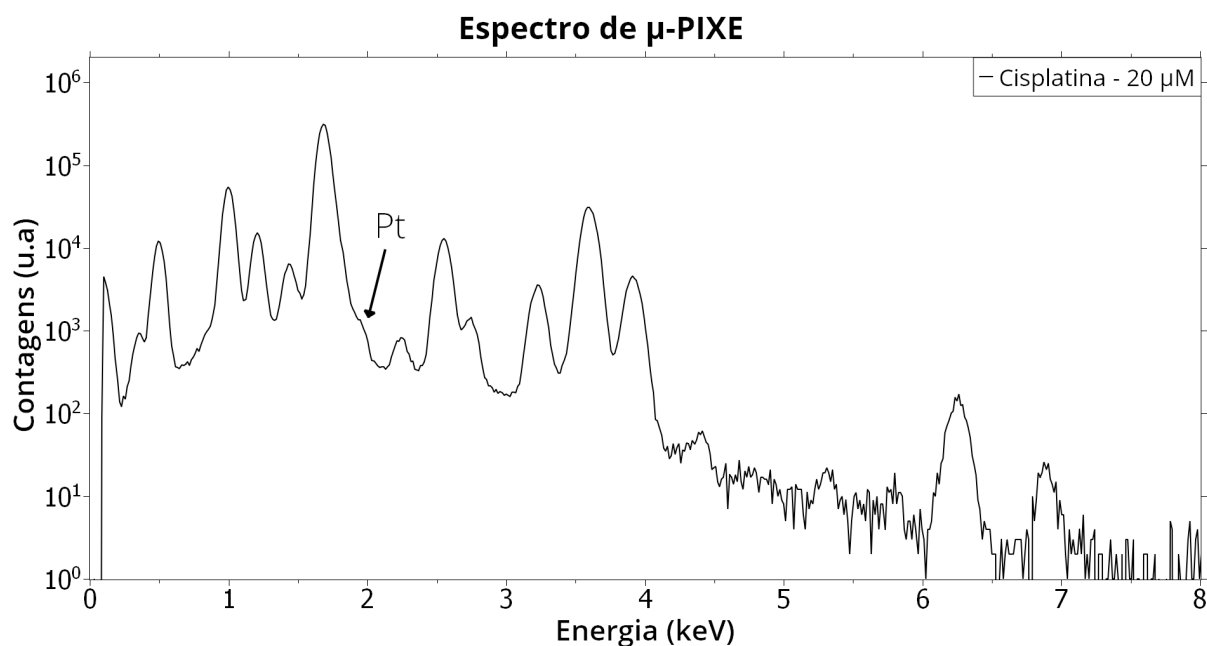
Na varredura ampliada foi possível observar mais atentamente alguns detalhes que na varredura inicial poderiam passar despercebidos. O primeiro deles é que o sinal da Platina está correlacionando também com regiões adjacentes às células, principalmente evidenciado pela célula marcada pela elipse na Figura 43. Uma hipótese possível é que a dose do tratamento foi tão alta que a membrana celular rompeu e os compostos e moléculas que estavam no meio intracelular vazaram, e por isso a correlação nas proximidades. Compreender as doses limite para que determinados processos ocorram é de suma importância para um maior entendimento de como as células estão interagindo com a droga, e, para o caso do presente trabalho, a correlação do sinal da Platina com regiões adjacentes não foi observada para a dose de 10  $\mu\text{M}$ .

Figura 43 – Mapas elementares ampliados do Cloro (a), (c) e da Platina (b), (d) da amostra de 20  $\mu\text{M}$ .



Outro ponto interessante de comentar é como o espectro de  $\mu$ -PIXE varia com a concentração de tratamento de cisplatina. Na [Figura 32](#) era extremamente difícil de observar a linha M da Platina devido a linha K do Silício. Agora, com um tratamento com dose maior, a distinção das duas linhas fica bem mais evidente e não precisa de ampliação no espectro para ser observada, como está evidenciado na [Figura 44](#).

Figura 44 – Espectro de  $\mu$ -PIXE da amostra de 20  $\mu$ M. Com um tratamento de maior dose é possível localizar a linha M da Platina (2,05 keV) sem a necessidade de ampliação.



### 4.3 Amostra de 100 $\mu$ M

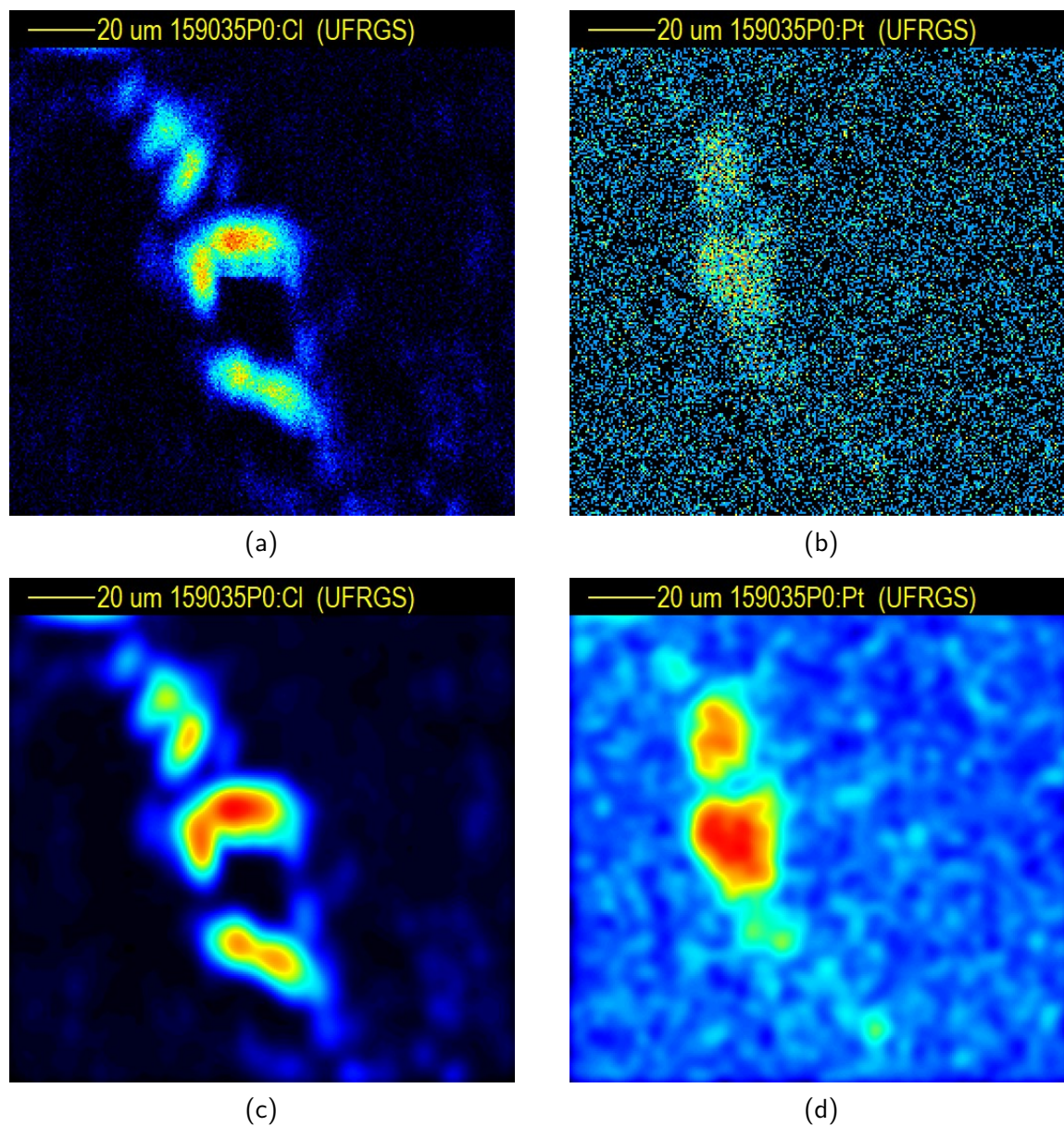
Como já comentado na [Seção 2.4](#), doses superiores a 10  $\mu$ M já são consideradas altas em se tratando de cisplatina, portanto 100  $\mu$ M é uma dose extremamente alta. A ideia de utilizar uma dose bastante intensa era justamente tentar observar as células em situações extremas, e, assim, analisar se algum fenômeno diferente ocorreria. Foi medida uma amostra celular com dose de tratamento de 100  $\mu$ M por 24 horas. Os resultados são apresentados abaixo.

#### 4.3.1 Varredura Inicial

O mapa obtido da varredura inicial pode ser observado na [Figura 45](#). Assim como no mapa da [Figura 42](#), o mapa do Cloro apresenta novamente a formação de estruturas maiores. Outro ponto interessante é o sinal da Platina, que está extremamente alto comparado com os das amostras anteriores, o que está de acordo com a realidade, na medida em que nessa amostra há maior concentração de cisplatina. O sinal também está correlacionando com regiões

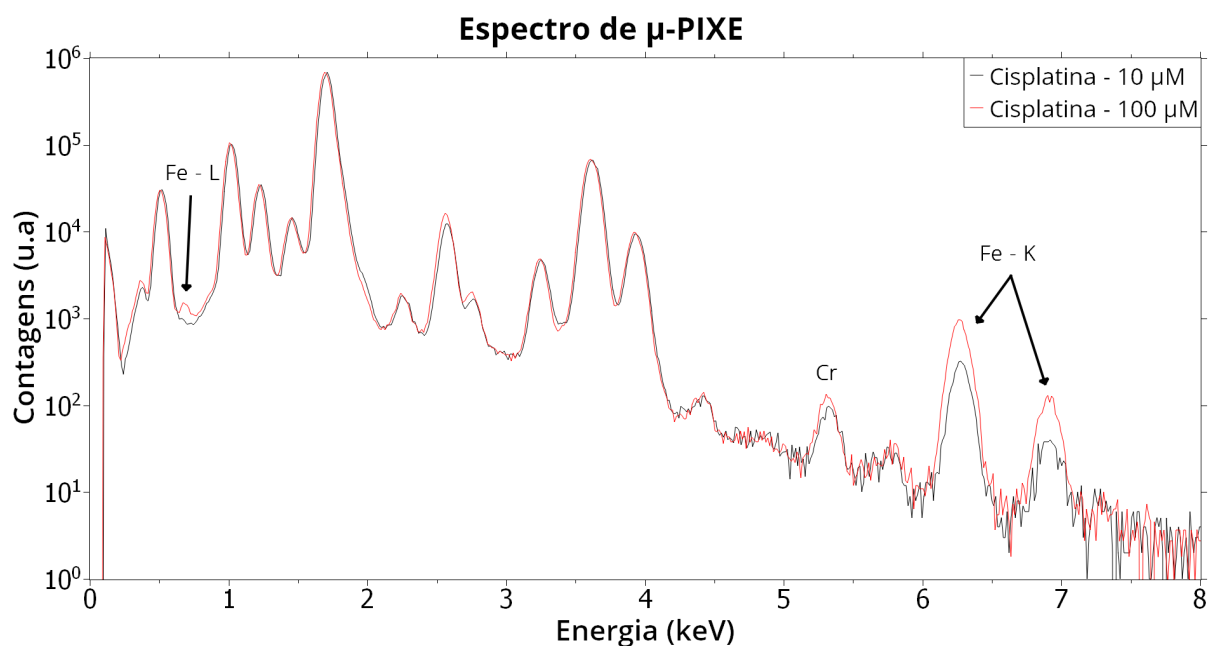
adjacentes às células, novamente indicando que pode estar havendo rompimento da membrana e vazamento de moléculas do meio intracelular.

Figura 45 – Mapas elementares do Cloro (a), (c) e da Platina (b), (d) da amostra de 100  $\mu\text{M}$ .



Para prosseguir com as análises, será apresentado o espectro de  $\mu\text{-PIXE}$  obtido, comparado com a da amostra de 10  $\mu\text{M}$ , para que algumas considerações possam ser feitas. Os espectros foram normalizados pelo pico do Silício.

Figura 46 – Espectro de  $\mu$ -PIXE da amostra de 100  $\mu$ M comparado com o da amostra de 10  $\mu$ M, com alguns elementos de interesse marcados no gráfico.



Pode-se perceber claramente que os picos das linhas  $K_{\alpha}$  e  $K_{\beta}$  do Ferro estão significativamente maiores na amostra de 100  $\mu$ M em relação a de 10  $\mu$ M. Além disso, há o surgimento da linha L do Ferro (0,705 keV), que não havia aparecido em nenhum outro espectro até agora. Esses dois resultados indicam que há maior concentração de Ferro na amostra de 100  $\mu$ M. O outro elemento que aparece desregulado em relação as outras é o Cromo, apesar de não tão fortemente quanto o Ferro. Para evidenciar o que está sendo mostrado no espectro, serão apresentados os mapas de Ferro e Cromo (Figura 47).

A primeira hipótese que surgiu foi a de que poderia ser algum tipo de contaminação da lamínula de vidro, porém a probabilidade de que seja essa a resposta é pequena, pois, como pode ser observado na Figura 48, tanto o sinal do Ferro, quanto o do Cromo, correlacionam fortemente entre si e com o sinal da Platina, ou seja, seria muita coincidência uma contaminação dupla de Ferro e Cromo na mesma região coincidindo com o sinal da Platina. Para ampliar as análises, será mostrado a varredura magnificada dessa região onde há maior concentração de Ferro e Cromo.



Figura 47 – Mapas elementares do Ferro (a), (c) e do Cromo (b), (d) da amostra de 100  $\mu\text{M}$ .

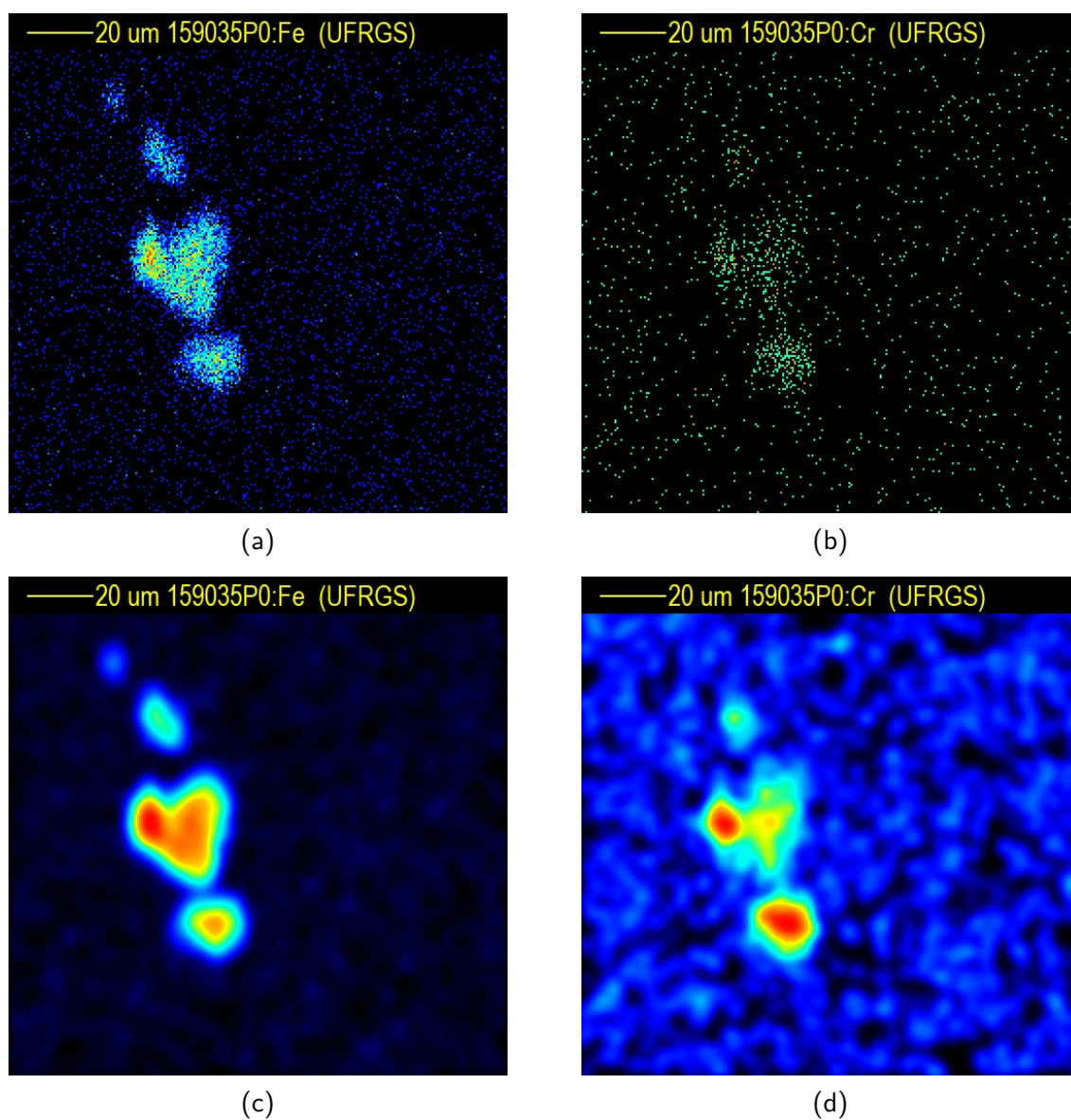
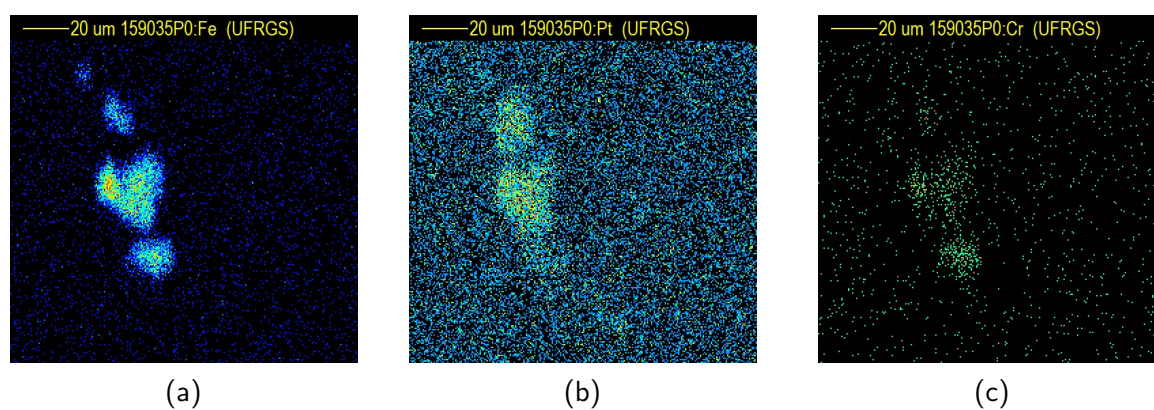


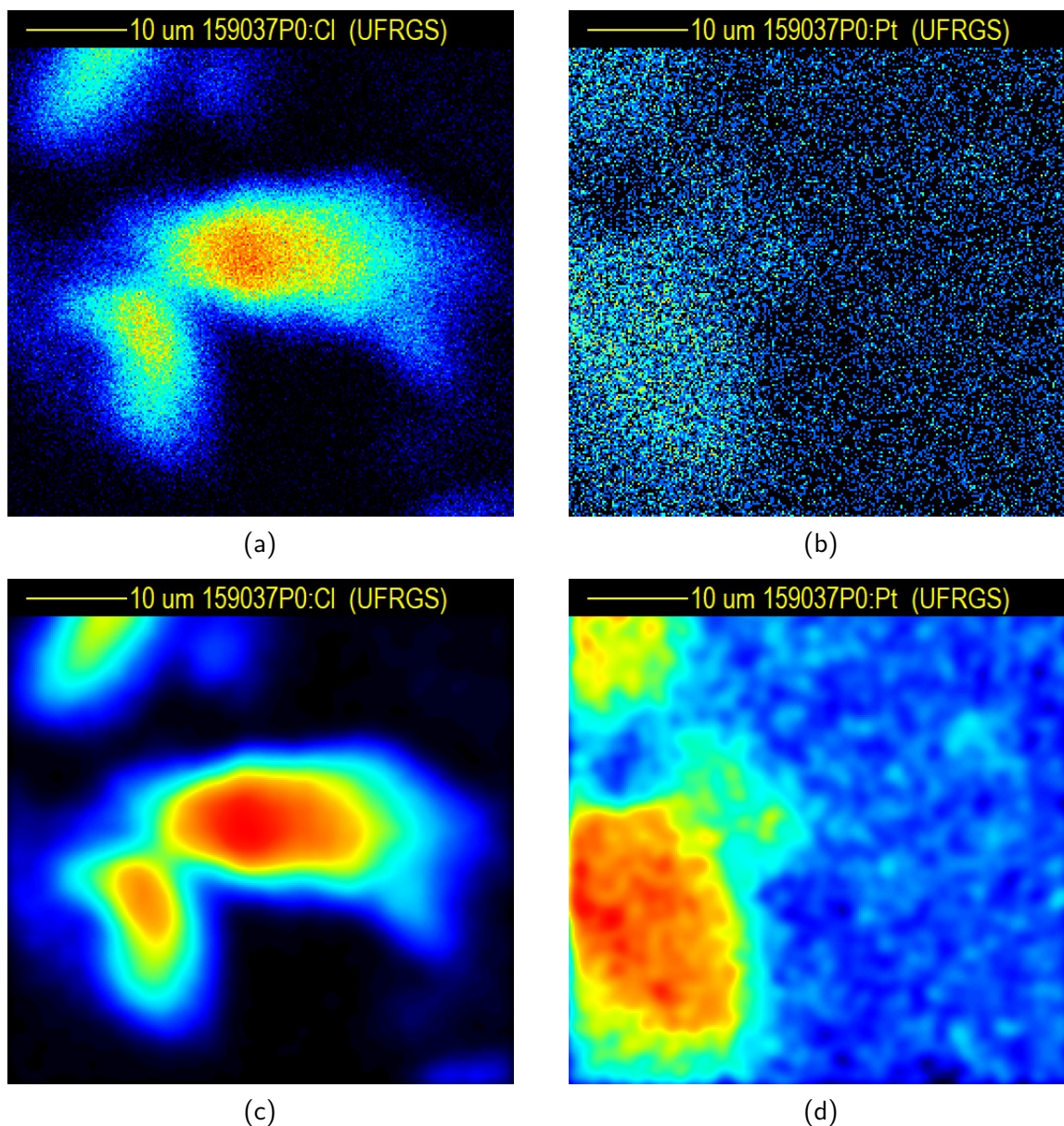
Figura 48 – Mapa elemental do Ferro (a), da Platina (b) e do Cromo (c) da amostra de 100  $\mu\text{M}$ .



### 4.3.2 Varredura Ampliada

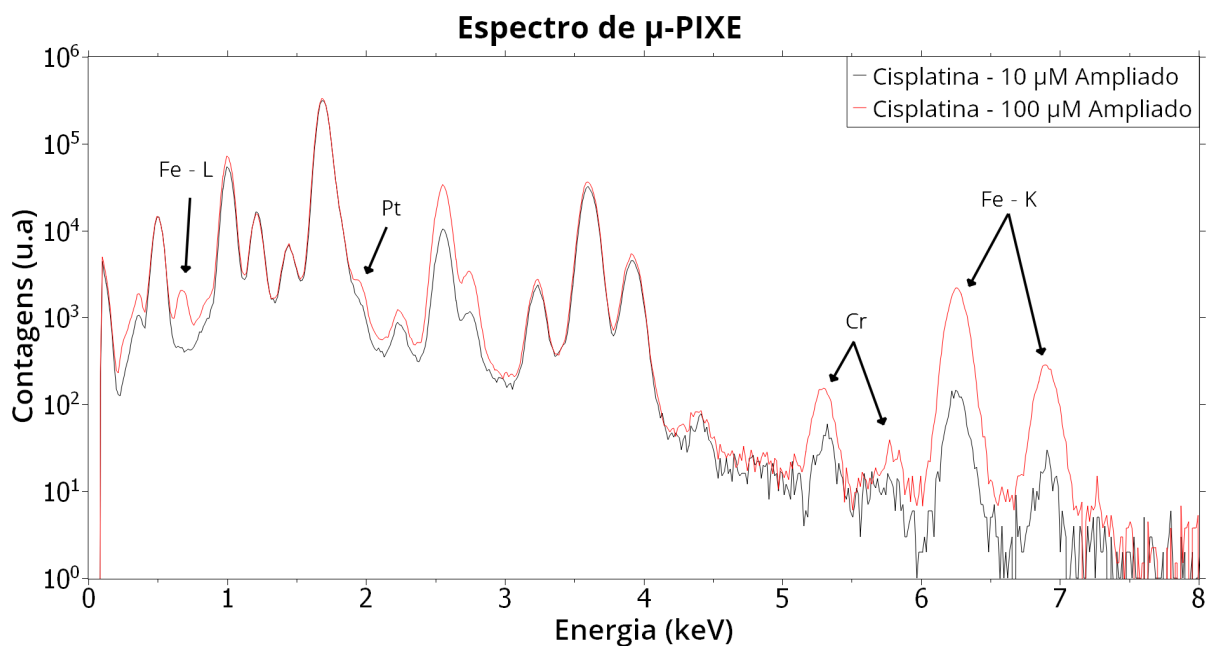
Com a varredura ampliada é possível observar mais detalhadamente a região de interesse, que no caso foi onde havia maior concentração de Ferro e Cromo. Os primeiro mapas que serão mostrados seguirão o padrão das outras amostras, isto é, Cloro e Platina.

Figura 49 – Mapas elementares ampliados do Cloro (a), (c) e da Platina (b), (d) da amostra de 100  $\mu\text{M}$ .



Observa-se com mais clareza na [Figura 49](#) a correlação do sinal da Platina com as regiões adjacentes às células. Para continuar com as análises do Ferro e do Cromo, primeiro será mostrado o espectro magnificado dessa amostra comparado com o espectro magnificado da amostra de 10  $\mu\text{M}$ , para que as diferenças apontadas pela [Figura 46](#) fiquem mais evidentes.

Figura 50 – Espectro de  $\mu$ -PIXE ampliado da amostra de 100  $\mu$ M comparado com o da amostra de 10  $\mu$ M, com alguns elementos de interesse marcados no gráfico.



A [Figura 50](#) acentua as diferenças entre a amostra de 100  $\mu$ M e as outras, visto que, a de 10  $\mu$ M e a de 20  $\mu$ M eram extremamente parecidas, com apenas a diferença no sinal da Platina, que, naturalmente, é maior na de 20, porém sem significativas alterações entre outros elementos. Agora, podem ser apresentados os mapas ampliados do Ferro e do Cromo para melhor visualização ([Figura 51](#)). Claramente observa-se a correlação entre o sinal do Ferro e do Cromo, indicando que os dois elementos estão fortemente relacionados. A correlação com o sinal da Platina também fica evidente quando os mapas ampliados são colocados lado a lado, como na [Figura 52](#).

Figura 51 – Mapas elementares ampliados do Ferro (a), (c) e do Cromo (b), (d) da amostra de 100  $\mu$ M.

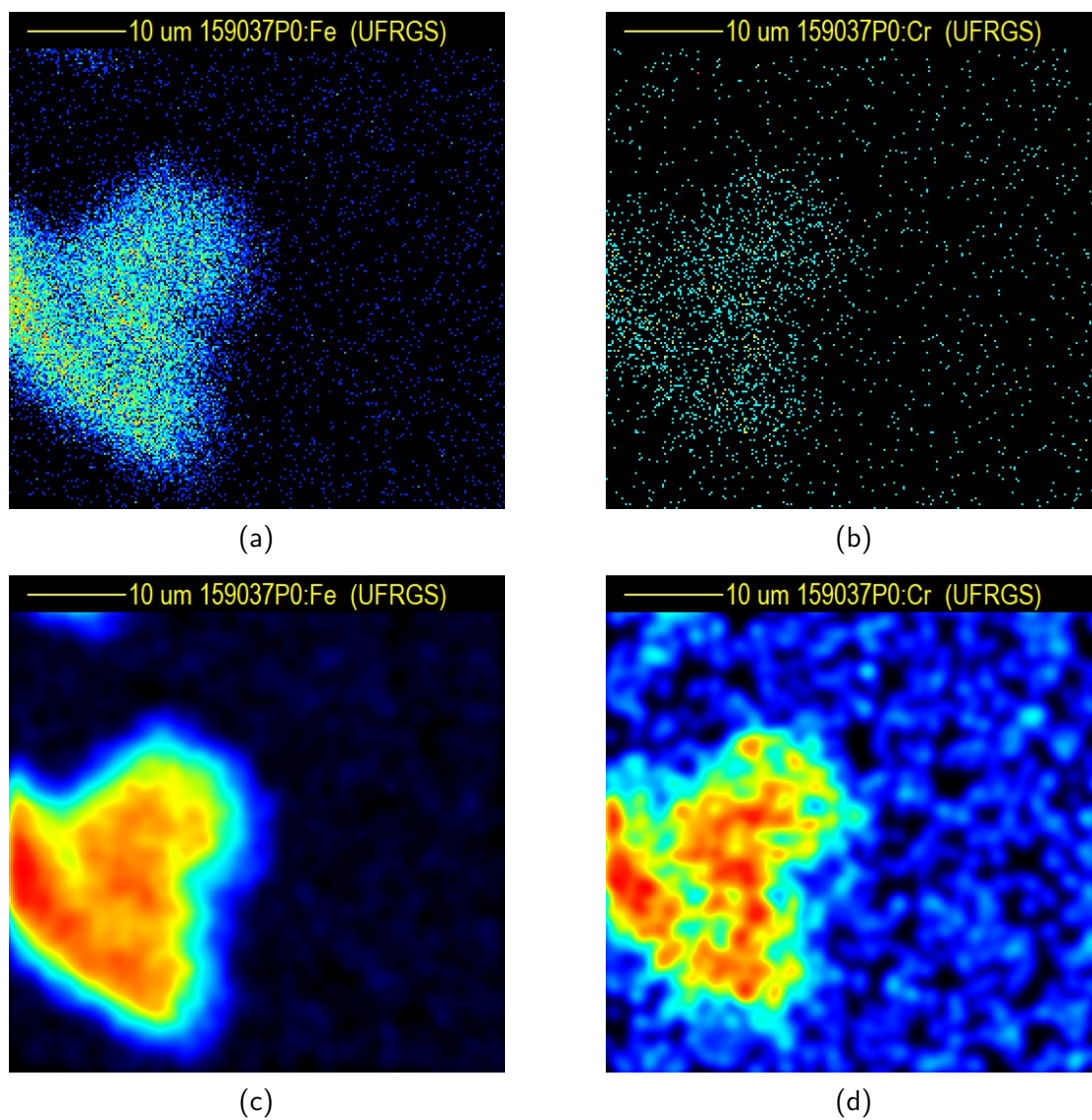
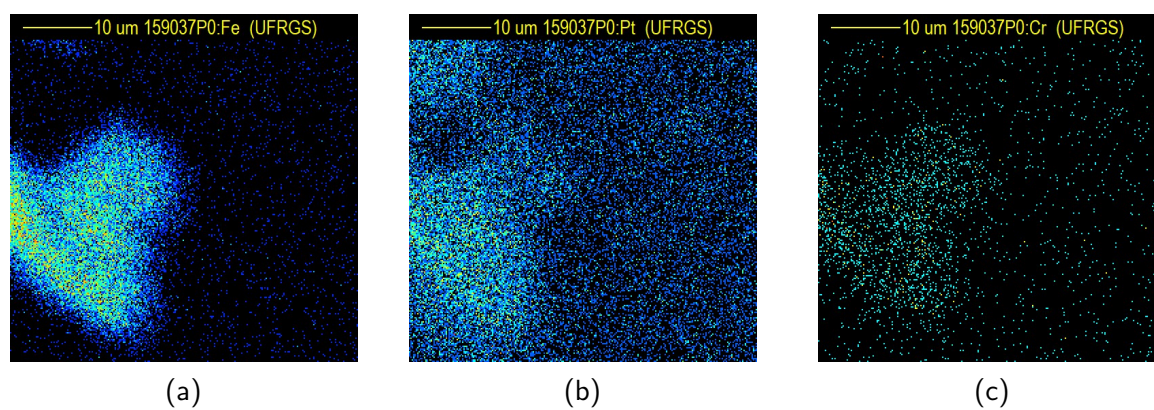
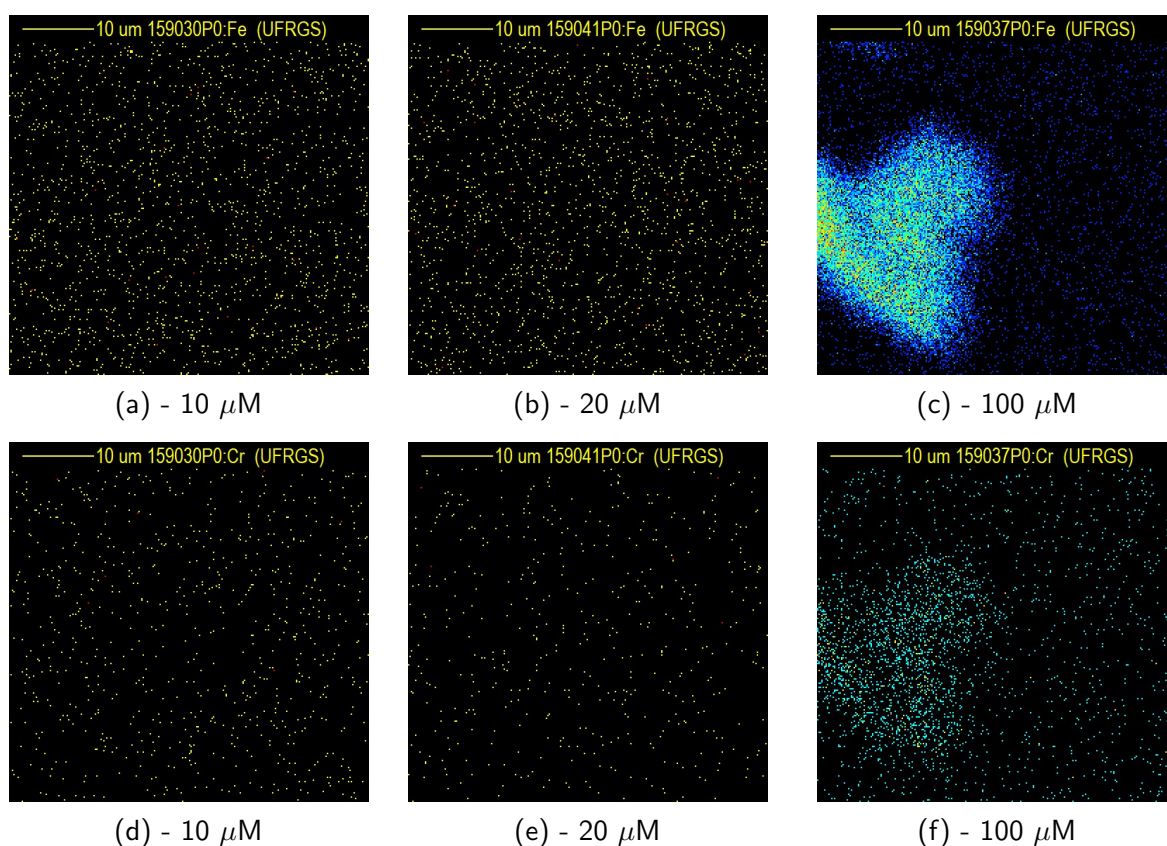


Figura 52 – Mapa elemental ampliado do Ferro (a), da Platina (b) e do Cromo (c) da amostra de 100  $\mu$ M.



Antes de começar a tentar explicar o aumento no sinal do Ferro e do Cromo, é importante colocar lado a lado como eram os mapas de Ferro e Cromo das outras amostras, para que fique claro que nas outras esses sinais eram devido a presença de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  e Cromo na lamínula de vidro, ou seja, *background*. Já na amostra de  $100 \mu\text{M}$  é devido a algum fator que influenciou na medida, pois o aumento é bastante significativo e concentrado em uma região específica.

Figura 53 – Mapas elementares ampliados do Ferro (a), (b), (c) e do Cromo (d), (e), (f), com diferentes concentrações de tratamento de cisplatina.



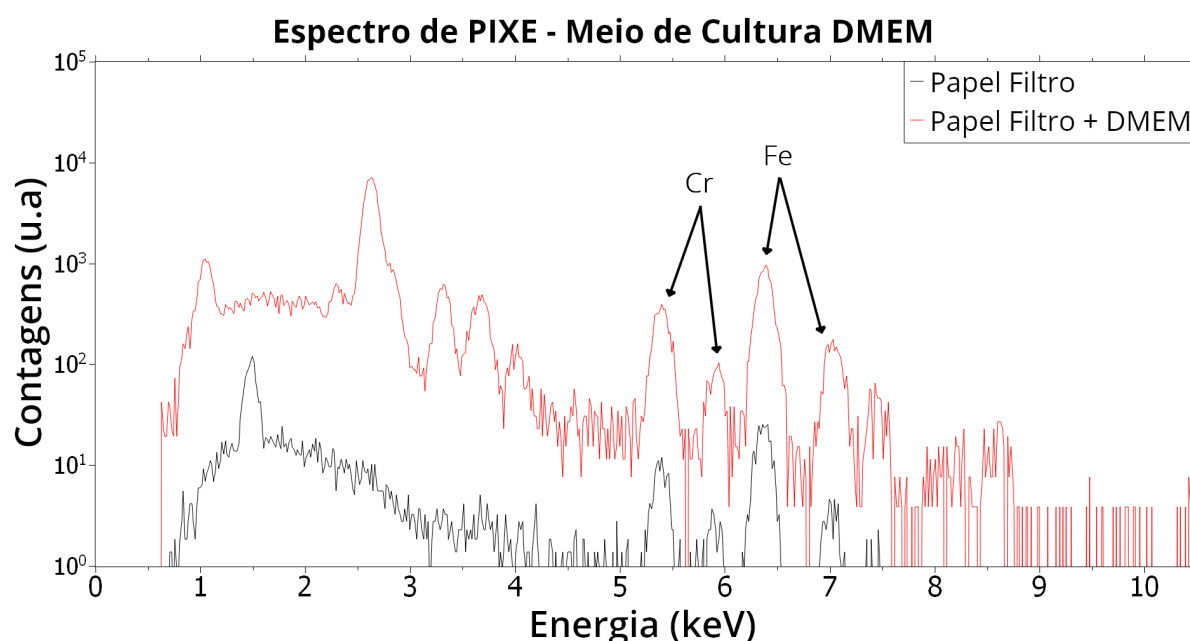
#### 4.3.3 Possíveis Explicações para a Concentração Expressiva de Ferro

Como já comentado na [Seção 2.5](#), em 2018, um grupo de pesquisadores mostrou fortes evidências que a cisplatina pode induzir morte celular por ferroptose, além da apoptose convencional ([GUO et al., 2018](#)). Esse processo, no entanto, só foi observado em duas das cinco linhagens celulares estudadas no trabalho publicado, o que quer dizer que o tipo de célula tem bastante influência se haverá ou não indução de ferroptose pela cisplatina. A linhagem U87 não foi estudada, e até o presente momento não é de conhecimento do autor alguma referência que mostre a indução ou não-indução de ferroptose em células dessa linhagem por cisplatina. A partir disso, pode-se começar a pensar que, o que está sendo visto nos mapas da subseção anterior, poderia ser a cisplatina induzindo ferroptose nas células e causando um aumento na concentração de Ferro. Essa hipótese possui mais um argumento favorável, que é o sinal da

Platina e do Ferro correlacionando com as células e regiões adjacentes, podendo dar indícios de que pode ter havido rompimento da membrana celular e vazamento dos compostos do meio intracelular, que é comum na ferroptose, pois há peroxidação lipídica, seguida de perda da permeabilidade da membrana e consequente rompimento da mesma, levando a morte celular.

A pergunta natural que segue depois de pensar em uma possível indução de ferroptose pela cisplatina e um consequente aumento na concentração de Ferro é de onde este Ferro está vindo, pois, obviamente, as células não estão agregando o Ferro presente na lamínula de vidro. A primeira hipótese que surgiu foi de que, como a cisplatina é adicionada no meio de cultura em que as células estão embebidas, caso o meio de cultura possua compostos com Ferro, elas poderiam então agregá-los dessa “fonte“. Para ter certeza de que há Ferro no meio de cultura, foi conduzido um experimento de PIXE, onde foi comparado um papel filtro de éster celulose virgem com um em que o meio de cultura foi depositado. O resultado pode ser observado na [Figura 54](#). Claramente percebe-se que no papel filtro em que o meio de cultura DMEM foi depositado há um substancial aumento, tanto na concentração de Ferro, quanto na concentração de Cromo. Esse resultado indica que, caso seja realmente uma indução de ferroptose, as células possivelmente agregaram o Ferro que estava presente no meio de cultura e que foi observado posteriormente nos experimentos de  $\mu$ -PIXE. O pico do Alumínio, perto de 1,5 keV, presente no espectro do papel filtro virgem e ausente no espectro com DMEM é devido ao fato de que na hora da medida o porta-amostra, que contém Alumínio, foi também irradiado não propositalmente, o que não aconteceu na medida posterior.

Figura 54 – Espectro de PIXE comparando um papel filtro de éster celulose virgem com um em que o meio de cultura DMEM + Soro fetal bovino foi depositado. Os espectros foram normalizados pela carga.



#### 4.3.4 Possíveis Explicações para a Concentração Expressiva de Cromo

O aumento na concentração de Ferro pode ser talvez explicado pela ferroptose, porém o aumento do sinal do Cromo ainda é uma incógnita. Recentemente, um artigo de revisão sobre ferroptose foi publicado (LI et al., 2020), e nele constam algumas perguntas em aberto em relação a esse fenômeno, visto que seu descobrimento data em apenas 10 anos, e a indução pela cisplatina 4 anos (GUO et al., 2018), ou seja, ainda há muitas questões a serem respondidas e muitos experimentos a serem realizados. Um desses questionamentos presentes no artigo é o seguinte: seria o Ferro o único agente necessário para promover a peroxidação lipídica ou outras substâncias e elementos poderiam substituí-lo na ferroptose? Essa questão é extremamente relevante e curiosa, pois ainda não se tem total certeza se apenas o Ferro é capaz de induzir ferroptose. É baseado nesse questionamento que, talvez, possa surgir uma explicação para o aumento na concentração de Cromo, isto é, a célula agregando, além do Ferro, Cromo, e ambos participando da ferroptose. A Figura 54 mostra que, além de Ferro, também há expressiva concentração de Cromo no meio de cultura, e portanto seria possível que as células agregassem o Cromo do meio. A desregulação na concentração de Cromo na ferroptose ainda não foi reportada na literatura.

Outro argumento favorável a essa hipótese é que Ferro e Cromo são átomos extremamente parecidos, tendo apenas o Manganês entre eles na tabela periódica. Ambos os átomos também possuem um mesmo estado de carga, 3+. Além disso, não é incomum que células acabem substituindo átomos parecidos, inclusive é essa a razão da toxicidade do Cádmio, que,

por ter estrutura parecida com a do Cálcio, acaba sendo substituído e causando malefícios para o sistema celular (CHOONG; LIU; TEMPLETON, 2014).



## 5 Conclusões e Perspectivas

Esse trabalho mostrou como a técnica de  $\mu$ -PIXE pode ser utilizada para analisar e imagear amostras biológicas, que no caso foram células da linhagem U87 de glioblastoma humano tratadas com diferentes doses de cisplatina. A versatilidade da técnica propiciou a criação de mapas elementares de diversos elementos químicos, fazendo com que fosse possível observar a correlação entre eles. Já a resolução espacial micrométrica, permitiu com que células individuais fossem analisadas e imageadas.

Os resultados apresentados no [Capítulo 4](#) mostraram que células que na teoria deveriam se comportar da mesma maneira frente ao quimioterápico, por serem idênticas e da mesma linhagem, acabaram tendo interações completamente diferentes, pois o *uptake* de cisplatina foi bastante variado. Esse inclusive é um dos principais questionamentos atuais em pesquisa de fronteira de câncer e uma das razões que faz com que haja recorrência do tumor, pois como nem todas células vão internalizar a droga efetivamente, elas não morrerão e poderão continuar a realizar mitose e contribuir para o aparecimento de um novo tumor.

Além de correlacionar o sinal da Platina com o sinal do Cloro para inferir a respeito da internalização da cisplatina, foi possível observar a presença de Ferro e Cromo na amostra de 100  $\mu$ M. Tal resultado é extremamente relevante e curioso, na medida em que ainda não foi reportado na literatura que a cisplatina é capaz de induzir ferroptose em células da linhagem U87, nem que o Cromo participe ativamente desse mecanismo. Já se sabe que a ferroptose só acontece quando a dose de cisplatina excede um valor limite, que depende de linhagem para linhagem, e nesse trabalho o aumento na concentração de Ferro só foi observado na última amostra. Obviamente, os resultados mostrados são referentes a apenas uma amostra, o que faz com que seja necessário repetir esses experimentos e observar se esse fenômeno ocorre novamente para que uma conclusão mais robusta possa ser tirada. Análises quantitativas infelizmente não puderam ser conduzidas, pois o detector da linha de  $\mu$ -PIXE ainda não está totalmente padronizado, e o *software* que realiza a quantificação dos mapas necessita de alguns parâmetros dessa padronização.

Em suma, ao longo desse estudo, foi possível explorar as potencialidades da técnica de  $\mu$ -PIXE para que análises multidisciplinares pudessem ser conduzidas. É de grande importância para a pesquisa acadêmica que diferentes áreas troquem seus conhecimentos para enriquecer e engrandecer a ciência. Espera-se que com os resultados obtidos linhas de pesquisa envolvendo análises de células possam ser sedimentadas e desenvolvidas no Laboratório de Implantação Lônica para que esse intercâmbio de conhecimentos continue e traga ainda mais resultados.

## 5.1 Perspectivas Futuras

Os resultados apresentados nesse trabalho são extremamente animadores e curiosos, fazendo com que seja natural a progressão e evolução desse estudo, na medida em que ambos os laboratórios que participaram continuam interessados em buscar mais respostas para as questões levantadas. Como foi observado uma diferença bastante significativa no *uptake* de cisplatina, o próximo passo é justamente quantificar a quantidade de platina que foi internalizada e investigar mais profundamente as causas desse fenômeno. A troca do substrato de vidro para um substrato polimérico vai auxiliar na quantificação da Platina, pois assim não existirá o sinal do Silício que acaba contribuindo negativamente para as medidas. Além disso, a indução de ferroptose pela cisplatina é extremamente recente, fazendo com que haja diversos campos que podem ser explorados em trabalhos futuros.

Outro ponto a ressaltar é que o grupo de pesquisa vem expandindo seus interesses na área de interação de quimioterápicos a base de platina com células tumorais, principalmente envolvendo o tema de nanopartículas associadas a cisplatina para um entrega mais efetiva da droga. Devido as variadas técnicas presentes no LII, é possível caracterizar as nanopartículas por MEIS<sup>1</sup> e observar se elas foram internalizadas efetivamente por  $\mu$ -PIXE.

---

<sup>1</sup>Do Inglês, *Medium Energy Ion Scattering*.

## Referências

- ACS. **Cancer Treatment & Survivorship Facts & Figures 2019-2021**. 2019. Citado na página 1.
- ALDOSSARY, S. A. Review on pharmacology of cisplatin: Clinical use, toxicity and mechanism of resistance of cisplatin. **Biomedical and Pharmacology Journal**, Oriental Scientific Publishing Company, v. 12, n. 1, p. 07–15, fev. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.13005/bpj/1608>>. Citado na página 6.
- ARANGO, D. et al. Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. **British Journal of Cancer**, Springer Science and Business Media LLC, v. 91, n. 11, p. 1931–1946, nov. 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602215>>. Citado na página 4.
- ARCANE. **Particle Induced X-ray Emission (PIXE)**. 2020. Citado na página 22.
- BACKMAN, M. **Effects of nuclear and electronic stopping power on ion irradiation of silicon-based compounds**. Tese (Doutorado) — University of Helsinki, 2012. Citado na página 18.
- BORST, P. et al. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, Oxford University Press (OUP), v. 92, n. 16, p. 1295–1302, ago. 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jnci/92.16.1295>>. Citado na página 8.
- BREZAR, S. K. et al. Synergistic effect of cisplatin chemotherapy combined with fractionated radiotherapy regimen in HPV-positive and HPV-negative experimental pharyngeal squamous cell carcinoma. **Scientific Reports**, Springer Science and Business Media LLC, v. 10, n. 1, jan. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-58502-9>>. Citado na página 2.
- BROWNING, R. J. et al. Drug delivery strategies for platinum-based chemotherapy. **ACS Nano**, American Chemical Society (ACS), v. 11, n. 9, p. 8560–8578, ago. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.nano.7b04092>>. Citado na página 6.
- CHEN, X. et al. miR-873 acts as a novel sensitizer of glioma cells to cisplatin by targeting bcl-2. **International Journal of Oncology**, Spandidos Publications, v. 47, n. 4, p. 1603–1611, ago. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3143>>. Citado na página 2.
- CHOONG, G.; LIU, Y.; TEMPLETON, D. M. Interplay of calcium and cadmium in mediating cadmium toxicity. **Chemico-Biological Interactions**, Elsevier BV, v. 211, p. 54–65, mar. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.01.007>>. Citado na página 58.
- CRICHTON, R. **Iron Metabolism**. John Wiley & Sons, Ltd, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/9781118925645>>. Citado 2 vezes nas páginas 11 e 12.
- DABROWIAK, J. C.; GOODISMAN, J.; SOUID, A.-K. Kinetic study of the reaction of cisplatin with thiols. **Drug Metabolism and Disposition**, American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET), v. 30, n. 12, p. 1378–1384, dez. 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1124/dmd.30.12.1378>>. Citado na página 5.

DAVIES, M. S.; BERNERS-PRICE, S. J.; HAMBLEY, T. W. Slowing of cisplatin aquation in the presence of DNA but not in the presence of phosphate: improved understanding of sequence selectivity and the roles of monoaquated and diaquated species in the binding of cisplatin to DNA. **Inorganic Chemistry**, American Chemical Society (ACS), v. 39, n. 25, p. 5603–5613, dez. 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/ic000847w>>. Citado na página 5.

DILRUBA, S.; KALAYDA, G. V. Platinum-based drugs: past, present and future. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 77, n. 6, p. 1103–1124, fev. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00280-016-2976-z>>. Citado 3 vezes nas páginas 4, 7 e 8.

DORNELL, J. **In Vivo vs In Vitro: Definition, Pros and Cons**. 2021. Disponível em: <<https://www.technologynetworks.com/drug-discovery/articles/in-vivo-vs-in-vitro-definition-pros-and-cons-350415>>. Citado na página 10.

DUAN, X. et al. Nanoparticle formulations of cisplatin for cancer therapy. **WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology**, Wiley, v. 8, n. 5, p. 776–791, fev. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/wnan.1390>>. Citado na página 2.

FERRO, R. M. **Estudo do espectro contínuo de raios-X induzido pela passagem de prótons de alguns MeV na matéria**. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2021. Citado 2 vezes nas páginas 23 e 24.

FURUTA, T. et al. Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells. **Cancer Res**, v. 62, n. 17, p. 4899–4902, Sep 2002. Citado na página 8.

GALANSKI, M. Recent developments in the field of anticancer platinum complexes. **Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery**, Bentham Science Publishers Ltd., v. 1, n. 2, p. 285–295, jun. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.2174/157489206777442287>>. Citado na página 1.

GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. **Oncogene**, Springer Science and Business Media LLC, v. 31, n. 15, p. 1869–1883, set. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/onc.2011.384>>. Citado 2 vezes nas páginas 8 e 9.

GHOSH, S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. **Bioorganic Chemistry**, Elsevier BV, v. 88, p. 102925, jul. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.102925>>. Citado na página 2.

GIULIAN, R. **Estudo da composição elementar da erva-mate (Ilex paraguariensis)**. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Física, 2005. Citado na página 24.

GO, R. S.; ADJEI, A. A. Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. **Journal of Clinical Oncology**, American Society of Clinical Oncology (ASCO), v. 17, n. 1, p. 409–409, jan. 1999. Disponível em: <<https://doi.org/10.1200/jco.1999.17.1.409>>. Citado na página 6.

GONZÁLEZ-LÓPEZ, M. A. et al. Reducing the effective dose of cisplatin using gold nanoparticles as carriers. **Cancer Nanotechnology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 11,

n. 1, mar. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12645-020-00060-w>>. Citado na página 2.

GUO, J. et al. Ferroptosis: A novel anti-tumor action for cisplatin. **Cancer Research and Treatment**, Korean Cancer Association, v. 50, n. 2, p. 445–460, abr. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.4143/crt.2016.572>>. Citado 5 vezes nas páginas 11, 14, 15, 55 e 57.

IARC. **Latest global cancer data**. 2018. Disponível em: <<http://gco.iarc.fr/>>. Citado na página 1.

INCA. **Incidência de Câncer no Brasil**. 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/estimativa>>. Citado na página 1.

ISHIDA, S. et al. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter ctr1 in yeast and mammals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 99, n. 22, p. 14298–14302, out. 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.162491399>>. Citado na página 7.

JEOL. **Silicon Drift Detector**. 2020. Disponível em: <[https://www.jeol.co.jp/en/words/semterms/search\\_result.html?keyword=silicon-drift%20detector](https://www.jeol.co.jp/en/words/semterms/search_result.html?keyword=silicon-drift%20detector)>. Citado na página 31.

JEYNES, J. et al. Microbeam PIXE analysis of platinum resistant and sensitive ovarian cancer cells. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, Elsevier BV, v. 268, n. 11-12, p. 2168–2171, jun. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.nimb.2010.02.042>>. Citado na página 10.

JOHANSSON, S. et al. **Particle-Induced X-Ray Emission Spectrometry (PIXE)**. Wiley, 1995. (Chemical Analysis: A Series of Monographs on Analytical Chemistry and Its Applications). ISBN 9780471589440. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=zKgFMQrfiH8C>>. Citado 3 vezes nas páginas 20, 21 e 22.

KNITTEL. **Microscope Slides – Data Sheet**. 2012. Disponível em: <<https://knittel-glaeser.com/>>. Citado na página 38.

KUTWIN, M. et al. Assessment of the proliferation status of glioblastoma cell and tumour tissue after nanoplatinum treatment. **PLOS ONE**, Public Library of Science (PLoS), v. 12, n. 5, p. e0178277, maio 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178277>>. Citado na página 2.

LI, J. et al. Ferroptosis: past, present and future. **Cell Death & Disease**, Springer Science and Business Media LLC, v. 11, n. 2, fev. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41419-020-2298-2>>. Citado na página 57.

LIN, X. et al. The copper transporter CTR1 regulates cisplatin uptake in *saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Pharmacology**, American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET), v. 62, n. 5, p. 1154–1159, nov. 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1124/mol.62.5.1154>>. Citado na página 5.

LIN, Y. et al. Single cell imaging reveals cisplatin regulating interactions between transcription (co)factors and DNA. **Chemical Science**, Royal Society of Chemistry (RSC), v. 12, n. 15, p. 5419–5429, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/d0sc06760a>>. Citado na página 11.

LLABADOR, Y.; MORETTO, P. **Applications of Nuclear Microprobe in the Life Sciences: An Efficient Analytical Technique for the Research in Biology and Medicine**. World Scientific, 1998. ISBN 9789810223625. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=fc1PTeoLHN0C>>. Citado na página 25.

LODISH, H. et al. **Molecular Cell Biology**. W.H. Freeman, 2000. (Cd-Rom). ISBN 9780716737063. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=PrJHK8CFS8EC>>. Citado na página 37.

Lü, J.-M. et al. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, Wiley, v. 14, n. 4, p. 840–860, set. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x>>. Citado 2 vezes nas páginas 12 e 13.

MARTEIJN, J. A. et al. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 15, n. 7, p. 465–481, jun. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrm3822>>. Citado na página 9.

MICROBEAMS, O. **OMDAQ Software**. 2021. Disponível em: <<http://www.microbeams.co.uk/download.html>>. Citado na página 36.

MILLER, R. P. et al. Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity. **Toxins**, MDPI AG, v. 2, n. 11, p. 2490–2518, out. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/toxins2112490>>. Citado na página 2.

MITRE, A.-O. et al. Ferroptosis involvement in glioblastoma treatment. **Medicina**, MDPI AG, v. 58, n. 2, p. 319, feb 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390%2Fmedicina58020319>>. Citado na página 15.

NEUHAUSER, W. D.; ZHANG, R. The physics of proton therapy. **Physics in Medicine and Biology**, IOP Publishing, v. 60, n. 8, p. R155–R209, mar 2015. Disponível em: <<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0031-9155/60/8/R155/meta>>. Citado 2 vezes nas páginas 15 e 16.

NIEKRASZEWICZ, L. A. B. **Microanálise com Feixes de Íons: Caracterização de Elementos Leves em Materiais via Micro-NRA e Micro-PIXE**. Tese (Doutorado) — Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Física, 2014. Citado 5 vezes nas páginas 21, 27, 28, 29 e 30.

PLENCHETTE, S.; PAUL, C.; BETTAIEB, A. Nitric oxide and platinum-derivative-based regimens for cancer treatment: From preclinical studies to clinical trials. In: **Nitric Oxide as a Chemosensitizing Agent**. Elsevier, 2017. p. 91–103. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811020-1.00006-5>>. Citado 2 vezes nas páginas 7 e 8.

REED, S. J. B.; WARE, N. G. Escape peaks and internal fluorescence in x-ray spectra recorded with lithium drifted silicon detectors. **Journal of Physics E: Scientific Instruments**, IOP Publishing, v. 5, n. 6, p. 582–583, jun 1972. Disponível em: <<https://doi.org/10.1088/0022-3735/5/6/029>>. Citado na página 23.

ROCHA, C. et al. DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. **Clinics**, Fundacao Faculdade de Medicina, v. 73, n. Suppl 1, out. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.6061/clinics/2018/e478s>>. Citado na página 8.

ROSENBERG, B.; CAMP, L. V.; KRIGAS, T. Inhibition of cell division in escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode. **Nature**, Springer Science and Business Media LLC, v. 205, n. 4972, p. 698–699, fev. 1965. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/205698a0>>. Citado na página 2.

SCHARER, O. D. Nucleotide excision repair in eukaryotes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, Cold Spring Harbor Laboratory, v. 5, n. 10, p. a012609–a012609, out. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012609>>. Citado 2 vezes nas páginas 9 e 10.

SOUSA, G. F. de; WLODARCZYK, S. R.; MONTEIRO, G. Carboplatin: molecular mechanisms of action associated with chemoresistance. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, FapUNIFESP (SciELO), v. 50, n. 4, p. 693–701, dez. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s1984-82502014000400004>>. Citado na página 4.

TANAKA, N. et al. Quantitative analysis of cisplatin sensitivity of human esophageal squamous cancer cell lines using in-air micro-PIXE. **Cancer Science**, Wiley, v. 101, n. 6, p. 1487–1492, fev. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01542.x>>. Citado na página 11.

THOMPSON, A. et al. **X-ray data booklet**. Lawrence Berkeley National Laboratory: LBNL/PUB-490 Rev, 2009. Citado 2 vezes nas páginas e 67.

VAISMAN, A. et al. The role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance: correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts. **Cancer Res**, v. 58, n. 16, p. 3579–3585, Aug 1998. Citado na página 9.

WIELOPOLSKI, L.; GARDNER, R. P. Prediction of the pulse-height spectral distortion caused by the peak pile-up effect. **Nuclear Instruments and Methods**, v. 133, n. 2, p. 303–309, 1976. ISSN 0029-554X. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0029554X76906236>>. Citado na página 25.

WU, Y. et al. Ferroptosis in cancer treatment: Another way to rome. **Frontiers in Oncology**, Frontiers Media SA, v. 10, set. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fonc.2020.571127>>. Citado 2 vezes nas páginas 13 e 14.

ZHANG, Q.; LU, Q.-B. New combination chemotherapy of cisplatin with an electron-donating compound for treatment of multiple cancers. **Scientific Reports**, Springer Science and Business Media LLC, v. 11, n. 1, jan. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-80876-z>>. Citado na página 2.

Anexos



**ANEXO A – Energia dos fótons, em eV, das principais linhas de emissão das camadas K, L e M dos elementos químicos (THOMPSON et al., 2009).**

*X-Ray Data Booklet Table 1-2. Photon energies, in electron volts, of principal K-, L-, and M-shell emission lines.*

| <b>Element</b> | <b>K<math>\alpha_1</math></b> | <b>K<math>\alpha_2</math></b> | <b>K<math>\beta_1</math></b> | <b>L<math>\alpha_1</math></b> | <b>L<math>\alpha_2</math></b> | <b>L<math>\beta_1</math></b> | <b>L<math>\beta_2</math></b> | <b>L<math>\gamma_1</math></b> | <b>M<math>\alpha_1</math></b> |
|----------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 3 Li           | 54.3                          |                               |                              |                               |                               |                              |                              |                               |                               |
| 4 Be           | 108.5                         |                               |                              |                               |                               |                              |                              |                               |                               |
| 5 B            | 183.3                         |                               |                              |                               |                               |                              |                              |                               |                               |
| 6 C            | 277                           |                               |                              |                               |                               |                              |                              |                               |                               |
| 7 N            | 392.4                         |                               |                              |                               |                               |                              |                              |                               |                               |
| 8 O            | 524.9                         |                               |                              |                               |                               |                              |                              |                               |                               |
| 9 F            | 676.8                         |                               |                              |                               |                               |                              |                              |                               |                               |
| 10 Ne          | 848.6                         | 848.6                         |                              |                               |                               |                              |                              |                               |                               |
| 11 Na          | 1,040.98                      | 1,040.98                      | 1,071.1                      |                               |                               |                              |                              |                               |                               |
| 12 Mg          | 1,253.60                      | 1,253.60                      | 1,302.2                      |                               |                               |                              |                              |                               |                               |
| 13 Al          | 1,486.70                      | 1,486.27                      | 1,557.45                     |                               |                               |                              |                              |                               |                               |
| 14 Si          | 1,739.98                      | 1,739.38                      | 1,835.94                     |                               |                               |                              |                              |                               |                               |
| 15 P           | 2,013.7                       | 2,012.7                       | 2,139.1                      |                               |                               |                              |                              |                               |                               |
| 16 S           | 2,307.84                      | 2,306.64                      | 2,464.04                     |                               |                               |                              |                              |                               |                               |
| 17 Cl          | 2,622.39                      | 2,620.78                      | 2,815.6                      |                               |                               |                              |                              |                               |                               |
| 18 Ar          | 2,957.70                      | 2,955.63                      | 3,190.5                      |                               |                               |                              |                              |                               |                               |
| 19 K           | 3,313.8                       | 3,311.1                       | 3,589.6                      |                               |                               |                              |                              |                               |                               |
| 20 Ca          | 3,691.68                      | 3,688.09                      | 4,012.7                      | 341.3                         | 341.3                         | 344.9                        |                              |                               |                               |
| 21 Sc          | 4,090.6                       | 4,086.1                       | 4,460.5                      | 395.4                         | 395.4                         | 399.6                        |                              |                               |                               |

*Table 1-2. Energies of x-ray emission lines (continued).*

| Element | $K\alpha_1$ | $K\alpha_2$ | $K\beta_1$ | $L\alpha_1$ | $L\alpha_2$ | $L\beta_1$ | $L\beta_2$ | $L\gamma_1$ | $M\alpha_1$ |
|---------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|
| 22 Ti   | 4,510.84    | 4,504.86    | 4,931.81   | 452.2       | 452.2       | 458.4      |            |             |             |
| 23 V    | 4,952.20    | 4,944.64    | 5,427.29   | 511.3       | 511.3       | 519.2      |            |             |             |
| 24 Cr   | 5,414.72    | 5,405.509   | 5,946.71   | 572.8       | 572.8       | 582.8      |            |             |             |
| 25 Mn   | 5,898.75    | 5,887.65    | 6,490.45   | 637.4       | 637.4       | 648.8      |            |             |             |
| 26 Fe   | 6,403.84    | 6,390.84    | 7,057.98   | 705.0       | 705.0       | 718.5      |            |             |             |
| 27 Co   | 6,930.32    | 6,915.30    | 7,649.43   | 776.2       | 776.2       | 791.4      |            |             |             |
| 28 Ni   | 7,478.15    | 7,460.89    | 8,264.66   | 851.5       | 851.5       | 868.8      |            |             |             |
| 29 Cu   | 8,047.78    | 8,027.83    | 8,905.29   | 929.7       | 929.7       | 949.8      |            |             |             |
| 30 Zn   | 8,638.86    | 8,615.78    | 9,572.0    | 1,011.7     | 1,011.7     | 1,034.7    |            |             |             |
| 31 Ga   | 9,251.74    | 9,224.82    | 10,264.2   | 1,097.92    | 1,097.92    | 1,124.8    |            |             |             |
| 32 Ge   | 9,886.42    | 9,855.32    | 10,982.1   | 1,188.00    | 1,188.00    | 1,218.5    |            |             |             |
| 33 As   | 10,543.72   | 10,507.99   | 11,726.2   | 1,282.0     | 1,282.0     | 1,317.0    |            |             |             |
| 34 Se   | 11,222.4    | 11,181.4    | 12,495.9   | 1,379.10    | 1,379.10    | 1,419.23   |            |             |             |
| 35 Br   | 11,924.2    | 11,877.6    | 13,291.4   | 1,480.43    | 1,480.43    | 1,525.90   |            |             |             |
| 36 Kr   | 12,649      | 12,598      | 14,112     | 1,586.0     | 1,586.0     | 1,636.6    |            |             |             |
| 37 Rb   | 13,395.3    | 13,335.8    | 14,961.3   | 1,694.13    | 1,692.56    | 1,752.17   |            |             |             |
| 38 Sr   | 14,165      | 14,097.9    | 15,835.7   | 1,806.56    | 1,804.74    | 1,871.72   |            |             |             |
| 39 Y    | 14,958.4    | 14,882.9    | 16,737.8   | 1,922.56    | 1,920.47    | 1,995.84   |            |             |             |
| 40 Zr   | 15,775.1    | 15,690.9    | 17,667.8   | 2,042.36    | 2,039.9     | 2,124.4    | 2,219.4    | 2,302.7     |             |

|       |           |          |          |          |          |          |          |          |       |
|-------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-------|
| 41 Nb | 16,615.1  | 16,521.0 | 18,622.5 | 2,165.89 | 2,163.0  | 2,257.4  | 2,367.0  | 2,461.8  |       |
| 42 Mo | 17,479.34 | 17,374.3 | 19,608.3 | 2,293.16 | 2,289.85 | 2,394.81 | 2,518.3  | 2,623.5  |       |
| 43 Tc | 18,367.1  | 18,250.8 | 20,619   | 2,424    | 2,420    | 2,538    | 2,674    | 2,792    |       |
| 44 Ru | 19,279.2  | 19,150.4 | 21,656.8 | 2,558.55 | 2,554.31 | 2,683.23 | 2,836.0  | 2,964.5  |       |
| 45 Rh | 20,216.1  | 20,073.7 | 22,723.6 | 2,696.74 | 2,692.05 | 2,834.41 | 3,001.3  | 3,143.8  |       |
| 46 Pd | 21,177.1  | 21,020.1 | 23,818.7 | 2,838.61 | 2,833.29 | 2,990.22 | 3,171.79 | 3,328.7  |       |
| 47 Ag | 22,162.92 | 21,990.3 | 24,942.4 | 2,984.31 | 2,978.21 | 3,150.94 | 3,347.81 | 3,519.59 |       |
| 48 Cd | 23,173.6  | 22,984.1 | 26,095.5 | 3,133.73 | 3,126.91 | 3,316.57 | 3,528.12 | 3,716.86 |       |
| 49 In | 24,209.7  | 24,002.0 | 27,275.9 | 3,286.94 | 3,279.29 | 3,487.21 | 3,713.81 | 3,920.81 |       |
| 50 Sn | 25,271.3  | 25,044.0 | 28,486.0 | 3,443.98 | 3,435.42 | 3,662.80 | 3,904.86 | 4,131.12 |       |
| 51 Sb | 26,359.1  | 26,110.8 | 29,725.6 | 3,604.72 | 3,595.32 | 3,843.57 | 4,100.78 | 4,347.79 |       |
| 52 Te | 27,472.3  | 27,201.7 | 30,995.7 | 3,769.33 | 3,758.8  | 4,029.58 | 4,301.7  | 4,570.9  |       |
| 53 I  | 28,612.0  | 28,317.2 | 32,294.7 | 3,937.65 | 3,926.04 | 4,220.72 | 4,507.5  | 4,800.9  |       |
| 54 Xe | 29,779    | 29,458   | 33,624   | 4,109.9  | —        | —        | —        | —        |       |
| 55 Cs | 30,972.8  | 30,625.1 | 34,986.9 | 4,286.5  | 4,272.2  | 4,619.8  | 4,935.9  | 5,280.4  |       |
| 56 Ba | 32,193.6  | 31,817.1 | 36,378.2 | 4,466.26 | 4,450.90 | 4,827.53 | 5,156.5  | 5,531.1  |       |
| 57 La | 33,441.8  | 33,034.1 | 37,801.0 | 4,650.97 | 4,634.23 | 5,042.1  | 5,383.5  | 5,788.5  | 833   |
| 58 Ce | 34,719.7  | 34,278.9 | 39,257.3 | 4,840.2  | 4,823.0  | 5,262.2  | 5,613.4  | 6,052    | 883   |
| 59 Pr | 36,026.3  | 35,550.2 | 40,748.2 | 5,033.7  | 5,013.5  | 5,488.9  | 5,850    | 6,322.1  | 929   |
| 60 Nd | 37,361.0  | 36,847.4 | 42,271.3 | 5,230.4  | 5,207.7  | 5,721.6  | 6,089.4  | 6,602.1  | 978   |
| 61 Pm | 38,724.7  | 38,171.2 | 43,826   | 5,432.5  | 5,407.8  | 5,961    | 6,339    | 6,892    | —     |
| 62 Sm | 40,118.1  | 39,522.4 | 45,413   | 5,636.1  | 5,609.0  | 6,205.1  | 6,586    | 7,178    | 1,081 |

Table 1-2. Energies of x-ray emission lines (continued).

| Element | $K\alpha_1$ | $K\alpha_2$ | $K\beta_1$ | $L\alpha_1$ | $L\alpha_2$ | $L\beta_1$ | $L\beta_2$ | $L\gamma_1$ | $M\alpha_1$ |
|---------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|
| 63 Eu   | 41,542.2    | 40,901.9    | 47,037.9   | 5,845.7     | 5,816.6     | 6,456.4    | 6,843.2    | 7,480.3     | 1,131       |
| 64 Gd   | 42,996.2    | 42,308.9    | 48,697     | 6,057.2     | 6,025.0     | 6,713.2    | 7,102.8    | 7,785.8     | 1,185       |
| 65 Tb   | 44,481.6    | 43,744.1    | 50,382     | 6,272.8     | 6,238.0     | 6,978      | 7,366.7    | 8,102       | 1,240       |
| 66 Dy   | 45,998.4    | 45,207.8    | 52,119     | 6,495.2     | 6,457.7     | 7,247.7    | 7,635.7    | 8,418.8     | 1,293       |
| 67 Ho   | 47,546.7    | 46,699.7    | 53,877     | 6,719.8     | 6,679.5     | 7,525.3    | 7,911      | 8,747       | 1,348       |
| 68 Er   | 49,127.7    | 48,221.1    | 55,681     | 6,948.7     | 6,905.0     | 7,810.9    | 8,189.0    | 9,089       | 1,406       |
| 69 Tm   | 50,741.6    | 49,772.6    | 57,517     | 7,179.9     | 7,133.1     | 8,101      | 8,468      | 9,426       | 1,462       |
| 70 Yb   | 52,388.9    | 51,354.0    | 59,370     | 7,415.6     | 7,367.3     | 8,401.8    | 8,758.8    | 9,780.1     | 1,521.4     |
| 71 Lu   | 54,069.8    | 52,965.0    | 61,283     | 7,655.5     | 7,604.9     | 8,709.0    | 9,048.9    | 10,143.4    | 1,581.3     |
| 72 Hf   | 55,790.2    | 54,611.4    | 63,234     | 7,899.0     | 7,844.6     | 9,022.7    | 9,347.3    | 10,515.8    | 1,644.6     |
| 73 Ta   | 57,532      | 56,277      | 65,223     | 8,146.1     | 8,087.9     | 9,343.1    | 9,651.8    | 10,895.2    | 1,710       |
| 74 W    | 59,318.24   | 57,981.7    | 67,244.3   | 8,397.6     | 8,335.2     | 9,672.35   | 9,961.5    | 11,285.9    | 1,775.4     |
| 75 Re   | 61,140.3    | 59,717.9    | 69,310     | 8,652.5     | 8,586.2     | 10,010.0   | 10,275.2   | 11,685.4    | 1,842.5     |
| 76 Os   | 63,000.5    | 61,486.7    | 71,413     | 8,911.7     | 8,841.0     | 10,355.3   | 10,598.5   | 12,095.3    | 1,910.2     |
| 77 Ir   | 64,895.6    | 63,286.7    | 73,560.8   | 9,175.1     | 9,099.5     | 10,708.3   | 10,920.3   | 12,512.6    | 1,979.9     |
| 78 Pt   | 66,832      | 65,112      | 75,748     | 9,442.3     | 9,361.8     | 11,070.7   | 11,250.5   | 12,942.0    | 2,050.5     |
| 79 Au   | 68,803.7    | 66,989.5    | 77,984     | 9,713.3     | 9,628.0     | 11,442.3   | 11,584.7   | 13,381.7    | 2,122.9     |
| 80 Hg   | 70,819      | 68,895      | 80,253     | 9,988.8     | 9,897.6     | 11,822.6   | 11,924.1   | 13,830.1    | 2,195.3     |
| 81 Tl   | 72,871.5    | 70,831.9    | 82,576     | 10,268.5    | 10,172.8    | 12,213.3   | 12,271.5   | 14,291.5    | 2,270.6     |

|       |          |          |         |          |           |          |          |          |         |
|-------|----------|----------|---------|----------|-----------|----------|----------|----------|---------|
| 82 Pb | 74,969.4 | 72,804.2 | 84,936  | 10,551.5 | 10,449.5  | 12,613.7 | 12,622.6 | 14,764.4 | 2,345.5 |
| 83 Bi | 77,107.9 | 74,814.8 | 87,343  | 10,838.8 | 10,730.91 | 13,023.5 | 12,979.9 | 15,247.7 | 2,422.6 |
| 84 Po | 79,290   | 76,862   | 89,800  | 11,130.8 | 11,015.8  | 13,447   | 13,340.4 | 15,744   | —       |
| 85 At | 81,520   | 78,950   | 92,300  | 11,426.8 | 11,304.8  | 13,876   | —        | 16,251   | —       |
| 86 Rn | 83,780   | 81,070   | 94,870  | 11,727.0 | 11,597.9  | 14,316   | —        | 16,770   | —       |
| 87 Fr | 86,100   | 83,230   | 97,470  | 12,031.3 | 11,895.0  | 14,770   | 14,450   | 17,303   | —       |
| 88 Ra | 88,470   | 85,430   | 100,130 | 12,339.7 | 12,196.2  | 15,235.8 | 14,841.4 | 17,849   | —       |
| 89 Ac | 90,884   | 87,670   | 102,850 | 12,652.0 | 12,500.8  | 15,713   | —        | 18,408   | —       |
| 90 Th | 93,350   | 89,953   | 105,609 | 12,968.7 | 12,809.6  | 16,202.2 | 15,623.7 | 18,982.5 | 2,996.1 |
| 91 Pa | 95,868   | 92,287   | 108,427 | 13,290.7 | 13,122.2  | 16,702   | 16,024   | 19,568   | 3,082.3 |
| 92 U  | 98,439   | 94,665   | 111,300 | 13,614.7 | 13,438.8  | 17,220.0 | 16,428.3 | 20,167.1 | 3,170.8 |
| 93 Np | —        | —        | —       | 13,944.1 | 13,759.7  | 17,750.2 | 16,840.0 | 20,784.8 | —       |
| 94 Pu | —        | —        | —       | 14,278.6 | 14,084.2  | 18,293.7 | 17,255.3 | 21,417.3 | —       |
| 95 Am | —        | —        | —       | 14,617.2 | 14,411.9  | 18,852.0 | 17,676.5 | 22,065.2 | —       |