



DESENVOLVIMENTO DE UM EXPERIMENTO DE QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS POR FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X E APLICAÇÃO PARA O ESTUDO DE MODELOS DE EPILEPSIA EM ROEDORES.

Pedro Piquet¹; Jean Rinkel².

O PROJETO

Uma colaboração foi estabelecida entre o Departamento de Genética Médica e Medicina Genômica (DGM) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) e o Departamento de Física Aplicada (DFA) do Instituto de Física (IFGW) da UNICAMP para o estudo da epilepsia pela técnica de fluorescência de raios X por energia dispersiva (Energy Dispersive X-Ray Fluorescence, EDXRF).

O principal objetivo do projeto foi otimizar os parâmetros experimentais para conseguir estimar com maior precisão as possíveis variações na concentração dos metais de interesse, o Ferro (indicador da atividade mitocondrial) e o Zinco (envolvido nos processos de ativação dos fatores de transcrição), entre o grupo controle (cérebros normais) e o de teste (cérebros com epilepsia induzida), várias regiões do hipocampo foram estudadas, com um foco especial nas lesões do giro denteado.

O estudo foi feito a partir da quantificação da concentração desses diferentes metais (Ferro e Zinco) em cérebros de roedores, por meio do método desenvolvido por Silva et al para a fluorescência e o método desenvolvido por Geraldelli et al para o espalhamento a baixo ângulo.

¹ Aluno;

² Orientador.

MÉTODO: FLUORESCÊNCIA POR ESPALHAMENTO

- Correlação linear entre a razão de fluorescência por espalhamento e a concentração do elemento na amostra;
- Diferentes aplicações do método.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Trace elements as tumor biomarkers and prognostic factors in breast cancer: a study through energy dispersive x-ray fluorescence

Marina P Silva^{1*}, Danilo F Soave^{2†}, Alfredo Ribeiro-Silva^{2†} and Martin E Poletti^{1†}

Abstract

Background: The application and better understanding of traditional and new breast tumor biomarkers and prognostic factors are increasing due to the fact that they are able to identify individuals at high risk of breast cancer, who may benefit from preventive interventions. Also, biomarkers can make possible for physicians to design an individualized treatment for each patient. Previous studies showed that trace elements (TEs) determined by X-

Determination of Ca, Fe, Cu and Zn and their correlations in breast cancer and normal adjacent tissues

M. P. Silva,^a A. Tomal,^a C. A. Pérez,^b A. Ribeiro-Silva^c and M. E. Poletti^{a*}

An experimental procedure using monoenergetic Synchrotron Radiation x-ray Fluorescence (SR-XRF) method was studied, justified and applied to determine trace elements concentrations of normal and neoplastic human breast tissues in the same individual. Scattered radiation from each sample was used as an internal standard in x-ray emission spectroscopy in order to construct calibration curves used to determine Ca, Fe, Cu and Zn concentrations in 52 breast tissue specimens (26 neoplastic and 26 adjacent normal tissues).

This work showed that this experimental alternative is approximately matrix independent and also allows a reduction in instrumental variables. Our results showed, as expected, that Ca, Fe, Cu and Zn concentrations levels were significantly higher in neoplastic than in healthy breast tissues (all $p < 0.001$). It was also observed that Fe and Cu levels are correlated in malignant breast tissues as well as Ca and Zn levels, indicating that these elements' concentrations are related, in agreement with the hypothesis that there is a connection between Fe and Cu with both increased cellular activity and blood supply in the formation of neoplasias in breast tissue, and between Ca and Zn as regulators of neoplasias growth, since these metals are present in active matrix metalloproteinases (MMPs). Copyright © 2008 John Wiley & Sons, Ltd.

Figuras 1 e 2. Artigos exemplificando o uso da metodologia em câncer de mama



DESENVOLVIMENTO DE UM EXPERIMENTO DE QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS POR FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X E APLICAÇÃO PARA O ESTUDO DE MODELOS DE EPILEPSIA EM ROEDORES.

ETAPAS DO PROJETO

- Caracterização dos canais do detector CtDe a partir de linhas de emissão de metais conhecidos.
- Desenvolvimento da gelatina a base de glicerina como amostras padrão, possibilitando a construção das primeiras retas de concentração por fluorescência /espalhamento;
- Realização dos primeiros testes com amostras biológicas controle, na qual foi possível a identificação de três picos associados aos metais presente no cérebro controle: Calcio, Ferro e Zinco.
- Análise e tratamento estatístico dos dados extraídos a partir dos espectros energéticos.

Figura 3. Espectro utilizado para realizar a caracterização do detector

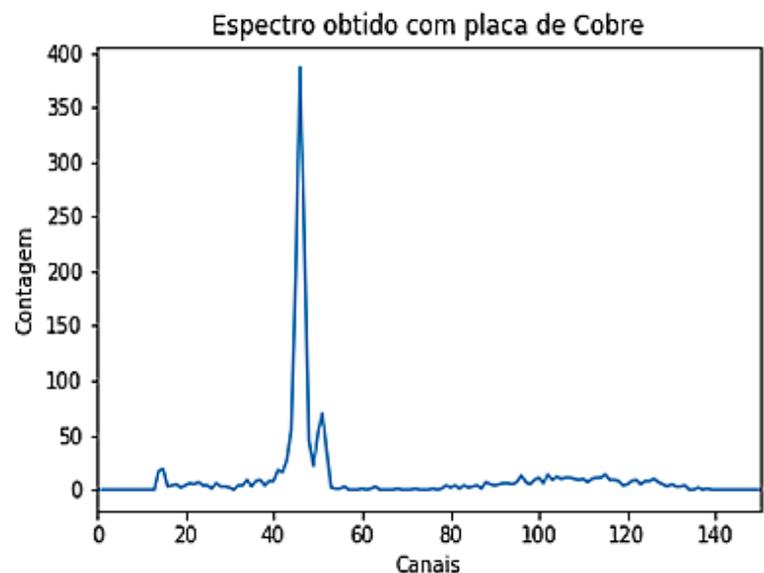
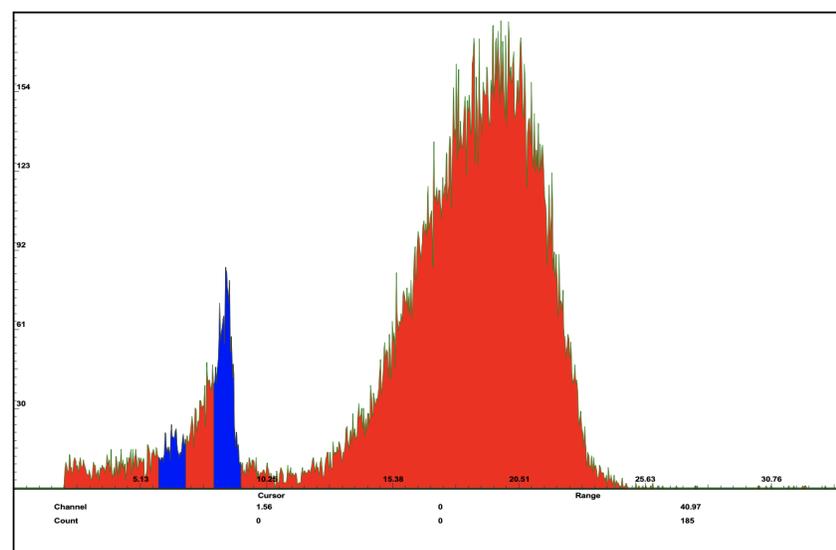


Figura 4. Exemplo de espectro obtido a partir das amostras biológicas.



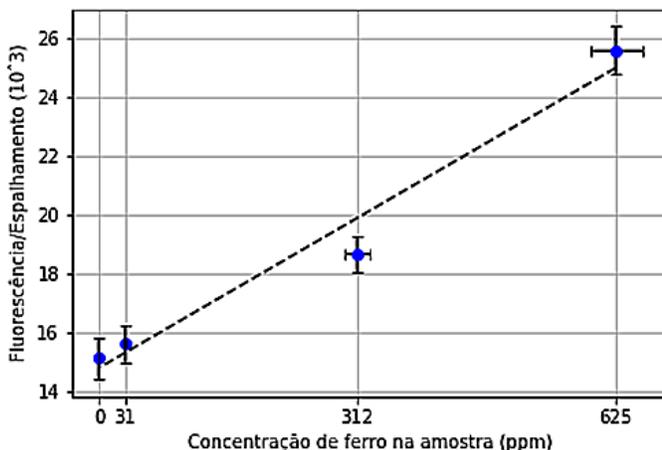
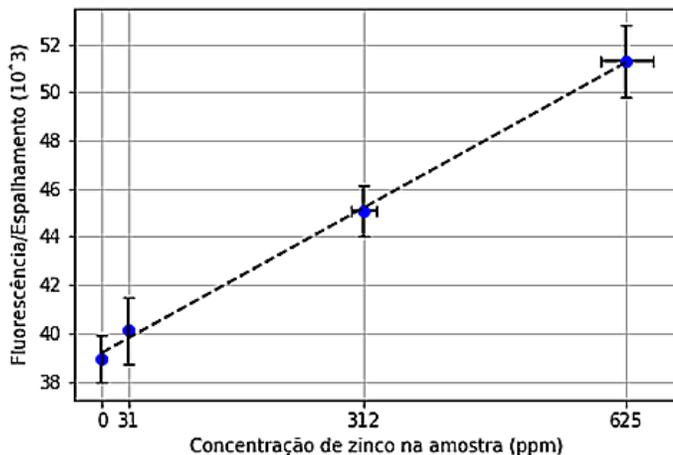
DESENVOLVIMENTO DE UM EXPERIMENTO DE QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS POR FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X E APLICAÇÃO PARA O ESTUDO DE MODELOS DE EPILEPSIA EM ROEDORES.

RESULTADOS INICIAIS

-Retas de concentração | Zinco e Ferro

-Erro alto para baixas concentrações devido ao ruído

-Atual limite de detecção | Signal to Noise Ratio



- Nessa fase do projeto buscávamos conseguir confirmar, a partir de nossas medidas, a relação linear:

$$\frac{F}{E} = \alpha C$$

- As retas obtidas comprovam essa relação com clareza, dado que ambas as retas apresentam um coeficiente de correlação entre a concentração e a razão F/E muito próximo de 1, para o ferro $\rho = 0.9854$ e para o zinco $\rho = 0.999$.
- Notou-se em ambas as retas, que para concentrações mais baixas, nos pontos de 0ppm e 31ppm, os intervalos de incerteza intersectam, limitando a confiabilidade desses valores, isso indica que nessa faixa estamos próximo do atual limite de detecção

DESENVOLVIMENTO DE UM EXPERIMENTO DE QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS POR FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X E APLICAÇÃO PARA O ESTUDO DE MODELOS DE EPILEPSIA EM ROEDORES.

• DETERMINANDO O LIMITE DE DETEÇÃO

- Signal to Noise Ratio (S/N)
- Limite de detecção é aquele no qual: $S/N < 3$
- Aproximadamente 31ppm para o Ferro e Zinco

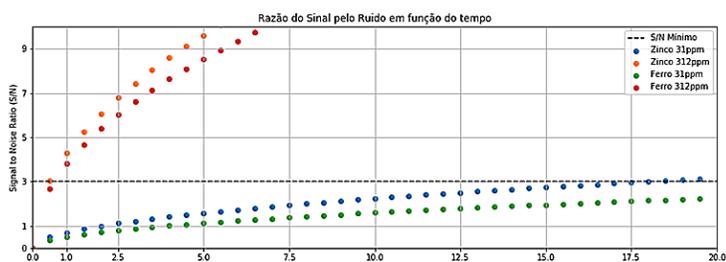


Figura 5. Gráfico do Sinal pelo Ruído em função do tempo de medição

• AQUISIÇÕES E PRIMEIRAS MEDIDAS COM AS AMOSTRAS DE CÉREBRO CONTROLE

- Possível identificação da presença dos metais
- 3 picos notáveis: Cálcio ($K\alpha$: 3.7KeV), Ferro ($K\alpha$: 6.4KeV) e Zinco ($K\alpha$: 8.6KeV)

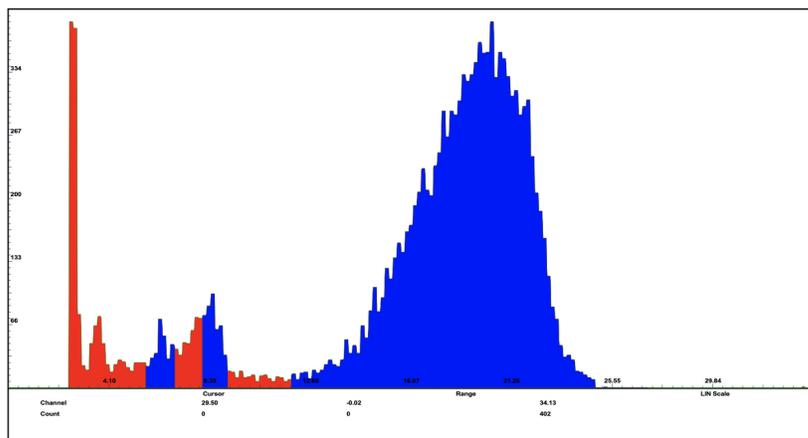


Figura 7. Primeiro espectro obtido a partir das amostras biológicas (Retirado diretamente do software Amptek DppMCA)

Devido a incerteza do detector utilizado seguir a distribuição de Poisson. É possível aumentar o S/N, e portanto, a qualidade do sinal, por meio do aumento do tempo de captura para cada amostra. Assim, realizando medidas mais longas, melhoramos a confiabilidade dos resultados obtidos.

A partir do gráfico, nota-se que a concentração de 31ppm do ferro e zinco, para tempos curtos, apresenta um S/N abaixo do limite mínimo, porém, aumentando o tempo de medida consideravelmente podemos atingir uma qualidade suficiente do sinal.

Os valores encontrados para as concentrações dos metais de interesse a partir da razão F/E medidos na amostra foram incompatíveis com as retas expostas anteriormente, acreditamos que esse problema advém do vidro utilizado para suportar as amostras biológicas, que está poluindo o espectro com elementos fluorescentes que compõe o material, comprometendo a qualidade do sinal detectado. As próximas medidas serão, portanto, realizadas utilizando um suporte de acrílico, do qual é esperado uma atenuação muito mais reduzida.

Apesar dos problemas enfrentados, encontramos valores satisfatórios de S/N para os sinais do Ferro e Zinco. Isto é, foi possível a partir dessa medida, detectar a presença dos metais na amostra. Assim, aumentando os tempos de medida, espera-se que possamos estimar as concentrações com um alto nível de confiabilidade

DESENVOLVIMENTO DE UM EXPERIMENTO DE QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS POR FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X E APLICAÇÃO PARA O ESTUDO DE MODELOS DE EPILEPSIA EM ROEDORES.

CONCLUSÕES

A gelatina a base de glicerina desenvolvida no projeto forneceu boas medidas com alto grau de reprodutibilidade, por meio dela foi possível a construção das retas de concentração e a replicação bem-sucedida do método Silva et. Al. de Fluorescência por Espalhamento.

Devido a limitações encontradas com os parâmetros experimentais, ainda não foi possível realizar uma estimativa confiável das concentrações metálicas nos cérebros de rato. Apesar disso, foi identificado com sucesso a presença dos metais de interesse nas amostras, esclarecendo o caminho a ser tomado no futuro do projeto.

OBJETIVOS FUTUROS DO PROJETO

Apesar do sucesso das amostras padrão, as retas obtidas possuem altas incertezas para baixas concentrações, além de apresentar poucos pontos experimentais. Para melhorar esses parâmetros, foram desenvolvidas mais amostras de ambos os metais, cobrindo um maior intervalo de concentração com um maior número pontos experimentais.

No atual estágio do projeto realizamos medidas apenas com cérebros do grupo de controle. Futuramente, com a aquisição dos dois grupos de amostras com epilepsia induzida, poderemos analisar e comparar os espectros, buscando variações significativas dos metais entre os três grupos de roedores. Permitindo assim, desenvolver o principal objetivo do projeto, a descrição do comportamento das concentrações dos metais devido ao quadro epiléptico.