



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARCELO ESTEVAM

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE METAIS NO ORGANISMO DE
RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256 E
CAMUNDONGOS INFECTADOS COM O PROTOZOÁRIO
TRYPANOSOMA CRUZI PELA TÉCNICA DE
FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X PORTÁTIL (PXRF)**

Londrina
2009

MARCELO ESTEVAM

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE METAIS NO ORGANISMO DE
RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256 E
CAMUNDONGOS INFECTADOS COM O PROTOZOÁRIO
TRYPANOSOMA CRUZI PELA TÉCNICA DE
FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X PORTÁTIL (PXRF)**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Física da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Física.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Appoloni
Co-orientador: Prof. Dr. Phileo Pingé Filho

Londrina
2009

MARCELO ESTEVAM

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE METAIS NO ORGANISMO DE RATOS
PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256 E CAMUNDONGOS
INFECTADOS COM O PROTOZOÁRIO *TRYPANOSOMA CRUZI* PELA
TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X PORTÁTIL (PXRF)**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Física da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Física.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Roberto Appoloni
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Avacir Casanova Andrello
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Virgílio Franco Nascimento Filho
Universidade de São Paulo

Prof^a. Dra. Márcia de Almeida Rizzutto
Universidade de São Paulo

Prof^o Dr. Fábio Luiz Melquiades
Universidade Estadual do Centro-Oeste

Londrina, ____ de _____ de 200__.

DEDICATÓRIA

A Deus e a minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Carlos Roberto Appoloni pela paciência, confiança, amizade, conselhos, bom humor, ensinamentos e muitas outras coisas que hoje fazem parte do meu caráter.

Ao Professor Phileo Pinge Filho pela confiança, amizade e ensinamentos.

Aos amigos Carolina Panis – Mestre em Ciências Biológicas, Paula Ferracioli e Vanessa Jacobis – IC em Ciências Biológicas, Felipe de Souza, Salomão Cury Riechi e Diego Lima Petenuci IC em Farmácia, pela ajuda nos experimentos, companhia nas madrugadas e fins de semana no laboratório, compreensão e ensinamentos.

Aos Professores Celso L. Borges e Aparecida Malvezi pela ajuda nas medidas *in vivo* no Laboratório de Imunologia e pelos dados de pesquisa.

As alunas de Farmácia Thalita Perdigão e Juliana Alves por colherem as primeiras amostras de Tumor de Walker em 2005.

Aos Professores Fábio Luis Melquiades e Paulo Sérgio Parreira pela ajuda nas horas de dificuldades e sugestões.

Ao Médico Veterinário Jayme Augusto Peres pelas primeiras amostras de neoplasias eqüinas e por ter acreditado no meu trabalho.

A Professora Ângela Maria Ferreira Falleiros pela ajuda na interpretação dos primeiros resultados.

A grande parte do corpo docente da Especialização em Biologia Aplicada à Saúde que compreenderam minha estada pela Biologia.

Ao corpo docente da Especialização em Química do Cotidiano, em especial ao Prof. Dimas Augusto Morozin Zaia e a Prof^a. Suely R. C. Andrade, que compreenderam minha estada pela Química.

A todos os amigos e companheiros dos cursos de Física, Biologia e Química.

Aos meus familiares, amigos, alunos, diretores e coordenadores que compreenderam minha total falta de tempo. Em especial a minha amiga Giuliane pela ajuda e pelos momentos de alegria.

ESTEVAM, Marcelo. **Avaliação dos níveis de metais no organismo de ratos portadores de tumor de Walker-256 e camundongos portadores de *Trypanosoma cruzi* pela técnica de fluorescência de raios X portátil (PXRF)**. 2009. 87f. Tese (Doutorado em Física) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina / PR.

RESUMO

Parte 1: Nos últimos 25 anos foram desenvolvidas técnicas não invasivas para determinação de concentrações de metais *in vivo*. Aprimoramentos tecnológicos recentes permitem que a técnica de Fluorescência de Raios X Portátil (PXRF) tenha sensibilidade suficiente para diagnósticos ou monitoramento em aplicações biomédicas. Uma aplicação potencial envolve a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, um parasita protozoário que causa a doença humana difundida na América Latina, conhecida como doença de Chagas. As alterações nos níveis de metais presentes em animais infectados por essa doença nunca foram medidos *in vivo* por PXRF durante o progresso da infecção experimental. O estudo utilizou duas espécies de camundongos, camundongos C57BL/6 que são resistentes à infecção e os Swiss suscetíveis a infecção. Para as medidas *in vivo* foi utilizado um sistema portátil, denominado PXRF-LFNA 01, que possibilita arranjos geométricos que viabilizam as medidas nas mais variadas situações e locais distantes. Esse sistema é constituído de um detector Si PIN-diodo e uma fonte de Pu-238 (17,2 keV; 95.2 mCi; 86.v). Os animais não isogênicos foram infectados por *T. cruzi* (cepa Y). Os espectros de Fluorescência de Raios X (XRF) foram analisados utilizando os programas AXIL e WinQXAS da AIEA. Medidas em simulados de pele com concentrações de Fe de 10 a 150 ppm, fornecem um limite mínimo de detecção (LD) de 13 ppm, em medidas de 50 segundos e dose superficial menores que 10 mSv. Os resultados sugerem que a patogenicidade do *T. cruzi* correlaciona sua taxa de crescimento com a quantidade de Fe medida por XRF.

Parte 2: Atualmente ainda não são conhecidos totalmente os processos metabólicos envolvidos no progresso de uma neoplasia maligna. Conhecer as alterações nos níveis dos metais em organismos portadores de câncer é de suma importância para uma compreensão desses processos metabólicos. Não ocorre nenhuma citação na biografia mundial sobre o acompanhamento dessas alterações por XRF, bem como, sua correlação com tratamentos que utilizam drogas antiinflamatórias em ratos portadores de tumor de Walker-256 (TW-256) usando um sistema de PXRF. Os animais utilizados foram ratos Wistar albinos. Para implantação no animal foi injetado uma quantidade padronizada de células do carcinoma subcutaneamente (8×10^7 cels / rato) no flanco direito (ACCO *et al*, 2007). Grupos controles (normais) receberam solução salina e ratos do grupo experimental receberam celecoxibe (CL) diariamente e/ou aminoguanidina (AG). No 10º dia os tumores do músculo gastrocnêmio que receberam o implante do tumor foram retirados. Para as medidas *in vivo* na pele foi utilizado o sistema PXRF-LFNA-01. Para as medidas *in natura* dos tumores e músculo foi usado o sistema PXRF-LFNA-02, constituído de um míni tubo de raios X (alvo de Ag, 20-28 kV/5-10 μ A). A duração de cada medida foi de 200 s. O LLD foi de 9 ppm para o Fe, 11 ppm para o Cu e 6 ppm para o Zn. Foi verificada viável a aplicação da PXRF para a determinação de alterações nos níveis de metais em ratos portadores de TW-256.

Palavras-chaves: PXRF. *Trypanosoma cruzi* e tumor de Walker-256.

ESTEVAM, Marcelo. **Evaluation of the levels of metals in mice carrier of tumor of Walker-256 and mice carrier of *Trypanosoma cruzi* through the technique of portable X-ray fluorescence (PXRF)**. 2009. 87f. Tese (PhD Thesis in Physics) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina / PR.

ABSTRACT

Part 1: At the last twenty five years until nowadays were developed non-invasive techniques for the determination of metal concentrations *in vivo*. Recent technological improvements allow the technique of Portable X-Ray Fluorescence (PXRF) has sufficient sensitivity for diagnostic or monitoring in biomedical applications. A potential application involves infection by *Trypanosoma cruzi*, a protozoan parasite that causes human disease spread on Latin America, known as Chagas disease. The modification in levels of metals present in animals infected with this disease has never been measured *in vivo* by PXRF during the progress of experimental infection. The study used two species of mice, C57BL / 6 mice that are resistant to the infection and the Swiss, susceptible to the infection. For the measurements *in vivo*, were used a portable system, PXRF-LFNA 01, that allows geometric arrangements enabling the measures in the most of situations and locations. This system consists in a detector Si PIN-diode, a source of Pu-238 (17,2 keV, 95.2 mCi; 86.v). The non isogenic animals were infected *T. cruzi* (Y strain). The spectra of fluorescence X-ray (XRF) were analyzed using the programs AXIL and WinQXAS the IAEA. Measures in phantoms of skin doped with concentration of Fe from 10 to 150 ppm, provide a lower limit of detection (LLD) of 13 ppm, in times of 50 seconds and surface dose of less than 10 mSv. The results suggest that the pathogenicity of *T. cruzi* correlates its growth rate with the amount of Fe measured by XRF.

Part 2: Nowadays are not known fully the metabolic process involved in the progress of a malignancy. Knowing the changes in the levels of metals in bodies of cancer patients is of summary importance for an understanding of these metabolic process. There will be no citation in the world bibliography on the monitoring of these changes by XRF, as well as its correlation with treatments that use anti-inflammatory drugs in rats with Walker-256 tumor (TW-256) using a system PXRF. The used animals were albino rats. In order to implement in the animal was injected into a standard amount of carcinoma cells subcutaneously (8×10^7 cells / mouse) on the right flank (ACCO *et al*, 2007). Control groups (normal) received saline and rats, in the experimental group, received celecoxib (CL) daily and / or aminoguanidine (AG). In the tenth day the gastrocnemius muscle tumors that received the implant of the tumor were removed. For the measurements *in vivo* skin system were used PXRF-LFNA-01. For measures *in natura* tumor and muscle were used the system PXRF-LFNA-02, consisting of a mini tube X-ray (target of Ag, 20-28 kV/5-10 μ A). The duration of each measurement was 200 s. The LLD was 9 ppm for Fe, 11 ppm for Cu and 6 ppm for Zn. It was feasible the implementation of PXRF to determine changes in the levels of metals in rats with TW-256.

Key-words: PXRF. *Trypanosoma cruzi* and Tumor of Walker-256.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> . Fonte: Instituto Pasteur (2005)	17
Figura 2 - Tipos de espalhamento envolvidos quando uma radiação mono energética incide sobre a amostra	27
Figura 3 - Energia dos raios X em função do número atômico. Fonte: VANDECASTEELE; BLOCK (1993)	28
Figura 4 - Representação esquemática da fluorescência de raios X com dispersão por comprimento de onda.....	29
Figura 5 - Representação esquemática da fluorescência de raios X com dispersão de energia	30
Figura 6 - Geometria e dimensões da fonte anelar de Pu.....	38
Figura 7 - Obtenção dos ângulos de α e θ geometricamente	38
Figura 8 - Obtenção de β e ω geometricamente.....	39
Figura 9 - No detalhe o detector (1), tubo de raios X (2) e o recipiente porta amostra (3).....	40
Figura 10 - Sistema portátil de excitação e detecção por PXRF (LFNA-01) vista geral em (a) e detalhe do detector, fonte anelar e porta amostra (b)	41
Figura 11 - Sistema portátil de excitação e detecção por PXRF (LFNA-02) vista geral em (a) e detalhe da medida <i>in natura</i> em (b).....	42
Figura 12 - (a) Coleta de 0,5 a 1 mL de sangue contaminado com <i>Trypanosoma cruzi</i> . (b) Procedimento de diluição do sangue contaminado. (c) Inoculação dos protozoários em camundongos saudáveis	43
Figura 13 - (a) Camundongo sendo anestesiado com <u>pentabarbital</u> . (b) Os camundongos foram fixados com fita adesiva em um suporte acrílico. (c) e (d) O local das medidas foi à pele do abdômen.....	47
Figura 14 - (a) Remoção do tumor do músculo gastrocnêmio contralateral. (b) Remoção da porção total do fígado	48
Figura 15 - Medida <i>in natura</i> da porção total do fígado de um rato com implante de T. Walker-256.....	50
Figura 16 - Tela do software PMCA para Windows.....	52

Figura 17 - (a) Tela do software WinQxas versão 1.23. (b) Janela com parâmetros da análise realizada pelo software WinQxas versão 1.23	52
Figura 18 - Curva de calibração do Fe para medidas de 50 s, com 95% de confiabilidade	53
Figura 19 - Variação do LLD em função do tempo de medida, com 95% de confiabilidade	54
Figura 20 - Curva de calibração do Fe, Cu e Zn para medidas de 200 s, com 95% de confiabilidade	55
Figura 21 - (a) Curva de parasitemia dos camundongos Swiss. (b) Medidas de XRF <i>in vivo</i> realizadas na pele de camundongos normais e infectados, até o 21º dia pós infecção. (c) Correlação entre concentração de Fe na pele medida <i>in vivo</i> e a parasitemia na fase anêmica (após 9 dias) dos camundongos Swiss.....	58
Figura 22 - (a) Curva de parasitemia dos camundongos C57BL/6. (b) Medidas de XRF <i>in vivo</i> realizadas na pele de camundongos normais e infectados, até o 21º dia pós-infecção. (c) Correlação entre concentração de Fe na pele medida <i>in vivo</i> e a parasitemia na fase anêmica (após 9 dias) dos camundongos C57BL/6	59
Figura 23 - Taxa de mortalidade dos camundongos Swiss e C57BL/6 infectados	60
Figura 24 - Concentração de Fe medida por XRF <i>in vivo</i> nos animais normais.....	61
Figura 25 - Concentração de Fe medida por XRF <i>in vivo</i> nos animais infectados	61
Figura 26 - Hematologia dos camundongos infectados	63
Figura 27 - Variação hematológica da hemoglobina e a variação dos níveis de Fe medidos por XRF <i>in vivo</i> nos animais controle e infectados	64
Figura 28 - Em (a) a amostra padronizada no porta amostra, em (b) detalhe da padronização da amostra antes dos cortes com micrótomo.....	65
Figura 29 - Variação dos níveis de Ca, Fe, Ni, Cu e Zn medidos por XRF para tecidos de pulmão equino com neoplasias comparado com partes normais do mesmo pulmão.....	66
Figura 30 - Variação dos níveis de Fe, Cu e Zn medidos pro XRF <i>in vivo</i> para os grupos experimentais de ratos Wistar, com 95% de confiabilidade.....	68
Figura 31 - Concentração de ferro (a), cobre (b) e zinco (c) medida em músculo normal, fígado e tumor por XRF em ratos Wistar.....	70

Figura 32 - Diâmetro médio do tumor versus dias pós implantação do T.Walker-256 (MCQUITTY <i>et al</i> , 1970)	71
Figura 33 - Variação dos níveis de Fe, Ni, Cu e Zn para os grupos experimentais G4, G5 e G6 medidos por XRF <i>in natura</i>	72

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo dos artigos que reportam resultados de XRF <i>in vivo</i> (ESTEVAM e APPOLONI, 2009).....	24
Tabela 2 - Tabela 2. Resumo dos artigos que reportam resultados de XRF <i>in vivo</i> para medidas de chumbo (Pb).....	25
Tabela 3 - Concentrações preparada (CP) e medidas (CM) para medidas de 50 s, resultados da curva de calibração, com 95% de confiabilidade.....	54
Tabela 4 - Concentrações preparada (CP) e medidas (CM) para medidas de 200 s, resultados das curvas de calibração, com 95% de confiabilidade.....	56

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 DOENÇA DE CHAGAS	16
1.2 TUMOR DE WALKER-256 E CAQUEXIA	18
2 OBJETIVOS	20
3 REVISÃO DA LITERATURA	21
4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	26
4.1 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X	26
4.2 ANÁLISE QUALITATIVA	30
4.3 ANÁLISE QUANTITATIVA	31
4.4 LIMITE DE DETECÇÃO (LD)	33
5 CÁLCULO DE ABSORÇÃO DE ENERGIA E TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA	36
5.1 FONTE DE RAIOS X – EXPOSIÇÃO EM AR	37
6 MATERIAIS E MÉTODOS	40
6.1 CALIBRAÇÃO E SIMULADOS DE PELE E TECIDOS	40
6.2 SISTEMA PXRF-LFNA-01	41
6.3 SISTEMA PXRF-LFNA-02	42
6.4 ANIMAIS INFECTADOS POR <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	43
6.4.1 Análise Hematológica dos Animais Normais e Infectados por <i>Trypanosoma Cruzi</i>	44
6.4.1.1 Contagem do número total de hemácias	44
6.4.1.2 Determinação da concentração de hemoglobina (Hb): método da cianometahemoglobina	45
6.4.1.3 Preparação das soluções padrão	45
6.4.1.4 Contagem total de leucócitos	46
6.4.2 Descrição das Medidas <i>IN Vivo</i>	46

6.5 ANIMAIS COM IMPLANTES DE T. WALKER-256.....	47
6.5.1 Descrição das Medidas <i>in natura</i>	49
6.6 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS ESPECTROS	50
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
7.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO E LIMITE DE DETECÇÃO (LLD) PARA MEDIDAS <i>IN VIVO</i>	53
7.2 CURVAS DE CALIBRAÇÃO E LIMITES DE DETECÇÃO (LLD) PARA MEDIDAS <i>IN NATURA</i>	55
7.3 NÍVEIS DE FERRO NA PELE DE CAMUNDONGOS SWISS E C57BL/6 INFECTADOS COM O <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> MEDIDOS POR XRF <i>IN VIVO</i>	57
7.4 ANÁLISE HEMATOLÓGICA E NÍVEIS DE FERRO NA PELE DE CAMUNDONGOS SWISS E C57BL/6 INFECTADOS COM O <i>T. CRUZI</i>	63
7.5 CÂNCER E ALTERAÇÕES NOS NÍVEIS DE METAIS NO ORGANISMO	65
7.5.1 Testes Realizados com a Xrf em Análises de Neoplasias de Tumor Eqüinas.....	65
7.5.2 Testes Realizados com a XRF <i>in vivo</i> na Pele de Ratos Wistar com Implantes de T. Walker-256	67
7.5.3 Alterações nos Níveis de Metais Medidos Através da XRF no Organismo de Ratos Wistar com Implantes de T. Walker-256 – Amostras Homogeneizadas	69
7.5.4 Alterações nos Níveis de Metais Medidos Através da XRF no Organismo de Ratos Wistar com Implantes de T. Walker-256 – Amostras <i>in natura</i>	72
8 CONCLUSÕES	74
GLOSSÁRIO	77
REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

Os avanços tecnológicos atuais da XRF (*X-Ray Fluorescence*) permitem explorar uma série de aplicações potenciais, envolvendo a medida da concentração de alguns elementos localizados em tecidos superficiais da pele onde há baixo risco à radiação por não serem vascularizados.

Com o desenvolvimento nos últimos anos, e crescente avanço na tecnologia de detectores resfriados por efeito Peltier, como detectores de diodo de Si-PIN ou de CdTe-PIN, que são pequenos, leves, funcionam à temperatura ambiente, possuem desempenhos próximos àqueles dos detectores criogênicos e com custo quase uma ordem de grandeza menor, assim XRF com equipamento portátil (PXRF – *Portable X - Ray Fluorescence*) mostrou-se totalmente factível (KHUSAINOV et al, 1999; LONGONI et al, 1998).

A revisão bibliográfica sugere que a PXRF parece ser ideal para análises não destrutivas em biomedicina, uma vez que os detectores criogênicos de alta resolução, como os de Si(Li), HPGe não são apropriados para instrumentação portátil. Medidas não invasivas demonstraram que existe uma alta correlação entre níveis de ferro na pele e níveis de ferro no fígado de camundongos. A existência de correlação entre a sobrecarga férrica do organismo e a concentração de ferro na pele humana foi anteriormente estudada por Olivieri e Brittnham (1997). Segundo Porter (1996) a concentração de ferro *in vivo* pode ser usada como um indicador relacionado a desordens orgânicas. Assim, um estudo em camundongos sugeriu que a pele possa agir como um marcador útil.

Os metais presentes no organismo animal têm papel vital nos diversos processos metabólicos. Desordens causadas por patologias ou contaminação alteram os níveis normais desses metais fazendo com que estes se tornem tóxicos ao organismo quando presente em alta ou baixa concentração. Rotineiramente as concentrações de metais no organismo são analisadas em sangue e urina. As concentrações de metais em sangue e urina são influenciadas por vários fatores como o nível de exposição contínua a esses metais, função renal e diferenças individuais na biocinética.

Medidas invasivas, como biópsias, apresentam uma estimativa da concentração em um volume pequeno e não necessariamente um valor que representa a concentração média no órgão. As medidas realizadas por biópsias envolvem um risco para o paciente por serem invasivas e perigosas. Biópsias do fígado apresentam taxa de mortalidade de 0,1% e não podem ser repetidas (GILMORE; HAZLETT, 1995).

Portadores humanos da doença de Chagas apresentam variações na quantidade de Fe sérico. Apresentam um elevado acúmulo de ferro ou estado anêmico dependendo do estágio da patologia, ou seja, da parasitologia, que tende a se estabilizar com o progresso da doença (RASSI et al, 1996). Assim, foi estudada a relevância dessa variação do ponto de vista biológico através de uma técnica de Física Atômico Nuclear, verificando a aplicabilidade do sistema de PXRf em cobaias infectadas experimentalmente pelo *T. cruzi*. Os processos bioquímicos e metabólicos que envolvem a prosperidade desse parasita no organismo, até hoje sem cura, nunca foram estudados *in vivo*, por PXRf, durante o desenvolvimento da infecção. A biocinética dos metais, medidos por PXRf, nunca foram relacionadas à taxas de crescimento (parasitologia) do *T. cruzi*, assim esse estudo abre um caminho para se interpretar os mecanismos e relações entre metais presentes no organismo, sua variação e correlação com progresso da infecção.

Um dos maiores problemas enfrentados pelos doentes de câncer é o quadro de caquexia. Este constitui um dos principais desafios no tratamento de pacientes com câncer, pois seus efeitos ainda carecem de uma normalização, ou seja, não existe ainda uma definição quantitativa sobre o grau de caquexia, nem sua correlação com a quantidade de metais no organismo. Existem atualmente evidências que sugerem a participação de mediadores como as prostaglandinas (PGs) e óxido nítrico (NO) no desenvolvimento da caquexia induzida por tumores (SMITH; TISDALE, 1993).

O progresso de uma neoplasia ainda apresenta processos metabólicos desconhecidos. O progresso de uma neoplasia para o estado maligno pode ser favorecido pela presença de metais oriundos de reações bioquímicas presentes nesses tecidos. Uma aplicação inédita é a utilização da XRF para o estudo das alterações desses metais, em um quadro experimental de tumor, assim como sua correlação com as alterações no quadro clínico de portadores e seus diferentes tratamentos.

Apresenta-se neste trabalho medidas *in vivo* e *in natura* de tecidos animais portadores experimentais das doenças de Chagas e câncer. Acompanhamos as alterações nos níveis de metais como Fe, Cu, Ni e Zn, decorridas do progresso dessas patologias, através de medidas utilizando a técnica de Fluorescência de Raios X Portátil (PXRf), técnica precisa, rápida, não invasiva e capaz de repetições regulares.

1.1 DOENÇA DE CHAGAS

Uma possível aplicação da Fluorescência de Raios X é determinar a variação do elemento Fe em camundongos portadores da doença de Chagas causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Correlacionando-se essa variação ao metabolismo do protozoário, ou seja, se o protozoário utiliza o ferro do organismo do hospedeiro a seu favor e como ele utiliza esse elemento.

O protozoário causador da doença de Chagas é da classe dos flagelados, essa doença também é conhecida como Tripanossomíase americana. É uma doença de evolução crônica, debilitante, caracterizada por cardiopatias e distúrbios digestivos incuráveis. Está intimamente relacionada às más condições das moradias, pois as mesmas favorecem a nidificação dos insetos vetores conhecidos vulgarmente como “barbeiros”.

Um século após a sua descoberta, a doença de Chagas ainda representa um desafio internacional à saúde pública: em todo o mundo, mais de 14 milhões de pessoas estão infectadas pelo parasito causador da doença. Apesar da alta endemicidade, a doença de Chagas permanece no grupo de doenças negligenciadas. Na tentativa de modificar este quadro, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu explicitamente a importância global da enfermidade, há pouco restrita à América Latina (AGÊNCIA FIOCRUZ DE NOTÍCIAS, 2008).

A doença de Chagas espalhou-se da América Latina para os Estados Unidos e a Europa devido a falhas nos exames do sangue destinado a transfusões (OMS, 2007).

O homem se infecta quando o barbeiro (triatomíneos dos gêneros *Triatoma infestans*, *Panstrongylus sp* e *Rhodnius sp*) elimina as formas tripomastigotas metacíclicas do *Trypanosoma cruzi* em suas fezes, durante ou logo após alimentar-se do sangue humano. Estas formas infectantes podem penetrar por abrasões da pele provocados pelo ato de coçar, pelo orifício da picada do barbeiro ou ainda pelas mucosas, quando o homem, inadvertidamente, leva as mãos contaminadas aos olhos ou nariz. Logo após a penetração, os tripomastigotas metacíclicos são fagocitados por macrófagos, perdem o flagelo e a membrana ondulante, tornando-se amastigotas, forma sob a qual se reproduzem por divisão binária até que os macrófagos fiquem repletos de amastigotas. Os parasitos então re-adquirem o flagelo e a membrana ondulante, tornando-se tripomastigotas que rompem a célula hospedeira e disseminam-se para o restante do organismo pela circulação sanguínea.

Os protozoários quando chegam ao coração, esôfago e cólon, principais órgãos atingidos, penetram nas fibrilas musculares desses órgãos e repetem o ciclo intracelular. Os tripomastigotas podem, ainda, ser fagocitados por macrófagos nos órgãos do sistema fagocitário mononuclear (fígado, baço, linfonodos, medula óssea), onde se reproduzem novamente como amastigotas.

Quando os triatomíneos (barbeiros) alimentam-se do sangue de uma pessoa infectada, ingerem os tripomastigotas que se convertem em epimastigotas e se reproduzem por divisão binária no tubo digestivo do inseto, voltando à forma tripomastigota quando chegam à porção terminal do intestino do barbeiro. Estas novas formas tripomastigotas, altamente móveis, delgadas e infectantes, são as formas metacíclicas eliminadas nas fezes do vetor, fechando um complexo ciclo, figura 1, (COURA; CASTRO, 2002).

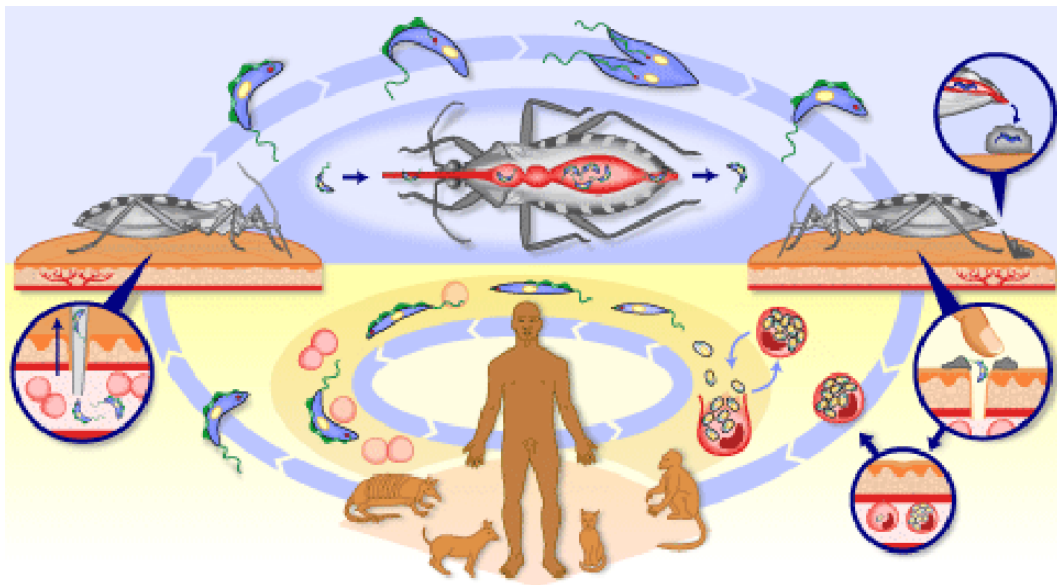


Figura 1 - Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*.
Fonte: Instituto Pasteur (2008).

A fase crônica da doença tem evolução de 15 anos ou mais e os sintomas são muitas vezes indeterminados. Entretanto, em cerca de 30% dos casos há o comprometimento do coração, especialmente a cardiomegalia e nestes casos o paciente pode apresentar arritmias cardíacas, insuficiência circulatória, edemas dos membros, cansaço, dispnéia e morte súbita por falência cardíaca.

As alterações digestivas ocorrem em torno de 10% dos casos e os pacientes podem apresentar dificuldades de deglutição, digestão ou defecação, conforme a porção do sistema digestório afetada (megaesôfago, megacólon) (RASSI et al. 1996).

O diagnóstico parasitológico pode ser feito pela visualização dos tripomastigotas em distensões sangüíneas ou das amastigotas em biópsias de linfonodos (quando houver poliadenite) durante a fase aguda da doença. Os métodos de imunodiagnóstico, especialmente a imunofluorescência, ELISA e hemaglutinação, são utilizados na fase crônica. Métodos complementares como o diagnóstico por imagem também podem ser utilizados.

O tratamento para a doença é apenas sintomático e, infelizmente, ainda não há cura, pois as drogas disponíveis, como o benznidazol, têm apenas atividade parcial sobre o protozoário.

1.2 TUMOR DE WALKER-256 E CAQUEXIA

Além de sua alta atividade metabólica, células tumorais parecem ser "protegidas" contra a apoptose celular ou necrose (GIGLIO, 2001; DAVIS et al, 2004). Esta característica aumenta a viabilidade e progressão tumoral e contribui significativamente para a sua resistência a agentes quimioterápicos. Em consequência, a progressão da maioria dos tipos de câncer só pode ser eficazmente evitada com estratégias que combinam variabilidade e tratamentos com diferentes drogas e sucessivos. Uma alternativa para estes procedimentos é a prevenção farmacológica, uma tentativa de utilizar compostos sintéticos e naturais para intervir nas fases iniciais do câncer, antes que a fase invasiva comece (GIGLIO, 2001; BACKHUS et al, 2006).

Agentes químicos preventivos podem impedir ou parar as mutações genéticas que levam ao câncer. Eles também podem impedir ou interromper processos que levam à replicação excessiva das células malignas.

Agentes antiinflamatórios, como o celecoxibe, foram sugeridas como eficaz no tratamento de diversas neoplasias. As investigações mostraram que a inibição da formação de mediadores inflamatórios é susceptível de prejudicar o desenvolvimento de tumores, e, especialmente, que pode reduzir a perda de peso, caquexia, geralmente associada a neoplasias. Foi relatado, por exemplo, que celecoxibe rapidamente reverte à perda de peso por caquexia

em dois modelos: tumores do Colón 25 e 1483 HNSCC (GIGLIO, 2001). Nos últimos 5 anos, numerosos estudos têm sido publicados mostrando que celecoxibe é capaz de diminuir o crescimento tumoral, metástases para controlar e melhorar as condições clínicas dos pacientes com câncer (WENGER et al, 2002; BACKHUS et al, 2006).

A melhora clínica dos doentes tratados com celecoxibe pode ser parcialmente devido a uma reversão das alterações metabólicas induzidas por tumores. A este respeito, deve ser enfatizado que o estado caquético induzido por neoplasias é caracterizado por alterações em várias vias metabólicas, em consequência das alterações enzimáticas e mecanismos de sinalização celular.

A caquexia é a principal síndrome paraneoplásica. Ela afeta pelo menos a metade de todos os pacientes com câncer e a grande maioria (80%) dos pacientes com câncer avançado (ARGILES et al, 1997). De forma simplificada, podemos defini-la como: “uma síndrome catabólica envolvendo a perda de músculo e gordura, causada diretamente por fatores tumorais”, e indiretamente pela resposta aberrante do hospedeiro à presença do tumor (SEELAENDER et al, 1996).

Trata-se de um fenômeno clínico clássico, que evoca a imagem histórica de leitos hospitalares com pacientes sendo progressivamente “consumidos”. Constitui-se em uma síndrome multifacetada, de etiologia extremamente complexa, diretamente relacionada à redução da sobrevida e a prognose adversa (KAZANTZIS; SEELANDER, 2005). As alterações nos metais, medidos por XRF, podem fornecer resultados que conduzam pesquisadores a uma melhor compreensão do quadro de caquexia e sua quantificação em níveis de caquexia, por exemplo.

Assim, tendo em conta a potencial utilidade do celecoxibe na melhoria da condição dos pacientes com câncer (NIITSU et al, 2004; PARK et al, 2005) e a hipótese levantada anteriormente que a sua ação pode ser parcialmente devido a uma reversão das alterações metabólicas, em consequência da condição caquética, o presente trabalho foi planejado para analisar a influência deste antiinflamatório hepático em alguns parâmetros metabólicos, e suas conseqüentes alterações nos níveis de metais, medidos através da técnica de PXRF, em ratos Wistar albinos com implantes de tumor de Walker-256. Os resultados devem acrescentar novas informações sobre a ação do celecoxibe e drogas afins, como a aminoguanidina, bem como, a aplicabilidade da PXRF.

2 OBJETIVOS.

Compreender alguns dos processos metabólicos envolvidos nas doenças de Chagas e câncer.

Compreender o papel do elemento ferro na infecção experimental da doença de Chagas em camundongos da raça Swins (suscetíveis) e C57BL/6 (resistentes), medindo a quantidade de ferro presente na pele desses animais durante o progresso da infecção por *T. cruzi*, através da técnica de XRF *in vivo*.

Medir a alteração dos níveis dos metais Fe, Cu, Ni e Zn em tecidos de ratos Wistar albinos durante o progresso dos implantes de tumor de Walker-256 através da técnica de XRF *in natura* e *in vivo*.

Possibilitar um trabalho em colaboração com outras áreas ligadas ao monitoramento e tratamento de portadores da doença de Chagas e câncer.

3 REVISÃO DA LITERATURA.

Em um estudo para avaliar a aplicabilidade de um sistema de XRF não portátil, Farquharson e Bradley (1999) e Bradley e Farquharson (2000) utilizaram simulados de pele constituídos de sulfato de ferro (FeSO_4), e posteriormente utilizando peles de ratos investigaram relações entre níveis de ferro na pele e ingestão de Fe. Utilizaram um sistema XRF *in vivo* com as seguintes características: fonte um tubo Cometa 160 kV, alvo de tungstênio; operação com 20 kV e 20 mA; filtro de 0,15 mm de cobre 99,9 % puro; detector EG&G Ortec alta-pureza de germânio GLP, concluíram ser necessário melhorar o arranjo experimental para realização de medidas *in vivo*.

No intuito de medir metais em pele humana *in vivo*, Fischer et al (1999) utilizando susceptibilidade magnética, que usa um supercondutor quântico por um dispositivo de interferência (LULA), tiveram êxito em quantificar ferro *in vivo* em pele humana de maneira sensível, mas o equipamento é extremamente caro.

Em um estudo utilizando técnicas de construção de imagem por ressonância magnética (MRI) para avaliar a quantidade de ferro no corpo e quantificar a relação entre ferro do fígado e ferro mensurável por MRI, Ito et al (1999) observaram que a técnica MRI não foi suficientemente sensível na gama crítica de concentração *in vivo* observada em sobrecarga férrea.

Estudando as alterações orgânicas e metabólicas do excesso de ferro no organismo, Olivieri e Brittenham (1997) verificaram que estes danos são proporcionais à concentração de ferro nos tecidos. Concluíram ser necessária uma melhor avaliação dos níveis de Fe para uma correlação, sugerindo uma biopsia do fígado.

No desenvolvimento de simulados orgânicos, Shukri et al (1995) desenvolveram um estudo com simulados de pele, soluções de (FeSO_4), depositados em camadas sobre filtros de papel utilizando um sistema de PXRF, com as seguintes características: Fonte (alvo secundário) de ^{109}Cd / raio X de 22,1 keV; alvo de Ag; tempo de medida 1200s; dose de 5 mSv e LD de $119 \mu\text{g g}^{-1}$ de Fe.

Green et al (1994) realizaram estudos envolvendo trabalhadores expostos a concentrações aerotransportadas de metais pesados. Utilizaram um sistema de XRF *in vivo* para estudos em ossos contaminados por chumbo de grupos de trabalhadores expostos, com as seguintes características: tempo de contagem 1500s; dose de 0,5 mSv. Os resultados foram: Grupo controle: $27,8 \mu\text{g (Pb) g}^{-1}$ e grupo exposto: $74,2 \mu\text{g (Pb) g}^{-1}$. A precisão foi de $\pm 4,9$ a

$\pm 14,2 \mu\text{g (Pb) g}^{-1}$. Mostrando sensibilidade suficiente para quantificação de chumbo em ossos.

Gorodetsky et al (1990) desenvolveram um sistema portátil de XRF *in vivo* utilizado para detecção de elementos como Fe, Zn e Cu em portadores da β -Thalassaemia, utilizando: Fonte mono energética com 11,4 keV; dose de 10 mSv. Obtendo os seguintes resultados: Tecido normal (5,6 a 14,0) ppm de Fe e tecido de portadores de Beta Talassemia (13,7 a 150,0) ppm de Fe. Este é o trabalho pioneiro sobre medidas *in vivo* com doentes de Talassemia.

Usando um método de XRF *in vivo* para examinar níveis de Fe, Cu e Zn em *prurigo nodularis*, doença auto-imune, Sheskin et al (1986) notaram que há uma redução na quantidade de Zn na pele afetada durante o tratamento com a droga Thalidomine. Investigaram também níveis de Fe, Cu e Zn em tecidos cancerosos e pré-cancerosos. Obtiveram os seguintes resultados para tecidos acometidos de neoplasias: $10,2 \pm 2,5$ ppm de Fe; $4,5 \pm 1,7$ ppm de Zn e $0,8 \pm 0,3$ ppm de Cu. Mostrando elevação dos níveis para Fe, Cu e Zn com relação ao tecido normal.

Michaelsson et al (1980) usaram espectroscopia de absorção atômica (AAS), investigaram a epiderme e a derme de pacientes saudáveis, encontrando níveis de Zn em acordo com valores informados na investigação de Molin e Wester (1973).

Molin e Wester (1973) desenvolveram um sistema de análise de ativação *in vitro* por nêutrons (NAA) para investigar concentrações de Fe, Zn e Cu em amostras normais, obtendo: $26,53 \pm 6,73 \mu\text{g g}^{-1}$ de Fe; $39,3 \pm 12,4 \mu\text{g g}^{-1}$ de Zn e $3,76 \pm 0,83 \mu\text{g g}^{-1}$ de Cu. Mostrando que a NAA seria uma técnica capaz de medidas *in vitro*.

Em modelos animais infectados experimentalmente, Malvezi et al. (2004) demonstrou que em infecções experimentais em modelos animais, camundongos Swiss e C57BL/6, ocorre uma parasitemia bifásica e transitória ao inoculo de 5000 formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Essa quantidade de parasitas utilizada na infecção é padronizada em estudos biológicos e é necessária para uma infecção experimental que cause as complicações necessárias ao estudo de mortalidade da espécie em questão.

No primeiro estudo sobre *T. cruzi* e ferro, Lalonde e Holbein (1984) demonstraram *in vitro* uma dependência entre os protozoários *T. cruzi* e a concentração de Fe no meio, concluíram que a quantidade de ferro disponível aumentava a reprodução do parasita.

Arantes et al. (2007) demonstrou os efeitos da droga quelante deferoxamina (DFO) em camundongos Swiss portadores de *T. cruzi*. Os animais induzidos a anemia pelo DFO apresentaram maior sobrevida, demonstrando a correlação entre a quantidade de Fe disponível e a quantidade de parasitas no organismo.

Com relação aos estudos que envolvem T. Walker-256, Acco et al. (2007) estudaram as alterações metabólicas apresentadas por ratos com implantes de tumor de Walker-256 tratados com celecoxibe pertence ao grupo dos anti-inflamatórios, observou uma redução do estado caquético no grupo tratado com o antiinflamatório.

Lima et al. (2005) demonstraram, entre outros resultados, o aumento de 3,6 vezes do DNA fragmentado em cobaias portadoras de implantes de T. Walker-256. Demonstraram também o envolvimento de linfócitos e mitocôndrias na evolução do estado caquético.

Pizato et al. (2006) demonstraram a influência de uma dieta rica em Ácidos graxos poliinsaturados (peixe ou óleo de girassol ou misturas de peixe e óleos de girassol) em ratos portadores de T. Walker-256. Verificaram o aumento do número de linfócitos e macrófagos, representantes do sistema imunológico e uma diminuição da perda de peso por caquexia.

Farquharson et al. (2007) realizou o mapeamento de Cu e outros elementos traço utilizando micro-XRF por radiação síncontron em tecidos de mama humana acometidos por neoplasias. O estudo demonstrou grande dificuldade em relacionar a maior concentração dos metais à localização da maior densidade de células tumorais. Concluindo ser necessária uma técnica mais sensível para tal feito.

Geraki et al. (2002) utilizou a XRF por radiação síncrotron para avaliar tecidos humanos acometidos com tumores, verificou o aumento dos níveis de Fe, Cu e Zn. O aumento mais acentuado ocorreu para os elementos Cu e Zn, os autores comentam que o aparato precisa ser melhorado, pois testes de reprodutibilidade não foram satisfatórios, além de citarem com o relevante o estudo da correlação entre concentração e localização dos elementos.

Recentemente Estevam e Appoloni (2009) correlacionaram medidas de Fe através da PXRF *in vivo* na pele de portadores de Beta-Talassemia e pessoas saudias, verificando a aplicabilidade da técnica em monitoramento da sobrecarga férrea nesses pacientes.

Técnicas não invasivas para determinação de concentrações de metais *in vivo* foram desenvolvidas extensivamente durante os últimos 25 anos. Poucos trabalhos

estudaram os elementos Fe, Cu, Zn ou Ni no organismo humano. A maior parte dos estudos determina os níveis de metais como Cd, Au, I, Pb, Hg e Pt no organismo. A tabela 1 resume os principais trabalhos relacionados com XRF *in vivo*, A unidade do SI para dose equivalente é sievert (Sv), assim todos os trabalhos tiveram suas doses apresentadas em mSv, onde, 1 Sv = 1 Gy. (FQ), FQ é o fator de conversão, e 1 mSv = 100 mrem.

Tabela 1 - Resumo dos artigos que reportam resultados de XRF *in vivo* (ESTEVAZ; APOLONI, 2009).

Autor / ano	Técnicas de XRF	Fonte de Excitação	Matriz / amostra	Tempo de Medidas	Dose equivalente (mSv)	Elementos (LLD)
MacLean <i>et al</i> / 1995	XRF	²⁴¹ Am (500 mCi)	Fêmeas de ratos / pele	10 min	6,8-11,0	I (não informado)
Shukri <i>et al</i> / 1995	KXRF	¹⁰⁹ Cd (100 mCi)	Simulados de FeSO ₄	20 min	5,0	Fe (119 ppm)
MacLean <i>et al</i> / 1996	XRF	²⁴¹ Am (500 mCi)	Humanos / pele	25 min	2,4	I (não informado)
O'Meara <i>et al</i> / 1998	XRF	⁵⁷ Co (1 mCi)	Simulados / gesso de Paris	60 min	8,0.10 ⁻⁵	U (20 ppm)
O'Meara <i>et al</i> / 2000	Polarizado XRF	Tubo de Raios X (250 kV e 15 mA)	Simulados / soluções aquosas dopadas de Hg	Não informado	8,0-14,0 (em uma hora)	Hg (26-54 ppm)
Bradley <i>et al</i> / 2000	XRF	Tubo de Raios X (15 kV, 23 mA,)	Simulados / soluções de Fe, Zn e Cu	33.3 min	16,0	Fe (20 ppm), Zn (10 ppm) e Cu (5 ppm)
O'Meara / 2004	XRF	Tubo de Raios X (200 kV e 20 mA)	Humanos / rim	50 min	5,0	Hg (19 ppm)
Ali / 1998	Polarizado XRF	Tubo de Raios X (220 kV)	Humanos / tumores	33.3 min	3,0	Pt (5,6 ppm)
Shakeshaft / 1993	XRF	¹⁵³ Gd (24 GBq)	Humanos / rim	30 min	0,1	Au (30-60 ppm)
Börjesson / 1995	XRF	Tubo de Raios X	Humanos / rim	30-50 min	5,0	Hg (12-45 ppm)
Christoffersson / 1983	Polarizado XRF	Tubo de Raios X (150 kV, 15 mA) e ²⁴¹ Am	Humanos / córtex do rim	30 min	10,0	Cd (8-20 ppm)
Christoffersson / 1986	XRF	Tubo de Raios X (150 kV, 15 mA)	Humanos / córtex do rim	33.3 min (tempo vivo)	1,8	Cd (8-20 ppm)
Al-Ghorabie <i>et al</i> / 2001	XRF	^{99m} Tc e ¹³³ Xe	Simulados / garrafas de polietileno	Não informado	7,0	Pt (não informado)
Zamburlini <i>et al</i> / 2006	XRF	¹²⁵ I	Simulados / não informado	30 min	Não informado	Sr/Ca (110-258 ppm)
Gollnick e Greenfield / 2004	XRF	²⁴¹ Am	Simulados / não informado	Não informado	0,13 – 0,15	Não informado
O'Meara / 2004	XRF	¹²⁵ I	Simulados / não informado	10-20 min	Não informado	Ag (3-4 ppm)
Pejović-Milić <i>et al</i> / 2004	XRF	¹⁰⁹ Cd	Ossos / falange e tibia	Não informado	0,08	Sr/Ca (250 ppm)

O chumbo em particular vem despertando o interesse de muitos pesquisadores, alguns trabalhos são reportados na tabela 2. Sabe-se que mais de 90% do

acúmulo de chumbo no organismo fica depositado no esqueleto (WIELOPOLSKI *et al*, 1983). Esses estoques de chumbo com a perda óssea, durante o passar dos anos, podem novamente ser lançados no organismo.

Tabela 2 - Resumo dos artigos que reportam resultados de XRF *in vivo* para medidas de chumbo (Pb).

Autor / ano	Técnicas de XRF	Fonte de Excitação	Matriz / amostra	Tempo de Medidas	Dose equivalente (mSv)	Elementos (LLD)
Wielopolski <i>et al</i> / 1982	SXRF	^{125}I e ^{109}Cd	Ossos / tíbia	30 min.	100,0	Pb (22 ppm)
Wielopolski <i>et al</i> / 1989	Polarizado XRF	Tubo (50 kV e 30 mA)	ossos / córtex da tíbia	16,5 min.	104,0	Pb (6,4 ppm)
Aro <i>et al</i> / 1994	XRF	^{109}Cd	Simulados / gesso de Paris	30 min	Não informada	Pb (7-13 ppm)
Gerhardsson / 1993	XRF	^{109}Cd (59-65 mCi)	Humanos / pele e ossos	30 min	2,0- 6,0	Pb (9.8-19.1 ppm)
Aro / 2000	XRF	^{109}Cd (500 mCi)	Humanos / pernas de cadáveres	Não informado	Não informado	Não informado
Somervaille / 1985	XRF	^{109}Cd (100 e 200 mCi)	Humanos / tíbia e metatarso	20-30 min	4,5	Pb (10 ppm)
Ahlgren / 1979	XRF	^{57}Co (20 mCi)	Humanos / ossos do dedo	15 min	Não informado	Pb (14 ppm)
Somervaille / 1989	XRF	^{57}Co (16 mCi) e ^{109}Cd (150 mCi)	Humanos / fêmur, tíbia e calcânhar	30 min	12,0- 30,0	Não informado
Ahlgren / 1980	XRF	^{57}Co	Humanos / ossos do dedo	40 min	55,0	Pb (20-118 ppm)
Erkkilä / 1992	XRF	^{109}Cd (3,7-7,4 GBq)	Humanos / ossos	25 min	8,0- 16,5	Não informado
Ahlgren / 1976	XRF	^{57}Co (20 mCi, 122 keV)	Humanos / ossos do dedo	30 min	8,0	Não informado
Christoffersson / 1984	XRF	^{57}Co (86 % 122 keV, 10% 136 keV)	Humanos / ossos do dedo	40 min	25,0	Pb (20 ppm)

4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

A fluorescência de raios X é um método analítico baseado nas medidas de energia e intensidade (número de raios X detectados por unidade de tempo) dos raios X característicos emitidos pelos elementos que constituem uma amostra.

Quando uma amostra é irradiada os elementos irradiados que a constituem podem ser excitados por fótons que podem ser emitidos de um tubo de raios X, de aceleradores e fontes radioativas. Quando um elemento da amostra é excitado, este tende a ejetar os elétrons dos níveis interiores do átomo, e como consequência disto, elétrons dos níveis mais afastados realizam um salto quântico para preencher as vacâncias. Cada transição constitui uma perda de energia para o elétron, e esta energia é emitida na forma de fótons de raios X com energia característica e bem definida para cada elemento, permitindo a identificação desses elementos na amostra. O número de fótons emitidos é diretamente proporcional à concentração do elemento na amostra (NASCIMENTO FILHO, 1999; RAO; CHATT, 1993).

A análise por fluorescência de raios X consiste em três fases: excitação dos elementos que constituem a amostra, dispersão dos raios X emitidos pela amostra e detecção dos mesmos.

No espectro de raios X também estão presentes espalhamentos elásticos e inelásticos de fótons provenientes da interação dos fótons incidentes com a amostra. Na figura 2, considera-se uma radiação incidente mono energética entrando na amostra normal à superfície e a radiação espalhada composta de espalhamento elástico, espalhamento Compton e raios X característicos, todos deixando a amostra também normal à superfície (CESAREO, 1992; BACON, et al 1999).

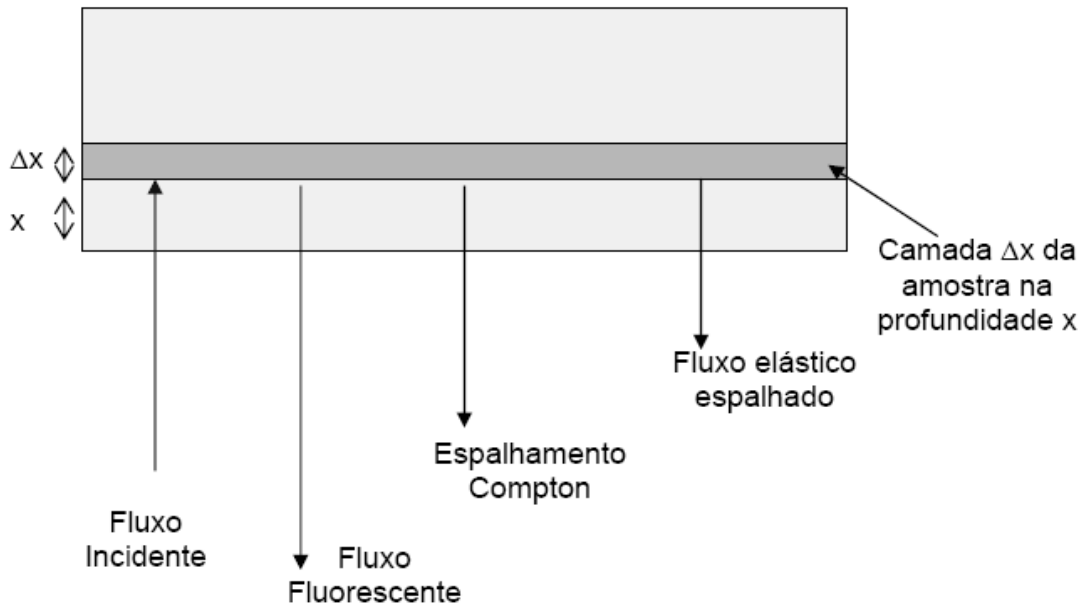


Figura 2 - Tipos de espalhamento envolvidos quando uma radiação monoenergética incide sobre a amostra

O fluxo fluorescente de um elemento genérico a em uma camada de massa por unidade de área $\rho \Delta x$ (g/cm^2) a uma profundidade x (cm) depende dos seguintes fatores (VAN GRIEKEN; MARKOWICZ, 2002):

$$\Delta N_a = N_0 K \omega_a(E_0) \left(1 - \frac{1}{J_a}\right) c_a \rho \Delta x e^{-\mu_t(E_0)\rho x} e^{-\mu_t(E_{a0})\rho x} \quad (1)$$

Onde: ΔN_a – número de fótons dos raios X fluorescentes por unidade de área e de tempo dos raios X do elemento a ; N_0 – fluxo incidente de fótons; K – Fator geométrico; ω_a – o rendimento fluorescente do elemento a na camada de interesse; $(1 - 1/J_a)$ – Fator de “branching ratio” que corresponde à intensidade dos raios X na linha de interesse em relação à intensidade total dos raios X; c_a – concentração do elemento a (% de peso) e $\mu_t(E)$ – coeficiente de absorção de massa total da amostra para energia E .

Para haver produção de raios X característicos há necessidade de se retirar elétrons localizados nas camadas mais internas, e para isto a energia mínima incidente deve ser superior a energia de ligação do elétron nessa camada. Esta energia pode ser calculada de modo aproximado (NASCIMENTO FILHO, 1993), para elétrons das camadas K e L dos átomos de um elemento, de acordo com a equação:

$$E = C \cdot \left(\frac{Z - b}{n} \right)^2 \quad (2)$$

onde: E é a energia mínima para retirar elétrons da camada K ; C é uma constante com valor de 13,65 eV; b é a constante de Moseley com os valores: 1 para a camada K e 7,4 para a camada L ; Z é o número atômico do elemento e n é o número quântico principal do nível eletrônico ($n=1$ para a camada K , $n=2$ para a camada L , etc.).

Através da Equação 2 pode ser observado que a energia de ligação para uma dada camada é diretamente proporcional ao quadrado no número atômico do elemento, de modo que a radiação, por exemplo, a série K tem menor energia para os elementos mais leves, conforme a figura 3.

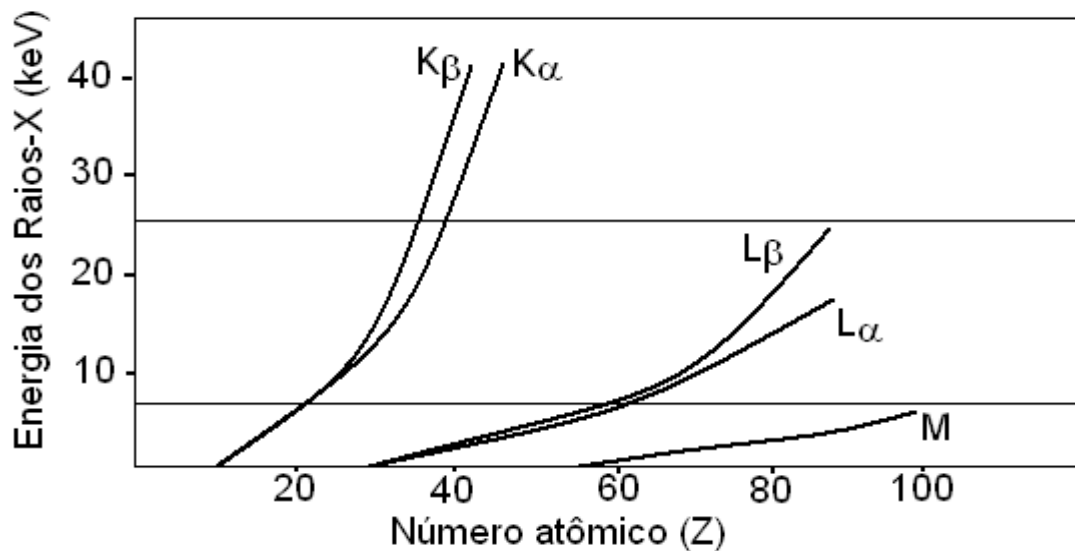


Figura 3 - Energia dos raios X em função do número atômico. Fonte: Vandecasteele; Block (1995).

A energia característica dos raios X emitidos pela amostra, após a excitação, depende da diferença de energia do elétron nos níveis quânticos, ou seja:

$$E_x = E_{ni} - E_{nf} \quad (3)$$

onde: E_x é a energia do raio X característico, E_{ni} e E_{nf} são as energias do elétron nos níveis inicial e final, respectivamente.

Os métodos de dispersão usados na maioria dos espectrômetros de raios X podem ser classificados em duas categorias: dispersão por comprimento de onda e por dispersão de energia (BUCHAM, 1974; CESAREO et al, 1992).

Na fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda (WDXRF), que é uma técnica mais antiga, os raios X emitidos pela amostra são dispersos espacialmente com base em seus comprimentos de onda por difração em um cristal antes da detecção. Os raios X característicos são selecionados por um cristal analisador, de acordo com seus comprimentos de onda, obedecendo à lei de Bragg da difração (VANDECASTEELE; BLOCK, 1995; KAPLAN, 1963).

$$n \lambda = 2 d \sin(\theta) \quad (4)$$

onde: n é um número natural; λ é o comprimento de onda considerado; d é a distância interplanar do cristal e θ é o ângulo de incidência e de emergência da radiação considerada. A figura 4 mostra um arranjo experimental para WDXRF.

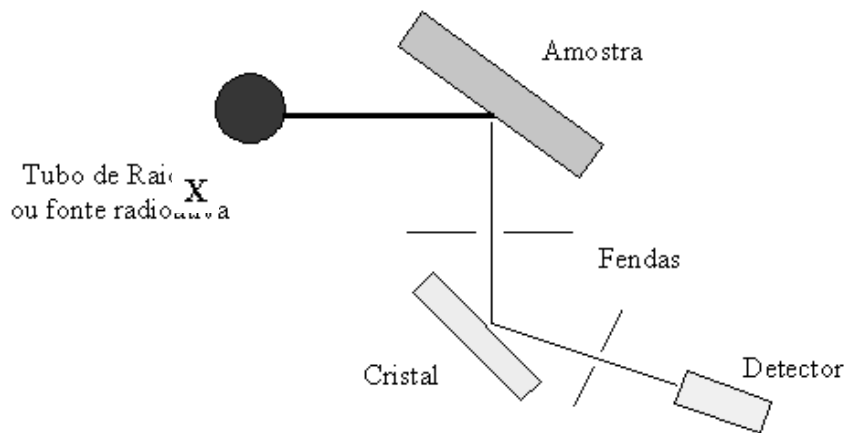


Figura 4 - Representação esquemática da fluorescência de raios X com dispersão por comprimento de onda.

De forma simplificada, na fluorescência de raios X com dispersão de energia (EDXRF), o detector recebe todas as linhas de raios X da amostra diretamente. Os raios X são selecionados através de pulsos eletrônicos produzidos em um detector apropriado, estes pulsos são diretamente proporcionais às energias dos raios X. Os detectores mais usados são: Si(Li), Ge(Li) e HPGe.

A Figura 5 mostra um arranjo experimental para EDXRF. Em equipamentos de fluorescência de raios X, que fazem uso da dispersão de energia com detectores

semicondutores, as equações 3 e 4 são necessárias para que a partir da energia detectada possa se determinar o elemento a ser analisado (CUNHA; SILVA, 2004).

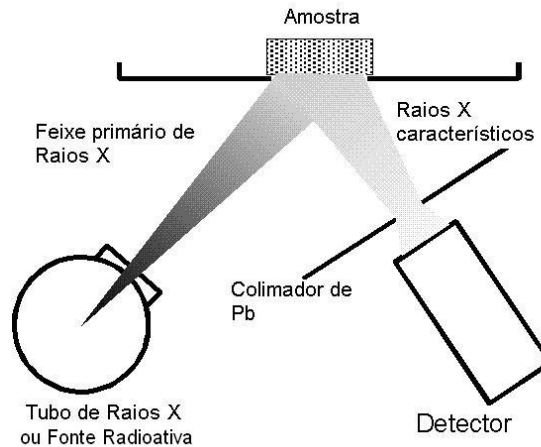


Figura 5 - Representação esquemática da fluorescência de raios X com dispersão de energia

A sensibilidade da XRF depende de muitos fatores, por exemplo: a energia detectada, intensidade da radiação incidente, a geometria dos instrumentos utilizados (ângulo sólido para excitação e detecção), a refletividade do cristal analisador (no caso de WDXRF) e a eficiência do detector (CUNHA; SILVA, 2004).

4.2 ANÁLISE QUALITATIVA

O desenvolvimento de novas técnicas analíticas e métodos que sejam capazes de identificar e quantificar os componentes de amostras complexas, tais como aquelas relacionadas a problemas ambientais, proteção alimentar ou amostras biológicas são amplamente explorados. Entretanto, do ponto de vista prático, torna-se importante reconsiderar até onde resultados quantitativos são realmente necessários. Em rotinas de laboratório, por exemplo, é usual, em um primeiro estágio, verificar se um ou mais elementos estão presentes/ausentes na amostra antes de estimar suas concentrações (MELQUIADES; APPOLONI, 2007). Métodos qualitativos são usados, neste caso, como técnicas de

mapeamento antes da quantificação por métodos rotineiros, o que possibilita a redução no tempo e custo das análises. (TRULLOLS et al, 2004).

A definição de métodos qualitativos de acordo com a Comunidade Europeia é: “avaliação da presença ou ausência de um ou mais elementos em uma amostra devido a suas propriedades físicas e químicas” (657/EC, 2002), e de acordo com a *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC): “método de análise cuja resposta é a presença ou ausência do elemento, detectada direta ou indiretamente em certa quantidade de amostra” (FELDSINE et al, 2002).

Métodos analíticos baseados em detecção instrumental fornecem respostas onde a decisão final é feita comparando a resposta da amostra teste com a resposta da amostra dos elementos de interesse nos níveis especificados (amostra padrão). Ao invés de se trabalhar no domínio de concentração se trabalha no domínio de resposta. Por exemplo, sabendo o limite de detecção do sistema de medidas, uma vez detectado o elemento, pode-se afirmar que ele está presente na amostra com concentração acima de determinado valor (MELQUIADES; APPOLONI, 2007).

Desse modo, a partir das definições, métodos analíticos qualitativos são usados para determinar se uma amostra contém um ou mais elementos específicos. Nestes casos o resultado da análise pode ser somente binário: presença/ausência ou sim/não. A resposta presença/ausência está relacionada a um nível específico de concentração. Abaixo deste limite, a concentração do elemento é desprezada.

Outra forma de análise é a comparação entre valores percentuais. Uma vez detectado na amostra de interesse um elemento com concentração acima do limite de detecção, pode-se comparar percentualmente o valor encontrado com o resultado de uma amostra padrão.

4.3 ANÁLISE QUANTITATIVA

Para realizar a quantificação dos elementos presentes numa amostra, em concentração (C), utilizando o método dos parâmetros fundamentais (Equação 5) é necessário conhecer previamente os valores das sensibilidades elementares (S), fator geométrico, eficiência de detecção, fator de absorção (A), entre outros fatores. Este procedimento tem a vantagem de necessitar de um único padrão para cada elemento a ser analisado. Porém torna-

se essencial determinar o fator de absorção da amostra para cada energia/elemento de interesse (MELQUIADES; APPOLONI, 2007). A intensidade (I) é dada por:

$$I = S.C.A \quad (5)$$

A determinação do fator de absorção pode ser contornada nas análises semi quantitativas, supondo-se conhecidos os componentes majoritários da matriz e supondo que todas as amostras tenham uma composição similar.

O fator de absorção é escrito da seguinte forma:

$$A = \frac{1 - e^{-\chi \cdot \rho_0 \cdot D}}{\chi \cdot \rho_0 \cdot D} \quad (6)$$

onde: $\chi = \frac{\mu_0}{\text{sen}\theta_0} + \frac{\mu}{\text{sen}\theta}$, $\rho_0 D$ é a densidade superficial da amostra ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$);

Uma amostra fina é obtida, por exemplo, depositando e secando líquidos em filmes finos, por deposição a vácuo, pela aplicação de tintas, camadas finas de tecidos biológicos, entre outros. Em amostras consideradas finas ou filmes finos, no limite de $D \rightarrow 0$, o termo $\chi \cdot \rho_0 \cdot D$ tende a zero, ou seja, $\lim (\chi \cdot \rho_0 \cdot D) \rightarrow 0$, e logo o fator de absorção tem valor unitário.

Assim, a equação para o cálculo da concentração simplifica-se.

$$C_i = \frac{I_i}{S_i} \quad (7)$$

o índice i nas grandezas refere-se ao elemento de interesse.

As amostras biológicas foram medidas *in vivo* ou *in natura* e para esse caso, estas são consideradas amostras infinitamente espessas, outros exemplos são: líquidos, ligas metálicas, minerais, pastilhas, que são analisados com uma espessura maior que poucos décimos de milímetro (CESAREO, 1992).

Em amostras espessas, no limite de $D \rightarrow \infty$, o termo $\chi \cdot \rho_0 \cdot D$ na Equação 6 tende a infinito e o valor do fator de absorção assume o seguinte valor:

$$A = \frac{1}{\chi \cdot \rho_0 \cdot D} \quad (8)$$

Neste caso, torna-se necessário obter o valor dos três parâmetros (equação 9) para se calcular a concentração, ou seja:

$$C_i = \frac{I_i}{S_i \cdot A_i} \quad (9)$$

Através da equação 9 foi realizado uma curva de calibração, onde a parametrização fornece uma equação do 1º grau, As curvas são apresentadas nas figuras 18 e 20 páginas 45 e 48 respectivamente. A concentração é dada por:

$$C_i = Y_0 + M \cdot I_i \quad (10)$$

Os termos Y_0 e M são as constantes de parametrização linear e representam as médias \bar{A}_i . A sensibilidade foi considerada a mesma para os simulados e a matriz biológica que possui 80 a 90 % de água em sua composição.

4.4 LIMITE DE DETECÇÃO (LD)

Em um espectro de XRF pode-se observar uma linha aproximadamente contínua sob os picos característicos dos elementos que compõem a amostra, chamada de *background*, o tratamento desses espectros é descrito no item 6.6. Este contínuo é devido à detecção do espalhamento Compton do feixe incidente na amostra (MELQUIADES; APPOLONI, 2007). Assim, a intensidade líquida de cada pico de interesse no espectro é obtida pela subtração da área do *background* da área total na região selecionada no espectro, dividido pelo tempo de aquisição (MELQUIADES; APPOLONI, 2007).

Conforme descrito em detalhes por Curie (1968), o limite de detecção (LD) em XRF para amostras finas, pode ser calculado através da equação:

$$LD_i = \frac{3}{S_i} \sqrt{\frac{I_{i(BG)}}{t}} \quad (11)$$

Onde: LD_i = limite de detecção para o analito ($g\ cm^{-2}$); $I_{i(BG)}$ = intensidade (cps) do *background* sob o pico do analito; S_i = sensibilidade do analito ($cps\ g^{-1}\ cm^2$); t = tempo de excitação/detecção (s).

No caso de amostras semi-espessas e espessas deve ser levado em consideração o fator de absorção, devido à interação dessas com os fótons de fluorescência. Assim, o limite de detecção pode ser dado pela equação:

$$LD_i = \frac{3}{S_i A_i} \sqrt{\frac{I_{i(BG)}}{t}} \quad (12)$$

onde: A_i é o fator de absorção (adimensional).

Outra grandeza a ser considerada é o limite de quantificação (LQ), definido como o valor mínimo a partir do qual é possível determinar, com acurácia e precisão, a concentração do elemento na amostra. A equação para o limite de quantificação é, conforme Currie (1968):

$$LQ_i = \frac{10}{S_i A_i} \sqrt{\frac{I_{i(BG)}}{t}} \quad (13)$$

O limite mínimo de detecção (LD) depende da sensibilidade e da radiação de fundo “background” na região da linha de interesse (BERTIN, 1975).

Para o caso da curva de sensibilidade elaborada através da intensidade líquida das medidas relacionadas com a concentração de ferro, cobre ou zinco dos simulados, a intensidade correspondente ao LLD é dada pela equação 14.

O limite mínimo de detecção é calculado inserindo o valor desta intensidade na equação de parametrização da curva de sensibilidade.

$$I_{LLD_i} = 3 \frac{\sqrt{F_i}}{t} \quad (14)$$

Onde: I_{LLD_i} é a intensidade correspondente ao LD, F_i é radiação de *background* sob o pico do analito e t é o tempo de excitação/detecção.

A equação 14 é válida assumindo uma intensidade mínima, para um nível de 95% de confiança, para $2 \cdot \sigma_b$ das medidas da intensidade do *background* (I_b) abaixo do pico de interesse, i.e., em termos de intensidade, assumindo um tempo de medida de *background* (T_b). Frequentemente são requeridas duas ou mais medidas em análises de XRF, portanto o desvio é aumentado por um fator $\sqrt{2}$, assim o LLD é determinado pela relação 14, pois (ROUSSEAU, 2001):

$$3 \cdot \frac{\sqrt{I_b}}{\sqrt{T_b}} = \frac{3 \cdot \sqrt{F}}{t} \quad (15)$$

5 CÁLCULO DE ABSORÇÃO DE ENERGIA E TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA.

Através dos cálculos apresentados a seguir será possível calcular a dose de radiação utilizada nas medidas *in vivo*. No item 5.1 os cálculos são realizados para os valores correspondentes à fonte de Pu-238.

Considerando uma parede espessa e paralela, e fótons mono energéticos; primeiro determina-se a taxa à qual a energia é absorvida na parede, determinando a descrição do campo do fóton incidente (TURNER, 1995).

Assumindo que a parede é estreita comparada com o livre caminho médio dos fótons incidentes e secundários, assim o espalhamento múltiplo destes na parede é desprezível e virtualmente todos os fótons de fluorescência e de *bremsstrahlung* escapam da parede (TURNER, 1995). Por outro lado, os elétrons secundários produzidos pelos fótons são parados na parede. Considerando as condições descritas, acima, a intensidade transmitida é determinada por:

$$I = I_0 e^{-\mu_{en}x} \quad (16)$$

onde μ_{en} é o coeficiente de absorção de energia, e x é a espessura da parede. Para $\mu_{en}x \ll 1$ que é consistente com as suposições descritas, pode-se escrever:

$\exp(-\mu_{en}x) \approx 1 - \mu_{en}x$, obtendo-se a equação 17.

$$I_0 - I = I_0 \cdot \mu_{en}x \quad (17)$$

A taxa à qual a energia é absorvida na parede correspondente a uma área A é:

$$(I_0 - I) \cdot A = I_0 \cdot \mu_{en}x \cdot A \quad (18)$$

Como a massa da parede nesta área é ρAx onde ρ é a densidade da parede, a taxa de absorção de energia por unidade de massa, D , na parede é:

$$D = \frac{I_0 \mu_{en}x A}{\rho Ax} = I_0 \frac{\mu_{en}}{\rho} \quad (18a)$$

A quantidade que D é, por definição, a taxa de dose comum na parede (TURNER, 1995).

5.1 FONTE DE RAIOS X – EXPOSIÇÃO EM AR

Uma fonte com atividade C que emite um fóton de energia E por desintegração. A taxa de liberação de energia na forma de fótons de raios gama/X que escapam da fonte é $C.E$. Desconsiderando a atenuação no ar para uma pequena distância fonte – amostra, pode-se escrever para a taxa de fluxo de energia, ou intensidade, pela superfície de uma esfera de raio r centrada sobre a fonte $I_0 = CE/(4\pi r^2)$, ou para uma fonte irradiando em 180° : $I_0 = CE/(2\pi r^2)$. Para essa geometria foi obtida variações de 90° e 360° apresentadas nas integrais a seguir:

$$\int_0^{\pi/2} \text{sen} \theta d\theta \int_0^{2\pi} d\varphi = 2\pi \quad (19)$$

Para fótons quase mono energéticos, segue a equação 18b. Assim a taxa de dose absorvida no ar à distância r da fonte é:

$$D = I_0 \frac{\mu_{en}}{\rho} = \frac{CE}{(2\pi r^2)} \frac{\mu_{en}}{\rho} \quad (18b)$$

onde: μ_{en}/ρ é o coeficiente de absorção de energia por unidade de massa.

Foi considerado o coeficiente de absorção de energia por unidade de massa para as três situações (ar, tecido e água), o mesmo valor: $0,12 \text{ m}^2/\text{kg}$ (TURNER, 1995).

A atividade da fonte de ^{238}Pu é atualmente de $92,5 \text{ mCi}$. A dose pode ser escrita da seguinte forma:

$$D = \frac{\left\{ 92,5 \times 10^{-3} \text{ Ci} \left[3,7 \times 10^{10} \frac{1}{\text{Ci}} \right] \right\} \left\{ 17,2 \times 10^3 \text{ eV} \left[1,6 \times 10^{-19} \frac{1}{\text{eV}} \right] \right\} \left\{ 0,12 \frac{\text{m}^2}{\text{kg}} \right\}}{2\pi r^2} \text{ Sv s}^{-1} \quad (20)$$

Inserindo o valor da distância fonte-amostra (r) na equação, como mostra a figura 6:

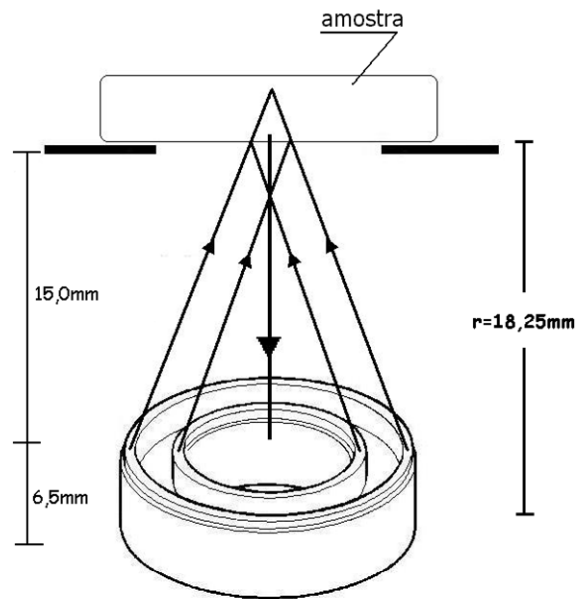


Figura 6 - Geometria e dimensões da fonte anelar de Pu-238.

Inserindo também a correção de ângulo sólido na equação 18a, tem-se:

$$D = I_0 \cdot \frac{\mu_{en}}{\rho} d\Omega \quad \text{onde:} \quad d\Omega = \int_{\omega}^{\beta} \sin\eta \cos\eta \, d\eta \int_0^{2\pi} d\phi \quad (21)$$

onde β e ω são ângulos obtidos dos valores médios da base anelar (figura 7), o valor de α e θ , que são ângulos de variação máxima do espalhamento da radiação, podem ser obtidos geometricamente (figura 8):

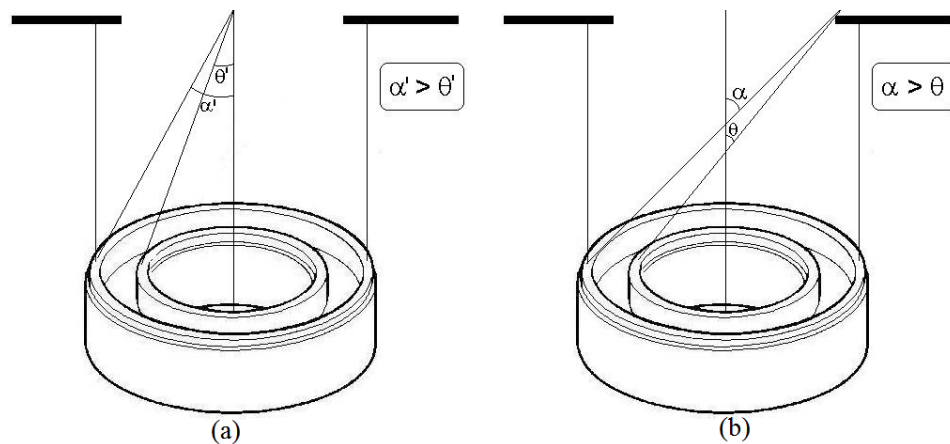


Figura 7 - Obtenção dos ângulos de α e θ geometricamente.

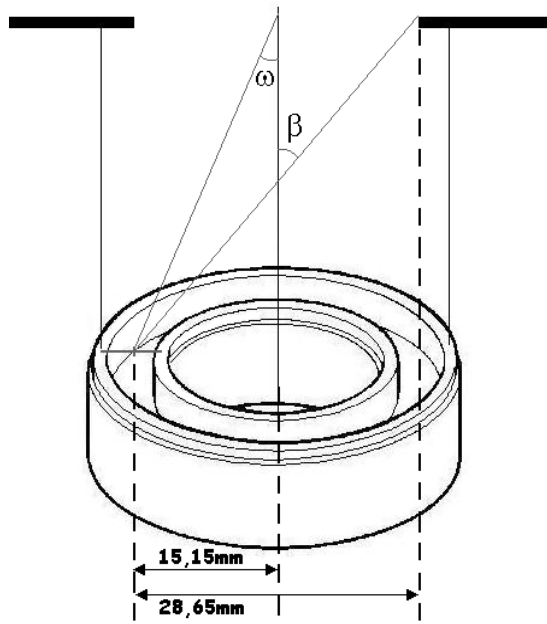


Figura 8 - Obtenção de β e ω geometricamente.

Obtendo a correção de ângulo sólido $d\Omega$:

$$d\Omega = \int_{0,25\pi}^{0,34\pi} \sin\eta \cos\eta \, d\eta \int_0^{2\pi} d\phi = 0,842 \quad (22)$$

Adequando a equação 20 da dose para a geometria descrita, obtém-se a equação 23:

$$D = \frac{\left\{ 92,5 \times 10^{-3} \text{ Ci} \left[3,70 \times 10^{10} \frac{1}{\text{Ci}} \right] \right\} \left\{ 17,2 \times 10^3 \text{ eV} \left[1,60 \times 10^{-19} \frac{1}{\text{eV}} \right] \right\} \left\{ 0,120 \frac{\text{m}^2}{\text{kg}} \right\}}{2\pi r^2} \cdot 0,842 \text{ Sv s}^{-1} \quad (23)$$

Obtendo-se a relação 24, para dose de radiação pela fonte anelar de Pu-238 em função do tempo:

$$D = 4,5 \times 10^{-5} \text{ Sv s}^{-1} \quad (24)$$

6 MATERIAIS E MÉTODOS.

6.1 CALIBRAÇÃO E SIMULADOS DE PELE E TECIDOS

Para construção da curva de calibração para quantificar *in vivo* os níveis de Fe na pele dos camundongos portadores de *T. cruzi* foram preparadas diferentes concentrações do padrão mono elementar de Fe, variando as concentrações desde água pura, destilada e deionizada, até 150 ppm de Fe a partir de soluções estoque (Sigma-Aldrich-Fluka). O sistema utilizado foi o PXRF-LFNA-01.

As amostras foram medidas usando um recipiente Chempex lacrado com filme fino, com 5 a 10 mL de simulado, figura 9.

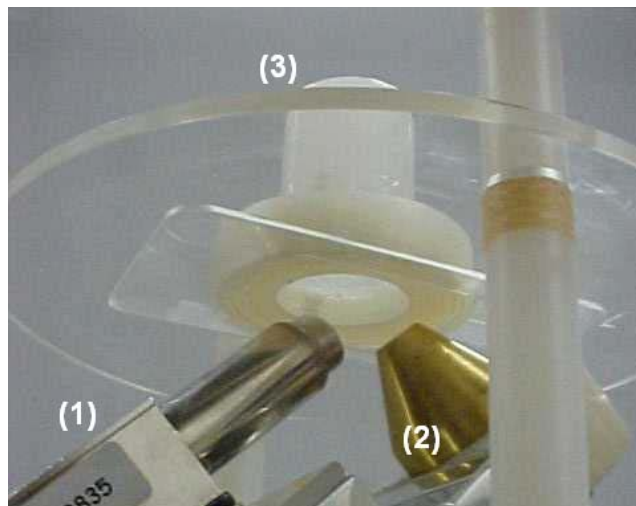


Figura 9 - No detalhe o detector (1), tubo de raios X (2) e o recipiente porta amostra (3).

Foi considerado um desvio de ± 5 ppm para as concentrações dos simulados preparados.

Foram preparados mais 10 simulados: 5, 15, 35, 55, 75, 95, 115, 135, 145 e 155 ppm de soluções aquosas dopadas com solução de sulfato de Fe ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) com PM = 278,01 da LABSYNTH Ltda para avaliação da curva de calibração.

Utilizando o sistema PXRF-LFNA-02, construíram-se as curvas de calibração utilizadas na quantificação dos níveis de Fe, Cu e Zn em amostras orgânicas de

ratos com implantes de T. Walker-256. Os simulados orgânicos foram preparados da mesma forma que os simulados de Fe. Variando a concentração de 20 ppm até a máxima concentração de 200 ppm para Fe, Cu e Zn.

Para avaliação das curvas de calibração foram preparados mais 3 simulados multielementares de Fe, Cu e Zn:

S1 = 35 ppm de Fe, 55 ppm de Cu e 175 ppm de Zn;

S2 = 25 ppm de Zn, 45 ppm de Fe e 170 ppm de Cu e

S3 = 30 ppm de Cu, 50 ppm de Zn e 165 ppm de Fe

6.2 SISTEMA PXRF-LFNA-01

O sistema utilizado para medidas *in vivo* foi o (PXRF-LFNA-01) composto de um detector Si PIN-diodo resfriado termoelectricamente por efeito Peltier, com pré-amplificador e janela de Be de 25 μm (figura 9-b). A resolução do detector é de 221 eV para a linha de 5,9 keV do Mn (AMPTEK INC., 1998).

Para excitação da amostra foi utilizado uma fonte de Pu-238 (17,2 keV; 92.5 mCi; 86 anos). A eletrônica do sistema é composta de um analisador multicanal modelo MCA8000A, notebook ou palmtop para aquisição, armazenamento e análise dos dados (figura 10-a).

A fonte e o detector foram montados em um suporte planejado e construído para utilização em campo, visto que todo o sistema é portátil.

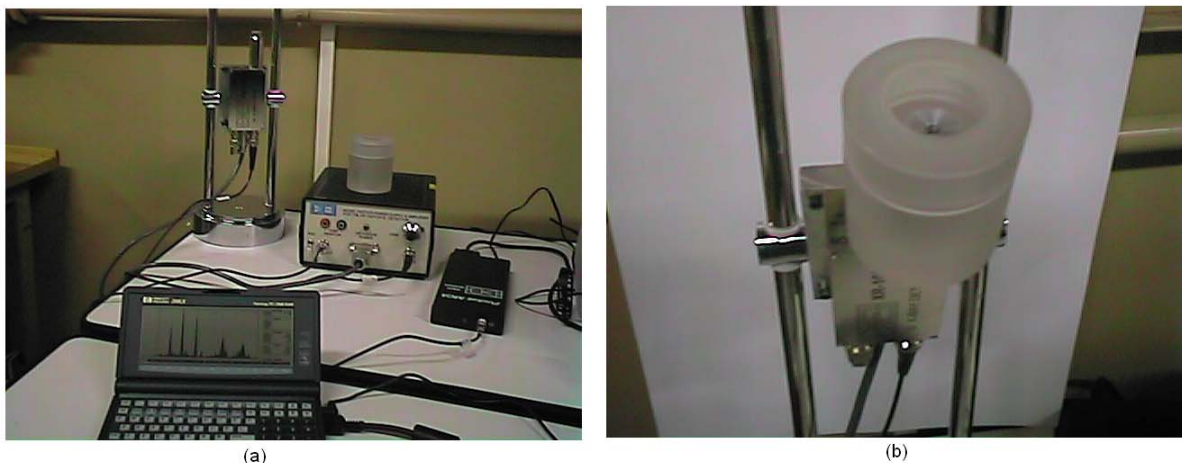


Figura 10 - Sistema portátil de excitação e detecção por PXRF (LFNA-01) vista geral em (a) e detalhe do detector, fonte anelar e porta amostra (b).

Foram realizados vários testes e optou-se pela utilização de um colimador de Pb no detector que melhorou o limite de detecção do sistema. Foram realizadas três medidas em cada camundongo e o tempo de aquisição foi de 50 s para cada medida *in vivo*.

6.3 SISTEMA PXRF-LFNA-02

O sistema utilizado para medidas *in natura* foi o (PXRF-LFNA- 02) é composto por um mini tubo de raios X com alvo de Ag, *spot* de 5 mm de diâmetro aproximadamente e 4 W de potência máxima (MOXTEK INC., 2003). Foi empregado um detector de raios X tipo Si-PIN com pré-amplificador, resolução de 221 eV para a linha de 5,9 keV do Mn, janela de Be de 25 μm (AMPTEK INC., 1998); fonte de alta tensão com amplificador, modelo PX2CR, analisador multicanal modelo MCA8000A, notebook para aquisição, armazenamento e análise dos dados. O tubo e o detector foram montados em um suporte planejado e construído para utilização em campo, visto que todo o sistema é portátil.

A Figura 11 apresenta uma foto com detalhes do sistema.



Figura 11 - Sistema portátil de excitação e detecção por PXRF (LFNA-02) vista geral em (a) e detalhe da medida *in natura* em (b)

Foram realizados vários testes e optou-se pela utilização de um colimador de Ag no detector, que melhorou o limite de detecção do sistema. As medidas foram realizadas com 28 kV, 10 μA , em triplicata e com tempo de aquisição de 200 s.

6.4 ANIMAIS INFECTADOS POR *TRYPANOSOMA CRUZI*

Foram utilizados camundongos Swiss e C57BL/6 machos de 8 a 12 semanas de idade, obtidos Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina. Os camundongos foram mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Patológicas da UEL em gaiolas coletivas, comportando 5 animais cada. Água e ração foram distribuídos “ad libitum”. Camundongos dos grupos experimentais e controles possuíam aproximadamente a mesma idade.

Os animais foram infectados, por um protocolo padrão de infecção (MALVEZI *et al*, 2004), por via intraperitoneal (ip), com 5000 formas tripomastigotas sanguícolas de *Trypanosoma cruzi* (Cepa Y), obtidas por sangria retro-orbital ou pulsão cardíaca de camundongos Swiss inoculados semanalmente pela via intraperitoneal com 200.000 formas sanguícolas, usadas para a manutenção de *T. cruzi in vivo*, figura 12.

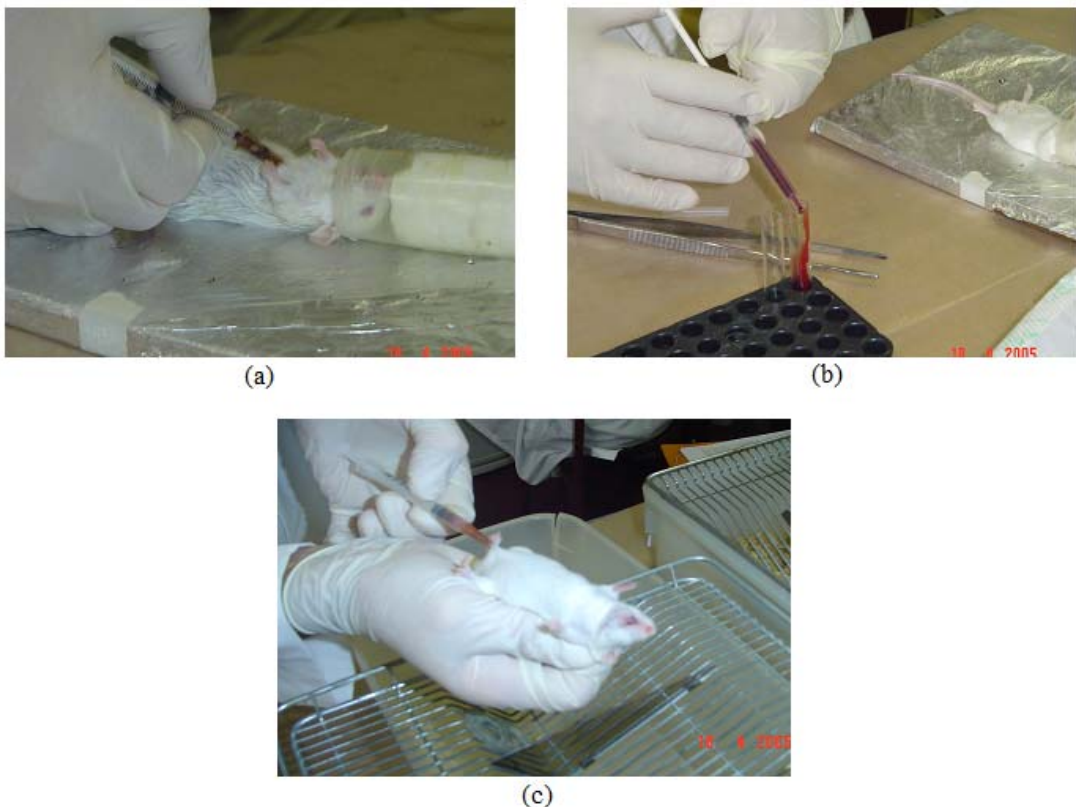


Figura 12 - (a) Coleta de 0,5 a 1 mL de sangue contaminado com *Trypanosoma cruzi*. (b) Procedimento de diluição do sangue contaminado. (c) Inoculação dos protozoários em camundongos saudáveis.

A avaliação da concentração de parasitas circulantes foi realizada através de contagem em microscópio óptico, do número de parasitas presentes em 5µl de sangue, retirados da cauda dos camundongos. Os resultados foram expressos em número de parasitas/mL de sangue.

6.4.1 Análise Hematológica dos Animais Normais e Infectados por *Trypanosoma Cruzi*

Para a realização da análise hematológica, 1,0 mL de sangue heparinizado de cada camundongo foi obtido através de punção cardíaca.

Em todos os experimentos realizados para determinar os parâmetros hematológicos dos animais infectados, consideramos como valores normais, aqueles obtidos com camundongos Swiss e C57BL/6, não infectados mantidos nas mesmas condições dos grupos experimentais (MALVEZI et al, 2004).

6.4.1.1 Contagem do número total de hemácias

A contagem de hemácias foi realizada manualmente nos camundongos normais e infectados, nos dias 0, 7 e 14, pós-infecção. Amostras de sangue foram cuidadosamente transferidas para tubos de ensaio e diluídas. A seguir, esta solução era homogeneizada e transferida para um hemocitômetro de Neubauer (Hirschmann, Techcolor), mantida por 10 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente antes do início da contagem em microscópio (Olympus, CH30), aumento final de 400x (MALVEZI et al, 2004).

6.4.1.2 Determinação da concentração de hemoglobina (Hb): método da cianometahemoglobina

A dosagem de hemoglobina foi realizada pelo método da cianometahemoglobina, onde ocorreram as seguintes reações:

1) Transformação do Ferro da hemoglobina em Ferricianeto, formando a metahemoglobina que por sua vez, 2) combinou com o cianeto de potássio e produziu o pigmento estável, a cianometahemoglobina. A cianometahemoglobina pode então ser quantificada pela absorção da luz em 540 nm, em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech, modelo Ultrospec 2000), gentilmente cedido pela Dra. Márcia Furnaleta do Departamento de Microbiologia do CCB da UEL.

A comparação da leitura do instrumento com a solução de referência (padrão) permite calcular a hemoglobina (Hb), o que é feito de forma mais conveniente com uma curva padrão ou uma tabela de conversão. A concentração de Hb foi expressa em gramas/dL.

6.4.1.3 Preparação das soluções padrão

As amostras de sangue obtidas de um “pool” de camundongos Swiss e C57BL/6 normais, foram centrifugadas a 2500 r.p.m. durante 5 minutos. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram descartados. As hemácias foram ressuspensas e lavadas (três vezes) por centrifugação (5 minutos, 2500 r.p.m) em solução salina a 85%. Após a 3ª centrifugação foi adicionado água destilada e agitado vigorosamente por dois minutos para completa lise das hemácias. Em seguida adicionou-se clorofórmio e agitado vigorosamente por 2 minutos e centrifugado a 3000 r.p.m. por 15 minutos e removido o sobrenadante (hemolizado) com pipeta de Pasteur. As amostras foram armazenado a -20 C° até o momento de uso.

Em seguida foram determinadas as concentrações de hemoglobina das diferentes amostras, em equipamento Cell-Dyn 1600 (Abbott) e confirmado no equipamento Coulter T-890 (Coulter Eletronics).

6.4.1.4 Contagem total de leucócitos

As contagens totais dos leucócitos totais foram realizadas manualmente. As amostras de sangue heparinizadas previamente homogeneizadas foram diluídas numa proporção de 1:20 no líquido de Turk (20 mL de ácido acético glacial, 1 mL de azul de Cresil

Brilhante e água destilada em q.s.p. (1000 mL). Esta solução provocou a lise das células anucleadas (hemácias).

A seguir, utilizou-se o seguinte procedimento: em tubos de ensaio 10 x 50 mm foram colocados 95 μ L do líquido de Turk, 5 μ L de sangue heparinizado seguido de agitação vagarosa e deixado em repouso por 5 minutos. Após mais um processo de homogeneização realizou-se a contagem dos leucócitos em hemocitômetro de Neubauer utilizando 4 quadrantes laterais da câmara e objetiva de 40x.

6.4.2 Descrição das Medidas *IN Vivo*

Para a realização das medidas *in vivo*, os animais foram anestesiados utilizando 30 mg / mL de pentobarbital (40-50 μ L / animal) e fixados com fita adesiva num suporte vertical. A figura 13 mostra o procedimento com um camundongo.

Foram realizadas três medidas no abdômen de cada camundongo desde o dia zero até o 21º dia, cada medida teve duração de 50 s. Este protocolo experimental foi realizado três vezes, assim, os resultados apresentados são a média de três animais medidos três vezes cada um, ou seja, 9 medidas.

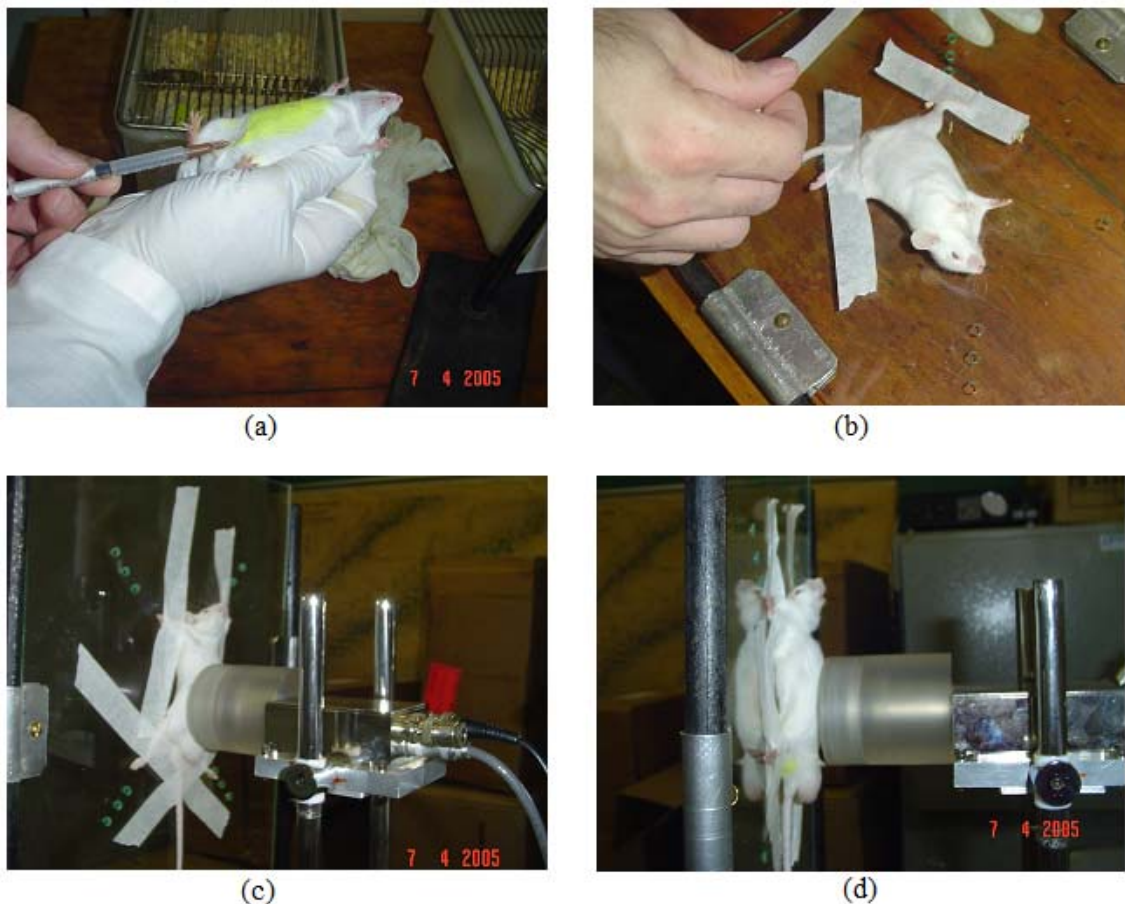


Figura 13 - (a) Camundongo sendo anestesiado com pentobarbital. (b) Os camundongos foram fixados com fita adesiva em um suporte acrílico. (c) e (d) O local das medidas foi à pele do abdômen.

6.5 ANIMAIS COM IMPLANTES DE T. WALKER-256

Foram utilizados ratos machos albinos Wistar (180 - 200 g). As células foram colhidas assepticamente em solução salina tamponada em pH 7.4 (PBS), após sete dias de desenvolvimento da forma ascítica.

Para implantação no animal, as células do carcinoma foram injetadas subcutaneamente (8×10^7 células por rato) no flanco direito. Essa quantidade é necessária para simular um progresso rápido (dias) para o estado terminal de um portador de câncer.

Ratos controles receberam solução salina e ratos do grupo experimental, receberam diariamente celecoxibe (CL, 50 -100 mg / kg-dia) ou aminoguanidina (AG, 50 – 100 mg / kg-dia) pela via i.p, 24 h após o inóculo.

A aminoguanidina (AG) tem a capacidade de impedir a formação dos produtos da glicação avançada. Ensaio clínico realizados mostram que a aminoguanidina permite aumentar a densidade do colagênio nas paredes das artérias, reduzindo o colesterol LDL. Nos animais, melhora a longevidade e as taxas de sobrevivência (WENGER et al, 2002 e BACKHUS et al, 2006).

A celecoxibe (CL) é um medicamento da classe dos anti-inflamatórios não esteróides, os quais apresentam a vantagem de serem eficazes no alívio sintomático da dor e da inflamação associadas a doenças artríticas. Além de possuírem um perfil de segurança gastrointestinal superior ao dos fármacos tradicionais, em função da inibição seletiva da enzima ciclooxigenase-2 (WENGER et al, 2002 e BACKHUS et al, 2006).

Os animais foram distribuídos em grupos: Controles (sem tumor) + solução salina tamponada inerte (PBS), Controles (sem tumor + CL), Controles (sem tumor) + AG, TW-256 + PBS, TW-256 + CL e TW-256+AG. No 12º dia pós-inoculação do TW-256, os tumores e o músculo gastrocnêmio contralateral à implantação do tumor foram removidos e tiveram suas massas medidas, o fígado também foi removido, figuras 14-a e 14-b respectivamente. Após esse procedimento as amostras foram mantidas em temperaturas inferiores a -10 °C.



Figura 14 - (a) Remoção do tumor do músculo gastrocnêmio contralateral. (b) Remoção da porção total do fígado.

A perda na massa corpórea (PMC) dos animais caquéticos foi calculada utilizando-se a fórmula:

$$PMC(\%) = \frac{(m^{ie} - m^{fe}) + (mt + gmc)}{m^{ie} + gmc} \quad (24)$$

Onde: m^{ie} = massa corpórea inicial do rato inoculado com o tumor; m^{fe} = massa corpórea final do rato inoculado com o tumor; mt = massa do tumor; gmc = ganho de massa do rato controle.

O estresse oxidativo no músculo gastrocnêmio foi avaliado por quimiluminescência (QL) estimulada por tert-butil e por meio da quantificação das defesas antioxidantes solúveis por capacidade antioxidante total (TRAP). Os resultados foram apresentados como média (M) \pm desvio padrão (DP) e os valores controle (VC) de referência, correspondentes ao grupo de controle.

6.5.1 Descrição das Medidas *in natura*

No 12º dia pós-inoculação do TW-256, os tumores e o músculo gastrocnêmio contralateral à implantação do tumor e o fígado dos animais foram removidos. Estas amostras foram guardadas em temperaturas inferiores a -10 °C até que fossem realizadas as medidas e o descarte do material biológico foi realizado seguindo os protocolos do Departamento de Patologia da UEL.

As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e medidas. Cada valor apresentado nos resultados representa a média das medidas de tecidos de três animais. Cada tecido foi medido três vezes, ou seja, cada resultado é a média de 9 medidas, variando sua posição na membrana suporte, cada medida teve duração de 200 s. Na figura 15 o exemplo do procedimento para uma amostra de fígado.

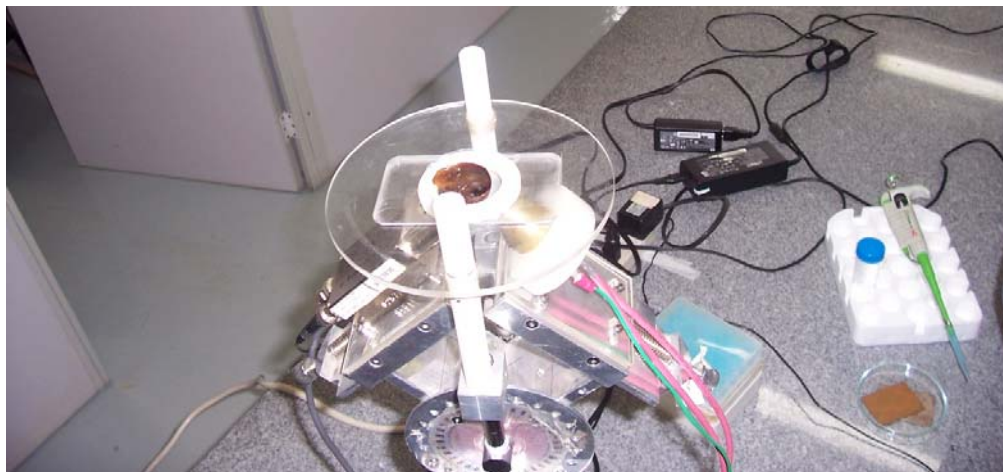


Figura 15 - Medida *in natura* da porção total do fígado de um rato com implante de TW-256.

6.6 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS ESPECTROS

A análise dos espectros de energia dos raios X é bastante complexa, uma vez que na região de uma determinada linha característica K pode ocorrer a contribuição dos raios X das linhas L de elementos mais pesados. Também pode ocorrer superposição de picos K_{α} do elemento adjacente, de número atômico menor. Desta forma é necessário um aplicativo que realize a desconvolução de todos os possíveis picos das várias linhas de raios X existentes no espectro. Foram utilizados dois softwares para a análise, o PMCA da AMPTEK inc e o WinQxas da IAEA.

O Software PMCA "multichannel analyzer pocket mca" versão 2.0.1, permite aquisição de dados e análises de espectros. Este software possui a opção de seleção da região de interesse (ROI), calibração de energia (inserida pelo usuário de fontes externas), procura de picos, informação sobre picos (livraria), espectros múltiplos, e operações matemáticas com os espectros.

O Software de PMCA adquire e exhibe todos os dados transmitidos pelo MCA8000A (analisador multicanal com 16K canais): dados espectrais, tempo real e tempo "vivo" e parâmetros de funcionamento, inclusive o estado da bateria se estiver sendo usada. Entre as ferramentas primárias do Software PMCA, existe uma rotina de procura de pico semi-automática que marca os cumes identificados com os ROIs inseridos pelo usuário. Cálculos com os picos são automáticos FWHM "Full Width - Half Maximum" e exibidos em canais ou unidades de calibração definidas pelo usuário.

A versão do Windows do Software PMCA inclui uma biblioteca isotópica e listas de linhas de emissão de raios X. As informações sobre o pico são mostradas no painel e automaticamente é sugerido o isótopo ou linha de raio X mais próximo ao pico. Podem ser exibidos múltiplos espectros simultaneamente e podem ser executadas operações matemáticas nos espectros. (AMPTEK, 2004).

Depois de concluído o ajuste do espectro esse programa fornece informações descrevendo, entre outras informações, a área total e a área líquida do espectro, figura 16.

Este software apresenta uma desvantagem comparado ao programa WinQxas "Quantitative X-Ray Analysis System" (versão Windows), pois não realiza o ajuste interativo até estabelecer um espectro com os picos desconvolucionados, levando em conta a

superposição de linhas. Esta rotina é capaz de ajustar o espectro de forma que a diferença entre as intensidades calculadas e experimentais seja mínima.

WinQxas (v.1.23) é uma versão adaptada para Windows do software QXAS (ambiente DOS). Este software foi desenvolvido na Universidade da Antuérpia, Bélgica, denominado AXIL (Analysis of X-Ray Spectra by Iterative Least Squares Fitting). Após a obtenção dos espectros de raios X esses passam por um ajuste matemático para se obter as áreas líquidas sob os picos. Este software possui os mesmos recursos descritos no item anterior relacionado ao software PMCA, acrescido da rotina responsável pelas operações matemáticas de desconvolução dos picos no espectro.

Para utilizar esse software é necessário criar um modelo (arquivo .MOD), ou seja, fornecer ao programa os elementos que estão presentes em uma amostra conhecida, as condições de excitação que foram utilizadas, as características do detector, calibração do detector (relação entre a energia e o número de canais) e o tipo de espectro contínuo mais adequado.

Feito isso, o software realiza o ajuste iterativo dos demais espectros utilizando o espectro de calibração como modelo, até estabelecer um espectro teórico, onde a soma dos quadrados da diferença entre as intensidades calculadas e experimentais seja mínima (quantidade denominada qui-quadrado e representada por χ^2).

Depois de concluído o ajuste espectral, o programa fornece um relatório contendo as informações referentes à energia, área líquida dos picos, desvio padrão e valor do χ^2 , para cada linha espectral dos elementos analisados. A figura 17-a mostra uma visão geral do funcionamento do software Winqxas, a figura 17-b mostra alguns parâmetros da análise feita pelo software.

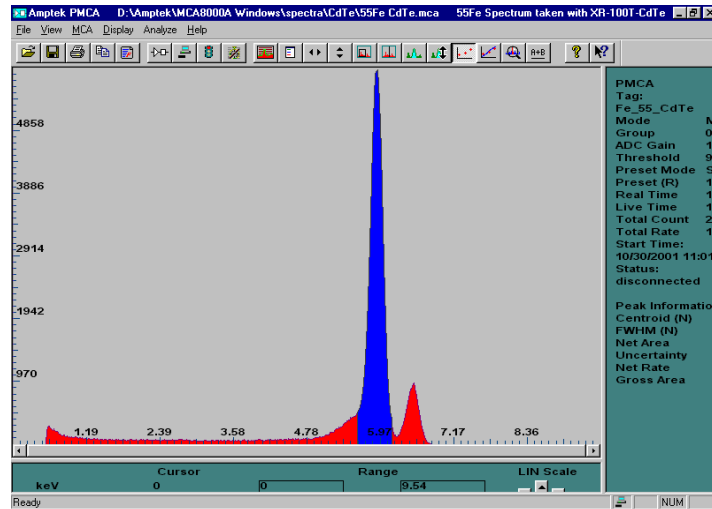


Figura 16 - Tela do software PMCA para Windows.

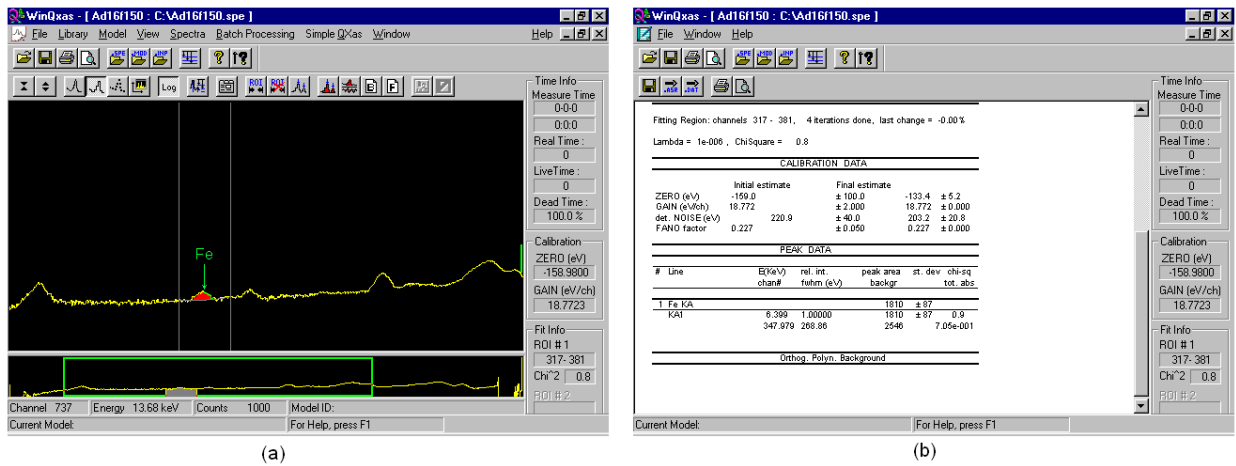


Figura 17 - (a) Tela do software WinQxas versão 1.23. (b) Janela com parâmetros da análise realizada pelo software WinQxas versão 1.23.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO.

7.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO E LIMITE DE DETECÇÃO (LLD) PARA MEDIDAS *IN VIVO*

Na Figura 18 esta a curva de calibração da linha K do Fe para as várias concentrações utilizando o aparato PXRf-LFNA-01, os desvios médios ficaram abaixo de 15%.

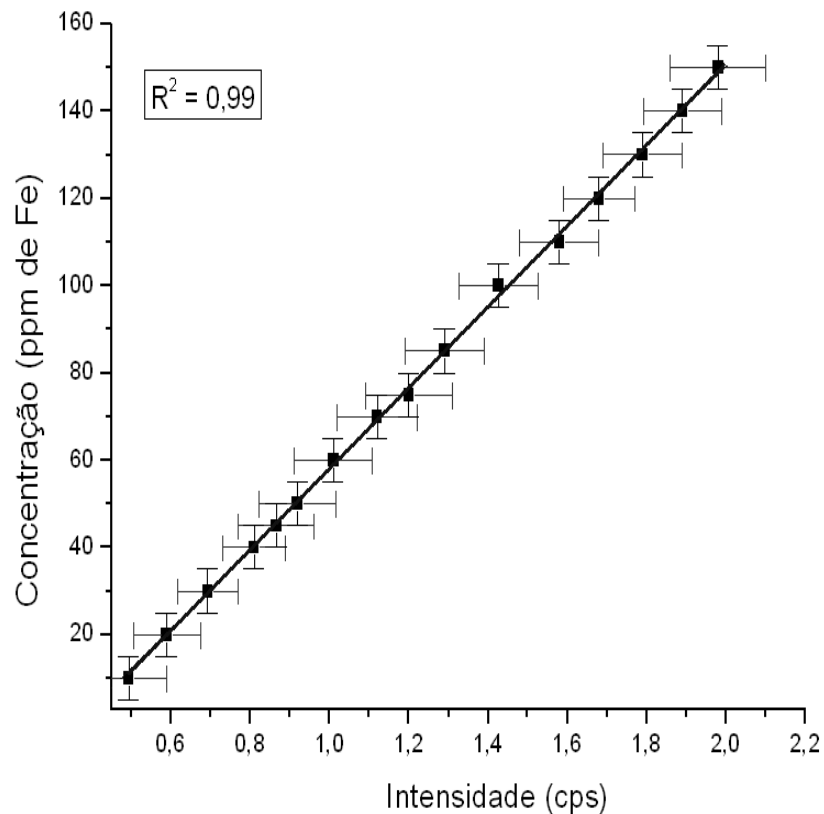


Figura 18 - Curva de calibração do Fe para medidas de 50 s, com 95% de confiabilidade.

O coeficiente de determinação da curva de calibração do ferro foi de 0,99. A tabela 3 apresenta os resultados dos valores medidos em comparação com valores titulados para os simulados teste feitos de solução de sulfato de Fe ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) para avaliação da curva de calibração.

Tabela 3 - Concentrações preparada (CP) e medidas (CM) para medidas de 50 s, resultados para avaliação da curva de calibração, com 95% de confiabilidade.

CP (ppm de Fe)	5 ± 5	15 ± 5	35 ± 5	55 ± 5	75 ± 5	95 ± 5	115 ± 5	135 ± 5	145 ± 5	155 ± 5
CM (ppm de Fe)	---	14 ± 6	33 ± 2	55 ± 1	76 ± 2	96 ± 4	115 ± 3	134 ± 3	147 ± 6	159 ± 4

Todas as medidas dos simulados apresentadas na tabela 3 estão estaticamente compreendidas dentro dos desvios com exceção da medida de 5 ppm que esta abaixo do limite de detecção e não pode ser quantificada.

A variação do LLD em função do tempo de medida pode ser visualizada na figura 19. Medidas nos simulados de pele forneceram um limite mínimo de detecção (LLD) de 13 ppm para o ferro, usando-se períodos de medida de 50 segundos e dose na superfície da pele de 3 mSv, para medidas realizadas em triplicata, resultando em uma dose total menor que 10 mSv.

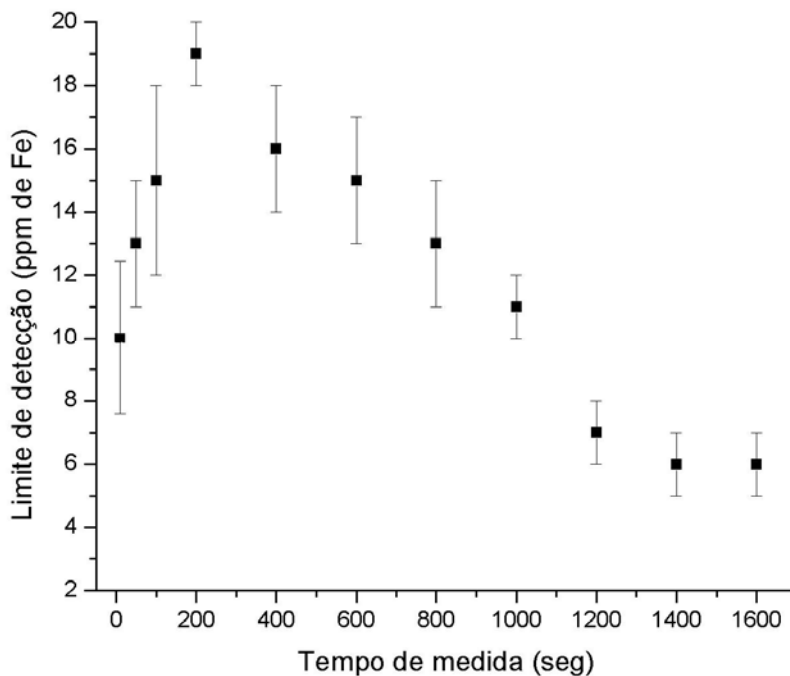


Figura 19 - Variação do LLD em função do tempo de medida, com 95% de confiabilidade.

A curva bifásica do LLD em função do tempo de medida revela a dependência da medida realizada com o aparato experimental descrito no item 6.2 e a radiação de *background*. Tempos de medida abaixo de 200 s geraram resultados com valores baixos de radiação de *background* para a energia $K\alpha$ do Fe. A equação 15 da página 31, mostra a dependência da intensidade do LLD e a radiação de *background*. Estatisticamente a medida com 50 s mostrou ser suficiente para determinar, com a precisão necessária, níveis de Fe medidos *in vivo*.

7.2 CURVAS DE CALIBRAÇÃO E LIMITES DE DETECÇÃO (LLD) PARA MEDIDAS *IN NATURA*

Na Figura 20 estão às curvas de calibração do Fe, Cu e Zn (linhas K) utilizando o aparato PXRF-LFNA-02 obtidas a partir dos padrões líquidos com diferentes concentrações de 20 até 200 ppm. Os desvios médios ficaram abaixo de 12%.

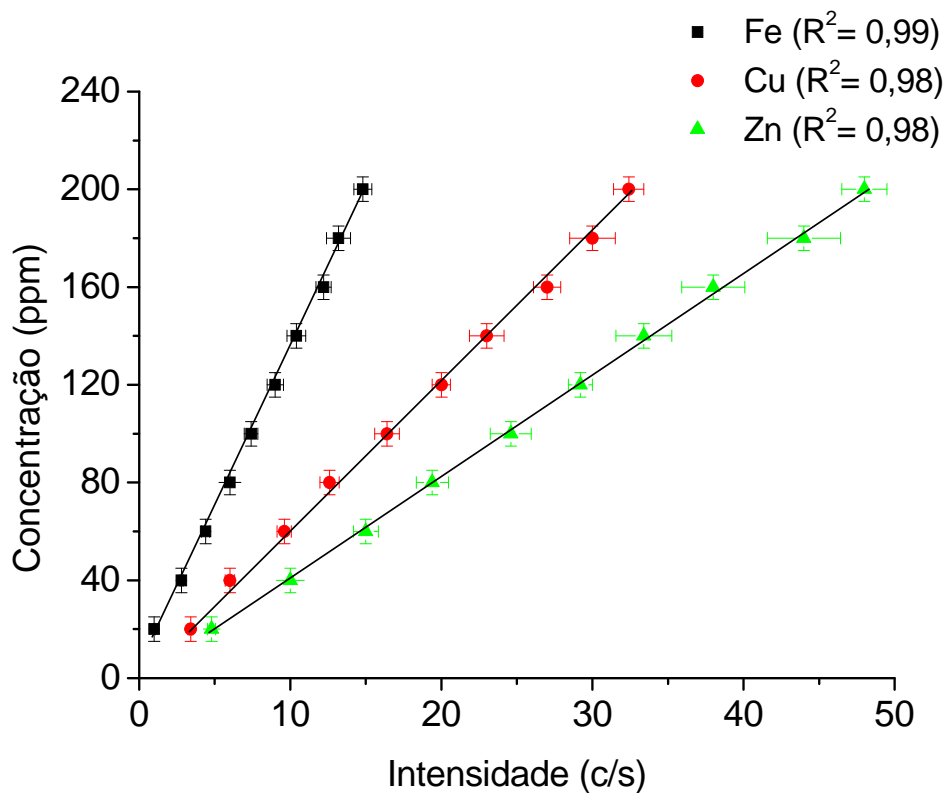


Figura 20 - Curva de calibração do Fe, Cu e Zn para medidas de 200 s, com 95% de confiabilidade.

Os limites de detecção com o sistema PXRF-LFNA-02 com 95% de confiabilidade foram: Fe (6 ppm), Cu (4 ppm) e Zn (3 ppm). Os coeficientes de determinação foram 0,99, 0,98 e 0,98 para Fe, Cu e Zn respectivamente.

A tabela 4 apresenta os resultados das medidas dos simulados testes multielementares de Fe, Cu e Zn.

Tabela 4 - Concentrações preparada (CP) e medidas (CM) para medidas de 200 s, resultados para avaliação das curvas de calibração, com 95 de confiabilidade.

	S1	S2	S3
CP	Fe (35 ± 5)	Zn (25 ± 5)	Cu (30 ± 5)
(ppm de Fe)	Cu (55 ± 5)	Fe (45 ± 5)	Zn (50 ± 5)
	Zn (175 ± 5)	Cu (170 ± 5)	Fe (165 ± 5)
CM	Fe (33 ± 7)	Zn (20 ± 5)	Cu (32 ± 4)
(ppm de Fe)	Cu (58 ± 3)	Fe (45 ± 6)	Zn (49 ± 7)
	Zn (174 ± 5)	Cu (171 ± 6)	Fe (163 ± 3)

Os resultados da tabela 4 apresentam todos os valores compreendidos dentro dos desvios estatísticos, mostrando um excelente ajuste da curva de sensibilidade.

7.3 NÍVEIS DE FERRO NA PELE DE CAMUNDONGOS SWISS E C57BL/6 INFECTADOS COM O *TRYPANOSOMA CRUZI* MEDIDOS POR XRF *IN VIVO*

Com a finalidade de verificar o curso da infecção por *T. cruzi* em camundongos Swiss susceptíveis e C57BL/6 resistentes em grupos de 10 a 12 animais, foram infectados com 5000 formas tripomastigotas sanguícolas de *T. cruzi* (Cepa Y). Os resultados das figuras 21 e 22 apresentam 95% de confiabilidade.

A infecção de camundongos Swiss foi caracterizada por uma alta parasitemia (Figura 21-a) e alta mortalidade (Figura 23).

Os camundongos C57BL/6 apresentaram alta parasitemia acompanhada de uma rápida diminuição no 11º dia (Figura 22-a) e uma sobrevida em relação aos camundongos Swiss (Figura 23).

Foi possível através das medidas por XRF *in vivo*, realizadas na pele de camundongos normais e infectados, até o 21º dia pós-infecção, mostrar que durante o curso da infecção há um aumento significativo na concentração de Fe na pele dos camundongos Swiss (suscetíveis) infectados, tendo um máximo no 9º dia. Foi observada uma resposta oposta nos camundongos C57BL/6 (resistentes), que apresentam um decréscimo na concentração de Fe após o 9º dia.

A parasitemia dos camundongos foi acompanhada diariamente até a morte dos animais. Com relação ao período pré-patente, isto é, o tempo entre a inoculação dos animais e a positividade da parasitemia, foi de 5 dias Swiss e C57BL/6 (Figuras 21-a e 22-a).

Através das medidas *in vivo* por XRF foi possível afirmar a positividade da infecção pela diferença nos níveis de ferro na pele dos animais infectados Swiss e C57BL/6 no 3º e 10º dia respectivamente (Figuras 21-b e 22-b). Para os Swiss esse resultado precedia o da parasitemia e as medidas de XRF foram utilizadas como teste de positividade da infecção.

Após o 9º dia, ambas as espécies de camundongos apresentaram uma diminuição da parasitemia simultaneamente. No mesmo período foi verificada a diminuição dos níveis de Fe na pele medidos por XRF nos camundongos C57BL/6 e um aumento nos níveis de Fe nos camundongos Swiss.

A correlação entre os níveis de Fe na pele e a quantidade de parasita no sangue durante esse período é apresentada nas figuras 21-c e 22-c.

Para ambos os animais, antes do 9º dia, não existe correlação entre níveis de Fe e parasitemia ($R^2 < 5$), pois o crescimento do número de parasitas é mais rápido que o aumento do Fe na pele, devido à velocidade biocinética do Fe para a pele.

O coeficiente de determinação entre níveis de Fe medidos por XRF e parasitemia para o intervalo do 9º ao 21º dia foi de 0,99 e 0,98 para Swiss e C57BL/6 respectivamente. Esse resultado mostra a capacidade da XRF em medir Fe *in vivo* e a possibilidade de um achado biológico ao poder utilizar esse resultado para explicar o papel do Fe no metabolismo do *T. cruzi*.

O metabolismo dos animais Swiss apresenta um aumento na quantidade de Fe na pele no período de maior parasitemia. Os C57BL/6 apresentam um estado de indução anêmica no período de maior parasitemia e conseqüentemente uma redução drástica na

parasitemia. Essa descoberta motivou um estudo sobre o papel do elemento Fe na infecção com *T. cruzi*.

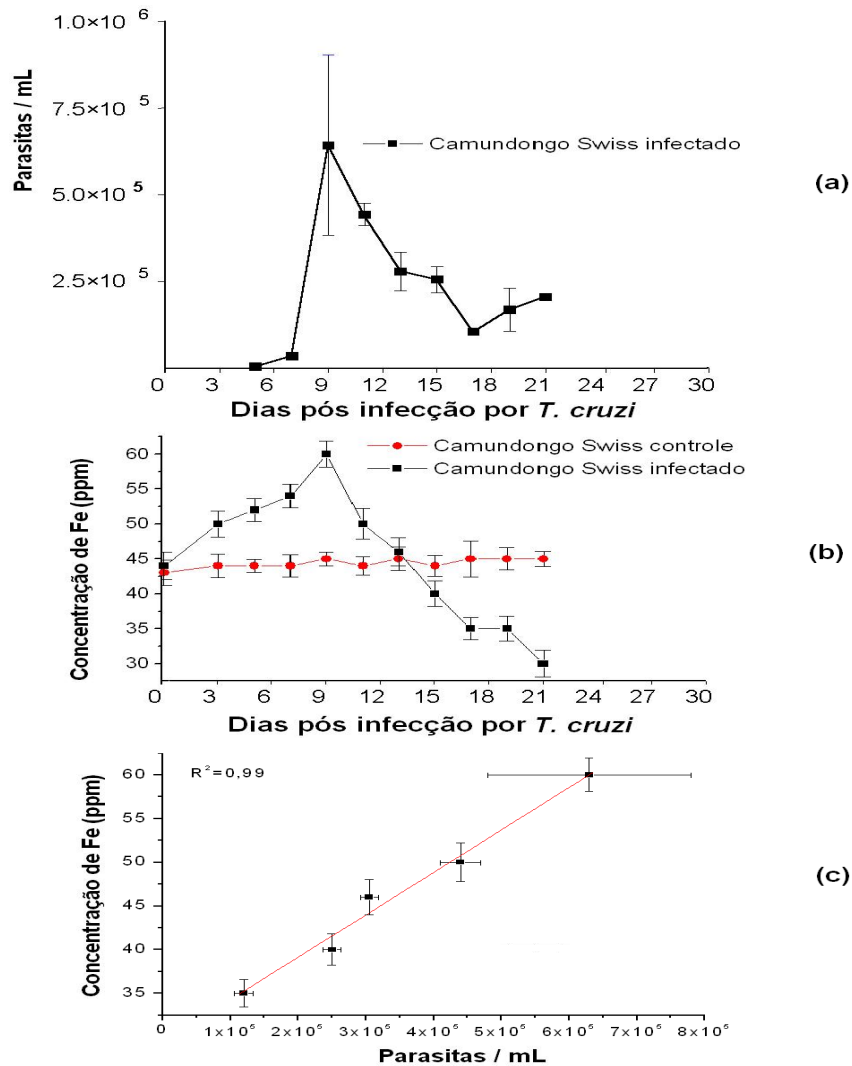


Figura 21 - (a) Curva de parasitemia dos camundongos Swiss. (b) Medidas de XRF *in vivo* realizadas na pele de camundongos normais e infectados, até o 21º dia pós-infecção. (c) Correlação entre concentração de Fe na pele medida *in vivo* e a parasitemia na fase anêmica (após 9 dias) dos camundongos Swiss.

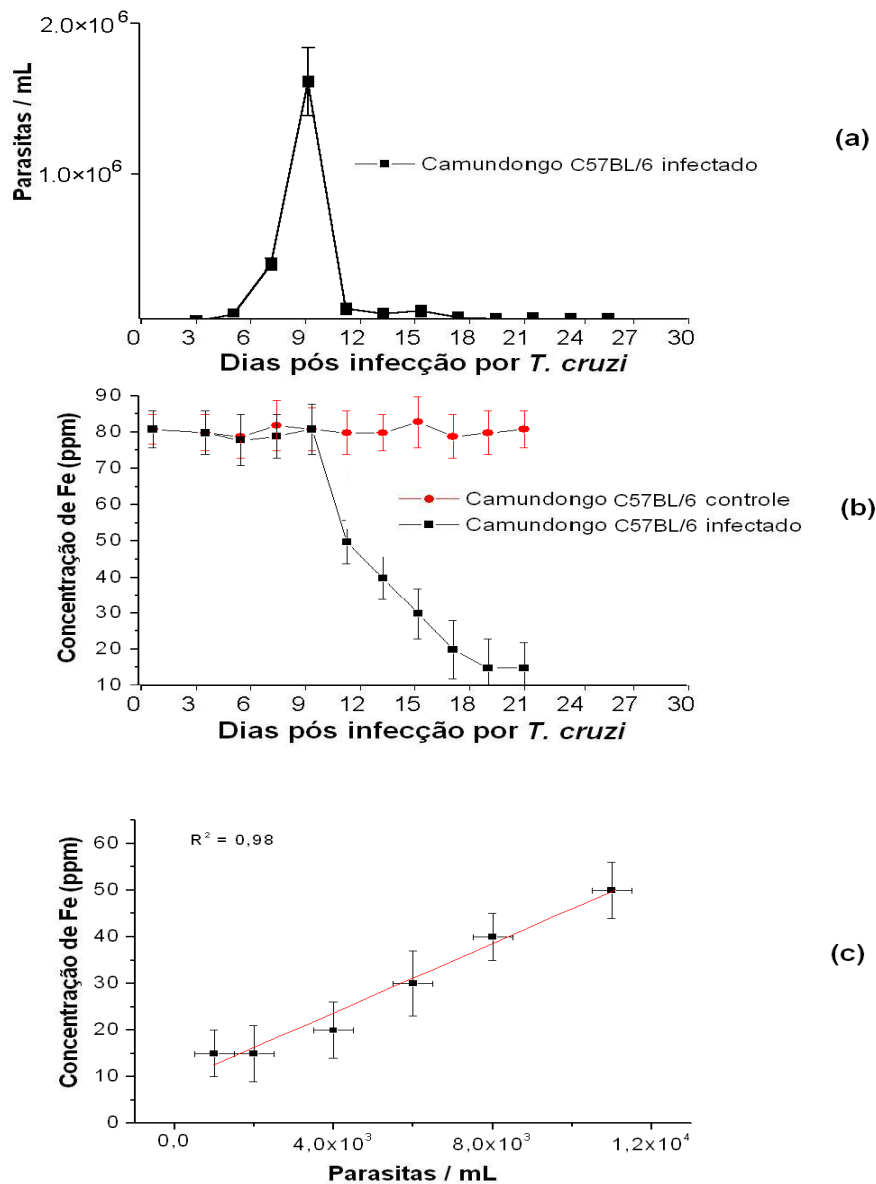


Figura 22 - (a) Curva de parasitemia dos camundongos C57BL/6. (b) Medidas de XRF *in vivo* realizadas na pele de camundongos normais e infectados, até o 21º dia pós-infecção. (c) Correlação entre concentração de Fe na pele medida *in vivo* e a parasitemia na fase anêmica (após 9 dias) dos camundongos C57BL/6.

A infecção experimental mostrou comportamento antagônico nos metabolismos das duas espécies com relação ao elemento Fe. Enquanto os Swiss apresentam um aumento da quantidade de Fe elevando sua parasitemia e esta se manteve elevada, o que é um dos fatores que ocasionaram uma menor sobrevida, os C57BL/6 apresentaram um decréscimo nas quantidades disponíveis de ferro na pele, simultaneamente houve uma diminuição drástica em sua parasitemia. O reflexo desse comportamento pode ser um dos motivos para a sobrevida dos C57BL/6 apresentado na figura 23.

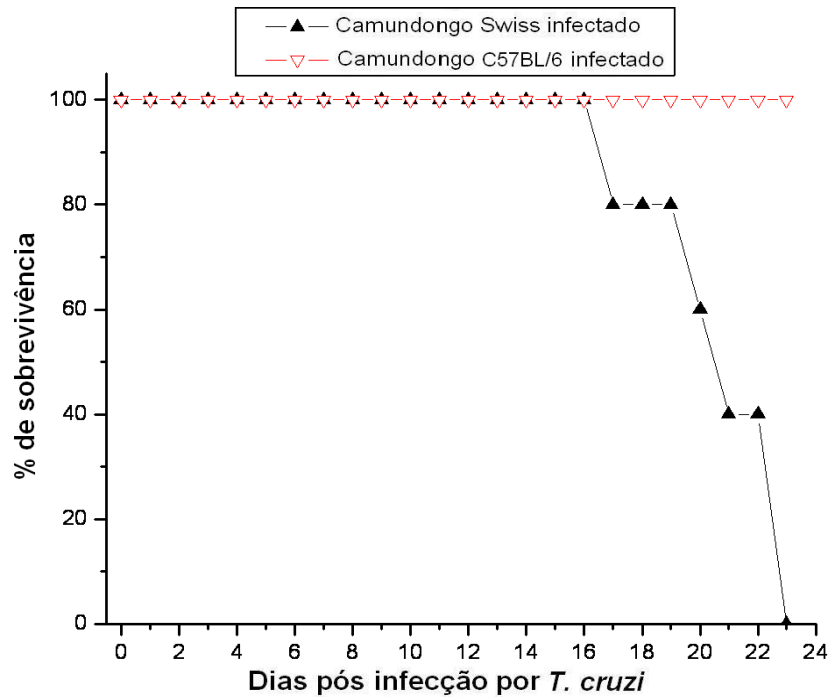


Figura 23 - Taxa de mortalidade dos camundongos Swiss e C57BL/6 infectados.

Foi possível através da XRF determinar a diferença entre os camundongos normais (controle) com relação à quantidade de ferro presente em suas peles, os Swiss apresentam um nível médio de 44 ± 2 ppm de Fe, enquanto os C57BL/6 apresentam um valor médio de 80 ± 3 ppm de Fe. Esses animais estiveram sobre as mesmas condições dos infectados e não apresentaram alteração significativa nos níveis de ferro (Figura 24).

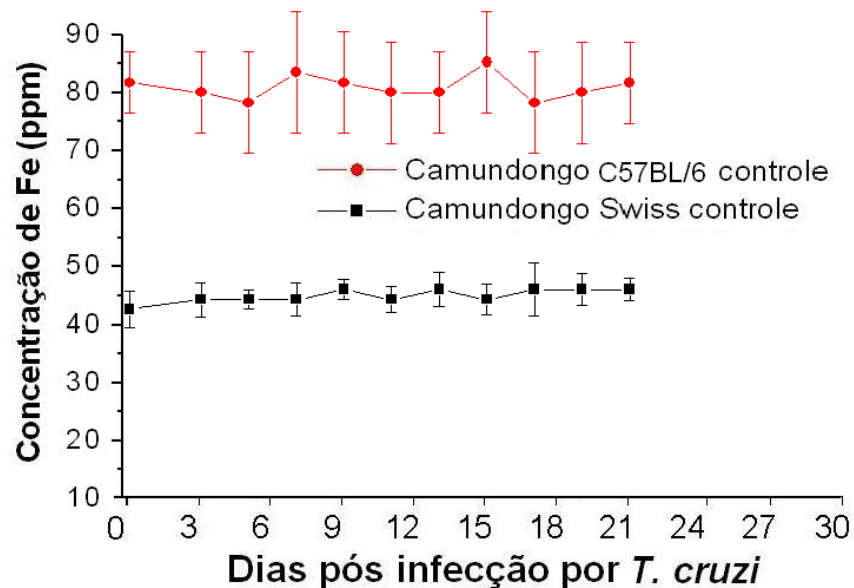


Figura 24 - Concentração de Fe medida por XRF *in vivo* nos animais normais.

A figura 25 mostra as alterações dos níveis de ferro medidos por XRF *in vivo* nos animais infectados. Enquanto os C57BL/6 mantêm os níveis de ferro constantes até o 9º dia, levando em consideração os desvios, seguida de uma brusca diminuição destes. Os Swiss apresentam um comportamento bifásico em relação ao 9º dia, primeiro um aumento dos níveis de ferro e após o 9º dia uma diminuição gradativa até sua morte.

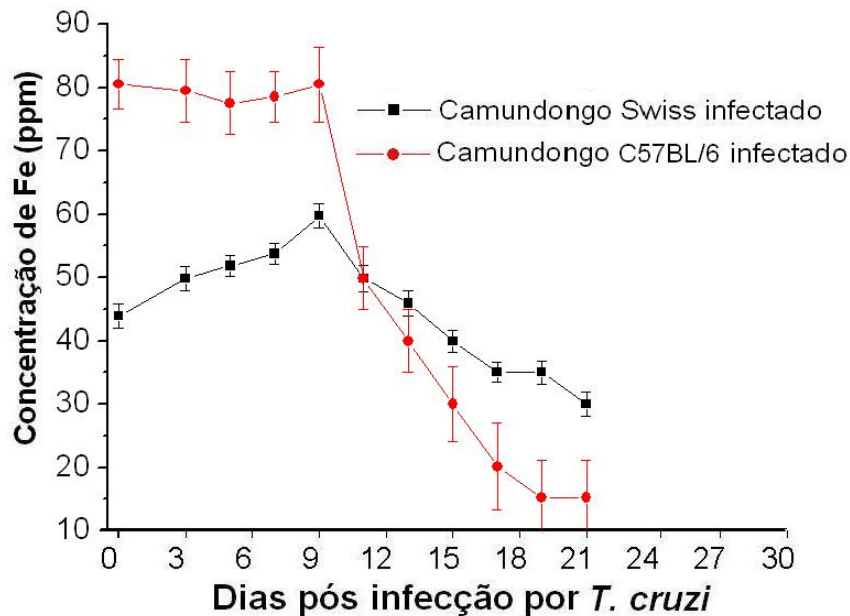


Figura 25 - Concentração de Fe medida por XRF *in vivo* nos animais infectados.

Uma redução semelhante à observada nos camundongos C57BL/6 foi estudada por Arantes *et al.* (2007) que demonstrou os efeitos da droga quelante deferoxamina (DFO), também utilizada como quelante de ferro no tratamento de portadores de Beta Talassemia (ESTEVAM; APPOLONI, 2009), em camundongos Swiss portadores de *T. cruzi*. Os animais induzidos a anemia pelo DFO apresentaram maior sobrevivência, demonstrando a correlação entre a quantidade de Fe disponível e a quantidade de parasitas no organismo.

Na figura 25 foi demonstrado o comportamento metabólico apresentado pelos camundongos C57BL/6 em comparação com os da espécie Swiss, os C57BL/6 apresentam sem administração de quelantes um estado anêmico aumentando sua resistência ao *T. cruzi*.

Em outro estudo Francisco *et al.*, (2008) mostrou que a combinação do medicamento benznidazole (medicamento padrão no tratamento da doença de Chagas) junto

com o tratamento com DFO aumentou a sobrevivência de animais susceptíveis a infecção por *T. cruzi*. Verificou-se uma queda da parasitemia em 98% em relação ao grupo infectado sem tratamento.

Em adição, o estudo de Lalonde e Holbein (1984) demonstrou *in vitro* que o *T. cruzi* utiliza-se do Fe para o seu crescimento em meios de cultura. Assim os resultados mostram que os efeitos dos tratamentos *in vivo*, citados anteriormente, correlacionam-se com as exigências do parasito *in vitro*.

Com relação ao *T. cruzi* o resultado de sua evolução revela sua complexa relação com o sangue dos mamíferos e conseqüentemente com o elemento ferro. No intestino do inseto a digestão do sangue gera radicais livres, pois este é rico em hemoglobina que contém ferro, um metal altamente suscetível à oxidação. Para se proteger de danos produzidos por radicais livres o parasito tem um eficiente sistema de detoxificação através de enzimas oxido redutoras (AGÊNCIA FIOCRUZ DE NOTÍCIAS, 2009).

A produção ATP nos tripanossomatídeos se dá através da fosforilação oxidativa. Além disso, toda a engrenagem enzimática para um metabolismo oxidativo está presente na maioria das formas adaptativas do *T. cruzi* (WILSON, 1999). Sabe-se também que o *T. cruzi* possui receptores específicos para transferrina sérica, proteína de transporte férrico no organismo. Mostrando uma adaptação evolutiva ligada ao elemento ferro.

7.4 ANÁLISE HEMATOLÓGICA E NÍVEIS DE FERRO NA PELE DE CAMUNDONGOS SWISS E C57BL/6 INFECTADOS COM O *T. CRUZI*

A análise hematológica dos camundongos Swiss e C57BL/6 normais, mantidos em biotério convencional, não revelou nenhum indicativo da presença de anemia nos animais de 8 a 12 semanas de idade. Os parâmetros hematológicos e os desvios fisiológicos encontrados foram utilizados como valores de referências para a realização de nossas investigações.

Os camundongos Swiss infectados com o *T. cruzi* apresentaram anemia em relação aos animais controles (não infectados), resultado semelhante foi verificado para os C57BL/6, as modificações nos índices hematológicos puderam ser detectadas a partir do 7º dia p.i, (Figura 26).

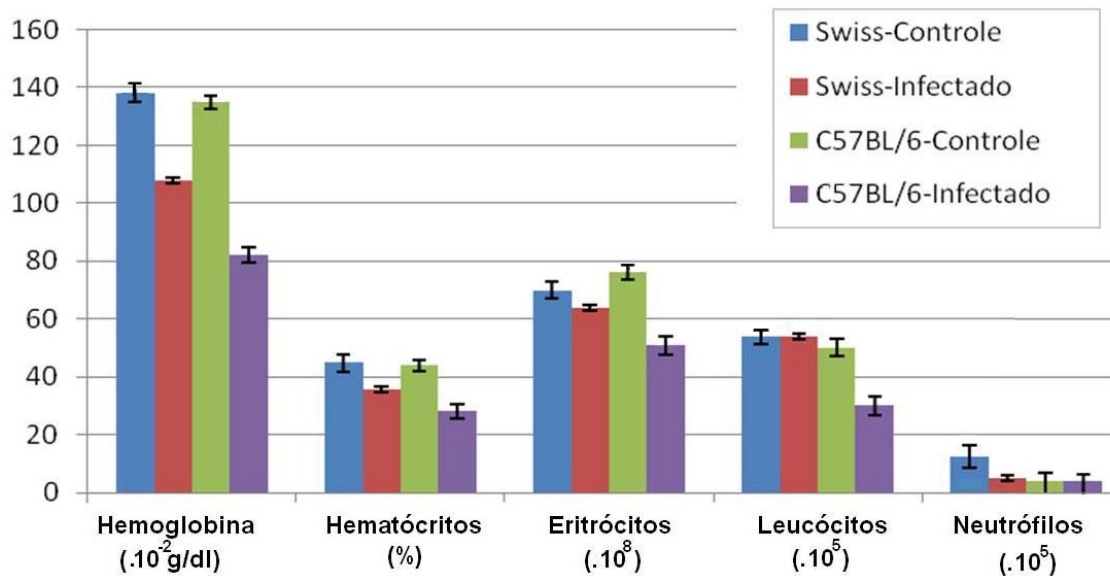


Figura 26 - Hematologia dos camundongos infectados.

A hemoglobina é uma metaloproteína que contém ferro presente nos glóbulos vermelhos (eritrócitos) e que permite o transporte de oxigênio pelo sistema circulatório. Parece apropriado comparar os níveis de hemoglobina do exame hematológico com os níveis de ferro medidos por XRF *in vivo* (Figura 27). Pode-se verificar que os camundongos C57BL/6 apresentam uma maior queda na hemoglobina, comprovando mais uma vez seu comportamento anêmico.

Hematócrito é a fração ocupada pelos glóbulos vermelhos ou hemácias no volume total de sangue. Sua variação segue o padrão da hemoglobina e dos eritrócitos (Figura 26). Os eritrócitos apresentam diminuição em ambas espécies de camundongos infectados, os eritrócitos são os glóbulos vermelhos, constituídos basicamente por globulina e hemoglobina sua função é transportar o oxigênio (principalmente) e o gás carbônico (em menor quantidade) aos tecidos.

Estatisticamente houve alteração dos níveis de leucócitos apenas nos camundongos C57BL/6 infectados. Os leucócitos, também conhecidos por glóbulos brancos, são células produzidas na medula óssea e presentes no sangue, linfa, órgãos linfóides e vários tecidos conjuntivos.

Os neutrófilos são uma classe de células sanguíneas leucocitárias, que fazem parte do sistema imunitário do organismo dos mamíferos. Sua variação só pode ser estatisticamente observada nos camundongos Swiss. Neutrófilos são fagócitos capazes de ingerir microrganismos ou partículas, uma maior quantidade desse constituinte do sistema

imuni dos camundongos Swiss normais demonstra a debilidade provocada pela infecção nos camundongos Swiss infectados.

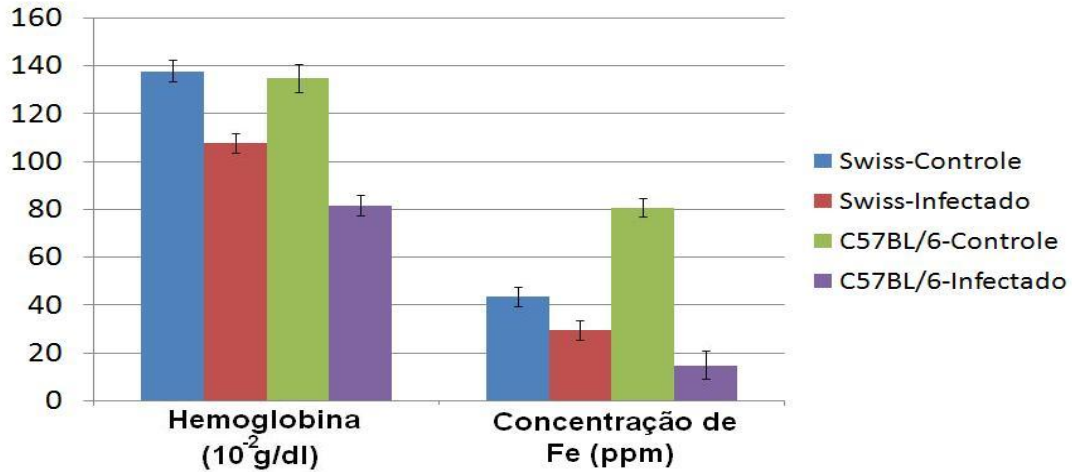


Figura 27 - Variação hematológica da hemoglobina e a variação dos níveis de Fe medidos por XRF *in vivo* nos animais controle e infectados.

Como a hemoglobina é uma metaloproteína que contém ferro sua variação sérica foi também medida na pele, mostrando um comportamento similar entre um exame hematológico e a XRF *in vivo*.

7.5 CÂNCER E ALTERAÇÕES NOS NÍVEIS DE METAIS NO ORGANISMO

7.5.1 Testes Realizados com a Xrf em Análises de Neoplasias de Tumor Eqüinas

Em um primeiro teste, para verificar a capacidade da XRF, recebemos uma amostra de pulmão eqüino extraída pelo Médico Veterinário Jayme Augusto Peres. A amostra era constituída por partes normais e outras acometidas. As amostras foram mantidas em solução formalina tamponada (10%) e medidas *in natura*, posteriormente foram lavadas em

água corrente “over night”. Em seguida estas foram padronizadas com cortes aproximados de 4 mm de espessura.

As amostras foram desidratadas em séries crescentes de alcoóis; diafanizadas com xilol ($C_6H_4(CH_3)_2$); foram incluídas em parafina (temperatura da estufa: $62^{\circ}C$), para serem padronizadas em espessura e superfície de corte em Micrótopo (LEICA RM 2145) do Departamento de Fisiologia da UEL (Figura 28), a preparação foi supervisionada pela Professora Dra. Ângela Maria Ferreira Falleiros do mesmo departamento.



Figura 28 - Em (a) a amostra padronizada no porta amostra, em (b) detalhe da padronização da amostra antes dos cortes com micrótopo.

O sistema utilizado nas medidas foi o (PXRF-LFNA-02) com condições de medida descritas no item 6.2. Os resultados estão apresentados na figura 29.

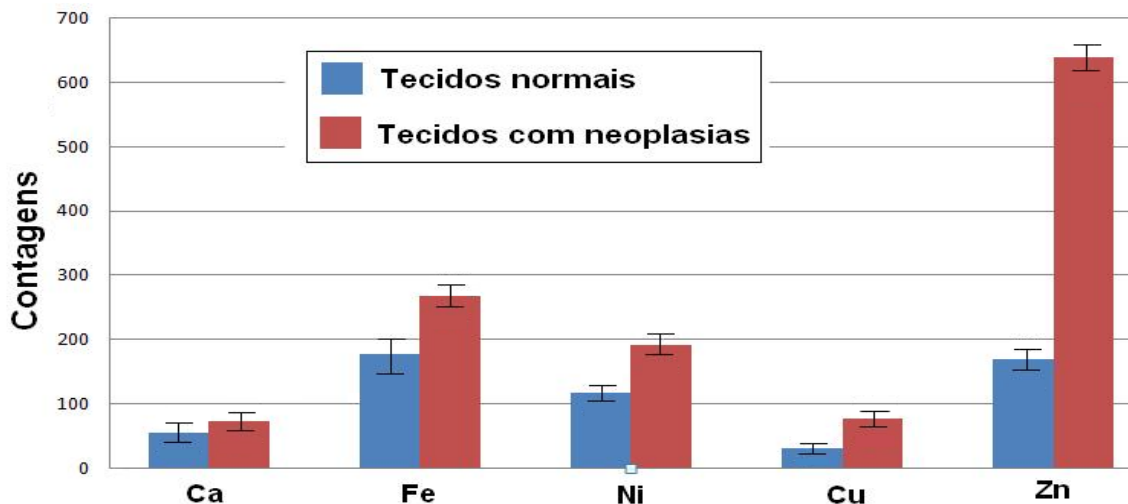


Figura 29 - Variação dos níveis de Ca, Fe, Ni, Cu e Zn medidos por XRF para tecidos de pulmão eqüino com neoplasias comparado com partes normais do mesmo pulmão.

A variação entre as medidas *in natura* e as preparadas não foram estatisticamente relevantes. Geraki et al, (2002) e Geraki et al, (2004) em análises de tumores verificaram que a preparação das amostras por secagem ou homogeneização não melhora os resultados, optando pela medida *in natura*.

Verificamos um aumento estatisticamente significativo para os metais Ca, Fe, Ni, Cu e Zn nos tecidos de pulmão equino com câncer em relação aos tecidos normais. Os desvios ficaram abaixo de 12 % com 95 % de confiabilidade.

Através desses resultados verificamos ser possível aplicar a técnica de XRF em amostras de tumor nas condições descritas.

Semelhante resultado foi obtido por Geraki et al, (2002) utilizando a XRF por radiação síncrotron para avaliar tecidos humanos acometidos com tumores, também verificou o aumento dos níveis de Fe, Cu e Zn. O aumento mais acentuado ocorreu para os elementos Cu e Zn, os autores comentam que o aparato precisa ser melhorado, pois testes de reprodutibilidade não foram satisfatórios, além de citarem como relevante o estudo da correlação entre concentração e localização dos elementos.

Farquharson et al, (2006) correlacionou a localização e a concentração dos elementos Fe, Cu, Zn e outros. Mapeando elementos traço utilizando micro-XRF por radiação síncrotron em tecidos de mama humana acometidos por neoplasias. O estudo demonstrou grande dificuldade em relacionar a maior concentração dos metais à localização da maior densidade de células tumorais. Concluindo ser necessária uma técnica mais sensível para tal feito.

Os resultados de Geraki et al, (2002) avaliando os níveis de metais em mastectomias estão de acordo com os resultados apresentados na figura 28, apesar de serem organismos diferentes.

O aumento nos níveis dos metais medidos possivelmente se deve ao aumento da densidade dos vasos sanguíneos no tecido circunvizinho ao tumor, causado pela liberação de produtos químicos mitogênicos do próprio tumor, processo conhecido com ativação angiogênica.

Biologicamente os resultados de Geraki et al, (2002) ou Farquharson *et al*, (2006) são relacionados a ativação angiogênica, que explica a grande concentração de elementos traços em tecidos com neoplasias.

A aplicação da técnica de XRF em tecidos biológicos e suas implicações no meio biomédico são relevantes, pois abrem uma grande gama de potenciais aplicações.

Um dos objetivos desse trabalho foi verificar a sensibilidade da XRF *in vivo* e *in natura* com os aparatos (PXRF-LFNA-01) e (PXRF-LFNA-02) para medidas em amostras biológicas com tumores. Além disso, verificar a variação, e não apenas o aumento devido à ativação angiogênica, dos elementos traço. Para isso acompanhamos o desenvolvimento de grupos experimentais de ratos Wistar com implantes de T. Walker-256 que receberam drogas antiinflamatórias, descritas no item 6.5, e comparamos as medidas por XRF com os resultados da caquexia e outros parâmetros biológicos.

7.5.2 Testes Realizados com a XRF *in vivo* na Pele de Ratos Wistar com Implantes de T. Walker-256

Foram utilizados ratos Wistar albinos, descritos no item 6.5, para medidas *in vivo* na pele no 12º dia pós-implante de T. Walker-256. O procedimento de medida foi descrito no item 6.4.2.

Os animais foram divididos em 6 grupos:

G1: Controles (sem tumor + PBS);

G2. Controles (sem tumor + CL);

G3. Controles (sem tumor + AG);

G4. TW-256 + PBS;

G5. TW-256 + CL;

G6. TW-256 + AG.

Os resultados estão apresentados na figura 30, os desvios nas medidas ficaram em torno de 10%.

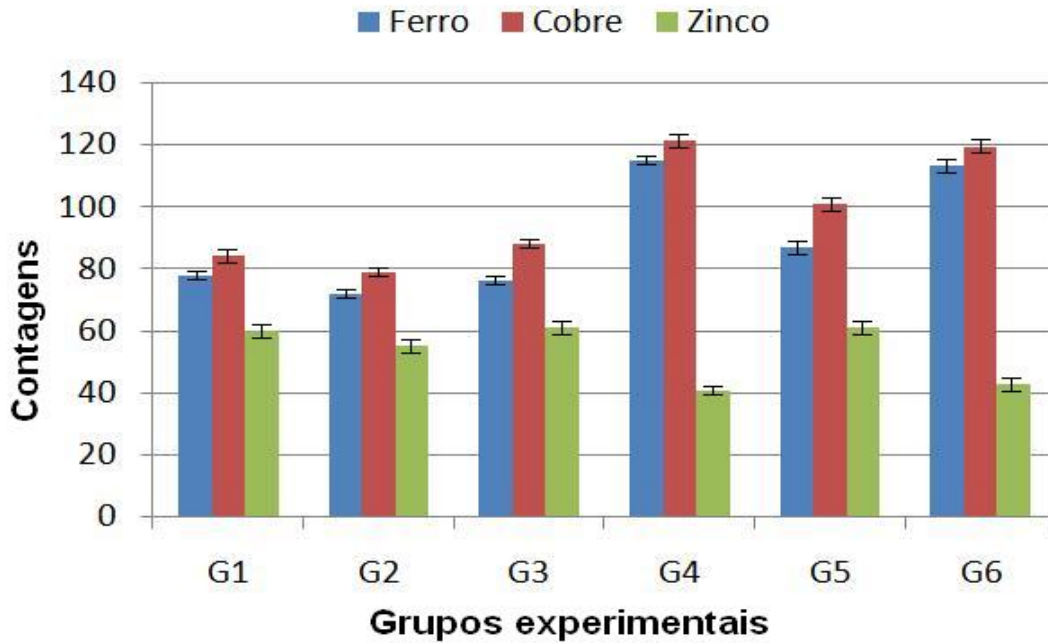


Figura 30 - Variação dos níveis de Fe, Cu e Zn medidos pro XRF *in vivo* para os grupos experimentais de ratos Wistar, com 95% de confiabilidade.

Em comparação com os resultados da figura 29, para animais sem tratamento os valores dos grupos G1, G2 e G3 (grupos com TW-256 e sem tratamento) apresentam as mesmas características em comparação com os grupos G4, G5 e G6, ou seja, um aumento dos elementos Fe e Cu. Porém a variação do elemento Zn não se comportou da mesma forma. O grupo G5 que recebeu o tratamento com celecoxibe manteve estatisticamente o nível de Zn se comparado com grupos sem tratamento. Enquanto os grupos G4 e G5 que receberam solução PBS e aminoguanidina respectivamente apresentaram um decréscimo na quantidade de Zn.

O elemento Zn em particular está relacionado ao funcionamento do sistema imunológico. O zinco apresenta funções catalíticas, estruturais e reguladoras, sendo componente de várias enzimas. Os sintomas observados na deficiência deste elemento incluem lesões de pele, anorexia, retardo do crescimento, hipogonadismo e alteração na função imune (SALGUEIRO et al, 2000; MCCALL et al, 2000)

No sistema imunológico o zinco desempenha papel fundamental, pelo fato de as células do sistema imune apresentarem altas taxas de proliferação, e este mineral estar envolvido na tradução, transporte e replicação do DNA (HAMBIDGE, 2003).

O zinco pode, ainda, afetar o processo de fagocitose dos macrófagos e neutrófilos, interferindo na lise celular mediada por células *natural killer* e ação citolítica das células T. A influência direta do zinco no sistema imune acontece devido a este elemento

estimular a atividade de enzimas envolvidas no processo de mitose, como a DNA e a RNA polimerase (HAMBIDGE, 2003; SALGUEIRO et al, 2000)

7.5.3 Alterações nos Níveis de Metais Medidos Através da XRF no Organismo de Ratos Wistar com Implantes de T. Walker-256 – Amostras Homogeneizadas

Os resultados apresentados são para amostras (músculo normal, tumor e fígado) homogeneizadas e diluídas em solução PBS na proporção de massa 1:3, o equipamento utilizado foi um homogeneizador de tecidos portátil (Haste Ultra 80-I).

Os grupos analisados foram: G1: Controles (sem tumor + PBS); G4. TW-256 + PBS e G5. TW-256 + CL.

O desvio padrão dos resultados variou de 2 % até 18 %. As figuras 31-a, 31-b e 31-c mostram os resultados para os elementos ferro, cobre e zinco respectivamente, medidos no músculo normal, fígado e tumor.

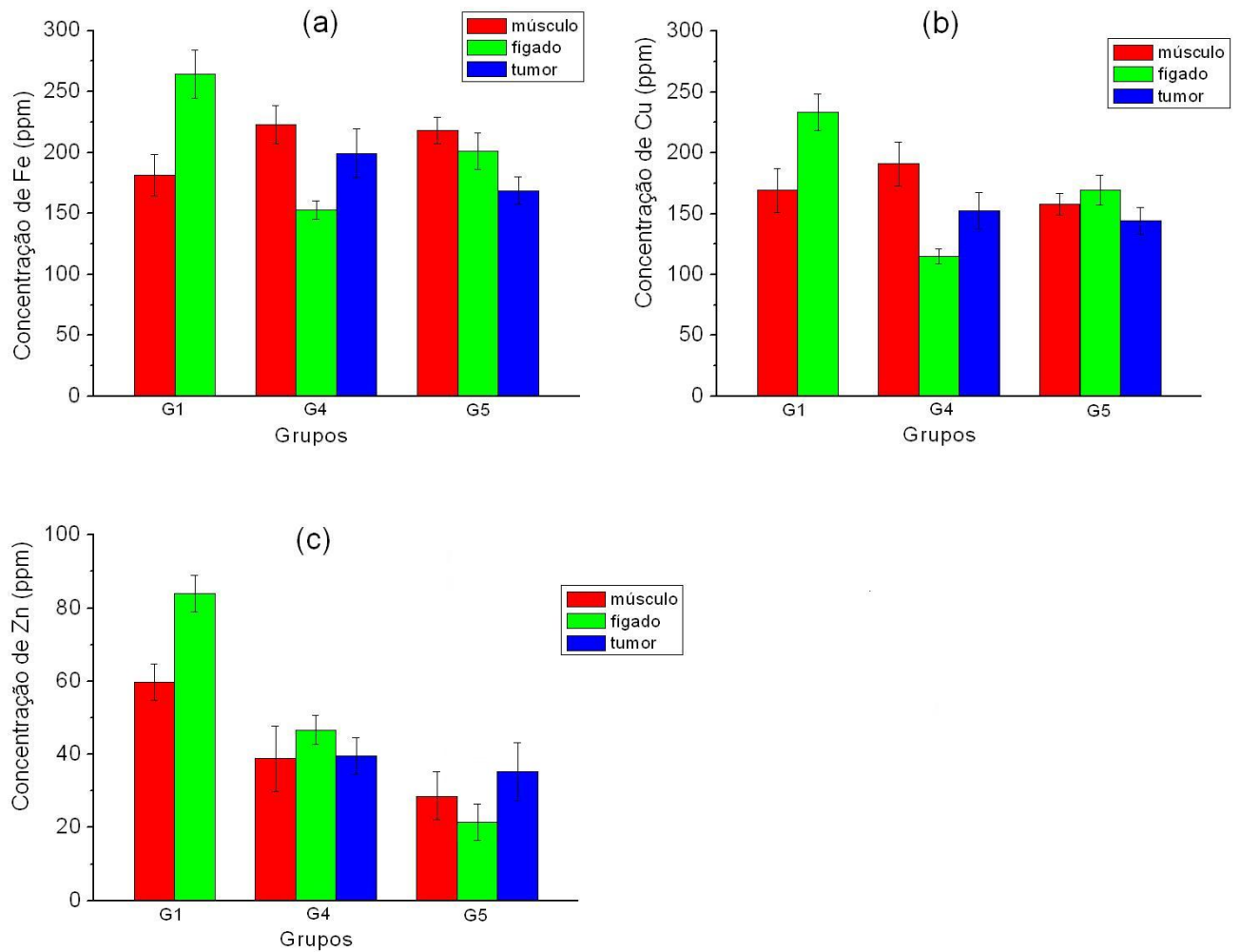


Figura 31 - Concentração de ferro (a), cobre (b) e zinco (c) medida em músculo normal, fígado e tumor por XRF em ratos Wistar.

Na figura 31 (a) o elemento ferro apresenta um decréscimo desse elemento no fígado dos animais com implantes de T. Walker-256 (G4 e G5), o menor valor é para o fígado dos animais sem tratamento (G4). Foi observado um aumento desse elemento nos músculos dos animais com implantes de T. Walker-256 (G4 e G5) em relação ao músculo dos animais controles (G1). G4 apresentou uma maior concentração no tumor em relação ao grupo G5 tratado.

O elemento cobre apresentado na figura 31 (b) segue o padrão do ferro com relação ao fígado e ao músculo. Estatisticamente não ocorre alteração significativa na quantidade desse elemento no tumor tratado e sem tratamento.

O elemento zinco apresentado na figura 31 (c) apresenta a maior concentração no animal sem implante de T. Walker-256 e sem tratamento (G1). Ocorre uma diminuição com relação aos grupos tratados com AG (G4) e com CL (G5).

O efeito de diferentes níveis de ingestão de zinco sobre o crescimento de um tumor de Walker foi estudada pela primeira vez por McQuitty (1970), através da implantação intramuscular de T. Walker em ratos mantidos em laboratório com uma dieta sintética deficiente em zinco. Os grupos que possuíam implantes de T. Walker e tiveram uma dieta rica em zinco apresentaram sobrevivência máxima de 20 dias, o grupo que teve uma dieta sem ingestão de zinco apresentaram sobrevivência maior que 50 dias, quando o experimento foi interrompido. Além da sobrevida observada nesse estudo, foi notada a redução das dimensões do tumor (Figura 32).

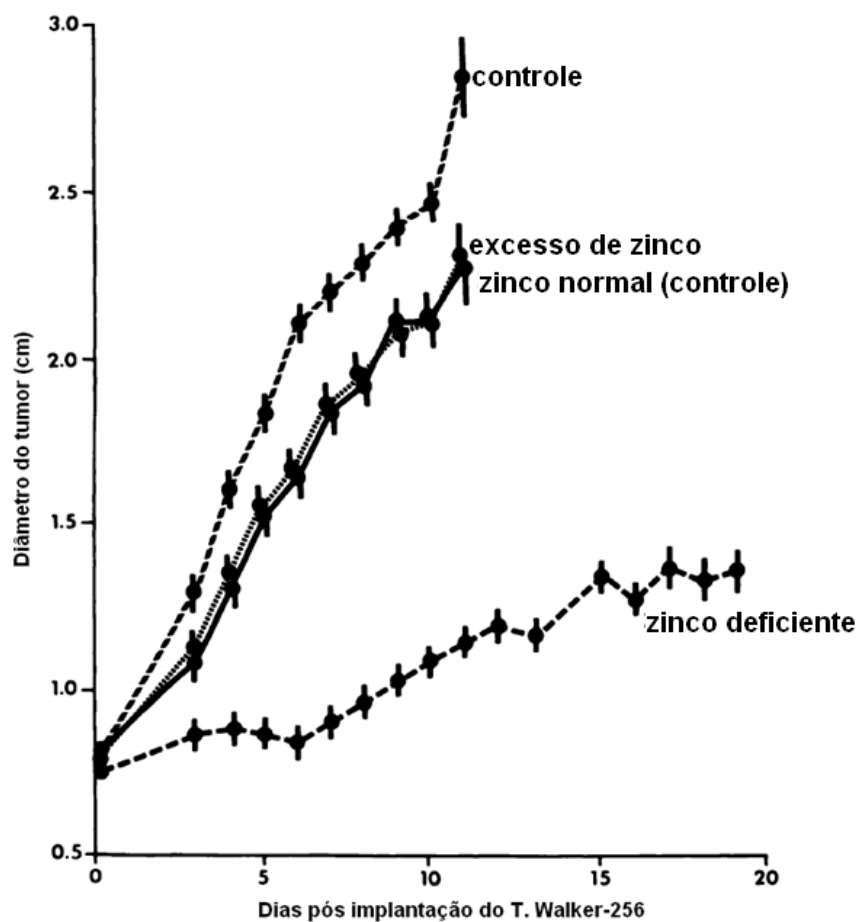


Figura 32 - Diâmetro médio do tumor versus dias pós implantação do T.Walker-256 (MCQUITTY et al, 1970).

O grupo G5 tratado com celecoxibe apresentou o melhor resultado com relação à diminuição de zinco, foi resolvido criar um sub grupo com administração de quantidades diferentes da droga, 50 e 100 mg / kg-dia. Os resultados são apresentados no item

7.5.4 Alterações nos Níveis de Metais Medidos Através da XRF no Organismo de Ratos Wistar com Implantes de T. Walker-256 – Amostras *in natura*.

Na figura 33 foi apresentado os resultados dos grupos G4, G5 e G6 medidos *in natura* no tumor, o grupo G5 apresentado com a variação em concentração de celecoxibe (celebra) em duas versões 50 e 100 mg.

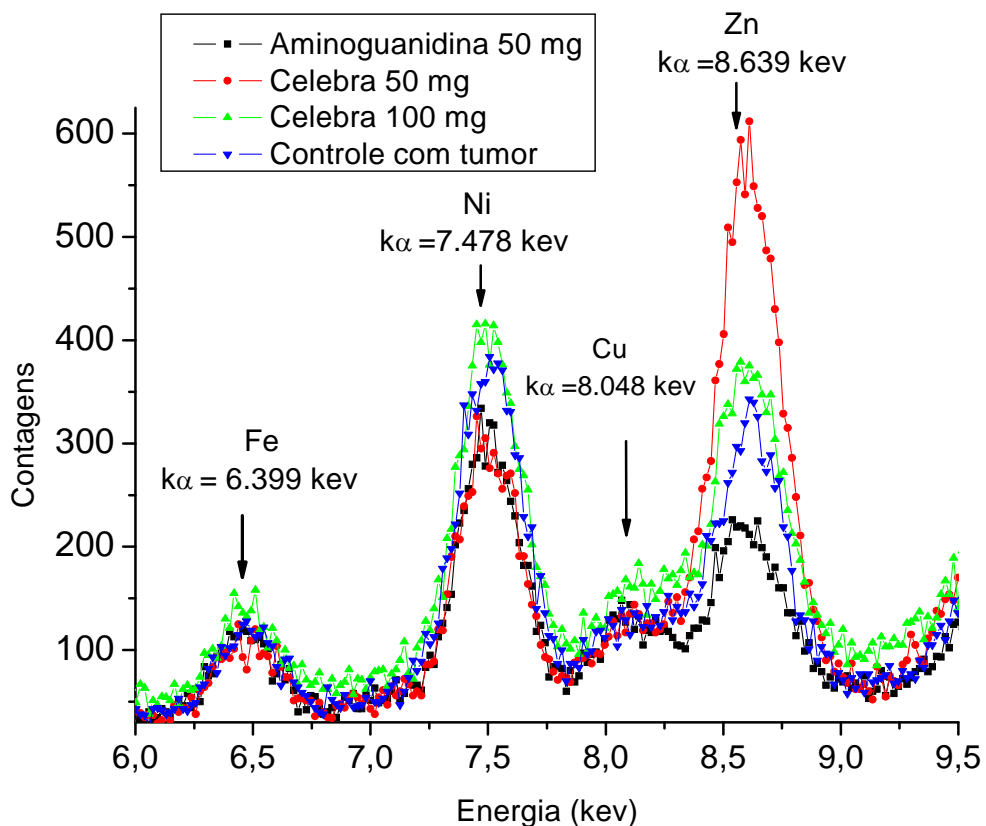


Figura 33 - Variação dos níveis de Fe, Ni, Cu e Zn para os grupos experimentais G4, G5 e G6 medidos por XRF *in natura*.

O grupo G6 foi excluído do protocolo experimental por não apresentar redução da caquexia. O elemento níquel não foi quantificado, pois não apresentou variação significativa nos grupos experimentais. Através da figura 33 foi verificado que as maiores alterações em relação ao grupo não tratado com implante de T. Walker—256 são apresentadas pelo grupo G5 tratados com celecoxibe 50 e/ou 100 mg.

O novo achado comparado com os primeiros resultados no estudo de zinco e T. Walker da década de 70 mostram que o antiinflamatório com melhor resultado, sobre a caquexia e sobrevida, quando tem sua quantidade de administração dobrada no organismo este apresenta uma redução na quantidade de zinco. Confirmando resultados sobre a dieta pobre em zinco e a redução do tamanho do tumor e sua maior sobrevida.

O que ainda não se conhecia é esse efeito do medicamento, além da diminuição do estresse oxidativo, este medicamento reduz a quantidade de zinco no organismo.

Muitas vezes um doente portador de câncer tem em sua dieta complementos alimentares com quantidades significativas de zinco (FERNANDES; MAFRA, 2005), no futuro poderemos demonstrar se essa dieta rica em zinco seria prejudicial ou não ao doente.

8 CONCLUSÕES

A geometria da fonte empregada reduz em 16 % a dose de radiação, como mostram os resultados para as correções de ângulo sólido. A dose de radiação foi inferior a 10 mSv para uma medida de 50 segundos.

As medidas *in vivo* de 50 s apresentaram resultados compatíveis com os necessários para a análise de pele dos grupos experimentais. O LLD das medidas de como um tempo de 50 s foi 13 ppm de Fe, o ajuste linear da curva de sensibilidade apresentou coeficiente de determinação de 0,99.

Através da medida por XRF *in vivo* foi possível demonstrar o comportamento dos níveis de Fe durante o curso da infecção experimental com o *T. cruzi* em dois modelos animais um suscetível e ou resistente.

A infecção experimental mostrou comportamento antagônico nos metabolismos das duas espécies com relação ao elemento Fe. Enquanto os Swiss apresentam um aumento da quantidade de Fe elevando sua parasitemia e esta se manteve elevada, o que é um dos fatores que ocasionaram uma menor sobrevida, os C57BL/6 apresentaram um decréscimo nas quantidades disponíveis de ferro na pele, simultaneamente houve uma diminuição drástica em sua parasitemia. O reflexo desse comportamento pode ser um dos motivos para a sobrevida dos C57BL/6.

Nossos dados sugerem que há uma relação direta entre o aumento de íons ferro na pele e aumento da parasitemia e com a alta susceptibilidade da linhagem Swiss de camundongo ao *T. cruzi*.

De fato, camundongos C57BL/6 (resistentes à infecção) apresentam anemia transitória e sobrevivem ao inóculo de 5000 formas tripomastigotas de *T. cruzi*, utilizado em nossos ensaios (Lalonde e Holbein, 1984; Malvezi *et al*, 2004), esses animais apresentam hipoferrêmia bifásica. A mortalidade desses animais aumentou em 23% quando receberam solução de ferro-dextarm e a depleção de Ferro com o quelante desferrioxamina B ou através de uma dieta pobre em Ferro, provocou a completa proteção dos camundongos C57BL/6 ao inóculo de *T. cruzi*.

Assim sendo, nossos resultados completam os achados de Lalonde e Holbein (1984), mostrando que camundongos susceptíveis apresentam um aumento de Ferro nos primeiros dias de infecção e esse aumento pode explicar a alta letalidade observada após a infecção com *T. cruzi*.

Concluindo, nossos dados sugerem que a hiperferremia que ocorre na fase aguda da infecção no camundongo susceptível potencialmente aumenta a disponibilidade de ferro para o *T. cruzi* e colabora de maneira importante para a patogenicidade do *T. cruzi*.

Sobre o inoculo de células de T. Walker-256, concluiu-se que é possível a medida da variação nos níveis de metais através XRF. É possível a avaliação dos níveis de metais em camundongos portadores de tumor Walker-256.

Os resultados sugerem o envolvimento de alguns elementos traço nos processos enzimáticos no desenvolvimento de tumores. Cu e Zn pertencem ao grupo dos metais antioxidantes e agem nas funções enzimáticas.

Os processos fisiológicos que levam ao acúmulo desses metais nos tumores podem estar relacionadas ao aumento celular e atividade enzimática do tecido afetado e pode afetar também a composição dos tecidos saudáveis nas fronteiras dessas lesões.

Em medidas testes verificamos um aumento estatisticamente significativo para os metais Ca, Fe, Ni, Cu e Zn nos tecidos de pulmão eqüino com câncer em relação aos tecidos normais. Os desvios ficaram abaixo de 12 % com 95 % de confiabilidade. Este resultado sugere o envolvimento da ativação angiogênica, o aumento nos níveis dos metais medidos possivelmente se deve ao aumento da densidade dos vasos sanguíneos no tecido circunvizinho ao tumor, causado pela liberação de produtos químicos mitogênicos do próprio tumor.

Em medidas *in vivo* na pele de animais do grupo controle e com implantes de T. Walker-256 concluiu-se que o grupo G5, que recebeu o tratamento com celecoxibe, manteve estatisticamente o nível de Zn se comparado com grupos sem tratamento. Enquanto os grupos G4 e G5 que receberam solução PBS e aminoguanidina respectivamente apresentaram um decréscimo na quantidade de Zn na pele.

Verificaram-se os efeitos de diferentes níveis de zinco sobre o crescimento de um tumor de Walker, acrescentando informações ao tratamento de T. Walker com antiinflamatórios e completando achados de McQuitty (1970).

Mostrou-se que o antiinflamatório com melhor resultado (CL) sobre a caquexia e sobrevida quando tem sua quantidade de administração dobrada, no organismo das cobaias, este apresenta uma redução na quantidade de zinco. Confirmando resultados sobre a dieta pobre em zinco e a redução do tamanho do tumor e sua maior sobrevida.

Soma-se ao efeito do medicamento celecoxibe, além da diminuição do estresse oxidativo, este medicamento reduz a quantidade de zinco no organismo.

Por fim julga-se que a dieta de portadores cobaias de câncer rica em zinco deve ser estudada, no futuro poderemos demonstrar se essa dieta rica em zinco seria prejudicial ou não ao doente.

GLOSSÁRIO

Aminoguanidina (AG) - Antiinflamatório com capacidade de impedir a formação dos produtos da glicação avançada. Aumenta a densidade do colagénio nas paredes das artérias, reduzir o colesterol LDL, melhorar o estado dos diabéticos e o funcionamento dos rins.

Animais não isogênicos - Animais que não possuem a mesma constituição genética.

Apoptose celular ou necrose - Mecanismo de "auto-destruição celular" que ocorre de forma ordenada e demanda energia para a sua execução. Já a necrose não demanda energia, pois é um processo patológico.

Ativação angiogênica - No caso de angiogênese tumoral, está associada à metástase do carcinoma, um dos fenômenos produzidos por esta associação é o crescimento de uma nova rede de vasos sanguíneos, a qual é denominada angiogênese tumoral.

ATP - Trifosfato de adenosina, adenosina trifosfato ou simplesmente ATP, é um nucleotídeo responsável pelo armazenamento de energia em suas ligações químicas.

Benznidazol - O benznidazol é o único medicamento com ação tripanocida empregado clinicamente no Brasil, com eficácia comprovada em infecções recentes.

Camundongos C57BL/6 - Cepa de "background genético" de camundongos geneticamente modificados para serem utilizados como modelos de doenças humanas. Eles são os camundongos de laboratório mais amplamente utilizado, devido à disponibilidade de cepas Congênicos, criação fácil e robustez, fazendo os controles ideal

Camundongos Swiss suscetíveis a infecção - Derivam de um grupo levados da Suíça para o Estados Unidos por Clara Lynch em 1926. Apresentam alta mortandade quando infectados pelo T. cruzi.

Cardiomegalia - É o crescimento do tamanho do coração em proporções anormais. Esta doença pode ter surgimento com a hipertensão arterial, doenças coronarianas, e geralmente está ligada à doença de chagas

Celecoxibe diariamente (CL) - É um antiinflamatório não esteróide e analgésico pertencente ao grupo de medicamentos denominados inibidores específicos da enzima ciclooxigenase 2 (COX-2). Inibidor das enzimas ciclooxigenase 1 e ciclooxigenase 2

Células *natural killer* - São um tipo de linfócito (glóbulos brancos do sangue), pertencentes ao ramo inato do sistema imunológico. Têm um papel importante no combate a infecções virais e células tumorais.

Citolítica - Destruição ou desagregação celular

Diafanizadas com xilol - É a impregnação de uma peça com um solvente de parafina. O mais usado é o xilol

Drogas antiinflamatórias - Grupo variado de fármacos que têm em comum a capacidade de controlar a inflamação, proporcionar analgesia e de combater a hipertermia

Estresse oxidativo - É uma condição biológica em que ocorre desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a sua desintoxicação através de sistemas biológicos que as removam ou reparem os danos por elas causados.

Fase crônica da doença - Geralmente uma doença que tem uma duração menor que duas semanas é considerada aguda. Mais do que isso é crônica

Forma ascítica - O tumor foi desenvolvido experimentalmente sob a forma sólida, sendo transplantado em animais da mesma espécie. A forma ascítica é aquela desenvolvida no peritônio de animais inoculados com células tumorais

Heparinizado - É a utilização de um agente farmacológico anti-coagulante, para a manutenção de uma via de acesso venoso em situações especiais

Linfonodos - Também conhecidos como gânglios linfáticos, são órgãos que consistem de vários tipos de células e são parte do sistema linfático

Metástases - É a formação de uma nova lesão tumoral a partir de outra, mas sem continuidade entre as duas. Isto implica que as células neoplásicas se desprendem do tumor primário, caminhando através do interstício - ganham assim uma via de disseminação - sendo levadas para um local distante onde formam uma nova colônia neoplásica

Músculo gastrocnêmio - O gastrocnêmio é um músculo que fica na região posterior da perna abaixo dos joelhos e recobre outro músculo chamado Sóleo

Pentabarbital - É um barbitúrico sintético comumente empregado como sedativo, hipnótico e antiespasmódico na forma de seus sais de sódio ou cálcio

Punção cardíaca - É o ato de puncionando o ventrículo direito ou esquerdo com o animal previamente anestesiado

Ratos Wistar albinos - Linhagem de ratos albinos desenvolvida no Instituto Wistar e que se espalhou amplamente para outras instituições, apresenta alta taxa de reprodução e cicatrização e grande adaptabilidade

Sérico - Sérico quer dizer relativo a soro, neste caso sangue

Trypanosoma cruzi - Protozoário flagelado, agente etiológico da doença de Chagas, tripanossomíase americana ou esquizotripanose. A doença foi descoberta em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas

Cepa Y - Constituído por cepas com predomínio de formas delgadas e macrofagotropismo na fase inicial da infecção. Se multiplicam rapidamente, apresentando elevada parasitemia e mortalidade dos camundongos.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and molecular immunology**. 2.ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1994.
- ACCO, A.; SILVA, M. H. R.; BATISTA, M. R.; YAMAMOTO, N.; BRACHT, A. Action of Celecoxib on Hepatic Metabolic Changes Induced by the Walker-256 Tumour in Rats. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v.101, p.294-300, 2007.
- AGÊNCIA Fiocruz de Notícias. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm>>. Acesso em: Junho de 2008.
- AL-GHORABIE, F. H.; NATTO, S. S.; AL-LYHIANI, S. H. A comparison between EGS4 and MCNP computer modeling of an *in vivo* X-ray fluorescence system. **Comput Biol Med.**, v.31, n.2, p.73-83, 2001.
- ALI, P. A.; AL-HUSSANY, A. F.; BENNETT, C. A.; HANCOCK, D. A.; EL-SHARKAWI, A. M. Plane polarized x-ray fluorescence system for the *in vivo* measurement of platinum in head and neck tumours. **Phys Med Biol**, v.43, n.8, p.2337-45, 1998.
- ARANTES, J. M.; PEDROSA, M. L.; MARTINS, H. R.; VELOSO, V. M.; BAHIA, M. T.; TAFURI, W. L.; CARNEIRO, C. M. Trypanosoma cruzi: Treatment with the iron chelator desferrioxamine reduces parasitemia and mortality in experimentally infected mice. **Experimental Parasitology**, v. 24, p. 1/24, 2007.
- ARO, A. C. A.; TODD, A. C.; AMARASIRIWARDENA, C.; HU, H. Improvements in the calibration of 109Cd K X-ray fluorescence systems for measuring bone lead *in vivo*. **Phys. Med. Biol.**, v.39, p.2263-2271, 1994.
- ARO, A.; AMARASIRIWARDENA, C.; LEE, M. L.; KIM, R.; HU H. Validation of K x-ray fluorescence bone lead measurements by inductively coupled plasma mass spectrometry in cadaver legs. **Med Phys.**, v.27, n.1, p.119-23, 2000.
- AHLGREN, L.; LIDÉN, K.; MATTSSON, S.; TEJNING, S. X-ray fluorescence analysis of lead in human skeleton *in vivo*. **Scand J Work Environ Health.**, v.2, n.2, p.82–86, 1976.
- AHLGREN, L.; MATTSSON, S. An X-ray fluorescence technique for *in vivo* determination of lead concentration in a bone matrix. **Phys Med Biol**, v.24, n.1, p.136–145, 1979.
- AHLGREN, L.; CHRISTOFFERSSON, J. O.; MATTSSON, S. *In vivo* determination of cadmium concentration in kidney cortex of occupationally exposed persons by X-ray fluorescence analysis. In: SCHMIDT, H. E. A. **Nuklearmedizin**. Stuttgart: [s.n.], 1980. p.1024-1027.
- AMPTEK. Disponível em: <<http://www.amptek.com>>. Acesso em: maio de 2008
- BACKHUS, L. M.; SIEVERS, E.; LIN, G. Y. Perioperative cyclooxygenase-2 inhibition to reduce tumor cell adhesion and metastatic potential of circulating tumor cells in nonsmall cell lung cancer. **J Thorac Cardiovasc Surg.**, v.132, p.297–303, 2006
- BACON, B. R.; POWELL, L. W.; ADAMS, P. C.; KRESINA, T. F.; HOOFNAGLE, J. H.

Molecular medicine and hemochromatosis: at the crossroads. **Gastroenterology**, v.116, p.193-207, 1999. [Medline].

BERTIN, E. P. **Principles and practice of X-ray spectrometric analysis**. London: Plenum Press, 1975.

BÖRJESSON, J.; MATTSSON, S. Toxicology; *in vivo* x-ray fluorescence for the assessment of heavy metal concentrations in man. Applied radiation and isotopes: including data, instrumentation and methods for use in agriculture, industry and medicine. **Applied Radiation and Isotopes**, v.46, n.6-7, p.571-576, 1995.

BRADLEY, D. A.; FARQUHARSON, M. J. X-ray fluorescence and the in-vivo evaluation of Fe, Cu and Zn in skin. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v.244, n.1, p. 213-7, 2000.

BURCHAM, EM. **Física nuclear**. Barcelona: Reverte, 1974.

CESAREO, R.; HANSON, A. L.; GIGANTE, G. E.; PEDRAZA, L. J.; MAHTABOALLY, S. Q. G. Interaction of keV photons with matter and new applications, **Physics Reports**, v.213, n.3, p. 117-178, 1992.

CHRISTOFFERSSON, J. O.; MATTSSON, S. Polarised X-rays in XRF-analysis for improved *in vivo* detectability of cadmium in man. **Phys Med Biol.**, v.28, n.10, p.1135-44, 1983

CHRISTOFFERSSON, J. O.; AHLGREN, L.; SCHÜTZ, A.; SKERFVING, S.; MATTSSON, S. Decrease of skeletal lead levels in man after end of occupational exposure. **Arch Environ Health** v.41, n.5, p.312–318, 1986.

CHRISTOFFERSSON, J. O.; A SCHÜTZ, L.; AHLGREN, B.; HAEGER-ARONSEN, S.; MATTSSON, S. Lead in finger-bone analysed *in vivo* in active and retired lead workers. **Am J Ind Med.**, v.6, p.447-457, 1984.

CURRIE, L. A. Limits for Qualitative Detection and Quantitative Determination. Application to Radiochemistry. **Analytical Chemistry**, v.40, n.3, p.586-593, 1968.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.97, p.3-24, 2002.

CUNHA e SILVA, R. M.; NASCIMENTO FILHO, V. F.; APPOLONI, C. R. **Publicação técnica – PT 01/04 LFNA UEL - Fluorescência de Raios X por dispersão em energia**. 2004.

ERKKILÄ, J.; ARMSTRONG, R.; RIIHIMÄKI, V.; CHETTLE, D. R.; PAAKKARI, A.; SCOTT, M.; SOMERVILLE, L.; STARCK, J.; KOCK, B.; AITIO, A. *In vivo* measurements of lead in bone at four anatomical sites: long term occupational and consequent endogenous exposure. **Br J Ind Med.**, v.49, n.9, p.631–644, 1992.

ESTEVAM, M.; APPOLONI, C. R.. The *in vivo* use of portable X-ray fluorescence as an alternative technique for the accompaniment of iron levels in patients with iron loading. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.31, n.3, 2009

FARQUHARSONA, M. J.; GERAKIB, K.; FALKENBERGC, G.; LEEKD, R.; HARRISD, A. The localisation and micro-mapping of copper and other trace elements in breast tumours using a synchrotron micro-XRF system. **Appl. Radiat. Isotopes**, v.65, n.2, p.183-188, 2007.

FARQUHARSON, M. J.; BRADLEY, D. A. The feasibility of a sensitive low-dose method for the *in vivo* evaluation of Fe in skin using K-shell x-ray fluorescence (XRF). **Phy. Méd. Biol.**, v.44, p.955-965, 1999.

FELDSINE, P.; ABEYTA, C.; ANDREWS, W. H. AOAC International methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis. **JAOAC Int.**, v.85, n.5, p.1187-200, 2002.

FERNANDES, A. G.; MAFRA, D. **Zinc and cancer**: a review. **Rev.Saúde.Com.** v.1, n.2, p.144-156, 2005.

FRANCISCO, A. F.; VIEIRA, P. M. A.; ARANTES, J. M.; PEDROSA, M. L.; MARTINS, H. R.; SILVA, M.; VELOSO, V. M.; LANA, M.; BAHIA, M. T.; TAFURI, W. L.; CARNEIRO, C. M. Trypanosoma cruzi: effect of Benznidazole therapy combined with the iron chelator Desferrioxamine in mice. **Experimental Parasitology**, v.120, n.4, p.314-319, 2008.

FISCHER, R.; TIEMANN, C. D.; ENGELHARDT, R.; NIELSEN, P.; DURKEN, M.; GABBE, E. E.; JANKA, G. E. Assessment of iron stores in children with transfusion siderosis by biomagnetic liver susceptometry. **Am. J. Hematol.**, v.60, p.289-99. 1999.

GERAKI, K.; FARQUHARSON, M.; BRADLEY, D. A. X-ray fluorescence and energy dispersive X-ray diffraction for the characterisation of breast tissue. **Radiation Physics and Chemistry**, v.71, n.3-4, p.969-970, 2004.

GERAKI, K.; FARQUHARSON, M. J.; BRADLEY, D. A. Concentrations of Fe, Cu and Zn in breast tissue, a synchrotron study. **Phys. Med. Biol.** v.47, n.13, 2327-2339, 2002.

GERHARDSSON, L.; ATTEWELL, R.; CHETTLE, D. R.; ENGLYST, V.; LUNDSTRÖM, N. G.; NORDBERG, G. F.; NYHLIN, H.; SCOTT, M. C.; TODD, A. C. *In vivo* measurements of lead in bone in long-term exposed lead smelter workers. **Arch Environ Health**, v.48, n.3, p.147-156, 1993.

GEORGE, E.; WONG, H. B.; GEORGE, R.; ARRIFIN, W. A. Serum ferritin concentrations in transfusion dependent beta-thalassaemia. **Singapore Méd. J.**, v.48, p.62-4, 1994.

GIGLIO, A. Resistência à quimioterapia: uma revisão para o oncologista. **Rev Soc Bras Cancerol.**, v.14, p.32-8, 2001.

GILMORE, A. M.; HAZLETT, T. L. Govindjee Xanthophyll cycle-dependent quenching of photosystem II chlorophyll a fluorescence: formation of a quenching complex with a short fluorescence lifetime. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.92, n.6, p.2273-2277, 1995.

GOLLNICK, D. A.; GREENFIELD, M. A.. The *in vivo* measurement of the total iodine content of the thyroid gland by x-ray fluorescence. **Radiology**, v.126, p.197-200, 1978

GREEN, S.; BRADLEY, D. A.; PALETHORPE, J. E.; MEARMAN, D. H.; CHETTLE, D. R.; LEWIS, A. D.; MOUNTFORD, P. J.; MORGAN, W. D. Na enhanced sensitivity K-shell x-ray fluorescence technique for tibial lead determination. **Phys. Méd. Biol.**, v.38, p.389-96, 1994.

GORODETSKY, R.; LOWENTHAL, E.; GOLDFAB, A.; RACHMILEWITZ, E. A.

Evaluation of iron load and clearance in patients with beta- thalassemia. **Ann. NY Acad. Sci.**, v.612, p.568-72, 1990.

HAMBIDGE, M. Biomarkers of trace mineral intake status.. **J Nutr.**, v.133, n.3 Suppl, p.948S-55, 2003.

INSTITUTO PASTEUR – FRANÇA. Disponível em: <<http://www.pasteur.fr/>>. Acesso em: nov, 2008.

ITO, K.; MITCHELL, D. C.; GABATA, T.; HANN, H. L.; KIM, P. N.; FUJITA, T.; AWAYA, H.; HONJO, K.; MATSUNAGA, N. Hematocellular carcinoma. Association with increased iron deposition in the cirrhotic liver at MR imaging. **Radiology**, v.212, p.235-40, 1999.

KHUSAINOV, A. K.; ANTONOVA, T. A.; BAHLANOV, S. V.; DERBIN, A. V.; IVANOV, V. V.; LYSENKO, V. V.; MOROZOV, F.; MOURATOV, V. G.; MURATOVA, V. N.; PETUKHOV, Y. A.; PIROGOV, A. M.; POLYTSIA, O. P.; SAVELIEV, V. D.; SOLOVEI, V. A.; YEGOROV, K. A.; ZHUCOV, M. Portable - and X-ray analyzers based on CdTe p-i-n detectors. **Nucl. Instr. and Meth.**, v.428, n.1, p.223-231, 1999.

KAPLAN, I. **Física nuclear**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1963. cap. 15, p. 327-368.

KAZANTZIS, M.; SEELANDER, M. C. L. Cancer cachexia modifies the zonal distribution of lipid metabolism-related proteins in rat liver. **Cell and Tissue Research**, v.321, p.419-427, 2005.

LALONDE, R. C.; HOLBEIN, B. E. Role of iron in Trypanosoma cruzi infection of mice. **J. Clin. Invest.**, v.73, p.470-476, 1984.

LONGONI, A.; FIORINI, C.; LEUTENEGGER, P.; SCIUTI, S.; FRONTEROTTA, G.; STRÜDER, L.; LECHNER, P. A portable XRF spectrometer for non-destructive analyses in archaeometry. **Nucl. Instr. and Meth.**, v.409, p.407-409, 1998.

MALVEZI, A. D.; CECCHINI, R.; SOUZA, F.; TADOKORO, C. E.; RIZZO, L. V.; PINGE-FILHO, P. Involvement of nitric oxide (NO) and TNF- α in the oxidative stress associated with anemia in experimental Trypanosoma cruzi infection. **Immunol. Med. Microbiol.**, v.41, p.69-77, 2004.

MCCALL, K. A.; HUANG, C. C.; FIERKE, C. A. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. **J Nutr.**, v.130, n.5, p.1437S-46, 2000.

MACLEAN, D. S.; ROBERTSON, J. D.; JAY, M.; STALKER, D. J. Noninvasive measurement of protein release from subcutaneous depo formulations *in vivo* using X-ray fluorescence. **J Control Release**, v.34, p.167-73, 1995.

MACLEAN, D. S.; ROBERTSON, J. D.; MOODY, E.; STALKER, D. J.; JAY, M. Secondary X-ray fluorescence for *in vivo* transdermal absorption measurements. **Int J Pharm.**, v.131, p.243-6, 1996.

MCQUITTY, J. T.; DEWYS, W. D.; MONACO, L.; STRAIN, W. H.; ROB, C. G.; APGAR, J.; PORIES, W. J. Inhibition of Tumor Growth by Dietary Zinc Deficiency. **Cancer Res.**, v.30, p.1387-1390, 1970.

MELQUIADES, F. L.; PARREIRA, P. S.; YABE, M. J.; CORAZZA, M. Z.; FUNFAS, R.; APPOLONI, C. R. Factorial design for Fe, Cu, Zn, Se and Pb preconcentration optimization with APDC and analysis with a portable X-Ray fluorescence system. **Talanta** (Oxford), v.73, p.121-126.

MELQUIADES, F. L. **Medida da concentração de metais em água com equipamento portátil de EDXRF**. 2007. 116fls. Tese (Doutorado em Física) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

MICHAELSSON, G.; LJUNGHALL, K.; DANIELSON, B G. 1980. Acta Dermatovener (Stockholm). Vol. 60. p. 295.

MOLIN, L; WESTER, P O. 1973. Acta Dermatovener (Stockholm). Vol. 53 p. 473 e 477.

NASCIMENTO FILHO, V. F.; POBLETE, V. H.; PARREIRA, P. S.; MATSUMOTO, E.; SIMABUCO, S. M.; ESPINOZA, E. P.; NAVARRO, A. A. Limits of detection of a total reflection X-ray fluorescence system with double reflection module. **Biol. Trace Elem. Res.**, v.71-72, n.winter, p.423-430. 1999.

NASCIMENTO FILHO, V. F. **Técnicas analíticas nucleares na pesquisa agropecuária: fluorescência de raios X e ativação neutrônica**. Piracicaba, S.P: Seção Metodologia de Radioisótopos/CENA, 1993.

NIITSU, Y.; TAKAYAMA, T.; MIYANISHI, K. Chemoprevention of colorectal cancer. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v.54, p.S40–3, 2004.

OLIVIERI, N. F.; BRITTENHAM, G. M. Iron chelating therapy and the treatment of thalassemia. **Blood**, v.89, p.739-61, 1997.

O'MEARA, J. M.; CHETTLE, D. R.; MCNEILL, F. E.; WEBBER, C. E. *In vivo* X-ray fluorescence (XRF) measurement of uranium in bone. **Appl Radiat Isot.**, v.49, n.5-6, p.713-5, 1998.

O'MEARA, J. M.; BÖRJESSON, J.; CHETTLE, D. R. Improving the *in vivo* X-ray fluorescence (XRF) measurement of renal mercury. **Appl Radiat Isot.**, v.53, n.4-5, p.639-46. 2000.

O'MEARA, J. M.; BÖRJESSON, J.; CHETTLE, D. R.; MCNEILL, F. E. Optimization of an *in vivo* X-ray fluorescence mercury measurement system. **Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B.**, v.213, p.560-3, 2004.

OMS. Disponível em: < <http://www.who.int/en/>>. Acesso em: mar. 2008.

PARK, K.; YANG, J. H.; CHOI, Y.; LEE, C.; KIM, S. Y.; BYUN, Y. Chemoprevention of 4-NQO-induced oral carcinogenesis by co-administration of all-trans retinoic acid loaded microspheres and celecoxib. **J Control Release**, v.104, n.167–79, 2005.

PEJOVIĆ-MILIĆ, A.; BRITO, J. A.; CHETTLE, D. R. A comparison of possible excitation sources and measurement geometries for strontium X-ray fluorescence measurements in human bone. In: EUROPEAN CONFERENCE ON ENERGY DISPERSIVE X-RAY SPECTROMETRY (EDXRS), June 6-11, Alghero, Italy, 2004

- PIZATO, N.; BONATTO, S.; PICONCELLI, M.; DE SOUZA, L. M.; SASSAKI, G. L.; NALIWAIKO, K.; NUNES, E. A.; CURI, R.; CALDER, P. C.; FERNANDES, L. C. 2006. Fish oil alters T-lymphocyte proliferation and macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. **Nutrition**, v.22, n.4, p.425-32.
- PORTER, J. B. Evaluation of new iron chelators for clinical use. **Acta Haematol.**, v.95, p.13-25, 1996.
- RAO, R. R.; CHATT, A. Preconcentration neutron activation analysis of trace elements in sea water by coprecipitation with 1-(2-thiazolylazo)-2-naphthol, pyrrolidinedithiocarbamate and N-nitroso-phenylhydroxylamine. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v.168, n.2, p. 439-448. 1993.
- RASSI, A.; LUQUETTI, A. O.; RASSI JUNIOR, A.; RASSI, G. G.; SILVA, I. G.; NAVES, H. A. M.; CARVALHO, E. S. D. Tentativa de tratamento da infecção chagásica humana com alopurinol. **Arq. Bras. Card.** 67, (supl 1), Res 560, 1996.
- ROUSSEAU, R. M. Detection limit and estimate of uncertainty of analytical XRF results. **The Rigaku Journal**, v.18, n.2, 2001.
- SALGUEIRO, M. J.; ZUBILLAGA, M. B.; LYSIONEK, A. E., SARABIA, M. I., CARO, R. A.; DE PAOLI, T. 2000. Zinc status and immune system relationship: A review. **Biol Trace Elem Res.**, v.76, n.3, p.193-205.
- SEELAENDER, M. C. L.; AMBRICO, C.; RODRIGUES, M. C. P. S.; BOECK-HAEBISCH, E. M.; CURI, R. 1996. **Cancer Res. Therapy Control**, v. 5, p. 29-33, 1996.
- SHAKESHAFT, J.; LILLICRAP, S. C. Technical note: an X-ray fluorescence system for the determination of gold *in vivo* following chrysotherapy. **Br J Radiol.**, v.66, n.788, p.714-7, 1993.
- SHEKIN, J.; GORODETSKY, E; LOEWINGER, A; WEINREB. 1986. **Dematologica**. Vol. 162.
- SHUKRI, A; GREEN, S e BRADLEY, DA. A feasibility study: *in vivo* x-ray fluorescence of iron using 109Cd. **Appl. Radiat. Isto**, v.46, p.625, 1995.
- SMITH, K. L.; TISDALE, M. J. Mechanism of muscle protein degradation in cancer cachexia induced by colon 26 adenocarcinoma are not fully ascribable to interleukin-6. **Int. J. Cancer**, v.62, p.332, 1993.
- SOMERVAILLE, L. J.; CHETTLE, D. R.; SCOTT, M. C.; TENNANT, D. R.; MCKIERNAN, M. J.; SKILBECK, A.; TRETOWAN, W. N. 1998. Copyright notice *In vivo* tibia lead measurements as an index of cumulative exposure in occupationally exposed subjects. **Br J Ind Med.**, v.45, n.3, p.174-181, 1998
- TRULLOLS, E.; RUISÁNCHEZ, I.; RIUS, F. Validation of qualitative analytical methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v.23, n.2. 2004.
- TURNER, J. E. Atoms, **Radiation, and Radiation Protection**. 2.ed. New York. J. Wiley & Sons, INC, 1995. cap. 1, p. 2-11.
- TURNER, J. E. Atoms, **Radiation, and Radiation Protection**. 2.ed. New York. J. Wiley &

Sons, INC, 1995. cap. 3, p.63-77.

TURNER, J. E. Atoms, **Radiation, and Radiation Protection**. 2.ed. New York. J. Wiley & Sons, INC, 1995. cap. 4, p. 82-87.

TURNER, J. E. Atoms, **Radiation, and Radiation Protection**. 2.ed. New York. J. Wiley & Sons, INC, 1995. cap. 8, p. 170-199.

TURNER, J. E. Atoms, **Radiation, and Radiation Protection**. 2.ed. New York. J. Wiley & Sons, INC, 1995. cap. 12 p. 366-373.

VANDECASTEELE, C.; BLOCK, C. B. **Modern methods for trace elements determination**. New York: John Willey & Sons, 1995.

VAN GRIEKEN, R. E.; MARKOWICZ, A. A. **Handbook of X-ray spectrometry**. 2.ed. New York: Marcel Dekker Inc, 2002.

WENGER, F. A.; KILIAN, M.; BISEVAC, M. Effects of Celebrex and Zylflo on liver metastasis and lipid peroxidation in pancreatic cancer in Syrian hamsters. **Clin Exp Metastasis**, v.19, p.681-7, 2002.

WILSON, M. E.; BRITIGAN, B. E. The interesting review: more on iron acquisition by parasitic protozoa. **Letters Parasitology Today**, v.15, n.5, 1999.

ZAMBURLINI, M.; PEJOVIĆ-MILIĆ, A.; CHETTLE, D. R. Evaluation of Geometries Appropriate for I-125 *in vivo* bone strontium X-ray Fluorescence Measurement. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v.269, n.3, p.625-629, 2006.

WIELOPOLSKI, L.; ROSEN, J. F.; SLATKIN, D. N.; ZHANG, R.; KALEF-EZRA, J. A.; ROTHMAN, J. C.; MARYANSKI, M.; JENKS, S. T. *In vivo* measurement of cortical bone lead using polarised x-rays. **Med Phys**, v.16, p.521-528, 1989.

WIELOPOLSKI, L.; ROSEN, J. F.; SLATKIN, D. N.; VARTSKY, D.; ELLIS, K. J.; COHN, S. H. Feasibility of noninvasive analysis of lead in the human tibia by soft X-ray fluorescence. **Med Phys**, v.10, p.248-251, 1983.