



Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia
Programa de Pós - Graduação em Física

Joel Félix Silva Diniz Filho

**ANÁLISE VIBRACIONAL E ULTRAESTRUTURAL DE
CÉLULAS E TECIDOS CANCERÍGENOS**

São Luís

2024

Joel Félix Silva Diniz Filho

**ANÁLISE VIBRACIONAL E ULTRAESTRUTURAL DE CÉLULAS E
TECIDOS CANCERÍGENOS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Maranhão como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Física.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Magalhães Rebelo Alencar

Co-Orientador: Prof. Dr. Clenilton Costa dos Santos

São Luís

2024

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UFMA / BIBLIOTECA

S237

DINIZ FILHO, J. F. S.

ANÁLISE VIBRACIONAL E ULTRAESTRUTURAL DE CÉ-
LULAS E TECIDOS CANCERÍGENOS. / Joel Félix Silva Diniz
Filho. – 2024.

142 f.

Orientadora: Luciana Magalhães Rebelo Alencar;

Co-Orientador: Clenilton Costa dos Santos

Tese de Doutorado - Pós Graduação em Física - Universi-
dade Federal do Maranhão.

Texto a ser informado pela biblioteca

CDU 621:528.8

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Joel Félix Silva Diniz Filho

**ANÁLISE VIBRACIONAL E ULTRAESTRUTURAL DE CÉLULAS E
TECIDOS CANCERÍGENOS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Maranhão como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Física.

Aprovado em: / /

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Luciana Magalhães Rebelo Alencar (Presidente)
Universidade Federal do Maranhão (Campus Dom Delgado)

Prof. Dr. Clenilton Costa dos Santos (Interno)
Universidade Federal do Maranhão (Campus Dom Delgado)

Prof. Dr. Diego Augusto Batista Barbosa (Interno)
Universidade Federal do Maranhão (Campus Dom Delgado)

Prof. Dr. Pedro Filho Noronha de Souza (Externo)
Universidade Federal Ceará (Fortaleza/ CE)

Prof. Dr. Ralph Santos-Oliveira (Externo)
Universidade Estadual do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro/ RJ)

São Luís

2024

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Joel Félix e Ana Paula,
por serem muito mais que apenas pais,
mas sim educadores da vida.*

“Se a força me faltar no braço, na coragem me sustento.”

(Calixto Antônio Ochoa Campo)

AGRADECIMENTO

Agradeço profundamente a Deus, a quem devo minha vida e tudo o que tenho, assim como a todas as pessoas preciosas que estão ao meu redor. Com Ele, encontrei a força e a coragem necessárias para percorrer esta jornada. Agradeço por Sua constante iluminação, orientação e bênçãos que permeiam cada minuto da minha vida. Tenho plena consciência de que todas as dificuldades enfrentadas foram oportunidades de crescimento e evolução.

Expresso minha sincera gratidão à minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Luciana Magalhães Rebelo Alencar, que sempre acreditou em meu potencial e se mostrou disponível para me auxiliar em todas as etapas deste trabalho e minha jornada como pesquisador. Seu conhecimento e experiência foram fundamentais para o desenvolvimento deste projeto. Além disso, sou grato pela sua paciência e dedicação em me ajudar a superar os desafios encontrados ao longo do caminho.

Quero expressar minha sincera gratidão ao Prof. Dr. Clenilton Costa dos Santos, cuja fé em meu potencial e constante disposição para oferecer orientação têm sido fundamentais para o meu desenvolvimento acadêmico.

Ao Prof. Dr. Ralph Santos-Oliveira e ao Prof. Dr. Gyl Eanes Barros Silva, manifesto minha profunda gratidão pela valiosa ajuda e apoio fornecidos ao longo deste trabalho.

Às pessoas mais importantes da minha vida, meus pais, Joel Félix Silva Diniz e Ana Paula dos Santos Paiva, que desde o meu nascimento me amaram de forma incondicional, me ensinando a ser uma pessoa melhor a cada dia. Como excelentes professores, mostraram-me que educação e dignidade me levariam longe. O amor que sinto por vocês é imensurável e inexplicável. Agradeço por nunca desistirem dos meus sonhos, por abraçá-los e lutar incansavelmente ao meu lado para torná-los realidade. Tenho a certeza de que, sem todo o esforço e amor que dedicaram a mim, nada disso teria sentido.

Às minhas irmãs, Carol e Magda, pelo incentivo constante, pelas risadas compartilhadas, pelo apoio incondicional e pela compreensão.

À minha querida vizinha Laide (*in Memoriam*), e ao meu vô Chico (*in Memoriam*), pois amaram cada um dos cinco netos, foram essenciais na minha educação. À minha avó

Pretinha, que sente um orgulho imenso de mim.

A todos os meus familiares, Maria Madalena, Marcos, Puluca, Marli, Teresa, Marival, Valbinho, Assis, Salles, Chiquinho (*in Memoriam*), Raquel, Diniz, Alda, Cinaura, Aldenora e Aldenir, assim como aos primos e primas, agradeço por trazerem alegria aos meus dias, tornando esta jornada mais fácil. Obrigado por tudo!

Agradeço aos meus amigos do Laboratório de Biofísica e Nanossistemas, Beatriz Batista, Maria Socorro, Alefe Rogers, Erick Rates e Carol Muniz, pelos dias de trabalho árduo e momentos de alegria que compartilhamos, pelo apoio constante e pela colaboração.

Aos colegas do Laboratório de Imunofluorescência e Microscopia Eletrônica, Augusto, Bruna e Victor, pelo suporte dado neste trabalho.

Quero expressar minha gratidão a minha amiga de jornada, Ruana Lima, que desempenhou um papel fundamental, oferecendo suporte inestimável, amizade e compartilhando experiências em tempos tão desafiadores.

Aos meus amigos, Virna, João Luís, Rayanne, Priscila, Arthur, Charles, Joelson Reis, Josias, Pedro Sobrinho, Jonilson Ribeiro, Ulli, Jerdson, Barbara Ruth, Tarantini, Daniel Lima, Matheus Costa e Isaac, que compartilharam comigo momentos de alegria e superação. Sou profundamente grato pela amizade de vocês.

Ao Programa de Pós-Graduação em Física, pelo papel fundamental na formação de pesquisadores no nosso país.

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram indiretamente para a conclusão deste trabalho.

Por fim, expresso minha gratidão às agências de fomento à pesquisa que forneceram apoio financeiro FAPEMA, CNPq e CAPES. Seu suporte foi crucial para o desenvolvimento deste estudo.

RESUMO

A disseminação e o impacto do câncer têm se intensificado nas últimas décadas, tornando-se uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. As dificuldades em detectar precocemente a patologia muitas vezes resultam em diagnósticos tardios, limitando as opções de tratamento e aumentando a carga global da doença. Inovações técnicas e científicas contínuas têm o potencial de aprofundar nosso entendimento sobre a incidência do câncer. Este trabalho é dividido em duas partes: *(i)* avaliar os efeitos biológicos da radiação alfa utilizados na radioterapia do câncer de mama (tipo de câncer que mais acomete mulheres e uma das principais causas de morte em todo o mundo), particularmente [^{223}Ra] RaCl_2 , em células cancerígenas da linhagem celular MDA-MB-231 por meio da utilização de Microscopia de Força Atômica (AFM) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) combinadas com espectroscopia Raman (ER) é crucial para compreender o impacto destes tratamentos no tecido tumoral e nas células saudáveis circundantes, e pode ajudar a identificar as melhores opções de tratamento. Os resultados mostraram destruição maciça da membrana celular com preservação da membrana nuclear. Nenhuma evidência de alteração do DNA foi observada. Os dados demonstraram a formação de lisossomos e fagossomas. Os dados fornecidos podem ajudar a elucidar o principal mecanismo envolvido na morte celular durante a terapia com partículas α ; e, *(ii)* explorar as propriedades ultraestruturais e vibracionais de tecidos de câncer de pênis usando AFM e ER. O câncer de pênis é uma doença rara, prevalente em países de baixo e médio desenvolvimento, com taxas de morbidade e mortalidade significativas. Os resultados revelam que as propriedades ultraestruturais e vibracionais sofrem alterações nos dois subtipos estudados em relação ao tecido controle, e também entre eles, trazendo novas perspectivas para o entendimento dessa patologia. Este trabalho resultou na descrição biomolecular e nas assinaturas ultraestruturais e vibracionais de tipos de câncer, que, futuramente, poderão auxiliar na determinação de uma descrição biofísica mais precisa e no monitoramento desta patologia.

Palavras-chave: Câncer. Diagnóstico. Tratamento. Radiação Alfa. Microscopia de Força Atômica. Espectroscopia Raman. Câncer de Mama. Câncer de Pênis. Monitoramento.

ABSTRACT

The dissemination and impact of cancer have intensified in recent decades, becoming one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide. Difficulties in detecting the pathology early often result in late diagnoses, limiting treatment options and increasing the global burden of the disease. Continuous technical and scientific innovations can potentially deepen our understanding of cancer incidence. This work is divided into two parts: *(i)* evaluating the biological effects of alpha radiation used in breast cancer radiotherapy (the type of cancer that most affects women and one of the leading causes of death worldwide), particularly [^{223}Ra] RaCl_2 , in cancer cells of the MDA-MB-231 cell line using Atomic Force Microscopy (AFM) and Transmission Electron Microscopy (TEM) combined with Raman spectroscopy (ER) is crucial to understanding the impact of these treatments on tumor tissue and surrounding healthy cells and may help identify the best treatment options. The results showed massive destruction of the cell membrane with preservation of the nuclear membrane. No evidence of DNA alteration was observed. The data demonstrated the formation of lysosomes and phagosomes. The provided data can help elucidate the main mechanism involved in cell death during therapy with alpha particles and *(ii)* explore the ultrastructural and vibrational properties of penile cancer tissues using AFM and ER. Penile cancer is a rare disease, prevalent in low and middle-income countries, with significant morbidity and mortality rates. The results reveal that the ultrastructural and vibrational properties change the two subtypes studied compared to the control tissue and between them, bringing new perspectives to the understanding of this pathology. This work has resulted in the biomolecular description and ultrastructural and vibrational signatures of cancer types, which may assist in determining a more precise biophysical description and monitoring of this pathology.

Keywords: Cancer. Diagnosis. Treatment. alpha radiation. Atomic Force Microscopy. Raman Spectroscopy. Breast Cancer. Penile Cancer. Monitoring.

LISTA DE SIGLAS

ACO - Altos Comprimentos de Onda
AFM - Microscopia de Força Atômica
ATP - Trifosfato de Adenosina
BCO - Baixos Comprimentos de Onda
CAMa - Câncer de Mama
CAPe - Câncer de Pênis
CEC - Carcinomas de Células Escamosas
CEP - Comitê de Ética em Pesquisa
CNS - Conselho Nacional de Saúde
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
ER - Espectroscopia Raman
HPV - Papilomavírus Humano
HUUFMA - Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão
IARC - Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
INCA - Instituto Nacional de Câncer
LET - Transferência Linear de Energia
LIME - Laboratório de Imunofluorescência e Microscopia Eletrônica
MEC - Matriz Extracelular
OMS - Organização Mundial da Saúde
OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde
PCA - Análise de Componente Principal
 R_q - Rugosidade
TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEM - Microscopia Eletrônica de Transmissão

LISTA DE FIGURAS

- 3.1 Mapas topográficos AFM da ultraestrutura de células MDA-MB-231 tratadas e não tratadas com $[^{223}\text{Ra}] \text{RaCl}_2$. Figura 3.1A: mapa de $30 \times 30 \mu\text{m}$ de células não tratadas e Figura 3.1F tratadas com $[^{223}\text{Ra}] \text{RaCl}_2$. Os quadrados representam as regiões onde foram realizado o zoom para analisar a ultraestrutura da membrana: as áreas mais altas da célula (corpo celular). As Figura 3.1B-E e Figura 3.1G-J mostram, respectivamente, um zoom de $1 \times 1 \mu\text{m}$ da membrana de células não tratadas e tratadas com $[^{223}\text{Ra}] \text{RaCl}_2$. As setas azuis nas Figura 3.1G-J destacam possíveis danos à membrana devido à sua interação com a radiação α 36
- 3.2 Dados quantitativos sobre propriedades ultraestruturais e nanomecânicas da membrana celular. Figura 3.2A: rugosidade quadrada média entre amostras não tratadas e tratadas ($2,1 \pm 0,3 \times 10^1 \text{ nm}$ e $(1,2 \pm 0,1) \times 10^1 \text{ nm}$ respectivamente); Figura 3.2B: contagem de vales $(1,1 \pm 0,2) \times 10^2$ e $(1,9 \pm 0,2) \times 10^2$, grupo controle e tratado respectivamente); Figura 3.2C: Adesão à superfície da membrana ($9,4 \pm 0,1 \text{ nN}$ e $7,7 \pm 0,1 \text{ nN (SD)}$); Figura 3.2D: Rigidez da membrana ($1,9 \pm 0,4 \text{ N/m}$ e $0,8 \pm 0,6 \text{ N/m (SD)}$).
* $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle. 37
- 3.3 Visão geral da microscopia eletrônica de transmissão de células derivadas de tumores de mama. Aspectos ultraestruturais de células MDA-MB-231 não expostas (a) e expostas a $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$. (b). Observa-se que em ambas as situações o conteúdo do aspecto nuclear é semelhante. Não há evidência de aumento da heterocromatina após a radiação. 39

3.4	Análise ultraestrutural de células derivadas de tumor de mama não expostas a $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$. É possível observar citoplasma preservado (a-d), mitocôndrias (setas), retículo endoplasmático (ponta de seta) e complexo de Golgi (G); núcleo (N); nucléolos (Nu).	40
3.5	Análise ultraestrutural de células derivadas de tumor de mama expostas a $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$. É possível observar um núcleo muito regular e preservado (a - d). Número aumentado de retículo endoplasmático (retângulos com linhas contínuas) (b) e de mitocôndrias (retângulos com linhas tracejadas) (c). Observa-se a presença de membrana ao redor do auto-fagossomo (setas). núcleo (N); nucléolos (Nu); mitocôndrias (M); retículo endoplasmático (RE); lisossomo (L).	41
3.6	Análise quantitativa do fenótipo de autofagia em células de CAMa após exposição ao $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$. Trinta campos aleatórios foram contados usando microscopia eletrônica de transmissão em células expostas e não expostas ao sal de Rádio. Há um aumento das características autofágicas nas células tratadas.	42
3.7	Espectroscopia Raman. (A) Espectro médio de células MDA-MB-231 tratadas e não tratadas com $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$. (B) Análise de PCA mostrando a diferenciação entre os grupos com variância total de 83,4%	43
4.1	Corte histológico dos tecidos do grupo controle e dos portadores de CAPE, corados com Hematoxilina e Eosina (H&E). (A): Controle; (B): basalóide e; (C): sarcomatóide.	49
4.2	Mapas de Microscopia de Força Atômica. Mapas topográficos de 25 x 25 μm da ultraestrutura dos tecidos do grupo controle (não tumorigênicos) (A) e daqueles provenientes de tumores de CAPE: basalóide (B) e sarcomatóide (C) e suas respectivas representações tridimensionais (D-F).	55
4.3	CAPE Superfície porosa. Mapas topográficos de AFM da ultraestrutura de tecidos de tumores basalóides (A) e sarcomatóides (B). As setas apontam para os buracos observados nos cortes micrométricos de tumores em cada subtipo de câncer. Círculos pontilhados delimitam os buracos representativos em cada tipo de tumor.	57

4.4	Dados quantitativos de AFM. Dados quantitativos de propriedades ultra-estruturais de tecidos do grupo controle, não tumorigênicos, e de pacientes com CAPE. (A) Rugosidade, (B) Área de Superfície do tecido, (C) Volume e (D) Gráficos de Dispersão de Deformação. O (*) indica diferenças significativas no teste ANOVA com Turkey para $p < 0,05$	60
4.5	Identificação vibracional. Espectros médios e identificação dos modos relacionados ao grupo controle (Preto); grupo sarcomatóide (vermelho) e; grupo basalóide (azul).	63
4.6	Análise de PCA dos grupo controle com os tecidos sarcomatóide e basalóide. (4.6A) controle x sarcomatóide em BCO; (4.6B) controle x sarcomatóide em ACO; (4.6C) controle x basalóide em BCO; (4.6D) controle x basalóide em ACO (4.6E) sarcomatóide x basalóide em BCO e; (4.6F) sarcomatóide x basalóide em ACO.	69
A.1	Esquema de funcionamento do Microscópio de Força Atômica.	73
A.2	Esquema representando o menisco de água formado entre uma esfera de raio R e uma superfície plana.	78
A.3	Típica curva de força produzida por um Microscópio de Força Atômica. Para cada parte da curva de aproximação e de retração está representando o movimento da sonda.	83
A.4	Diagrama esquemático do feixe de elétrons em um microscópio TEM convencional. Adaptado de TEM (2023)	87
A.5	Em (a), espalhamento elástico (ou Rayleigh) e, em (b), espalhamento inelástico (ou Raman).	90
A.6	Representação gráfica das linhas de espectroscopia devido aos espalhamentos Rayleigh e Raman.	91
A.7	Representação da organização dos dados em métodos de análise exploratória. Fonte: Imagem elaborada pelo autor (2023).	94
A.8	Representação gráfica da decomposição da matriz X no modelo PCA, sendo X é a matriz de dados com m linhas (amostras) por n colunas (números de onda), T é a matriz de <i>scores</i> , P é a matriz de <i>loadings</i> e E é a matriz de resíduos. Fonte: Imagem elaborada pelo autor (2023).	95

LISTA DE TABELAS

4.1	Atribuições de cada modo do espectro Raman do tecido [Dodo <i>et al.</i> (2022); Talari <i>et al.</i> (2015)].	65
-----	--	----

SUMÁRIO

1	Introdução	17
2	Revisão Bibliográfica	20
2.1	Neoplasia Maligna - Câncer	20
2.1.1	Câncer de Mama - CAMa	23
2.1.2	Câncer de Pênis - CAPE	24
2.2	Investigação Multimodal de Propriedades Ultraestruturais, Mecânicas e Vibracionais em Células e Tecidos Cancerígenos	25
I	ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DE CÉLULAS CANCERÍGENAS TRATADAS COM DICLORETO DE RÁDIO	
	[²²³Ra] RaCl₂	28
3		29
3.1	Introdução	29
3.2	Materiais e Métodos	31
3.2.1	Cultura de Células Mamárias	31
3.2.2	Protocolo de Exposição a [²²³ Ra] RaCl ₂ para Análise de AFM	31
3.2.3	Análise de Células por AFM	32
3.2.3.1	Análise de Rugosidade	32
3.2.3.2	Análise Nanomecânica	33
3.2.3.3	Análise de Dados Estatísticos AFM	33
3.2.4	Protocolo de Exposição a [²²³ Ra] RaCl ₂ para Análise por TEM	33
3.2.5	Análise de ER	34
3.2.5.1	Pré-Processamento Espectral	34

3.2.6	Análise de Componentes Principais - PCA	34
3.3	Resultados e Discussões	35
3.4	Conclusão	45
II	ESTUDO AVANÇADO DO CÂNCER DE PÊNIS: FOCO NAS ALTERAÇÕES BIOFÍSICAS E NA INFLUÊNCIA DO VÍRUS HPV	47
4		48
4.1	Introdução	48
4.2	Materiais e Métodos	51
4.2.1	Seleção dos Tecidos	51
4.2.2	Critério de Inclusão e Exclusão	51
4.2.3	Coleta de Tecido	51
4.2.4	Deteção e Genotipagem de HPV	52
4.2.5	Preparação do Tecido	52
4.2.6	Configuração do AFM	53
4.2.7	Análise Ultraestrutural	53
4.2.8	Análise por ER	53
4.2.8.1	Pré-Processamento Espectral	54
4.2.9	Análise de Componentes Principais - PCA	54
4.2.10	Análise Estatística	55
4.3	Resultados e Discussões	55
4.4	Conclusão	66
5	Conclusões e Perspectivas	70
A	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	72
A.1	Conceito Básicos de Microscopia de Força Atômica	72
A.1.1	Forças de Interação Sonda-Amostra	74
A.1.1.1	Forças de Van der Walls	74
A.1.1.2	Força de Capilaridade	77
A.1.1.3	Força de Adesão	78

	16
A.1.2 Modos de operação do AFM	81
A.1.3 Espectroscopia de Força	82
A.1.4 <i>PeakForce Quantitative NanoMechanics</i>	86
A.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão - TEM	86
A.3 Espectroscopia Vibracional Raman	89
A.4 Análise Multivariada	93
A.4.1 Análise de Componente Principal - PCA	95
B ARTIGOS PUBLICADOS E PRÊMIOS	97
C PARECER CONSUBSTÂNCIADO DO CEP	103
D GLOSSÁRIO	116
REFERÊNCIAS	120

Capítulo 1

Introdução

Segundo relatório divulgado em outubro de 2020 pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é a segunda causa de morte no mundo e é responsável por cerca de 10 milhões de óbitos por ano [OPAS (2020)]. O relatório foi divulgado em fevereiro de 2021 pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC). Ele incluiu estimativas das taxas de incidência e mortalidade de câncer em todo o mundo, bem como projeções para o ano de 2040, que apresentou um aumento de 2 milhões de mortes a cada cinco anos. Aproximadamente 30% de todos os tumores malignos registrados no Brasil são cânceres de pele não melanoma, segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA) [INCA (2022)], que utiliza o Registro de Câncer do Sistema de Informações sobre Mortalidade do Ministério da Saúde como seu fundamento.

Embora existam inúmeros estudos dedicados ao entendimento dos diversos tipos de câncer, o seu diagnóstico ainda representa um dos maiores desafios no campo da medicina [Ahrensberg *et al.* (2013); Cazap *et al.* (2016)]. Os principais desafios no diagnóstico do câncer estão relacionados à infraestrutura inadequada, à pouca eficácia de algumas técnicas de diagnóstico e à falta de qualificação profissional [Aden *et al.* (2022)].

Uma ou mais técnicas, incluindo tomografia computadorizada, radiografia, ressonância magnética, mamografia, densitometria óssea, ultrassonografia, entre outras, que variam dependendo de cada caso, são utilizadas no diagnóstico do câncer [Hussain *et al.* (2022)]. Para confirmar o diagnóstico, no entanto, geralmente é realizado um procedimento conhecido como biópsia [Nat (2021)]. Durante este procedimento, uma parte do tumor é removida por meio de cirurgia ou incisão, que é examinada ao microscópio para identificar qualquer célula cancerígena ou benigna presente na amostra, bem como outras

informações significativas que possam ter impacto na estratégia de tratamento proposta.

O desenvolvimento de novas técnicas e tecnologias que reduzam a exposição à radiação, o trauma psicológico e físico e resultem em uma melhoria notável nas ferramentas e componentes de diagnóstico do câncer é extremamente importante. Como resultado, algumas técnicas experimentais fizeram contribuições notáveis nos campos da química, biologia e física [Auner *et al.* (2018); Beton-Mysur *et al.* (2024); Plante (2021)].

Uma das técnicas analíticas mais significativas atualmente disponíveis é a Espectroscopia Raman (ER), que se destaca por sua versatilidade, velocidade e natureza não destrutiva. Essa técnica é essencial para uso em diagnóstico e está relacionada às transições rotacionais e vibratórias de moléculas que resultam da interação do material com a radiação monocromática [Chaichi *et al.* (2018); Jermyn *et al.* (2016)]. Isso é crucial para identificar ou classificar a composição química de tecidos e células, porque pode detectar os estados vibracionais fundamentais de biomoléculas e, ao fazê-lo, permitir uma abordagem não destrutiva. A Microscopia de Força Atômica, também conhecida como AFM, é outra técnica analítica promissora para a classificação de células e tecidos tumorais. Sua capacidade de realizar pesquisas sem causar danos a tornou uma ferramenta importante na caracterização de amostras biológicas, como células e tecidos [Nanobiotechnol *et al.* (2018)]. O AFM pode identificar variações nas forças de interação entre os átomos da superfície da amostra e da sonda ao escanear a superfície do material analisado. Esses detalhes são essenciais para identificar e caracterizar a ultraestrutura tridimensional, devido a alta resolução da técnica, e propriedades físicas, tais como forças de adesão, rigidez e dissipação de energia dos tecidos e células. [Vahabi *et al.* (2013)].

Outra técnica muito utilizada para estudar em nível celular e subcelular é a microscopia eletrônica de transmissão (TEM), que permite imagens detalhadas das estruturas celulares [Sciences (2021)]. É essencial para o estudo do câncer, fornecendo informações valiosas sobre as características das células envolvidas na formação e progressão do doença. O TEM permite a visualização de alta resolução da morfologia celular, permitindo a observação de anomalias na forma e tamanho das células, bem como a presença de características distintas associadas a diferentes tipos de câncer [King (2007)]. Também permite a observação detalhada de organelas celulares, revelando alterações em estruturas subcelulares relacionadas à malignidade [Graham & Orenstein (2007)]. Por exemplo, a análise de mitocôndrias e retículo endoplasmático pode fornecer informações cruciais

sobre bioenergia celular e estresse em células cancerígenas.

É importante observar que, apesar de técnicas avançadas como ER, AFM e TEM se mostrarem promissoras no diagnóstico de câncer, sua aplicação ainda é bastante limitada. A pesquisa contínua e a aplicação integrada dessas técnicas podem desempenhar um papel crucial no avanço do conhecimento do câncer, fornecendo estratégias complementares para detecção precoce, compreensão da patogênese e desenvolvimento de tratamentos mais eficazes.

Neste estudo, empreende-se a exploração das propriedades ultraestruturais e biomecânicas de células e tecidos cancerígenos. Essa investigação se vale do emprego de um Microscópio de Força Atômica (AFM) e um Microscópio Eletrônico de Transmissão (TEM) como ferramentas de alto poder de caracterização morfológica, juntamente com a avaliação de propriedades biofísicas, tais como: rugosidade de membrana, deformação, rigidez, área superficial, volume e adesão de superfície. Adicionalmente, a Espectroscopia Raman (ER) é utilizada para identificar os modos vibracionais característicos de células e tecidos tumorais, permitindo uma comparação direta com tecidos saudáveis (ou tratados com radiação alfa) a fim de proporcionar abordagens inovadoras para a compreensão dessa patologia.

Para tanto, a presente tese está estruturada da seguinte forma:

- Capítulo 1 - a presente introdução deste trabalho de tese;
- Capítulo 2 - uma explanação sobre o que é o câncer e um breve resumo das aplicações das técnicas no estudo de células e tecidos cancerígenos;
- Capítulo 3 - PARTE I - ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DE CÉLULAS CANCERÍGENAS TRATADAS COM DICLORETO DE RÁDIO [^{223}Ra] RaCl_2 ;
- Capítulo 4 - PARTE II - ESTUDO AVANÇADO DO CÂNCER DE PÊNIS: FOCO NAS ALTERAÇÕES BIOFÍSICAS E NA INFLUÊNCIA DO VÍRUS HPV;
- Capítulo 5 - conclusão e perspectiva da tese.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

Neste capítulo, apresentamos a revisão bibliográfica sobre o sistema em estudo e as técnicas empregadas para desenvolvimento da pesquisa.

2.1 Neoplasia Maligna - Câncer

A origem da palavra câncer vem do grego *karkínos*, que quer dizer caranguejo, e é creditada ao médico grego Hipócrates (460-370 a.C.), considerado o “Pai da Medicina”. Hipócrates usou os termos carcinos e carcinoma para descrever tumores não ulcerosos e ulcerosos [Nat (2021)].

O câncer é uma doença na qual algumas das células do corpo crescem descontroladamente e que podem se espalhar para outras partes do corpo. Pode começar em quase qualquer parte do corpo humano, que é composto de trilhões de células. O crescimento e multiplicação das células humanas ocorrem através da divisão celular para formar novas células conforme demandado pelo corpo. Quando as células envelhecem ou sofrem danos, eventualmente, passam por um processo de morte e são substituídas por novas células. No entanto, ocasionalmente, esse processo pode falhar, resultando na formação de novas células quando não são necessárias ou na sobrevivência de células antigas ou danificadas além do esperado. Esse desregulamento pode levar ao acúmulo de células extras, formando uma massa de tecido denominada neoplasia ou tumor. [Can (2019)].

Os tumores podem ser classificados como benignos ou malignos. Os tumores benignos são aqueles que permanecem em sua localização primária sem invadir outros locais do corpo. Eles não se espalham para estruturas locais ou para partes distantes do corpo. Os

tumores benignos tendem a crescer lentamente e têm bordas distintas, geralmente não são problemáticos. No entanto, podem se tornar grandes e comprimir estruturas próximas, causando dor ou outras complicações médicas. Já um tumor maligno, também conhecido como câncer, é um tipo de tumor que possui células que crescem descontroladamente e podem ter a capacidade de invadir os tecidos circundantes e se espalhar para outras partes do corpo através da corrente sanguínea ou do sistema linfático [Patel (2020)].

Os nomes dos vários tipos de câncer estão diretamente relacionados ao tipo de célula que deu origem ao tumor. O nome dado aos tumores depende do tipo de tecido de onde se originaram, pois o corpo humano possui vários tipos diferentes de células que compõem os tecidos [Cooper (2000)]. É comum acrescentar o sufixo “-oma” (tumor) aos termos que descrevem a origem do tecido no caso de tumores benignos. Por exemplo, “condroma” é um tumor benigno do tecido cartilaginoso, “lipoma” refere-se a um tumor benigno do tecido adiposo, e “adenoma” refere-se a um tumor benigno do tecido glandular [Cooper (2000)]. Os tumores malignos originários das camadas epiteliais externas e internas são chamados de “carcinomas”. Quando se originam de camadas epiteliais glandulares, são denominados “adenocarcinomas”. Exemplos incluem carcinoma basocelular, carcinoma sebáceo e câncer de células escamosas. Por outro lado, os tumores malignos que se originam de tecidos conjuntivos (mesenquimais) apresentam o sufixo “-sarcoma”. Por exemplo, um osteossarcoma é um tumor maligno do tecido ósseo [Cooper (2000)].

Além disso, a adição da topografia do tumor é frequentemente feita para auxiliar na identificação. Por exemplo, “osteossarcoma do fêmur”, “adenocarcinoma do pulmão” e “adenocarcinoma do pâncreas”. No entanto, há exceções à regra quando se trata de nomes de tumores. Eles incluem “linfoma de Burkitt”, “sarcoma de Kaposi” e “tumor de Wilms”, que são nomeados em homenagem aos pesquisadores que primeiro descreveram os tumores. Também é possível referir-se a tumores por nomes que não afirmam explicitamente que são tumores, como “doença de Hodgkin”, “mola hidatiforme” e “micose fungoide”, que se referem a tumores do sistema linfático, tecido placentário, e a pele, respectivamente [Thuler (2016)].

Com exceção dos cânceres do sistema circulatório, o estágio inicial do câncer é conhecido como carcinoma *in situ*, às vezes conhecido como câncer não invasivo. Nesta fase, as células cancerígenas ficam restritas à camada tecidual de onde se originaram e ainda não se espalharam para outras camadas do órgão de origem. A maioria dos cânceres

localizados são curáveis se tratados antes de progredir para o estágio invasivo, quando as células malignas podem se espalhar para outras partes do corpo. Com um câncer invasivo, as células cancerígenas se espalham para outras partes do corpo invadindo outras camadas celulares do órgão e adquirindo um fluxo de sangue ou linfa. A principal característica do câncer é sua capacidade de se espalhar e invadir, o que permite que tumores malignos desenvolvam mais tumores em diferentes partes do corpo do que os preexistentes. Esses novos focos de doença são conhecidos como metástases.

Em geral, o processo de carcinogênese ocorre lentamente e pode levar anos para que uma célula cancerosa se multiplique e dê origem a um tumor visível. Esse processo passa por várias etapas antes de chegar ao tumor.

Na primeira fase da carcinogênese, os agentes cancerígenos ou carcinógenos têm um efeito nas células que resulta em alterações em alguns de seus genes. Nesta fase, as células tornam-se geneticamente alteradas, mas um tumor ainda não pode ser detectado clinicamente. Descobre-se “preparados” ou “iniciados” para a chegada de um segundo grupo de agentes que atuarão num futuro próximo [Alencar (2010)].

O segundo estágio é chamado de promoção, que é aquele em que células geneticamente alteradas experimentam os efeitos de agentes causadores de câncer (oncopromotores). A transformação da célula em malignidade é lenta e gradual. Uma relação sustentada com o promotor do gene do câncer é essencial para que essa transformação ocorra. Frequentemente, o procedimento neste cenário é encerrado abruptamente devido ao contato com agentes promocionais. Certos ingredientes alimentares e exposição prolongada, e excessiva, a hormônios são exemplos de fatores que favorecem a transformação de células inicialmente benignas em malignas [Alencar (2010)].

O estágio avançado do câncer é conhecido como progressão, marcado pela proliferação incontável e irreversível de células alteradas. Nessa fase, o câncer já se desenvolveu o suficiente para apresentar as primeiras manifestações clínicas da doença [Alencar (2010)]. A progressão é um momento crítico, exigindo diagnóstico e intervenção médica adequados para controlar a doença e buscar o melhor tratamento para o paciente.

É essencial estar atento aos sinais e sintomas do câncer, buscando cuidados médicos o mais cedo possível, a fim de aumentar as chances de sucesso no tratamento e melhorar a qualidade de vida do paciente.

2.1.1 Câncer de Mama - CAMa

O câncer de mama é uma doença caracterizada pelo mau funcionamento das células que compõem o tecido mamário. Essas células crescem ou se multiplicam descontroladamente, resultando no aparecimento de estruturas (massas) de tipos celulares benignos ou malignos. Essas células que se replicam mais rapidamente em algumas circunstâncias e por razões desconhecidas levam ao desenvolvimento de massas de células conhecidas como neoplasias, que são de formação nova, mas de origem patológica.

De acordo com o INCA [INCA (2002)], normalmente leva 100 dias para que ocorra a replicação das células cancerígenas da mama. Um tumor pode ser palpado quando tem 1 cm de diâmetro, e uma esfera de 1 cm tem cerca de 1 bilhão de células, que é o produto de cerca de 30 duplicações celulares. Assim, uma célula maligna levaria 10 anos para se transformar em um tumor de 1 cm.

Além disso, estima-se que o tumor da mama possa dobrar de tamanho a cada período de 3 a 4 meses. Na fase inicial, conhecida como fase subclínica ou impalpável, a impressão é de um crescimento lento devido às dimensões mínimas das células. No entanto, assim que o tumor se torna palpável, a duplicação torna-se facilmente perceptível. Caso não seja tratado, o tumor pode desenvolver metástases, formando focos de tumor em outros órgãos [Feng *et al.* (2018)].

Sabe-se que a idade é um fator de risco significativo para o câncer de mama. Embora esse tipo de câncer seja relativamente raro em pacientes com menos de 35 anos, sua incidência aumenta rapidamente a partir dessa faixa etária. Esse conhecimento é de extrema importância para a definição de políticas públicas de saúde [INCA (2021)]. No Brasil, é recomendado que mulheres entre 50 e 69 anos façam uma mamografia a cada dois anos como parte do programa de rastreamento para detecção precoce do câncer de mama. Essa estratégia visa identificar possíveis tumores em estágios iniciais, aumentando as chances de tratamento bem-sucedido e proporcionando melhor qualidade de vida às mulheres afetadas pela doença.

A detecção desta doença em estágio avançado é um dos fatores que dificultam o tratamento. Atualmente, é amplamente reconhecido que as chances de cura do câncer de mama são relativamente altas se a detecção for feita precocemente. A mamografia continua sendo a forma mais eficaz de detecção precoce do câncer de mama, pois permite que o especialista identifique lesões muito pequenas em estágio inicial. Essa abordagem

é essencial para aumentar as perspectivas de sucesso no tratamento e oferecer melhores resultados aos pacientes, reforçando a importância da conscientização sobre a importância do rastreamento e exames regulares para a saúde das mulheres.

O tratamento do câncer de mama envolve uma variedade de opções, incluindo cirurgia, radioterapia, quimioterapia e terapia hormonal. Terapias direcionadas e imunoterapia também são utilizadas, especialmente em situações específicas. A escolha do tratamento depende do estágio e tipo do tumor e das características do paciente, sendo muitas vezes coordenada por uma equipe multidisciplinar de profissionais de saúde [Bateni *et al.* (2021); Doke *et al.* (2018)].

2.1.2 Câncer de Pênis - CAPE

O câncer de pênis é um tumor raro, com maior incidência em homens a partir dos 50 anos, embora possa afetar também os mais jovens. Essa forma de câncer apresenta um tratamento que pode impactar significativamente na qualidade de vida do paciente, afetando diretamente sua vida sexual e função miccional, resultando em estresse psicológico, emocional e social [Augusto *et al.* (2022); Engelsjerd & Lagrange (2023)]. É importante destacar que medidas relativamente simples podem ajudar na prevenção dessa condição, como a adequada higiene peniana, o uso de preservativos durante as relações sexuais e a vacinação contra o vírus HPV. Essas ações preventivas podem contribuir para a redução do risco de desenvolvimento do câncer de pênis e, assim, melhorar a qualidade de vida e bem-estar dos homens.

O CAPE é um tipo raro de câncer que afeta a pele e os tecidos do pênis. Existem vários tipos de câncer de pênis, mas a maioria (95%) é do tipo carcinoma de células escamosas (CEC), que se origina das células escamosas da pele da glande e do prepúcio. O CEC pode ser subdividido em vários subtipos, incluindo basalóide, verrucoso, papilífero, sarcomatoide e adenoescamoso, entre outros. Alguns desses subtipos podem ser relacionados ao HPV, enquanto outros não. Além disso, existem outros tipos raros de câncer de pênis, como o melanoma, o carcinoma de células transicionais e o sarcoma [Akers & Holden (2020); Necchi (2021)]. Os sintomas podem incluir feridas ou úlceras no pênis, dor, sangramento e secreção. O diagnóstico é feito por meio de exames físicos, biópsias e exames de imagem. O tratamento pode incluir cirurgia, radioterapia e quimioterapia, dependendo do estágio e da extensão do câncer.

O CAPE tradicionalmente começa como pequenas lesões, mais comumente na glândula ou prepúcio. A aparência pode variar muito, alguns tumores aparecem como massas exofíticas cinza-esbranquiçadas crescendo na pele do pênis e outras podem ser massas planas, de cor avermelhada e ulceradas. Essas lesões crescem lentamente lateralmente ao longo da superfície da pele do pênis e frequentemente cobrem toda a glândula ou prepúcio antes de invadir o corpo e a haste do pênis [Douglawi & Masterson (2019)]. O curso do tratamento depende da extensão local do tumor e do estado de comprometimento dos gânglios inguinais (ínguas na virilha). O tratamento das primeiras lesões inclui medicamentos para aplicação tópica, ablação a laser, cirurgia para remover apenas as lesões com margens negativas e radioterapia. No entanto, lesões invasivas exigem medidas mais drásticas, como a remoção de uma glândula, ressecção parcial ou amputação total [Akers & Holden (2020); Douglawi & Masterson (2019)].

2.2 Investigação Multimodal de Propriedades Ultraestruturais, Mecânicas e Vibracionais em Células e Tecidos Cancerígenos

A combinação do uso do AFM, do TEM e da ER nos estudos de células e tecidos cancerígenos tem mostrado resultados promissores, fornecendo informações detalhadas sobre estruturas nanométricas e alterações em suas funções. Essas técnicas também revelam propriedades mecânicas e composição molecular dos tumores [Sheth & Esfandiari (2022)]. Comparadas às células saudáveis, as células cancerígenas apresentam morfologia irregular, são mais deformáveis e possuem características moleculares alteradas, como mutações genéticas e desregulação das vias de sinalização. O AFM permite a análise de nanoestruturas, enquanto o TEM oferece *insights* sobre morfologia sub-micrométrica. Já a ER nos permite a identificação de biomarcadores e componentes moleculares específicos, auxiliando na compreensão das alterações moleculares associadas ao câncer. Essa abordagem integrada oferece novas perspectivas para diagnóstico precoce, prognóstico e terapias personalizadas no tratamento do câncer.

Desde a sua introdução em 1986, o AFM tem sido aplicado em estudos biológicos, juntamente com seu uso generalizado nas áreas de Física, Química e Engenharia. Devido

à suas capacidades de gerar imagens com resolução de nível atômico e de manipulação direta de amostras com alta precisão, o AFM é agora considerado um instrumento indispensável para pesquisadores de nanotecnologia, especialmente em campos orientados para a Física [Ikai (2009); Kosareva *et al.* (2022)]. O uso potencial da AFM para medir a rigidez celular como um biomarcador quantitativo de alterações relacionadas ao câncer foi demonstrado para vários tipos de câncer, incluindo mama [Levillain *et al.* (2022); Weber *et al.* (2023)], próstata [Bastatas *et al.* (2012)], ovário [Ansardamavandi *et al.* (2020)], tireóide [Levillain *et al.* (2022)], câncer de pâncreas [MacCurtain *et al.* (2021)], rim [Rebelo *et al.* (2013a); Rianna & Radmacher (2017)] e bexiga [Zhu *et al.* (2023)].

Alinhado com a AFM, a aplicação da TEM em tecidos e células cancerígenas tem sido fundamental para avanços significativos na compreensão da estrutura e ultraestrutura dessas células. Em um estudo pioneiro, Iglehart *et al.* [Iglehart *et al.* (1985)] examinaram a ultraestrutura de células cancerosas em amostras de biópsias por aspiração de câncer de pulmão humano, contribuindo para a compreensão inicial das características ultraestruturais do câncer. A TEM é usada para caracterizar tecidos, células, organelas e proteínas específicas na análise ultraestrutural de células e tecidos de câncer de mama, ajudando a preencher lacunas essenciais na biologia do tumor [Graham & Orenstein (2007)]. Ibiyeye *et al.* [Ibiyeye *et al.* (2019)] utilizaram a TEM para examinar as mudanças ultraestruturais nas células de câncer de mama (MDA-MB-231) tratadas com nanopartículas de $CaCO_3$ carregadas com doxorubicina/timoquinona. As imagens obtidas por TEM mostraram mudanças na membrana celular, como encolhimento e formação de bolhas, mas poucas mudanças foram observadas nos organelos celulares.

Uma outra técnica utilizada para diagnóstico diferencial de câncer é a ER, que utiliza a luz de um laser para obter informações detalhadas sobre a morfologia de células e tecidos [Auner *et al.* (2018)]. A luz dispersa pelo laser carrega consigo essas informações essenciais sobre as amostras analisadas. Estudos usando ER na análise do tecido mamário normal e canceroso relatam que os espectros de tecido não tumoral são atribuídos, principalmente, a moléculas lipídicas, enquanto os espectros de tecido canceroso foram atribuídos a moléculas de proteína [Pichardo-Molina *et al.* (2007)]. Quando um tumor se forma, ocorrem mudanças na estrutura e na concentração das várias biomoléculas que compõem os tecidos e células, como lipídios, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos. Normalmente, a ER não requer nenhuma preparação de amostra. Além disso, diferente

do que ocorre na espectroscopia no infravermelho, as fortes bandas de água no espectro Raman não se sobrepõem à região da impressão digital (região do espectro onde as características de absorção ou espalhamento são suficientemente distintas para permitir a identificação única de moléculas específicas), de modo que a ER se adapta melhor às aplicações biológicas do que a espectroscopia no infravermelho [Movasaghi *et al.* (2007)]. A ER fornece informações moleculares de forma não invasiva e *in situ* sem rotulagem e, portanto, muitos artigos sobre aplicações Raman em assuntos biológicos e médicos tem sido relatados [Ishigaki *et al.* (2016)]. No campo de sua aplicação ao diagnóstico de câncer, de fato, grupos de pesquisa têm se envolvido na exploração da viabilidade do diagnóstico de câncer em vários órgãos, como: cólon [Zheng *et al.* (2007)], colo do útero [Kamemoto *et al.* (2010); Kanter *et al.* (2009)], esôfago [Hutchings *et al.* (2010)], estômago [Bergholt *et al.* (2011)], boca [Singh *et al.* (2012)] e pele [Lieber *et al.* (2008)]. No estudo de câncer de pênis, a ER pode ser bastante valiosa especialmente na identificação de modos vibracionais que possam estar associados à infecção por HPV (*Human papillomavirus*), bastante comum em tecido peniano acometido de tumor [Martins *et al.* (2018)].

Parte I

ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DE CÉLULAS CANCERÍGENAS TRATADAS COM DICLORETO DE RÁDIO [^{223}Ra] RaCl_2

Capítulo 3

3.1 Introdução

Os radioisótopos, também conhecidos como radionuclídeos, são átomos que possuem núcleos instáveis e liberam radiação ao se desintegrarem para formar átomos mais estáveis. Essa desintegração pode ocorrer de várias maneiras, incluindo a emissão de partículas alfa (α) partículas beta (β) e radiação gama (γ) [Laschinsky *et al.* (2022)]. Devido a essas propriedades únicas, os radioisótopos têm sido amplamente utilizados em diversas aplicações científicas e médicas [Asadian *et al.* (2020); Mushtaq *et al.* (2023); Volz *et al.* (2023)].

Os emissores de partículas β são elétrons (partículas beta negativas) ou pósitrons (partículas beta positivas) emitidos do núcleo de um átomo durante a desintegração radioativa. Os emissores beta têm um alcance de penetração maior do que as partículas alfa, mas transferem menos energia por unidade de distância percorrida. Eles são usados tanto para diagnóstico quanto para terapia. Exemplos incluem o Iodo-131 (^{131}I), que é amplamente utilizado no tratamento de câncer de tireoide [Wyszomirska (2012)].

Já os emissores de radiação γ são uma forma de radiação eletromagnética de alta energia. Ao contrário das partículas alfa e beta, os raios gama não têm massa ou carga. Eles possuem alta capacidade de penetração e são frequentemente usados em diagnóstico por imagem e terapia. Exemplos incluem o Tecnécio-99m (^{99m}Tc), que é utilizado em muitas formas de imagiologia médica, incluindo cintilografia óssea e cardíaca [Papagiannopoulou (2017)].

As partículas α são caracterizadas por viajarem distâncias curtas (50-90 μm) devido à sua alta energia. Além disso, as partículas α estão associadas com alta transferência linear de energia (60-230 $\text{keV}/\mu\text{m}$), tornando esses radionuclídeos excelentes escolhas

para fins terapêuticos [Brechbiel (2007)]. Os efeitos das partículas α nas células podem ser explicados pela forma como a radiação ionizante interage com a matéria biológica. A radiação ionizante pode ter um efeito direto através da transferência direta de energia para biomoléculas (DNA, lipídios, proteínas), levando à sua ionização, ou efeitos indiretos em que a energia é transferida para a água, que é então dissociada em espécies reativas de oxigênio (ROS), dentre as quais o radical hidroxila OH \cdot é o mais reativo [Pouget & Constanzo (2021)]. As partículas devem atravessar a membrana celular e o citoplasma, incluindo organelas e membrana nuclear, para atingir o núcleo. Uma única travessia da partícula α pelo núcleo da célula tem a probabilidade de 20-40% de matar a célula [Boldyrev *et al.* (2018)]. Estudos recentes têm demonstrado alguns efeitos da radiação ionizante na estrutura dentro da célula e a contribuição destes efeitos extranucleares para a morte celular [Hong *et al.* (2010); Kim *et al.* (2006); Persson *et al.* (2005); Pouget *et al.* (2018)].

Entre os radionuclídeos emissores α , o Rádio-223 foi o primeiro aprovado para aplicação clínica em 2013 [Guerra *et al.* (2020)]. O Rádio-223 é usado na forma química do sal [^{223}Ra] RaCl_2 . Este radionuclídeo emite partículas de alta energia e de curto alcance ($<100 \mu\text{m}$), liberando energia de forma altamente focalizada, causando danos significativos ao DNA das células cancerígenas próximas, sem afetar gravemente o tecido saudável circundante [Morris *et al.* (2019); Nilsson *et al.* (2005); Parker *et al.* (2013)]. De acordo com a teoria do *Targeted Alpha Therapy Working Group* [Group (2018)], essa emissão de alta energia causa quebras complexas no DNA de fita dupla, aumentando a probabilidade de morte celular no tecido alvo e reduzindo o impacto em células normais adjacentes.

O [^{223}Ra] RaCl_2 é o primeira radiação emissor α aprovado nos Estados Unidos e na Europa (em 2013) para metástases ósseas de câncer de próstata [Subbiah *et al.* (2016)]. É importante notar que os radiofármacos emissores α fornecem mais toxicidade para as células tumorais e menor radiação para os tecidos normais circundantes. Os radiofármacos emissores α fornecem mais toxicidade às células tumorais, principalmente porque dispensam radiação de transferência linear de energia (LET) mais alta em um intervalo mais curto. Isto leva ao aumento de danos localizados, particularmente ao DNA das células tumorais. A alta radiação LET induz quebras predominantemente permanentes na cadeia dupla do DNA, que são significativamente mais letais para as células em comparação com outros tipos de danos induzidos pela radiação. Além disso, as partículas α têm um curto

alcance de penetração ($<100 \mu\text{m}$), o que confina os intensos efeitos da radiação às células tumorais, poupando os tecidos normais circundantes. [Manafi-Farid *et al.* (2020)]. Do ponto de vista da segurança, a radiação alfaé bastante seguro, especialmente em termos de exposições externas à equipe e familiares de pacientes administrados com ^{223}Ra RaCl_2 [Aro *et al.* (2019)]. De acordo com O'Dwyer e colaboradores, os radiofármacos emissores são drogas citotóxicas altamente cancerígenas, permitindo o tratamento de doenças microscópicas enquanto poupa o tecido normal circundante [O'Dwyer *et al.* (2021)].

Apesar do uso clínico generalizado de ^{223}Ra RaCl_2 (Xofigo: medicamento terapêutico emissor de partícula α) [Guerra *et al.* (2020)], há pouco conhecimento sobre o efeito das partículas α na ultraestrutura das células cancerígenas até o momento. Neste estudo, uma análise profunda de células de CAMa (**MDA-MB-231**) tratadas com ^{223}Ra RaCl_2 foi realizada usando as mais avançadas técnicas de microscopia, AFM e TEM, juntamente com a análise vibracional por ER.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Cultura de Células Mamárias

A linhagem de células de CAMa humano (**MDA-MB-231**) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro - Brasil, cultivadas na Comissão Brasileira de Energia Nuclear - CNEN, Instituto de Engenharia Nuclear, Laboratório de Nanoradiofármacos e Síntese de Novos Radiofármacos. As células foram mantidas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* - DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal - FBS, NaHCO_3 (3,7 g/L), HEPES (5,2 g/L), L-glutamina (2 mM), fungizona (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), penicilina e estreptomina (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As células foram incubadas a 37°C em uma atmosfera umidificada de 5% de CO_2 (incubadora de CO_2 , série 3, *Thermo Scientific*). As células foram cultivadas em frascos de cultura de confluência de 75 cm^3 .

3.2.2 Protocolo de Exposição a ^{223}Ra RaCl_2 para Análise de AFM

As células MDA-MB-231 foram cultivadas em 5×10^6 células por poço e semeadas em lamínulas de vidro circular de 13 mm em uma placa de 24 poços no Laboratório

de Nanoradiofármacos e Síntese de Novos Radiofármacos. Em seguida, as células foram tratadas na presença ou ausência de [^{223}Ra] RaCl_2 (0,09 mCi por poço) por 24h. Após esse período, as células foram lavadas com tampão fosfato-salino (do inglês, *Phosphate Buffered Saline* - PBS) e fixadas com solução de formaldeído 3,7% por 10 minutos. A solução fixadora foi removida e as células foram lavadas duas vezes com água ultrapura e secas ao ar para imagens de morfologia e análise de ultraestrutura.

3.2.3 Análise de Células por AFM

A análise foi realizada no Laboratório de Biofísica e Nanossistemas - LBN, na Universidade Federal do Maranhão - UFMA, usando um microscópio de força atômica *Multimode 8* (Bruker, Santa Barbara, CA, EUA) no modo *PeakForce Quantitative Nanomechanics* - QNM no ar. Como estamos lidando com radiofármacos, a imagem AFM de células vivas em meio fluido não é viável devido à necessidade de aguardar a decomposição da radiação alfa, principalmente para observar os primeiros efeitos da radiação na membrana celular. Utilizamos, em todas as medições, sondas modelo **qp-HBC** (*Nano-Sensores*) com constante de mola nominal do *cantilever* de 0,5 N/m e o raio nominal <10 nm. As medidas foram realizadas em ar (temperatura de 23°C e 44% de umidade), com resolução de 256 pixels e frequência de varredura de 0,5 Hz. A frequência de aquisição da curva de 0,5 kHz. Um total de 30 mapas foram analisados para cada grupo: (i) células MDAMB-231 não tratadas e (ii) tratadas com [^{223}Ra] RaCl_2 (0,09nCi) por 24h. Cada varredura contém 65.536 curvas de força.

3.2.3.1 Análise de Rugosidade

A análise estatística da rugosidade foi baseada na altura de cada pixel da imagem, analisada a partir do mapa de altura. O parâmetro R_q é a rugosidade [Dufrêne (2009)]:

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_i^N Z_i^2}, \quad (3.1)$$

onde Z é a altura de cada pixel e N é o número total de pixels (no nosso caso, 65.536), com tamanho de varredura padronizado para 1 μm . Este tamanho de varredura específico (1 μm) foi escolhido para evitar diferenças de altura relacionadas a toda a topografia celular. Portanto, a rugosidade superficial obtida foi associada às ultraestruturas da membrana

celular. Antes da análise de rugosidade, os mapas foram pré-tratados com um ajuste polinomial de terceira ordem [Gong *et al.* (2016)] , permitindo que diferenças de altura mais expressivas sejam minimizadas, resultando em topografias com contribuições mais significativas das estruturas e componentes de membrana.

3.2.3.2 Análise Nanomecânica

A adesão e rigidez das células tratadas na presença ou ausência de [^{223}Ra] RaCl_2 foram calculadas a partir de todas as curvas de força. A força de adesão entre a sonda e a superfície da célula foi obtida a partir de curvas de retração, consideradas no valor mínimo de deflexão do *cantilever*. Este valor representa a resistência da sonda do AFM para deixar a superfície da amostra. Para o cálculo da rigidez da membrana celular, foram considerados os valores de inclinação na porção de contato das curvas de retração em intervalos de 30-70% de deflexão após o ponto de contato da ponta com a amostra. Para os dados de adesão e rigidez, o modelo DMT foi empregado em cada curva de força [Kim *et al.* (2021)].

3.2.3.3 Análise de Dados Estatísticos AFM

A distribuição normal seguindo um único critério foi avaliada por ANOVA, uma análise de variância que testa se há diferenças estatisticamente significativas entre as médias de três ou mais grupos. Após o teste ANOVA, o pós-teste de Tukey foi aplicado para comparações múltiplas, determinando especificamente quais grupos diferem entre si. Esses valores foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. Análises estatísticas e gráficos de dados de rigidez, adesão e rugosidade foram feitos usando o *software OriginLab*. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi $< 0,05$.

3.2.4 Protocolo de Exposição a [^{223}Ra] RaCl_2 para Análise por TEM

As células MDA-MB-231 foram cultivadas em uma concentração de 4×10^6 células por frasco. Em seguida, as células foram tratadas na presença ou ausência de [^{223}Ra] RaCl_2 (2mCi) por 24h. Em seguida, as células foram fixadas em glutaraldeído 2,5%

em solução tampão cacodilato de sódio 0,1 M (temperatura ambiente por 1 h) e pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 0,8%. As células foram desidratadas usando uma série de concentrações crescentes de acetona (70, 90 e 100%), embebidas em resina Epoxi e polimerizadas a 60°C. Cortes ultrafinos (60-70 nm de espessura) foram obtidos sem coloração. A análise morfológica e ultraestrutural foi realizada na Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ, no Laboratório de Radiofarmácia e Nanoradiofármacos, utilizando um microscópio eletrônico de transmissão Hitachi HT 7800 (Japão). Dois experimentos independentes foram realizados.

3.2.5 Análise de ER

Os espectros Raman foram adquiridos usando um espectrômetro Raman triplo (modelo T64000, marca Horiba/Jobin-Yvon) do Laboratório de Espectroscopia Vibracional e Impedância - LEVI da Universidade Federal do Maranhão - UFMA, executado no modo *single* com fendas ajustadas para uma resolução inferior a 2 cm^{-1} . O instrumento é equipado com um detector tipo CCD (*Charge Coupled Device*) resfriado por N_2 líquido. A linha verde de 532,0 nm de um laser de estado sólido (LAS-532-100-HREV) operando a 14 mW foi usada para excitação. Para focalização da luz na superfície da amostra utilizou-se um microscópio modelo BX41, marca *Olympus* com uma objetiva de 100x. Dentro de cada faixa de dispersão espectral, os espectros foram adquiridos em diferentes pontos na superfície das amostras após nove aquisições de 20s cada.

3.2.5.1 Pré-Processamento Espectral

O processamento dos dados foi realizado com o *software LabSpec6*. Os picos estreitos causados por raios cósmicos foram removidos, e na sequência, o fundo de fluorescência variável e o substrato de vidro foram estimados usando o ajuste polinomial de quinta ordem e subtraídos. Cada espectro foi suavizado usando um algoritmo de suavização polinomial de quinta ordem antes da análise.

3.2.6 Análise de Componentes Principais - PCA

A Análise de Componentes Principais (PCA), um método de análise estatística que pode reduzir a dimensão dos dados ao mesmo tempo em que responde pela maior parte da variação nos dados originais, foi usada para a análise do conjunto de espectros Raman

obtidos seguindo a metodologia de YH Ong et al. [Ong *et al.* (2020)]. Segundo essa metodologia, a análise da variância é empregada nos *scores* dos dez primeiros componentes principais para determinar qual componente principal apresenta diferenças significativas na média dos *scores* entre os dois grupos de células, utilizando o *software OriginLab*.

3.3 Resultados e Discussões

Os mapas de AFM de alta resolução das células do câncer de mama, da linhagem MDA-MB-231, revelaram alterações ultraestruturais na superfície externa da membrana celular. Para garantir que as diferenças observadas estivessem de fato relacionadas aos efeitos do tratamento com $[^{223}\text{Ra}] \text{RaCl}_2$, foram realizadas 60 varreduras no total, revelando alterações na membrana das células tratadas, conforme exemplificado na Figura 3.1. Comparando os mapas de $1 \mu\text{m}$ da membrana das células não tratadas (Figura 3.1B a 3.1E) com a membrana das células tratadas com $[^{223}\text{Ra}] \text{RaCl}_2$ (Figura 3.1G a 3.1J), é possível observar um deterioração de componentes da membrana que causam defeitos na estrutura da membrana (regiões apontadas pelas setas azuis), expondo estruturas subjacentes da camada externa da membrana. Esse resultado sugere que a interação da radiação com a membrana celular, além de promover o dano conhecido à cadeia de DNA, também causa desgaste na estrutura externa da membrana celular.

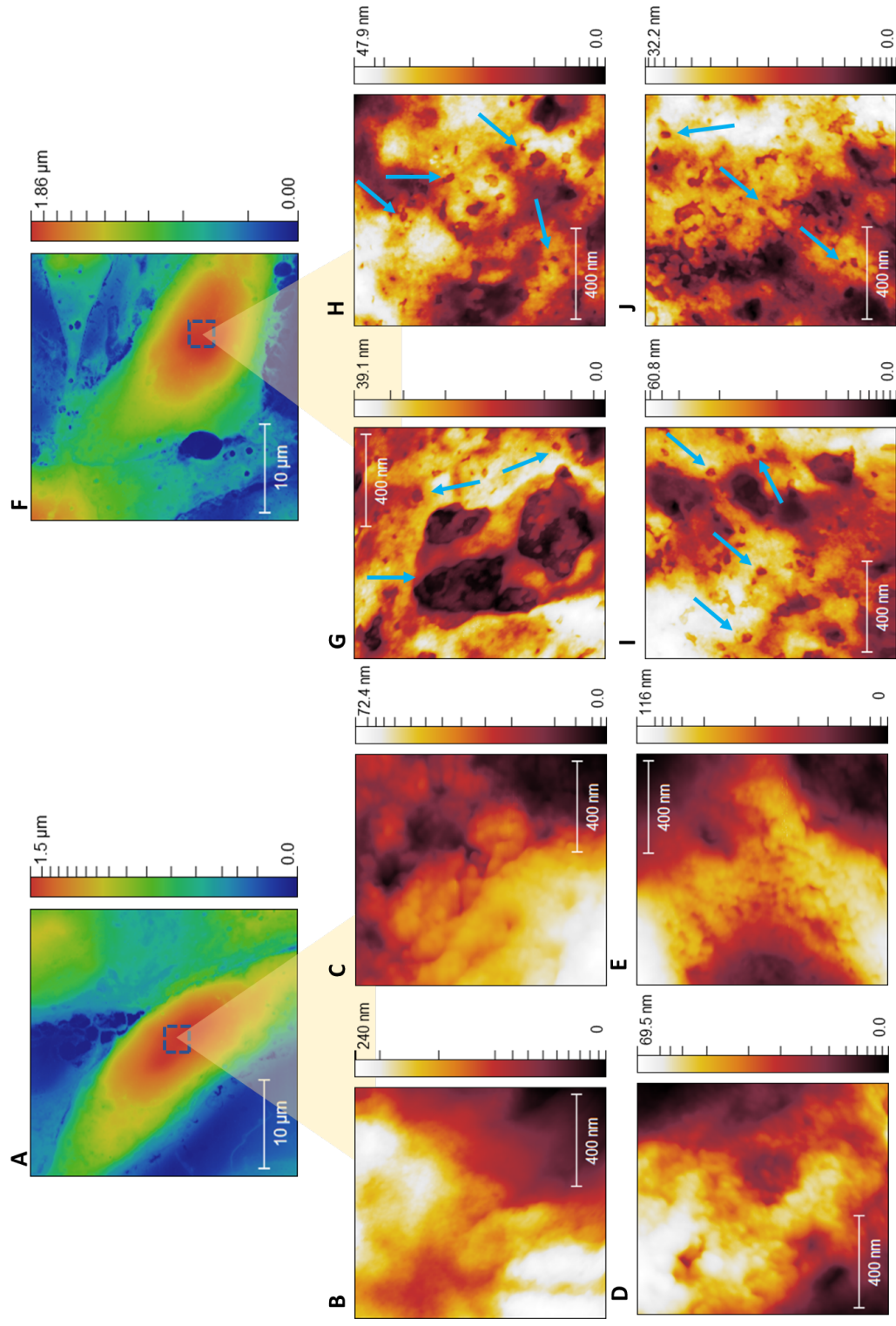


Figura 3.1: Mapas topográficos AFM da ultraestrutura de células MDA-MB-231 tratadas e não tratadas com $[^{223}\text{Ra}] \text{RaCl}_2$. Figura 3.1A: mapa de $30 \times 30 \mu\text{m}$ de células não tratadas e Figura 3.1F tratadas com $[^{223}\text{Ra}] \text{RaCl}_2$. Os quadrados representam as regiões onde foram realizado o zoom para analisar a ultraestrutura da membrana: as áreas mais altas da célula (corpo celular). As Figura 3.1B-E e Figura 3.1G-J mostram, respectivamente, um zoom de $1 \times 1 \mu\text{m}$ da membrana de células não tratadas e tratadas com $[^{223}\text{Ra}] \text{RaCl}_2$. As setas azuis nas Figura 3.1G-J destacam possíveis danos à membrana devido à sua interação com a radiação α .

Outra característica interessante é que para todos os conjuntos de imagens analisadas, pode-se observar uma diminuição nas diferenças de altura observadas nas barras de escala para as amostras tratadas em relação às não tratadas nos zooms da membrana. Este resultado nos motivou a investigar mudanças quantitativas na ultraestrutura da membrana. Aproveitando a capacidade do microscópio de força atômica de produzir dados tridimensionais a partir da topografia analisada, foram explorados os valores de R_q , contagem de vales, adesão e rigidez das amostras, conforme mostra a Figura 3.2.

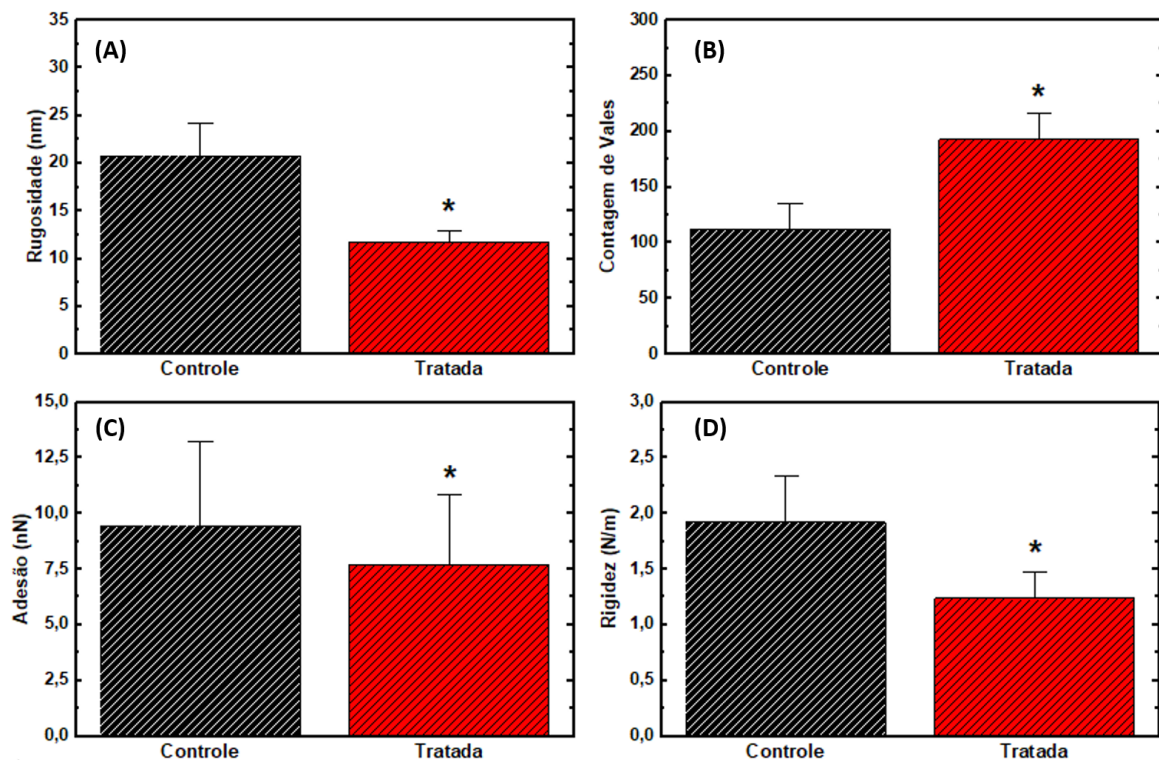


Figura 3.2: Dados quantitativos sobre propriedades ultraestruturais e nanomecânicas da membrana celular. Figura 3.2A: rugosidade quadrada média entre amostras não tratadas e tratadas ($2,1 \pm 0,3 \times 10^1$ nm e $1,2 \pm 0,1 \times 10^1$ nm respectivamente); Figura 3.2B: contagem de vales ($1,1 \pm 0,2 \times 10^2$ e $1,9 \pm 0,2 \times 10^2$, grupo controle e tratado respectivamente); Figura 3.2C: Adesão à superfície da membrana ($9,4 \pm 0,1$ nN e $7,7 \pm 0,1$ nN (SD)); Figura 3.2D: Rigidez da membrana ($1,9 \pm 0,4$ N/m e $0,8 \pm 0,6$ N/m (SD)). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

A Figura 3.2A traz o gráfico de barras dos valores de R_q das amostras não tratadas (controle) e tratadas com $[^{223}\text{Ra}] \text{RaCl}_2$. Podemos observar que o resultado revela uma redução dos valores de R_q para as amostras tratadas, indicando que o tratamento com o radiofármaco $[^{223}\text{Ra}] \text{RaCl}_2$ promove desgaste da superfície da membrana devido a remoção de componentes membranares, tornando suas diferenças de altura da ordem de nanômetros. Já a Figura 3.2B compara as contagens de vale das amostras em estudo

$((1,1 \pm 0,2) \times 10^2$ e $(1,9 \pm 0,2) \times 10^2$, grupos controle e tratado, respectivamente). A maior quantidade de depressões observadas nas amostras tratadas reforça o dano causado pela interação das partículas com a superfície da membrana celular, provavelmente ocasionado por colisões balísticas das partículas.

Os resultados das forças de adesão entre a sonda do microscópio de força atômica e a membrana celular (Figura 3.2C) apresentaram valores estatisticamente menores no grupo tratado ($7,7 \pm 0,1$ nN) em comparação com o grupo não tratado ($9,4 \pm 0,1$ nN). Este resultado é importante porque mudanças na interação sonda-amostra representam mudanças na superfície de um desses grupos. Como todas as sondas utilizadas neste trabalho foram iguais, as alterações nesta interação estão exclusivamente associadas à superfície da célula. Essas alterações são devidas à interação com $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$. Possibilitando assim sua interação com células cancerígenas que também possuem membrana carregada negativamente, devido à presença de fosfatiletanolamina e esfingosina que são umas das várias classes de fosfolipídios que constituem as membranas celulares. A presença de $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ interage com a fosfatiletanolamina e esfingosina, alterando a carga da superfície celular e resultando em menores forças de adesão medidas entre a sonda do AFM e a membrana celular no grupo tratado [de Almeida Gomes *et al.* (2024)] .

Chegando aos resultados de rigidez superficial da membrana celular também foi avaliada após o tratamento com o radiofármaco, mostrando uma redução desse parâmetro em relação ao grupo controle ($1,9 \pm 0,4$ N/m e $0,8 \pm 0,6$ N/m). A diminuição da rigidez local da membrana reforça a hipótese de alteração nos componentes da membrana. Mudanças na distribuição e densidade dos componentes da membrana resultam em uma diferença na rigidez local da membrana celular [Lamparter & Galic (2020)], nesse caso, desestabilizando a membrana, deixando ela mais maleável.

Todas as análises quantitativas de AFM mostraram diferenças estatísticas significativas. A força de adesão e a rigidez local foram calculadas para cada curva força. Assim, fica evidente que as diferenças observadas na ultraestrutura e na nanomecânica celular estão relacionadas ao tratamento com o radiofármaco.

A destruição da membrana celular pode ter consequências importantes para a sobrevivência da célula. Segundo Dias e Nylandsted [Dias & Nylandsted (2021)], a manutenção da integridade da membrana plasmática é essencial para a viabilidade e função celular. Esses dados demonstraram que as partículas α produziram um efeito indireto

na célula, levando à morte celular. Bertolet *et al.* [Bertolet *et al.* (2021)] corroboram este achado, afirmando que o efeito da radiação ionizante não é bem conhecida, e que as partículas α podem afetar organismos biológicos direta ou indiretamente.

Uma análise geral dos aspectos ultraestruturais das células de CAMa obitidas no TEM não revelaram diferenças no conteúdo nuclear quando expostas e não expostas à radiação (74 kBq; $2\mu\text{Ci}$) por 24 horas (Figura 3.3).

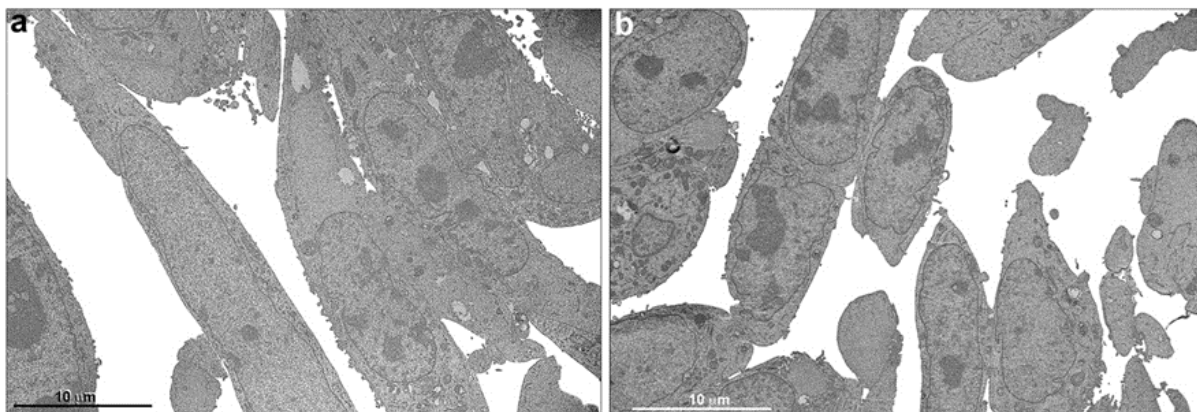


Figura 3.3: Visão geral da microscopia eletrônica de transmissão de células derivadas de tumores de mama. Aspectos ultraestruturais de células MDA-MB-231 não expostas (a) e expostas a $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$. (b). Observa-se que em ambas as situações o conteúdo do aspecto nuclear é semelhante. Não há evidência de aumento da heterocromatina após a radiação.

As imagens de TEM das células MDA-MB-231 não expostas a $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ apresentaram conexões muito próximas entre suas membranas plasmáticas (Figuras 3.4A, 3.4B e 3.4C). No entanto, as células não expostas apresentaram núcleos preservados com nucléolos bem desenvolvidos (Figuras 3.4A e 3.4C). Também é possível observar um citoplasma bem conservado e homogêneo e suas organelas (mitocôndrias, retículo endoplasmático e complexo de Golgi) (Figuras 3.4A, 3.4B, 3.4C e 3.4D, 3.4E e 3.4F). O retículo endoplasmático é disperso pelo citoplasma sem acúmulos. As mitocôndrias estão localizadas aleatoriamente no citoplasma e cristas bem preservadas (Figura 3.4F).

As células expostas a $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ apresentaram um núcleo muito regular e preservado (Figuras 3.5a, 3.5b, 3.5c e 3.5d), muito semelhante ao grupo de células não expostas, observando-se os nucléolos dentro do núcleo (Figuras 3.5a, 3.5b e 3.5c). Além disso, o envelope nuclear está intacto, apresentando as membranas de dupla ligação (Figuras 3.5d e 3.5e). A cromatina é regular e nenhuma heterocromatina foi observada; como mostrado nas Figuras 3.5a, 3.5b, 3.5c e 3.5d, a maior parte do DNA está na forma de eucromatina.

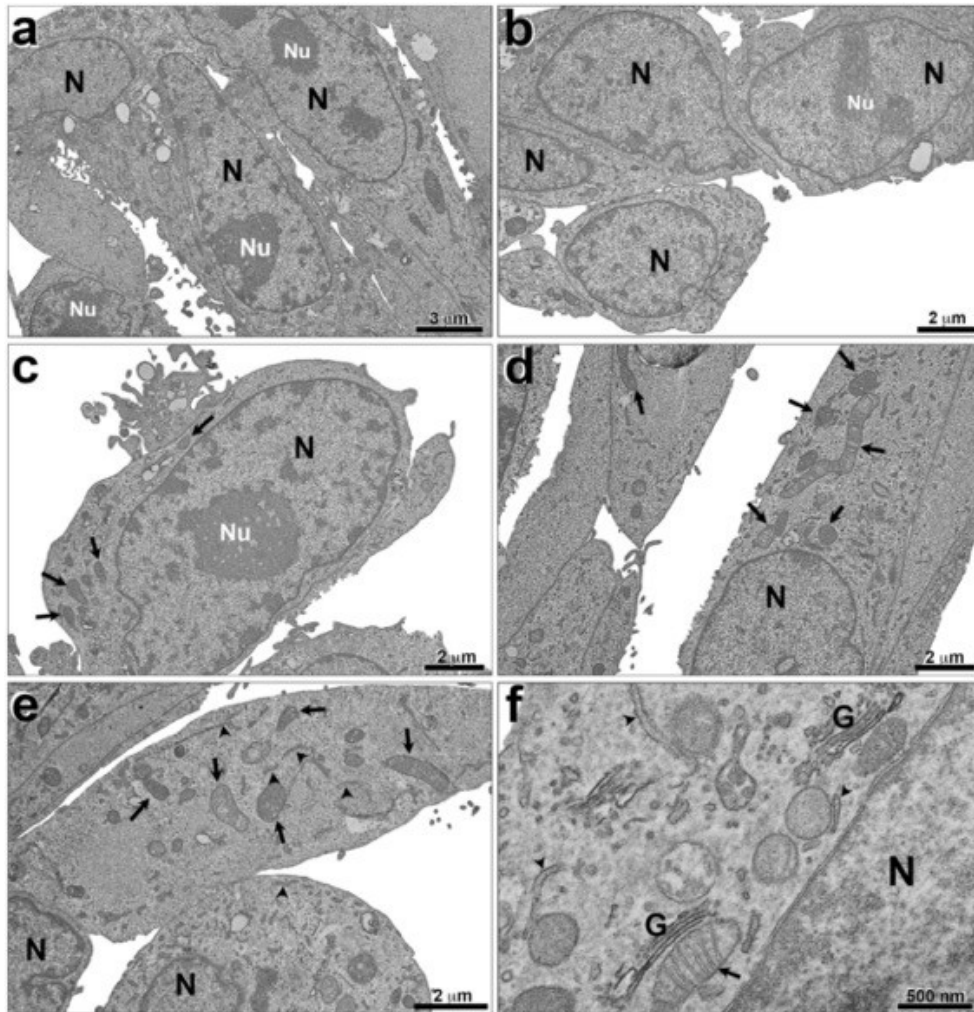


Figura 3.4: Análise ultraestrutural de células derivadas de tumor de mama não expostas a $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$. É possível observar citoplasma preservado (a-d), mitocôndrias (setas), retículo endoplasmático (ponta de seta) e complexo de Golgi (G); núcleo (N); nucléolos (Nu).

As imagens mostraram aumento do retículo endoplasmático (Figura 3.5b) e mitocôndrias (Figura 3.5c). Os resultados mostraram que a exposição à radiação α promoveu uma via clássica de autofagia (Figuras 3.5d, 3.5e e 3.5f) com a formação de autofagossomos e lisossomos. Na Figura 3.5f é possível observar esses auto-fagossomos com sinais autofágicos de morte.

Uma análise quantitativa foi realizada para avaliar a expressão do fenótipo autofágico entre as células que foram expostas e não expostas à radiação como podemos ver na Figura 3.6. Trinta campos aleatórios foram observados por TEM, e o aumento escolhido para análise foi padronizado até o limite de resolução onde as características ultraestruturais da autofagia pudessem ser observadas. A Figura 3.5 mostra um aumento do fenótipo de autofagia em células MDA-MB-231 expostas à radiação quando comparadas a células

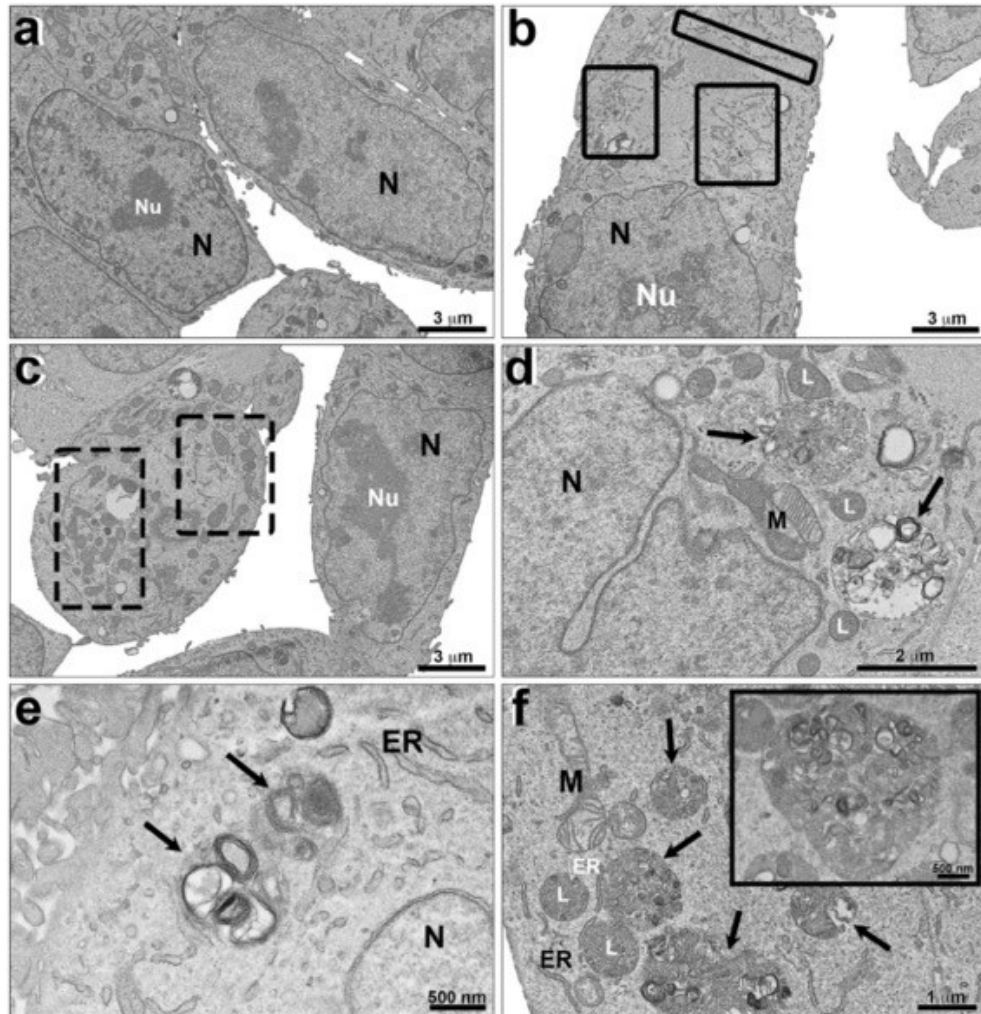


Figura 3.5: Análise ultraestrutural de células derivadas de tumor de mama expostas a $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$. É possível observar um núcleo muito regular e preservado (a - d). Número aumentado de retículo endoplasmático (retângulos com linhas contínuas) (b) e de mitocôndrias (retângulos com linhas tracejadas) (c). Observa-se a presença de membrana ao redor do auto-fagossomo (setas). núcleo (N); nucléolos (Nu); mitocôndrias (M); retículo endoplasmático (RE); lisossomo (L).

não expostas Figura 3.4.

Embora a literatura afirme que as partículas α são responsáveis por danos ao DNA (quebras irreparáveis da fita dupla do DNA) e, conseqüentemente, morte celular [Bannik *et al.* (2019); Dornish *et al.* (2008)], nossos dados sugerem que nenhum efeito no DNA foi observado após o tratamento de 24 horas com 74 kBq de $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$. Este fato é corroborado pela demonstração da integridade da membrana do núcleo. Segundo Kidiyoor *et al.* [Kidiyoor *et al.* (2020)], o envelope do núcleo (membrana) é responsável por proteger mecanicamente a integridade do genoma, a arquitetura nuclear, a dinâmica da cromatina, a expressão gênica, a migração celular e a diferenciação. Assim, a manuten-

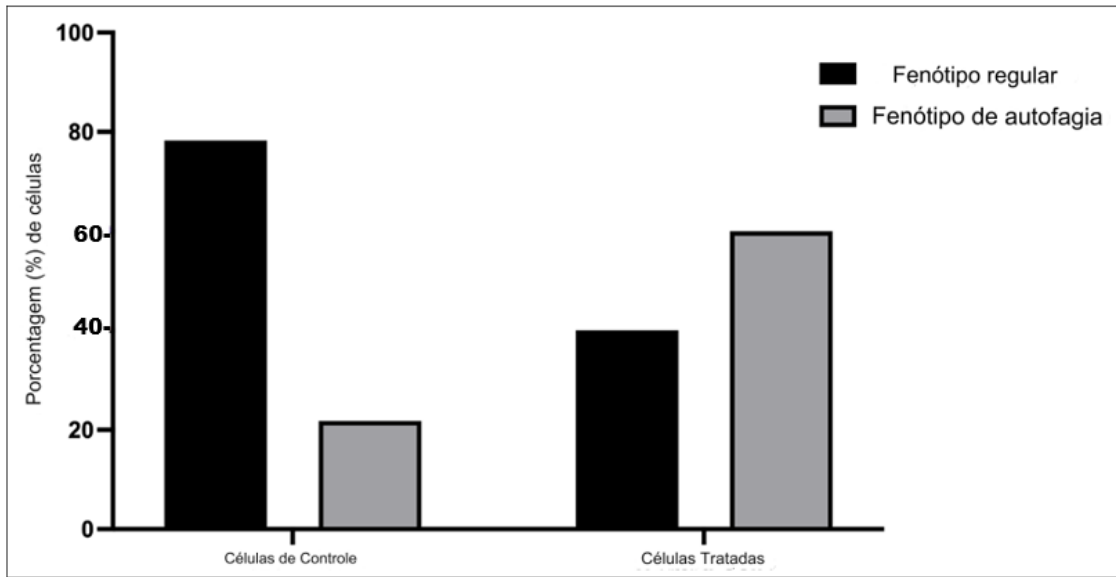


Figura 3.6: Análise quantitativa do fenótipo de autofagia em células de CAMa após exposição ao $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$. Trinta campos aleatórios foram contados usando microscopia eletrônica de transmissão em células expostas e não expostas ao sal de Rádio. Há um aumento das características autofágicas nas células tratadas.

ção da integridade da membrana nuclear é um indicativo da integridade do DNA. Outro sinal de que o DNA foi preservado após o tratamento com $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ foi a observação da presença de cromatina e não formação de heterocromatina. Embora Svetlicic *et al.* [Svetličič *et al.* (2020)], estudando a exposição à radiação fracionada de células de CAMa à radiação, demonstraram a formação de propriedades de heterocromatina e rigidez induzidas pela exposição à radiação fracionada, nossos dados não confirmam esses resultados mostraram controvérsia que a radiação não influencia na dinâmica da cromatina. Estados densos de cromatina, conhecidos como heterocromatina, são facilmente observados pela TEM [Cheutin & Cavalli (2019)]. Danos severos à cromatina geralmente formam grandes agregados de DNA que são vistos como heterocromatina por TEM [Tonnemacher *et al.* (2020)]. Portanto, nossos dados sugerem que não há aumento da heterocromatina. Ainda assim, pela falta de comparação com técnicas bioquímicas, é impossível afirmar que isso não ocorreu em pequenos trechos de DNA.

Embora nossos resultados não tenham demonstrado nenhum efeito significativo no DNA, uma técnica melhor como gama 2HAX deve ser usada para realmente avaliar o efeito do tratamento com radiação alfa no DNA. Além disso, é importante notar que, de acordo com van der Doelen [van der Doelen *et al.* (2020)], $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ produz danos irreparáveis no DNA, que posteriormente podem resultar em morte celular por apoptose,

onde Marques *et al.* [Marques *et al.* (2021)] corroborou esta informação.

A Figura 3.7 mostra o resultado da análise de ER e PCA comparando amostras tratadas e não tratadas. A Figura 3.7A mostra os espectros médios de cada grupo e a dispersão dos dados para os vinte espectros obtidos para cada grupo. Não são observadas diferenças significativas entre os espectros médios, em que não há aparecimento ou deleção de modos vibracionais evidentes. Já na Figura 3.7B mostramos a análise de PCA para esses espectros. Embora os espectros médios não apresentem alterações significativas, a análise de PCA mostra 83,4% da variância total, evidenciando as diferenças entre os grupos. Os principais modos que contribuem para essa diferenciação são, em ordem de relevância, em torno de 1003 cm^{-1} , 1446 cm^{-1} e 1659 cm^{-1} .

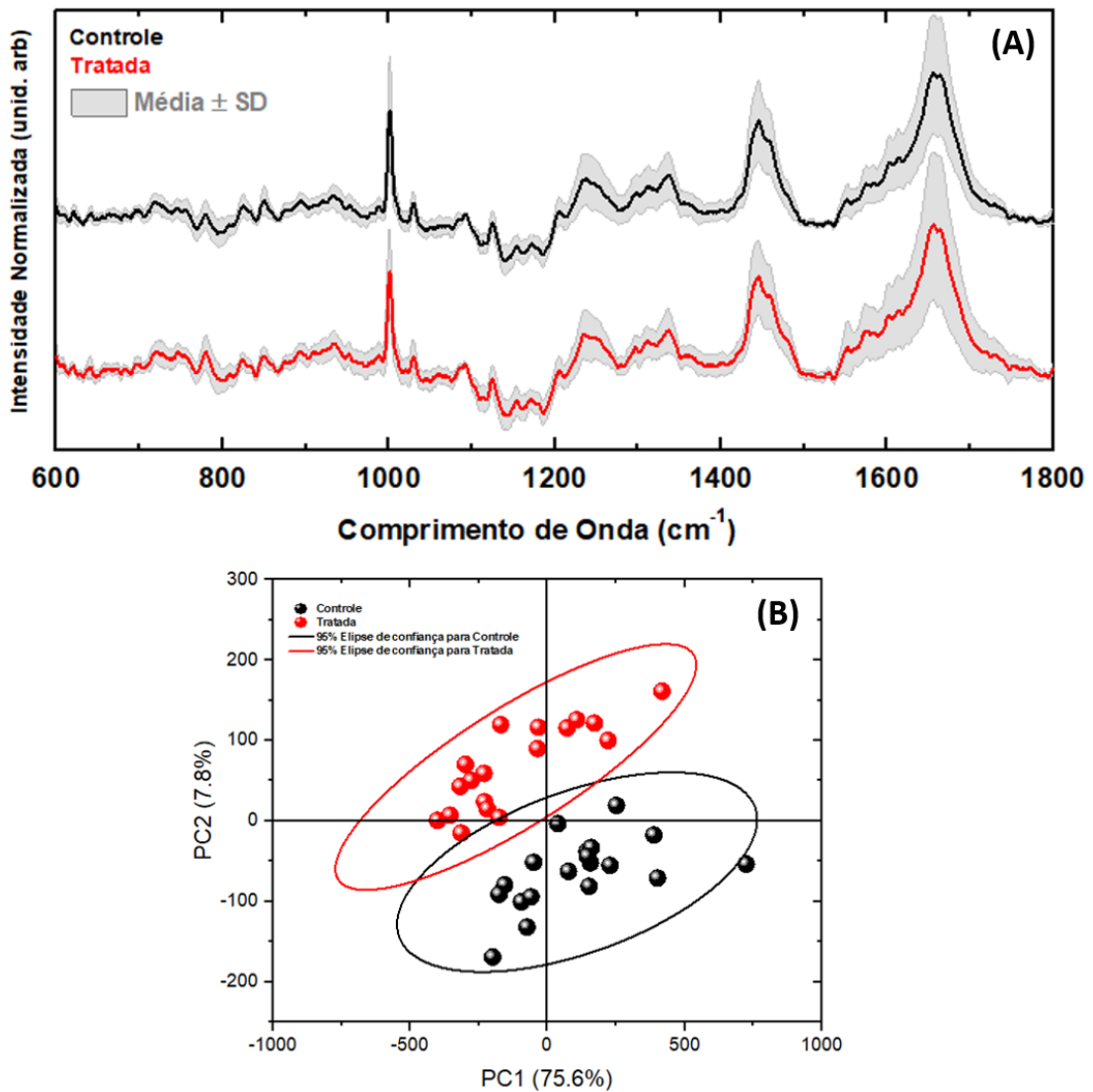


Figura 3.7: Espectroscopia Raman. (A) Espectro médio de células MDA-MB-231 tratadas e não tratadas com $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$. (B) Análise de PCA mostrando a diferenciação entre os grupos com variância total de 83,4%

A análise de ER corrobora fortemente com os dados de AFM. Quando um grupo molecular muda, os modos vibracionais relativos a ele também são alterados. Este fato pode ser verificado por mudanças na intensidade, posição e alargamento do pico do espectro Raman. Dessa forma, podemos determinar quais grupos moleculares da estrutura são mais sensíveis aos efeitos do radiofármaco, trazendo maior compreensão do processo de apoptose celular. Observou-se que a radiação alfa age na estrutura molecular da célula, mas é um desafio identificar visualmente mudanças marcantes nos espectros de amostras não tratadas e tratadas. Porém, com o auxílio da análise multivariada por PCA, foi possível determinar as alterações nos modos vibracionais de forma que haja uma clara distinção entre os grupos tratados e não tratados. De acordo com a análise de componentes principais (PCA) dos espectros, é possível observar que grupos tratados e não tratados são distintos, comprovando que a interação de $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ com a célula a modifica, distinguindo-a das células do grupo controle. As principais diferenças que contribuem para a variância de 83,4% no PCA está associada a intensidades dos modos em torno de 1003 cm^{-1} , 1446 cm^{-1} e 1659 cm^{-1} . De acordo com J. Xu *et al.* [Xu *et al.* (2021)], esses modos estão associados a lipídios e proteínas (1446 cm^{-1} e 1659 cm^{-1}) e fenilalanina (1003 cm^{-1}). Esse resultado entram de acordo com os resultados obtidos por AFM, pois as mudanças observadas na superfície da membrana levariam a mudanças nas bandas de proteínas e lipídios, principais componentes da membrana celular. Conforme observado nas imagens de AFM, as alterações de membrana causadas pela radiação podem estar associadas a alterações na Amida I e nas bandas lipídicas. Alterações nos modos vibracionais associados à fenilalanina estão relacionadas a mudanças no metabolismo celular após a exposição à radiação alfa .

Por fim, os resultados mostraram a formação de lisossomos e fagossomos, representando um dos principais mecanismos envolvidos na morte celular [Noguchi *et al.* (2020)]. De acordo com Noguchi *et al.* [Noguchi *et al.* (2020)], o alvo Akt-mamífero da via do complexo rapamicina (mTORC1) regula a bomba de prótons [vacuolar $\text{H}^{(\pm)}$ adenosina trifosfatase ATPase (v-ATPase)] na membrana lisossomial, que transporta prótons do citosol, assim regulando o processo de acidificação lisossomial necessário para a indução de autofagia. Acreditamos que as partículas, compostas por dois prótons, promovam o desequilíbrio da bomba de prótons, levando a uma massiva formação lisossomial e processo de autofagia.

3.4 Conclusão

A investigação realizada revelou alterações ultraestruturais em células MDA-MB-231 tratadas com $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$, demonstrando deterioração dos componentes da membrana e sem aparente danos ao DNA. A análise de imagens revelou uma diminuição na altura das barras de escala, motivando uma investigação quantitativa mais aprofundada na ultraestrutura da membrana. Os valores de R_q nas amostras tratadas com $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ indicaram uma redução em comparação ao grupo controle e o aumento no número de depressões nos grupos tratados, que parece estar associado à interação entre as partículas α e a membrana celular. Além disso, o tratamento com radiação alfa demonstrou reduzir a rigidez da membrana superficial, fortalecendo a hipótese de alteração nos componentes da membrana. As análises quantitativas de AFM identificaram diferenças significativas na ultraestrutura e nanomecânica celular, claramente relacionadas ao tratamento.

Os dados revelam danos na membrana celular, afetando potencialmente a sobrevivência e a função celular. A radiação ionizante não tem efeitos conhecidos nas células, e não foram observadas diferenças no conteúdo nuclear.

As imagens de TEM mostra células neoplásicas preservadas, com núcleos bem desenvolvidos e citoplasma homogêneo conservado, incluindo mitocôndrias, retículo endoplasmático e complexo de Golgi. As células expostas a $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ apresentam núcleos regulares e preservados, com envelope nuclear intacto e eucromatina, sem heterocromatina observada. As imagens mostram um aumento do retículo endoplasmático e das mitocôndrias, sugerindo uma via clássica de autofagia.

A análise quantitativa avalia a expressão de autofagia em células MDA-MB-231 expostas e não expostas, revelando um aumento nas características ultraestruturais. A literatura sugere que as partículas são responsáveis por danos ao DNA e morte celular, mas nenhum efeito significativo foi observado após 24 horas de tratamento com 74 kBq de $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$. A integridade da membrana nuclear também é indicada, pois foi observada a presença de cromatina e nenhuma formação significativa de heterocromatina.

Os resultados da ER não mostram diferenças visuais significativas entre os espectros médios, porém a análise PCA revela que 83,4% da variação total é explicada pelos principais fatores que contribuem para essa diferença. A análise confirma que as mudanças moleculares do grupo tratado também afetam seus modos vibracionais relativos. Isso pode ser verificado por mudanças na intensidade, posição e largura dos espectros Raman.

Isso ajuda a determinar quais grupos moleculares são mais sensíveis aos efeitos do radiofármaco, permitindo uma melhor compreensão da apoptose celular. O $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ causa sutis alterações na estrutura molecular da célula, mas identificar mudanças significativas em amostras não tratadas é um desafio. A análise PCA revela que os grupos tratados com $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ são distintos, com diferenças de intensidade em torno de 1003 cm^{-1} , 1446 cm^{-1} e 1659 cm^{-1} . Essas diferenças estão associadas à fenilalanina, aos lipídios e proteínas, respectivamente.

Os dados obtidos neste estudo mostraram que as células cancerígenas, quando tratadas com partículas α , sofrem uma degradação massiva da membrana celular, com preservação do invólucro nuclear. Além disso, observou-se que o DNA foi preservado. Nossos dados contribuem para uma melhor compreensão do efeito das partículas, especialmente do radiofármaco $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$, a nível celular.

Parte II

ESTUDO AVANÇADO DO CÂNCER DE PÊNIS: FOCO NAS ALTERAÇÕES BIOFÍSICAS E NA INFLUÊNCIA DO VÍRUS HPV

Capítulo 4

4.1 Introdução

O CAPE é uma neoplasia rara em países desenvolvidos, principalmente na América do Norte e Europa Ocidental, porém é mais comum em países em desenvolvimento, principalmente na Ásia, África e América do Sul [Christodoulidou *et al.* (2015)]. O Brasil é o país da América do Sul com maior prevalência da doença, com índices variando entre 2,9 e 6,8 homens afetados para cada 100.000 homens [Júnior *et al.* (2022)]. O CAPE acomete cerca de 2,1% de todos os casos de câncer masculino no Brasil, sendo que a maioria dos casos ocorre nos estados do Norte e Nordeste (53,2%), que apresentam índices socioeconômicos mais baixos [Paiva *et al.* (2015)]. Assim, o CAPE é um problema de saúde pública, principalmente em áreas com baixos índices socioeconômicos como o Estado do Maranhão. O estado do Maranhão tem visto um aumento na incidência de CAPE nos últimos dez anos, e foi recentemente considerada a região com a maior incidência em todo o mundo [Coelho *et al.* (2018)].

Essa realidade se agrava quando a doença é tipicamente diagnosticada em estágios avançados, resultando em menor sobrevida global. Além disso, o tratamento mutilante traz uma série de consequências físicas e psicológicas negativas para os pacientes. A compreensão dos aspectos histopatológicos é crucial para o planejamento terapêutico e também para o prognóstico do paciente. Portanto, a padronização dos exames anatomopatológicos e a interpretação dos mesmos são essenciais para os oncologistas [Bouvard *et al.* (2009)]. Histologicamente, a grande maioria dos carcinomas escamosos do pênis assemelham-se às neoplasias escamosas de outros órgãos. Os carcinomas oral e cervical compartilham uma semelhança maior. Cerca de 70% dos carcinomas escamosos de pênis são do tipo Usual. Os 30% restantes são categorizados como basalóide, verrucoso,

papilífero e sarcomatóide [Cubilla (2009); Wanick *et al.* (2011)].

No contexto dos subtipos de carcinomas de células escamosas (CEC) de pênis, o subtipo basalóide e sarcomatóide merecem atenção especial. A Figura 4.1 mostra uma imagem de microscopia ótica dos diferentes subtipos histológicos de CAPE, onde a Figura 4.1A é a amostra controle de tecido sem presença de câncer. O subtipo basalóide (Figura 4.1B) trata-se de uma neoplasia altamente agressiva, representando cerca de 4 a 10% dos casos de carcinomas epidermóides. Caracteriza-se pela presença de agrupamentos de pequenas células com escasso citoplasma e um elevado número de figuras mitóticas. A necrose é frequentemente observada. Além disso, esse tipo de carcinoma geralmente penetra profundamente nos tecidos subjacentes, e mais da metade dos pacientes apresentam comprometimento dos linfonodos inguinais no momento do diagnóstico inicial [Cubilla (2009)]. Este subtipo de CAPE está diretamente associado ao papilomavírus humano (HPV).

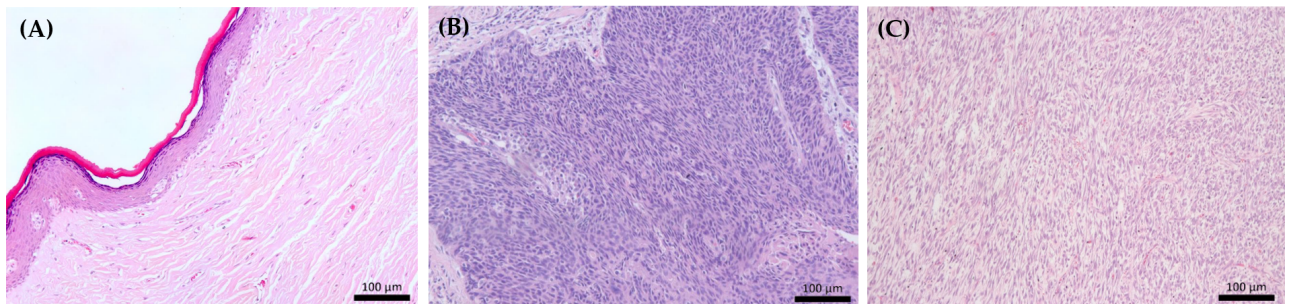


Figura 4.1: Corte histológico dos tecidos do grupo controle e dos portadores de CAPE, corados com Hematoxilina e Eosina (H&E). (A): Controle; (B): basalóide e; (C): sarcomatóide.

O HPV representa um fator crucial na etiologia do câncer de pênis, uma doença maligna que, embora relativamente incomum a nível mundial, representa desafios de saúde significativos em várias regiões, especialmente nos países em desenvolvimento. O câncer de pênis se manifesta principalmente como carcinoma de células escamosas (CEC), que é responsável pela grande maioria dos casos [Moen *et al.* (2023)]. A associação entre HPV e câncer de pênis ressalta o papel do vírus na transformação oncogênica de células epiteliais. O HPV, um vírus DNA da família Papillomaviridae, é conhecido por sua capacidade de infectar células epiteliais da pele e membranas mucosas, levando a uma série de resultados, desde lesões benignas até malignidades [Gheit (2019); Organization (2007)]. O potencial oncogênico do HPV, particularmente dos subtipos de alto risco,

como o HPV 16 e 18, está ligado à integração do seu material genético no DNA da célula hospedeira, interrompendo assim a regulação normal do ciclo celular e promovendo a transformação maligna [Da Silva *et al.* (2021); Williams *et al.* (2011)]. Esse processo é mediado pelas oncoproteínas virais E6 e E7, que interferem nas proteínas supressoras de tumor p53 e retinoblastoma (Rb), respectivamente [Yim & Park (2005)]. O papel da infecção na carcinogênese peniana destaca a importância da vacinação contra o HPV como medida preventiva, que tem sido eficaz na redução da incidência de câncer cervical em mulheres e é promissora para diminuir a carga do câncer peniano relacionado ao HPV.

Embora raro (ocorrendo em menos de 1% dos casos), o subtipo sarcomatóide (Figura 4.1C) demonstra significativa agressividade biológica, atingindo tamanhos consideráveis e penetrando profundamente em estruturas adjacentes. Microscopicamente, caracteriza-se por células fusiformes entremeadas por células de formato anômalo ou gigante, podendo apresentar componentes sarcomatosos, como condrossarcoma ou osteosarcoma. A histologia do CEC sarcomatóide é bifásica, envolvendo a diferenciação dos componentes epitelial escamoso e mesenquimal. No processo de transformação de células escamosas em células fusiformes, a transição epiteliomesenquimal ocorre através da diminuição da expressão da E-caderina, molécula primária de adesão intercelular epitelial, e do aumento da expressão da N-caderina, responsável pelo fenótipo móvel das células [Cubilla (2009)].

Diante da realidade, como da escassez de estudos dedicados ao CAPE e aos métodos terapêuticos, aqui visamos contribuir para um melhor entendimento da biologia tumoral e, conseqüentemente, possibilitar a busca de novos métodos de abordagem, prevenção e terapêuticos para essa patologia. Para preencher essa lacuna de conhecimento, este estudo integra AFM e ER como ferramentas investigativas para um exame ultraestrutural e molecular detalhado de tumores CAPE, focando especificamente nos subtipos sarcomatóides e basalóides. A justaposição de dados ultraestruturais e moleculares destas técnicas avançadas de imagem promete lançar luz sobre a complexa biologia do CEC do pênis, potencialmente abrindo caminho para novas abordagens para suas características patológicas únicas.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Seleção dos Tecidos

As amostras foram coletadas por pesquisadores especializados na área de três hospitais de referência localizados em São Luís, no Maranhão (Hospital Universitário Presidente Dutra, Hospital do Câncer Aldenora Bello e Hospital do Câncer do Maranhão Dr. Tarquínio Lopes Filho). Os participantes foram informados sobre os objetivos da pesquisa, riscos e impactos esperados do estudo. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos. Os sujeitos que aceitaram participar da pesquisa foram entrevistados para coleta de dados socio-comportamentais por meio de instrumento de coleta de dados, enquanto aqueles que não concordaram foram assegurados de que não haveria prejuízos ao tratamento e acompanhamento hospitalar convencional. Após a coleta do material para pesquisa, todos os materiais foram identificados por meio de um código específico do projeto para garantir a confidencialidade e os direitos de privacidade dos participantes.

4.2.2 Critério de Inclusão e Exclusão

Este estudo considerou homens maiores de 18 anos com diagnóstico clínico e anatomopatológico de câncer de pênis, que tiveram a amputação como primeira opção terapêutica. Foram incluídos apenas aqueles que aceitaram participar do estudo mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Não foram incluídos aqueles que haviam realizado quimioterapia ou radioterapia antes do procedimento cirúrgico.

4.2.3 Coleta de Tecido

As amostras utilizadas neste estudo foram coletadas no centro cirúrgico da seguinte maneira: o médico responsável pela amputação coletou pequenos fragmentos de tecido fresco contendo amostra tumoral e não tumoral (controle). As amostras foram armazenadas em duas soluções distintas: (1) RNAlater (ThermoFisher™), para extração de DNA e detecção de HPV, e (2) Formalina tamponada a 10%, para análises biofísicas.

4.2.4 Detecção e Genotipagem de HPV

Para extração de DNA, foi utilizado o kit QIAamp Fast DNA Tissue (Qiagen, Cat. Nº 51404). As amostras extraídas foram avaliadas quanto à qualidade da extração através da quantificação do material total em espectrofotômetro NanoDrop (ThermoFisher TM), com concentrações expressas em ng/ μ L, e avaliação da pureza com medidas 260/280 nm (entre 1,8 e 2,0) e 260/230 (acima de 1). As amostras foram armazenadas a -20°C até serem utilizadas nas etapas subsequentes.

A detecção do HPV foi realizada por PCR convencional (*Polymerase Chain Reaction*) em dois estágios (*nested* PCR). Na primeira PCR, foi utilizado um conjunto de primers genéricos denominado PGMY09/11, descritos por Gravitt *et al.* [Gravitt *et al.* (2000)], que produz um fragmento de 450 pb da região L1 do capsídeo do HPV. Na segunda PCR, foi utilizado o primer GP5+/6+, gerando um amplicon de 170 pb, que também corresponde à região L1 do capsídeo viral. Um par de iniciadores para o gene da β -globina (fragmento de 366 pb) foi utilizado como controle positivo para a reação. A mistura final foi de 25 μ L para cada amostra, utilizando o kit MASTERMIX PCR PLATINUM SUPERFI (Life TechnologiesTM), seguido de 45 ciclos a 94 °C por 45 segundos, 40°C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto; e finalmente 72 °C durante 10 minutos. Os amplicons foram separados em gel de agarose 1,5%, submetidos a voltagem constante de 90V por 40 minutos, sendo considerados positivos apenas aqueles com amplificação para os genes da β -globina e GP5+/6+. Os casos positivos foram sequenciados por eletroforese capilar e suas sequências foram comparadas com aquelas disponíveis em bancos de dados genéticos utilizando o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) para genotipagem viral.

4.2.5 Preparação do Tecido

As amostras de CAPE foram incluídas em parafina e cortadas em ultramicrótomo (modelo LEICA EM UC6), produzindo cortes de 2 μ m de espessura. As biópsias foram depositadas em lâminas de vidro de 13 mm de diâmetro e posteriormente levadas à estufa a 60°C por 30 minutos para desparafinação. Após esse processo, as amostras foram submersas em 30 ml de Xileno e agitadas suavemente por 15 minutos, sendo trocados 30 ml de Xileno a cada 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram reidratadas através de uma sequência de álcool etílico PA 90%, 80% e 70% para reidratação tecidual.

4.2.6 Configuração do AFM

A análise foi realizada no Laboratório de Biofísica e Nanossistemas - LBN, na Universidade Federal do Maranhão - UFMA, utilizando um microscópio de força atômica Multimode 8 (Bruker, Santa Bárbara, CA, EUA) no modo *PeakForce Quantitative Nanomechanics - QNM*. Para tanto, foram utilizadas sondas do modelo qp-HBC (*NanoSensors*) com constante de mola nominal do cantilever de 0,5 N/m e raio de ponta menor que 10 nm. Todos os dados foram obtidos com taxa de varredura de 0,5 Hz e frequência de aquisição de curva de 0,5 kHz. Foram utilizadas três amostras não tumorais (Grupo Controle), três amostras do subtipo sarcomatóide e três amostras do subtipo basalóide. Cada amostra foi submetida a 15 varreduras em pontos distintos. No total, foram analisados 45 mapas de 25 μm x 25 μm para cada grupo. Cada varredura continha 65.536 curvas de força, fornecendo um amplo banco de dados para análise comparativa entre os grupos estudados.

4.2.7 Análise Ultraestrutural

Para os dados do AFM, a análise estatística da rugosidade foi baseada na altura de cada pixel da imagem, analisada a partir do mapa de altura, conforme metodologia descrita por Rates *et al.* [Dias Rates *et al.* (2024)]. Os dados de área e volume foram calculados a partir de mapas topográficos de 25 \times 25 μm de superfície tecidual (controle/tumor) utilizando o software Gwyddion 2.57. O parâmetro de deformação foi calculado usando a razão Área/Volume. Segundo Degiorgio *et al.* [Degiorgio & Corti (1985)], mudanças na área superficial e no volume estão relacionadas a mudanças na composição da membrana celular (tecido) e nos arranjos dos componentes da membrana (tecido) relacionadas a mudanças na área superficial e no volume da célula e, conseqüentemente, na deformabilidade da célula (tecido). Os diâmetros dos furos para tecido basalóide (n = 669) e sarcomatóide (n = 94) foram calculados usando o software Gwyddion 2.57, aplicando a ferramenta de detecção de linha de borda. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão.

4.2.8 Análise por ER

Utilizamos a ER para analisar e identificar as diferenças espectrais obtidas do grupo-controle e dos grupos de pacientes portadores de CAPE, previamente diagnosti-

cados através do método clínico. Os espectros Raman foram adquiridos no Laboratório de Espectroscopia Vibracional e Impedância - LEVI da Universidade Federal do Maranhão - UFMA, as medidas foram executadas no espectrômetro T64000 da Horiba com um sistema de detecção do tipo CCD (*Charge Coupled Device*) resfriado com nitrogênio líquido. Todas as medidas foram obtidas em geometria de retroespalhamento. Para as medidas, foi utilizada a linha de 532 nm como fonte de excitação com sua potência máxima. A visualização da superfície da amostra deu-se mediante o uso de um microscópio da marca *Olympus*, com câmera de vídeo acoplada. Para a focalização do feixe sobre a superfície, utilizamos uma lente de 100x. Foram realizadas nove aquisições com tempos de 20 segundos. A região espectral observada nos experimentos foi dividida nos intervalos de 750 a 1750 cm^{-1} (Baixos Comprimentos de Onda - BCO) e 2650 a 3150 cm^{-1} (Altos Comprimentos de Onda - ACO).

4.2.8.1 Pré-Processamento Espectral

O processamento dos dados foi realizado com o *software LabSpec6*. Os picos estreitos causados por raios cósmicos foram removidos sequencialmente, o fundo de fluorescência variável e o substrato de vidro foram estimados usando o ajuste polinomial de quinta ordem e subtraídos. Cada espectro foi suavizado usando um algoritmo de suavização polinomial antes da análise.

4.2.9 Análise de Componentes Principais - PCA

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi usada no conjunto de dados de espectros, um método de análise estatística que pode reduzir a dimensão dos dados ao mesmo tempo em que responde pela maior parte da variação nos dados originais. Os espectros foram analisados de acordo com a metodologia de YH Ong et al. [Ong *et al.* (2012)], em que a análise de variância é empregada nos scores dos dez primeiros componentes principais para determinar qual PC apresenta diferenças significativas na média dos *scores* entre os dois grupos de células. Utilizamos o *software OriginLab* para esta análise.

4.2.10 Análise Estatística

O teste estatístico segundo critério único foi avaliado por meio de ANOVA e pós-teste de Tukey, considerando que os valores foram estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. As análises estatísticas e os gráficos foram realizados no software ORIGIN. O erro calculado foi o desvio padrão (DP) em todos os dados.

4.3 Resultados e Discussões

Os mapas representativos de AFM de alta resolução de cada grupo revelam alterações ultraestruturais na superfície dos tecidos CAPE, conforme observado na Figura 4.2.

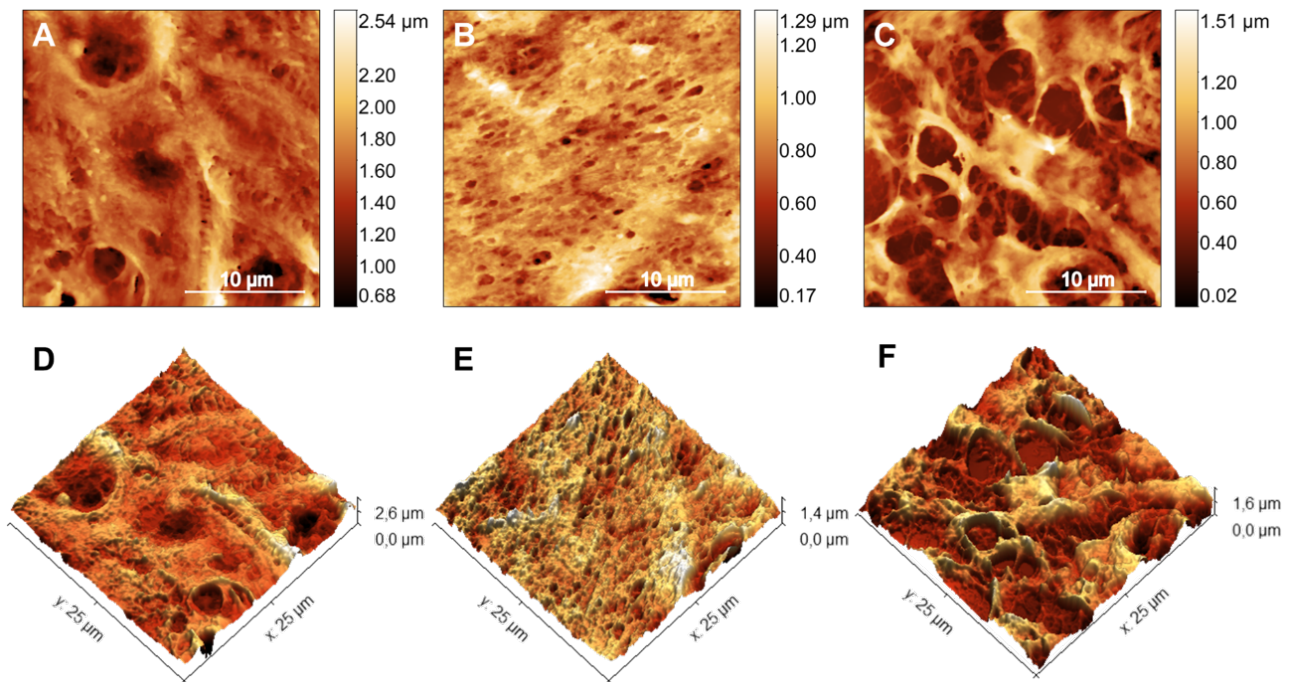


Figura 4.2: Mapas de Microscopia de Força Atômica. Mapas topográficos de 25 x 25 μm da ultraestrutura dos tecidos do grupo controle (não tumorigênicos) (A) e daqueles provenientes de tumores de CAPE: basalóide (B) e sarcomatóide (C) e suas respectivas representações tridimensionais (D-F).

A Figura 4.21A mostra uma varredura de 25 μm sobre uma região não tumoral do tecido peniano e sua respectiva visualização 3D na Figura 4.2D, compatível com a morfologia ultraestrutural preservada da camada do estrato espinhoso [Losquadro (2017)]. Em contraste, a Figura 4.2B (visualização 3D na Figura 4.2E) mostra uma varredura do mesmo tamanho para tecido tumoral de câncer basalóide associado à infecção por HPV

[Humphrey *et al.* (2016)]. A morfologia desse tecido apresentando buracos de tamanho submicrométricos na Figura 4.2B que são devidos a interações virais neste subtipo de câncer. Curioso que este é o CAPE subtipo basalóide, que está associado ao vírus HPV. Além desses aspectos, a presença desses buracos pode prejudicar a eficácia dos medicamentos no combate à propagação do câncer. No tecido do subtipo sarcomatóide CAPE, como mostrado na Figura 4.2C (visualização 3D na Figura 4.2F), vários trechos de tecido formam orifícios micrométricos em sua superfície. Podemos observar que, o tecido portador de CAPE subtipo sarcomatóide, Figura 4.2C, há diversos estiramentos de tecido formando buracos em sua superfície, que está associado a alta vascularidade nos tecidos de câncer e que pode ser um indicativo de um crescimento rápido do tumor, já que a vascularização é necessária para fornecer nutrientes e oxigênio às células cancerígenas. Além disso, a alta vascularidade também pode facilitar a disseminação do câncer para outras partes do corpo através da corrente sanguínea. Estes estiramentos também pode está atrelado as alterações do citoesqueleto. O citoesqueleto é uma rede tridimensional e emaranhada de filamentos proteicos que se estende por todo o citoplasma e é fundamental para a manutenção e organização das células, bem como para o movimento e direcionamento das estruturas internas [Fletcher & Mullins (2010); Ong *et al.* (2020)]. Os filamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários são seus principais constituintes. Esses filamentos desempenham papéis distintos no citoesqueleto. A actina é responsável pela formação de microvilosidades e pela contração muscular, enquanto os microtúbulos são essenciais para o transporte intracelular e a divisão celular. Os filamentos intermediários fornecem suporte estrutural e resistência mecânica às células [Ong *et al.* (2020)]. Portanto, modificações provocadas pelo citoesqueleto podem envolver também alterações na morfologia do tecido. Este fato está possivelmente associado à alta vascularização de capilares nos tecidos cancerígenos, indicando rápido crescimento tumoral, uma vez que a vascularização é necessária para fornecer nutrientes e oxigênio às células cancerígenas [Ribatti & Pezzella (2021)].

Na Figura 4.3, pode-se observar como cada subtipo de CAPE promove fenestrações na ultraestrutura do tecido tumoral. A Figura 4.3A mostra uma imagem representativa do subtipo basalóide, mostrando fenestrações uniformes (ou poros) de diâmetro submicrométrico ($0,69 \pm 0,05 \mu\text{m}$). Tal como acontece com muitos medicamentos [Habiger *et al.* (2016); Huang *et al.* (2012); Michalczyk *et al.* (2022); Yane *et al.* (2019)], que previnem

ou reduzem a sua eficácia, as partículas virais podem ficar presas nesta complexa estrutura porosa, o que pode associar este subtipo à infecção pelo HPV. A Figura 4.3B mostra uma imagem representativa do detalhe da superfície do tecido tumoral do subtipo sarcomatóide. Aqui é possível observar maior presença de regiões escuras (buracos), de tamanho micrométrico (6 ± 1) μm , compatíveis com falhas teciduais. Esses orifícios possuem diâmetro médio compatível com capilares que irrigam o tecido tumoral [Murrant & Fletcher (2022); Takeishi & Imai (2017)]. Quando o suprimento vascular e nutricional alinhado à alta atividade mitótica dos tumores não supre as demandas do microambiente tumoral, ocorre a formação de focos de necrose, típicos do CAPE basalóide e sarcomatóide, visíveis através dos trechos [Velázquez *et al.* (2005)]. Além disso, a alta vascularização também pode facilitar a propagação do câncer para outras partes do corpo através da corrente sanguínea. Este alongamento também pode estar ligado às alterações estruturais do citoesqueleto e do colágeno da matriz extracelular que promovem gradualmente a progressão do câncer [Al Tanoury *et al.* (2010); Meira *et al.* (2005); Xu *et al.* (2019)].

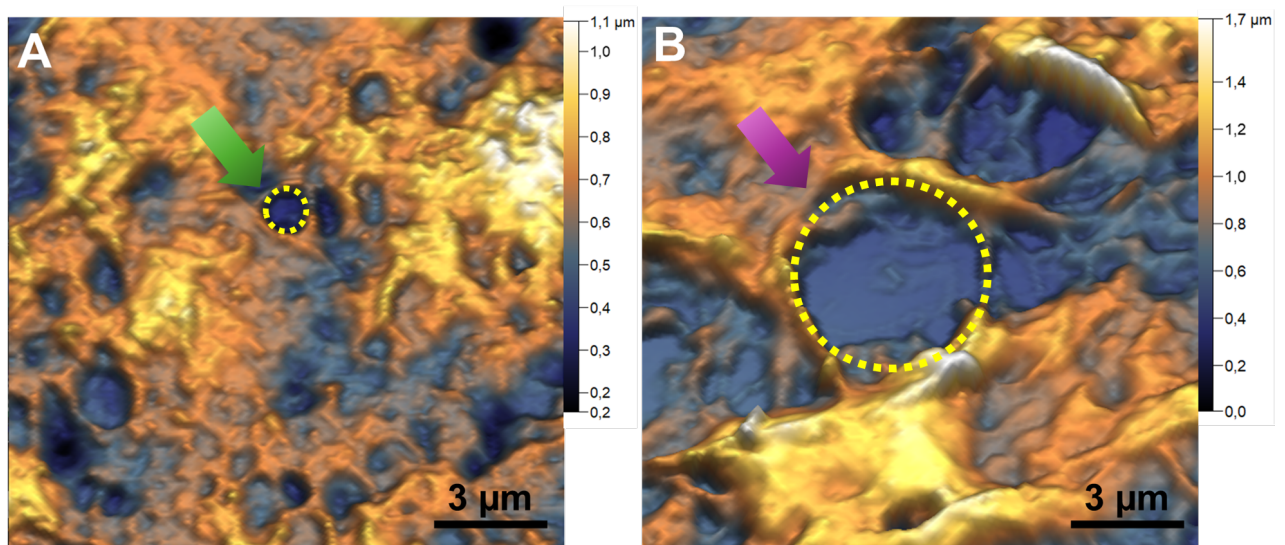


Figura 4.3: CAPE Superfície porosa. Mapas topográficos de AFM da ultraestrutura de tecidos de tumores basalóides (A) e sarcomatóides (B). As setas apontam para os buracos observados nos cortes micrométricos de tumores em cada subtipo de câncer. Círculos pontilhados delimitam os buracos representativos em cada tipo de tumor.

O CAPE sarcomatóide tem caráter bifásico, marcado por um componente escamoso com diferenciação sarcomatosa de células fusiformes. Esta transição epiteliomesenquimal é caracterizada pela diminuição da expressão da E-caderina e aumento da expressão da N-caderina, que é responsável pelo fenótipo móvel das células [Silva *et al.* (2019)]. As caderinas são polipeptídeos responsáveis pela adesão intercelular epitelial, associadas a um

grupo de proteínas cateninas que se ligam aos microfilamentos actínicos do citoesqueleto [Ozawa & Kemler (1998)].

Zemła e colaboradores demonstraram que as conformações mais rígidas dentro da superfície celular são constituídas por filamentos de actina, e os desarranjos estruturais na organização do citoesqueleto foram atribuídos à menor rigidez celular, conferindo ao câncer um aspecto móvel, o que se correlaciona com as modulações causadas por perdas de caderinas ligadas à E-actina [[Zemla *et al.* (2018)]. Alterações na dinâmica do citoesqueleto, mediadas por alterações na expressão da caderina, podem influenciar a morfologia celular, indicada por alterações de área e volume, que expressam redução nos dados de volume e área no grupo sarcomatóide.

Outra possível explicação para descrever as alterações estruturais e funcionais do citoesqueleto de actina é a L-plastina, um grupo de proteínas de ponte de actina que contribuem para a invasão de células tumorais de maneira dependente da fosforilação [Al Tanoury *et al.* (2010)]. A fosforilação da L-plastina em seu resíduo Ser5 aumenta sua capacidade de interagir com a actina, influenciando assim sua localização intracelular [Al Tanoury *et al.* (2010)]. O fornecimento de energia para desencadear a fosforilação no resíduo de L-plastina pode estar associado a enzimas glicolíticas, que nas células cancerígenas, devido à alta taxa de glicólise, estão aumentadas, produzindo trifosfato de adenosina (ATP) nas proximidades do citoesqueleto através da ligação reversível de enzimas glicolíticas para o citoesqueleto [Meira *et al.* (2005)].

O CAPE possui subtipos associados ao HPV, como o basalóide, e subtipos não associados, como o sarcomatóide [Júnior *et al.* (2022)]. A carcinogênese peniana relacionada ao HPV, típica do subtipo basalóide, surge da superexpressão das oncoproteínas virais E6 e E7, causando desregulação do ciclo celular e instabilidade genômica [Yim & Park (2005)]. A oncoproteína viral E6 interfere na via p53, uma proteína supressora de tumor, inibindo a apoptose ao direcionar a proteína para degradação. A inibição da p53 pelo E6 promove proliferação celular exacerbada e imortalização de células tumorais. No entanto, a carcinogênese não associada ao HPV, como no subtipo sarcomatóide, pode resultar de alterações mutagênicas nos genes supressores de tumor [Thomas *et al.* (2021)]. Num estudo realizado por Jacob *et al.*, pacientes com câncer peniano metastático apresentavam mutações no TP53 [Jacob *et al.* (2019)]. Eles foram negativos para HPV, sugerindo que mutações no TP53, e consequente superexpressão de p53, estavam associadas a metástases

em pacientes com câncer avançado e diminuição da sobrevida dos pacientes [[Júnior *et al.* (2022)]. A via p53 é um regulador na formação da assinatura 3 de colágeno associada ao tumor, que é referida como um feixe de colágeno angulado de 60° a 90° em relação à borda do câncer e é indicado pela proliferação e invasão do câncer [Xu *et al.* (2019)]. As alterações mostram que o subtipo sarcomatóide apresenta especificidade na expressão do colágeno na matriz extracelular que pode alterar suas propriedades nanomecânicas e ultraestruturais, como a redução de área e volume, associadas a modulações da matriz extracelular (MEC) que favorecem a formação de fissuras.

Motivados por essas diferenças ultraestruturais qualitativas observadas nos tecidos tumorais em relação ao tecido não tumoral e também entre os diferentes tipos de tumores (basalóide e sarcomatóide), analisamos parâmetros ultraestruturais quantitativos dos grupos, como rugosidade quadrática média da superfície do tecido, área superficial, volume e deformação associada à imagem do tecido (razão A/V). Os resultados podem ser vistos no painel mostrado na Figura 4.4. O gráfico de dispersão mostrado na Figura 4.4A apresenta os resultados médios quadráticos da rugosidade para cada grupo analisado. Os valores médios e seus respectivos desvios padrão são (284 ± 8) nm, (360 ± 10) nm e (284 ± 8) nm para os tecidos controle, basalóide e sarcomatóide. Um maior número de orifícios (fenestrações) no tecido tumoral basalóide se reflete no aumento do resultado de rugosidade, o que pode estar associado à maior capacidade desses tumores em capturar uma maior quantidade de partículas virais. A modificação na rugosidade da superfície pode estar associada a processos biológicos subjacentes ao desenvolvimento do câncer, como a proliferação celular descontrolada e a reorganização da MEC [Huang *et al.* (2021)]. As células cancerosas metastáticas exibem uma expressão expandida de proteínas de transporte, como canais iônicos, transportadores iônicos e aquaporinas. Estas proteínas de transporte de íons/água, como NHE1, NKCC1, AE2, ENaC, AQPs, canal IK, VRACs, CIC-3 e TMEM16s, frequentemente demonstram atividade ou expressão elevada em células cancerígenas. O aumento na expressão dessas proteínas de membrana pode justificar a rugosidade observada no basalóide e sarcomatóide, indicando uma possível adaptação dos tecidos cancerosos para uma disseminação mais eficaz e invasiva em outros tecidos [Morishita *et al.* (2019)].

A Figura 4.4B apresenta o gráfico de dispersão dos valores de área superficial dos tecidos de cada grupo analisado. Os valores médios obtidos foram (810 ± 10) μm^2 , $(738 \pm$

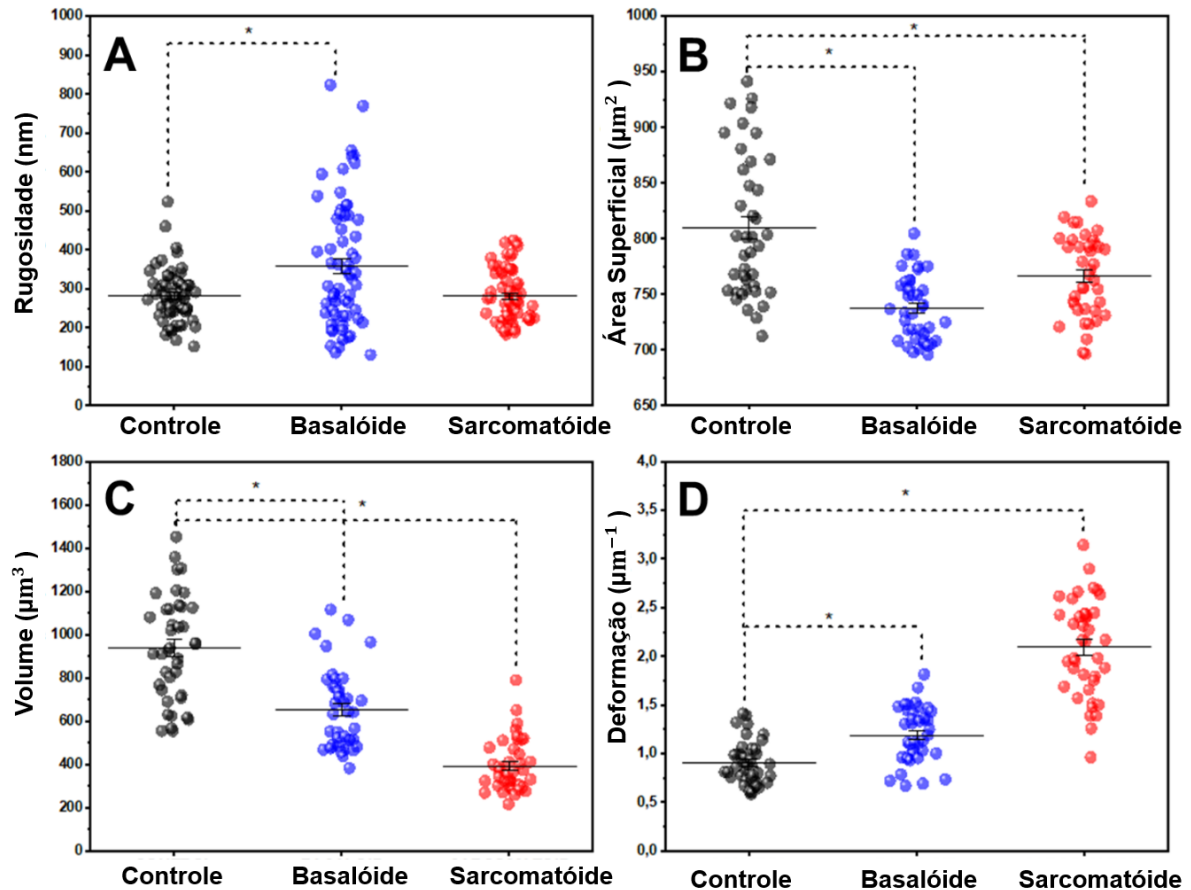


Figura 4.4: Dados quantitativos de AFM. Dados quantitativos de propriedades ultraestruturais de tecidos do grupo controle, não tumorigênicos, e de pacientes com CAPE. (A) Rugosidade, (B) Área de Superfície do tecido, (C) Volume e (D) Gráficos de Dispersão de Deformação. O (*) indica diferenças significativas no teste ANOVA com Turkey para $p < 0,05$.

5) μm^2 e $(767 \pm 6) \mu\text{m}^2$, respectivamente, para os grupos controle, basalóide e sarcomatóide. Aqui é possível observar uma tendência, com relevância estatística, de diminuição da área superficial dos tecidos tumorais quando comparados com os não tumorais. Com essa redução da área superficial dos tecidos do CAPE, mais evidente no subtipo basalóide, acometido pelo vírus HPV. Ao comparar as amostras com o grupo controle, pode-se observar nos mapas um padrão semelhante, com diminuição da altura entre as amostras sarcomatóide e basalóide. Essa redução na área de superfície sugere maior agressividade do tumor, principalmente nos subtipos basalóide e sarcomatóide, classificados como agressivos e com alta taxa de metástases nodais [Ereno *et al.* (2008); Gupta *et al.* (2018)].

A Figura 4.4C apresenta os resultados de volume dos mapas obtidos dos tecidos analisados. Os valores médios obtidos foram $(940 \pm 40) \mu\text{m}^3$, $(660 \pm 30) \mu\text{m}^3$ e $(30 \pm 20) \mu\text{m}^3$ para os grupos controle, basalóide e sarcomatóide, respectivamente. Assim como a

área superficial, os mapas obtidos nas amostras de tecido tumoral apresentaram volume médio reduzido em comparação ao grupo controle. Proteínas de transporte, como canais iônicos, transportadores de íons e aquaporinas (AQPs), regulam o volume celular durante a exposição ao estresse osmótico [Morishita *et al.* (2019)]. Estudos indicam que o fluxo de água relacionado aos gradientes osmóticos gerados pelo transporte iônico contribui para a migração celular [Loitto *et al.* (2002); Oster & Perelson (1987); Rosengren *et al.* (1994); Stroka *et al.* (2014)]. Foi relatado que a migração celular é atenuada pela hipertonicidade extracelular; o encolhimento celular, que inibe o volume local, facilitaria a migração celular [Rosengren *et al.* (1994)]. Além disso, o gradiente osmótico é responsável por regular a expressão de proteínas de transporte de íons/água e suas mudanças de localização na membrana, modulando os ciclos de protrusão da borda dianteira e retração da parte posterior da célula durante a migração [Stroka *et al.* (2014)]. Esses aspectos demonstram que alterações na expressão proteica em células metastáticas, alteradas pelo estresse osmótico extracelular, impactam diretamente na migração celular, típica do câncer metastático. A correlação com dados de volume e deformação mostra que alterações na estrutura celular causadas pela osmolaridade do meio podem impactar na redução do volume celular metastático e aumentar a deformação celular dos subtipos basalóides e sarcomatóides em comparação ao grupo controle.

O gráfico apresentado na Figura 4.4D mostra o gráfico de dispersão da deformação superficial calculada a partir dos parâmetros geométricos das imagens obtidas de cada grupo. Os valores médios encontrados foram, respectivamente, $(0,91 \pm 0,03) \mu\text{m}^{-1}$, $(1,20 \pm 0,04) \mu\text{m}^{-1}$ e $(2,10 \pm 0,07) \mu\text{m}^{-1}$ para os grupos controle, basalóide e sarcomatóide. É possível observar maior deformabilidade em amostras tumorais do que em amostras não tumorais. Este fato pode estar associado à maior capacidade de deformação tumoral em nível celular [Chen *et al.* (2018); Yu *et al.* (2022)], uma vez que estamos analisando a ultraestrutura dos tecidos tumorais, o que possibilita maior invasão desses tumores em novos sítios [Rebello *et al.* (2013b)].

O rápido crescimento das células cancerígenas pode exceder a capacidade de fornecimento de sangue, levando a áreas de necrose devido à falta de oxigênio e nutrientes [Liu & Jiao (2019); Mehrabi *et al.* (2018)]. A compressão dos vasos sanguíneos circundantes pode resultar em atrofia [Jain *et al.* (2014)]. Ambos os subtipos de câncer, basalóide e sarcomatóide, apresentam altas taxas de mitose e áreas de necrose, sendo o

basalóide caracterizado por comedonecrose. A atividade mitótica excessiva em relação ao suprimento vascular e nutricional pode resultar em necrose tecidual [Liu *et al.* (2024); Penna *et al.* (2017)], influenciando as medidas de área e volume observadas nos mapas de AFM. Condições hipóxicas na MEC rica em colágeno, intensificadas pela interação entre células cancerígenas e colágeno, afetam o suprimento vascular. Fatores como HIF-1, LOX e metaloproteinase desempenham papéis nesse processo, pois estão relacionados a vasos sanguíneos cancerosos. A firmeza do colágeno na matriz afeta o crescimento vascular, impactando na formação de focos necróticos e fissuras identificadas por AFM [Xu *et al.* (2019)]. O aumento da deformação nos grupos basalóide e sarcomatóide pode ser explicado pelos mesmos mecanismos, visto que a deformação está diretamente correlacionada com área e volume.

Neste trabalho, também foram obtidos espectros Raman dos cortes de tecido de pênis não tumoral, bem como de tecidos de CAPE do tipo sarcomatóide e basalóide, para fins de comparação espectral, conforme mostrado na Figura 4.5. Estes espectros visam detectar modos vibracionais de biomoléculas em CAPE, como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, oferecendo informações sobre a sua composição. Esses modos podem variar dependendo do tipo de câncer e são cruciais para a análise precisa do tecido cancerígeno. A técnica ajuda na caracterização bioquímica e estrutural do câncer, permitindo a identificação de biomarcadores específicos que podem auxiliar no diagnóstico e tratamento da doença.

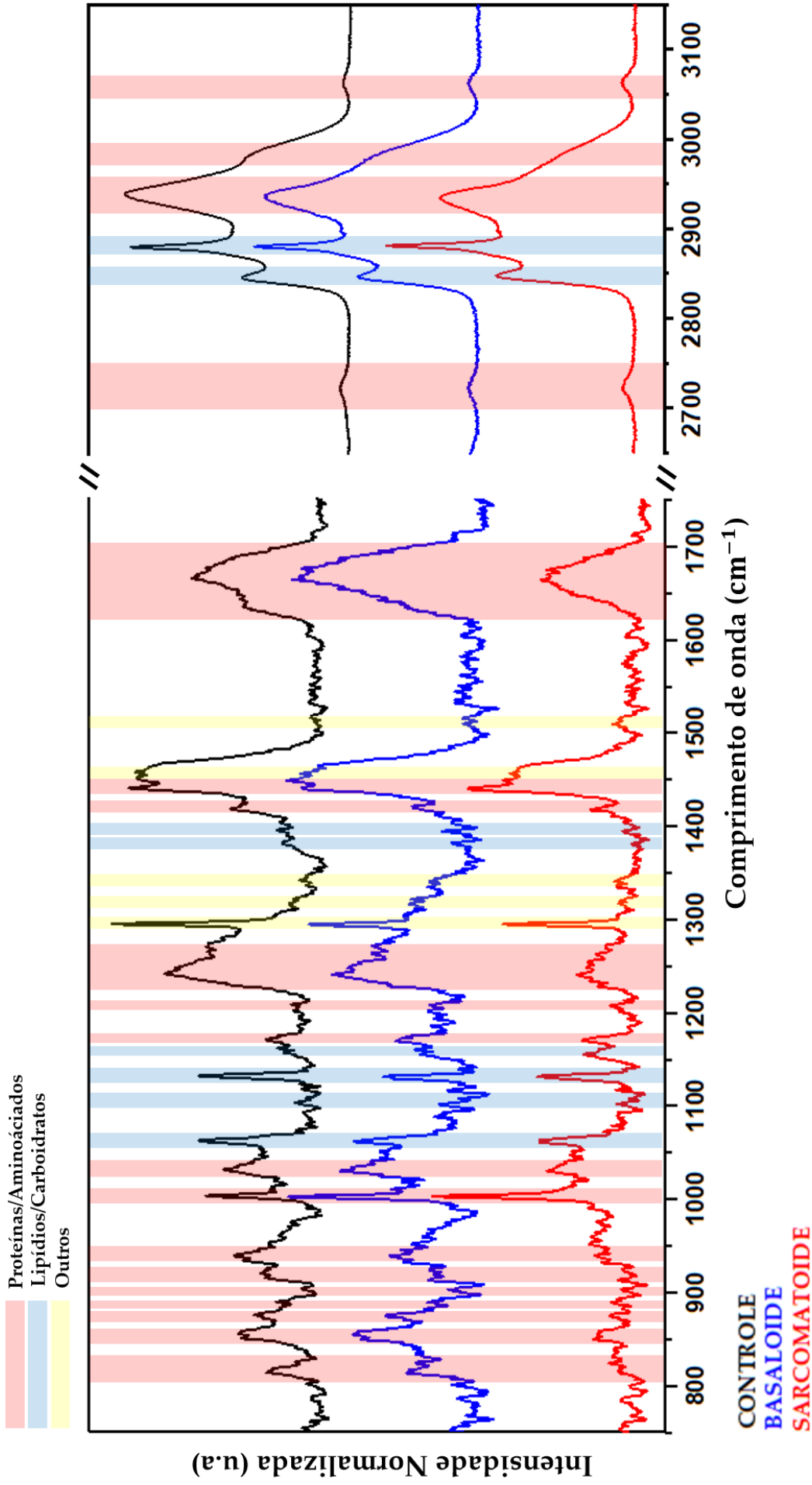


Figura 4.5: Identificação vibracional. Espectros médios e identificação dos modos relacionados ao grupo controle (Preto); grupo sarcoma-
tóide (vermelho) e; grupo basalóide (azul).

Nos espectros, é possível identificar modos vibracionais das principais componentes bioquímicas que compõem os tecidos de CAPE, incluindo lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. As maiores discrepâncias entre os tecidos não tumorais e dos diferentes tumores penianos aparecem nos modos situados na faixa dos baixos comprimento de onda (BCO) 700 a 1800 cm^{-1} , onde são observados modos vibracionais relacionados às proteínas, como o modo de Prolina (919 cm^{-1}) e estiramentos das ligações C - H e C = C (1392 cm^{-1} e 1416 cm^{-1} , respectivamente). Na faixa entre 1239 a 1272 cm^{-1} , atribuída à Amida III e na região 1638 a 1665 cm^{-1} , atribuída à Amida I, que são grupos compostos por átomos de carbono, oxigênio e nitrogênio (CONH), que desempenham um papel crucial na formação de proteínas. Essas ligações são essenciais para conferir rigidez estrutural e também fornecem informações sobre a organização da estrutura secundária nos tecidos de CAPE.

Além disso, foram identificadas alterações nas bandas correspondentes a lipídios (1131 e 1381 cm^{-1}). Esses modos refletem a composição, organização e estrutura dos lipídios nos tecidos cancerígenos de pênis, fornecendo informações valiosas sobre a bioquímica desses tecidos. A presença de citosina (1514 cm^{-1}) no tecidos CAPE indica como mutações ou alterações epigenéticas, podem ser críticas na transformação de uma célula normal em uma célula cancerígena .

Na região de altos comprimentos de onda (ACO) do espectro Raman, entre 2700 e 3100 cm^{-1} , são detectadas as bandas de estiramento das ligações C - H dos lipídios presentes nas membranas dos tecidos CAPE, descrito por Matthews *et.al.* [Matthews *et al.* (2010)]. Esse resultado, apesar de não demonstrar o precursor da quebra lipídica, evidencia que estes componentes muito provavelmente estão relacionados com a transformação carcinogênica. Essas vibrações também fornecem informações cruciais sobre a composição e a organização dos lipídios nas camadas lipídicas dos tecidos CAPE, desempenhando um papel fundamental na integridade e na permeabilidade das membranas. Da mesma forma que na região de baixos comprimentos de onda, também observamos variações nas intensidades dos modos relacionados aos grupos bioquímicos associados ao CAPE.

Os comprimentos de onda específicos para cada um dos modos identificados podem ser encontrados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Atribuições de cada modo do espectro Raman do tecido [Dodo *et al.* (2022); Talari *et al.* (2015)].

Número de Onda (cm^{-1})	Aminoácidos/Proteínas	Carboidratos/Lipídios	Outros
813	C - C str.		
856	Prolina		
874	C - C str.		
888	Proteína		
919	Prolina		
937	Prolina		
1002	Fenilalanina		
1031	Fenilalanina		
1058		Lipídios	
1100		Lipídios	Ácido graxo
1131		Fosfolípido	
1159			
1169		Lipídios	
1207	Hidroxiprolina, Tirosina		
1239 - 1272	Amida III		
1293			Citosina
1315			Guanina
1340			Ácido Nucleico
1381		δCH_3	
1392			
1402	C - N str.		
1416	Grupos Metil ben.		
1450	C = C str		
1450	CH_2 ben.		
1458			
1514			
1638 - 1665	Amida I		Ácido Nucleico
2728	C-H str.		Citosina
2853		CH_2 sym. str.	
2888		CH_2 asym. str	
2935		CH_3 sym. str	
2960 - 2980		CH_3 asym. str	
3008		= CH str.	
3030	Aromático	Aromático	

Finalmente, para avaliar a capacidade discriminatória do método utilizado por meio de uma análise multivariada, realizou-se a Análise por Componentes Principais (PCA) de todos os dados contidos nas regiões de BCO e ACO. No total, foram analisados 30 espectros de cada grupo de amostra, aptos à análise estatística. As elipses presentes no gráfico delimitam a região na qual 95% dos dados estão incluídos. Na Figura 4.6, estão evidenciadas as três primeiras componentes principais que resultam em uma boa variabilidade total do conjunto de dados.

Podemos perceber uma distinção estatisticamente significativa entre os espectros obtidos das amostras controle e os tecidos do tumores sarcomatóide e basalóide. Essa distinção estatisticamente significativa indica que existem diferenças nas características espectrais desses grupos. Essas diferenças podem ser exploradas para desenvolver métodos de diagnóstico mais precisos e eficientes para esses tipos de tecidos.

Ao analisar os dados espectrais dos subtipos basalóide e sarcomatóide, foi identificada uma distinção estatisticamente significativa entre os espectros desses dois tipos de amostras, indicando diferenças em suas características espectrais. No entanto, a proximidade das elipses sugere uma relação ou similaridade entre esses subtipos. Isso implica que, embora seja possível distinguir os tumores basalóide de sarcomatóide com base nas diferenças estatísticas, há também uma sobreposição ou proximidade em algumas áreas espectrais. Assim, apesar das diferenças que permitem a distinção, existem certas características espectrais compartilhadas entre os dois subtipos, refletidas na proximidade das elipses de confiança.

Esses resultados são valiosos, pois sugere a possibilidade de explorar as semelhanças e diferenças identificadas para desenvolver métodos de diagnóstico mais precisos e eficientes para distinguir entre os grupos controle, basalóide e sarcomatóide. Em outras palavras, a análise multivariada fornece informações sobre a variação global nos dados espectrais e destaca aspectos diferentes e compartilhados entre esses grupos, o que pode ser útil no desenvolvimento de abordagens diagnósticas mais refinadas.

4.4 Conclusão

Com o objetivo de investigar as propriedades ultraestruturais e vibracionais dos tecidos de CAPE, tanto basalóide quanto sarcomatóide, comparando com amostras de

tecidos não tumorais, foram utilizadas técnicas biofísicas como o AFM e a ER. Dada a escassez de estudos sobre essa patologia, nossos resultados são de grande relevância para a compreensão da biofísica tecidual envolvida.

Os mapas de AFM de alta resolução de amostras CAPE mostram alterações ultraestruturais na superfície do tecido CAPE. O tecido CAPE sarcomatóide apresentou estiramentos em sua superfície, possivelmente devido à alteração do citoesqueleto, uma rede proteica tridimensional essencial para manutenção e organização celular. A AFM fornece investigação detalhada de estruturas micrométricas, incluindo rugosidade, área e volume, permitindo uma análise mais precisa das características estruturais e propriedades funcionais dos tecidos. Os resultados de rugosidade (R_q) mostram um aumento nos valores dos tecidos afetados pelo câncer em comparação aos tecidos controle, indicando que os tecidos afetados pelo câncer estimulam a erosão da membrana, resultando em uma superfície mais afetada, possivelmente relacionada ao grau de agressividade dos tumores. A perda de proteínas e lipídios nas células cancerígenas pode aumentar a rugosidade nos tecidos de CAPE, afetando a comunicação celular e o crescimento do câncer.

A rugosidade na superfície dos tecidos cancerígenos, como os subtipos basalóide e sarcomatóide de CAPE, pode estar relacionada à proliferação celular descontrolada e à reorganização da matriz extracelular. A expressão aumentada de proteínas de transporte, como canais iônicos e aquaporinas, em células cancerígenas pode explicar o aumento da rugosidade, indicando adaptação para disseminação eficaz. Além disso, a perda de componentes celulares, como proteínas e lipídios, nas células cancerígenas pode comprometer a adesão celular, afetando a integridade da membrana e promovendo um ambiente propício para o crescimento e disseminação do câncer.

Os resultados indicam um decréscimo na área superficial dos tecidos de células aderentes de pênis (CAPE), sendo mais pronunciado no subtipo basalóide, afetado pelo vírus HPV. Essa redução sugere maior agressividade, dada a associação do basalóide com tumores agressivos e alta taxa de metástase nodal. Na análise dos volumes, observa-se uma diminuição nas amostras basalóide e sarcomatóide, indicando possível falta de suprimento sanguíneo e necrose associada ao rápido crescimento celular. Tanto o basalóide quanto o sarcomatóide exibem elevadas taxas de mitose e áreas de necrose, influenciando nas medidas de área e volume. Condições hipóxicas na matriz extracelular rica em colágeno também afetam o fornecimento vascular, relacionadas a fatores como HIF-1, LOX e Me-

taloproteinase. Os resultados de deformação sugerem maior deformabilidade nos tecidos de CAPE, indicando correlação com área e volume, explicada pelos mesmos mecanismos nos grupos basalóide e sarcomatóide.

Espectros de tecido de pênis controle e tecidos de CAPE, sarcomatóide e basalóide, são obtidos para comparação espectral. Esses espectros revelam os modos vibracionais das principais biomoléculas presentes nos tecidos CAPE, como lipídios, proteínas e ácidos nucléicos. Observamos diferenças na intensidade dos sinais em regiões de BCO entre os tecidos controle e os de CAPE. Além disso, na região de ACO, identificamos as ligações C-H dos lipídios presentes nas membranas do tecido CAPE. Essas informações são cruciais para entender a composição e organização das cadeias lipídicas, desempenhando um papel fundamental na integridade e permeabilidade da membrana.

A capacidade discriminatória do método foi avaliada por meio de análise multivariada de todos os dados das regiões BCO e ACO. Foram analisados 30 espectros de cada amostra, com 95% dos dados incluídos. Os resultados mostraram diferença estatisticamente significativa entre amostras controle e tecidos sarcomatóide e basalóide, indicando diferenças nas características espectrais. Essas diferenças podem ser exploradas para métodos diagnósticos mais precisos e eficientes para esses tipos de tecidos.

Essas descobertas têm implicações promissoras para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico mais precisos e eficientes para o câncer. Ao compreender melhor as características ultraestruturais e espectrais das células tumorais, pode-se trabalhar na criação de abordagens diagnósticas mais sensíveis, preditivas e específicas, permitindo uma detecção mais precoce e um planejamento terapêutico mais direcionado para pacientes com câncer. Essa pesquisa representa um passo importante em direção a avanços significativos no campo da oncologia.

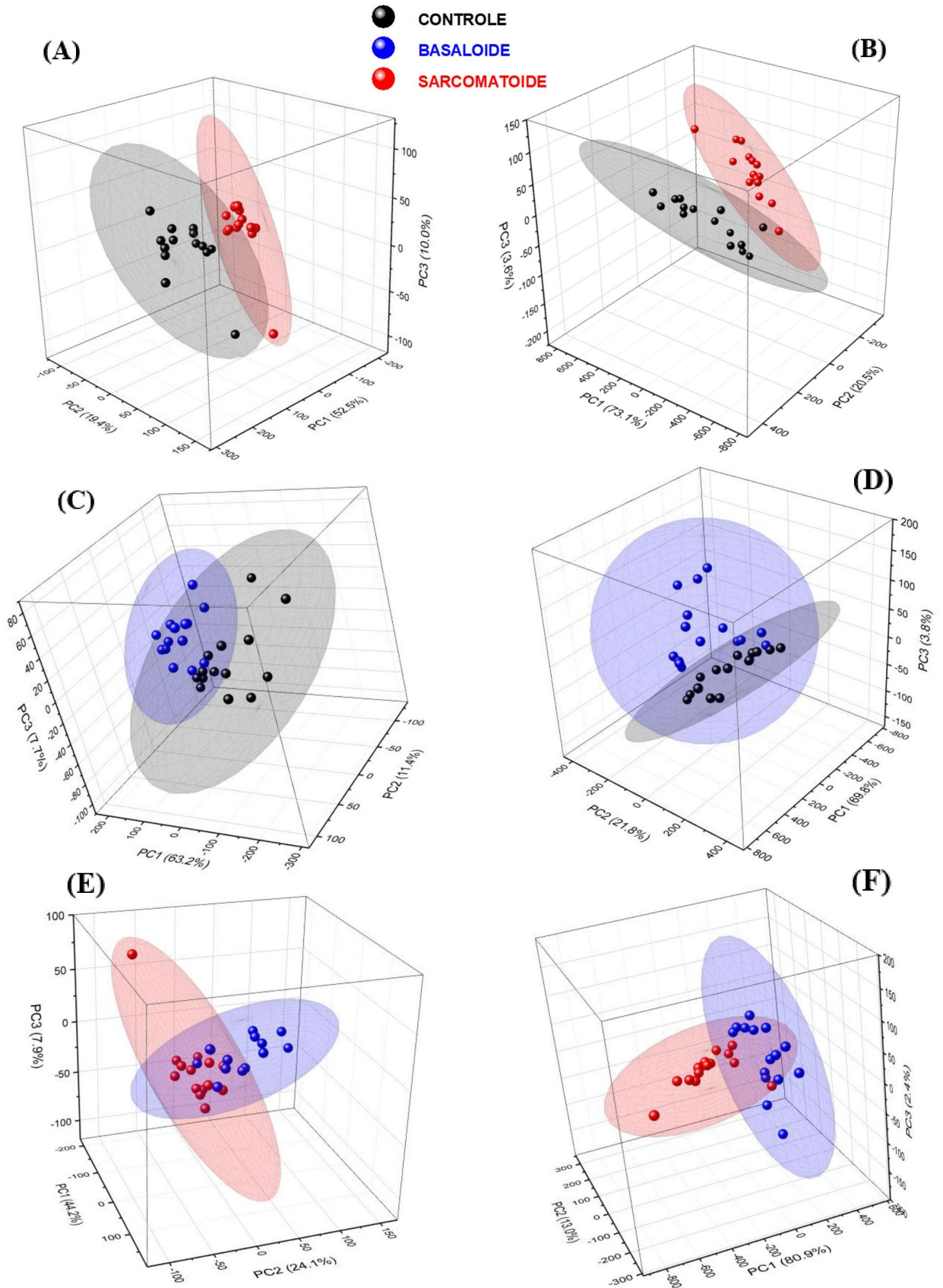


Figura 4.6: Análise de PCA dos grupo controle com os tecidos sarcomatóide e basalóide. (4.6A) controle x sarcomatóide em BCO; (4.6B) controle x sarcomatóide em ACO; (4.6C) controle x basalóide em BCO; (4.6D) controle x basalóide em ACO (4.6E) sarcomatóide x basalóide em BCO e; (4.6F) sarcomatóide x basalóide em ACO.

Capítulo 5

Conclusões e Perspectivas

Em vista do impacto significativo do câncer na saúde global e da busca incessante por métodos de diagnóstico mais eficazes, esta pesquisa representa um passo promissor em direção a avanços no entendimento e identificação precoce dessa doença devastadora. Ao empregar técnicas de microscopia, como Microscopia de Força Atômica (AFM), Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) e a técnica de espalhamento de luz, Espectroscopia Raman (ER), conseguimos obter *insights* valiosos sobre as características morfológicas e vibracionais de células e tecidos cancerígenos. Os resultados obtidos mostraram a capacidade dessas técnicas de revelar alterações ultraestruturais e nanomecânicas em células tratadas com $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$, destacando seu potencial para avaliar a resposta ao tratamento que vai além das alterações em material genético. Avaliar, de forma pioneira, a resposta ao tratamento com a perspectiva da Biofísica [Filho *et al.* (2023)].

Além disso, a análise de tecidos CAPE (basalóide e sarcomatóide) revelou mudanças significativas em suas propriedades ultraestruturais e biomecânicas, apontando para a possibilidade de utilização dessas técnicas na identificação de características distintivas do câncer. Essas descobertas, juntamente com a análise discriminatória, sugerem a promissora perspectiva de desenvolvimento de métodos diagnósticos mais precisos e eficientes para diferentes tipos de câncer. Além da participação do vírus HPV nas propriedades Biofísicas do tecido tumoral. À medida que continuamos a explorar e aprimorar a utilização de técnicas de microscopia e espectroscopia em pesquisas relacionadas ao câncer, podemos almejar não apenas diagnósticos mais precoces, mas também terapias mais personalizadas e eficazes, oferecendo uma esperança renovada para pacientes em todo o mundo.

À luz dos resultados obtidos neste estudo, surgem diversas possibilidades de inves-

tigaç o futura. Além das amostras de CAPE já analisadas e dos resultados significativos alcançados, há a oportunidade de expandir nossa pesquisa para explorar como as técnicas de AFM e ER podem contribuir para a compreensão de outros subtipos de CAPE, bem como o seu potencial em analisar diferentes níveis de metástases.

O uso de técnicas avançadas de AFM, aliado   inteligência artificial por meio de redes neurais, oferece uma abordagem promissora no estudo e diagnóstico de altera es morfológicas em câncer. Com o contínuo desenvolvimento de algoritmos de aprendizado profundo e o acesso a conjuntos de dados cada vez mais abrangentes, podemos antever um futuro em que a análise de imagens de AFM com o auxílio de redes neurais desempenhe um papel vital no diagnóstico precoce.

A técnica de ER tem se mostrado uma “peça-chave” no protocolo de caracteriza o biofísica de células e tecidos tumorais. Uma importante perspectiva ao empregar essa técnica   a elabora o de um banco de dados espectral de amostras de câncer de diferentes tumores, com o objetivo de estabelecer um padrão de classifica o dessas amostras.

A PCA demonstrou ser uma técnica valiosa na discrimina o e classifica o de diferentes grupos. Nota-se que a intensidade dos espectros   um fator que contribui fortemente para a separa o dos grupos em elipses de confiança, indo além do aparecimento ou desaparecimento de modos vibracionais.

  medida que avançamos,   imperativo continuar aprimorando essas técnicas, validando-as em estudos clínicos e trabalhando em colabora o com a comunidade médica para traduzir esses avanços em benefícios tangíveis para os pacientes. Esse progresso representa uma esperança renovada na luta contra o câncer e no aprimoramento dos cuidados de saúde em todo o mundo.

Apêndice A

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

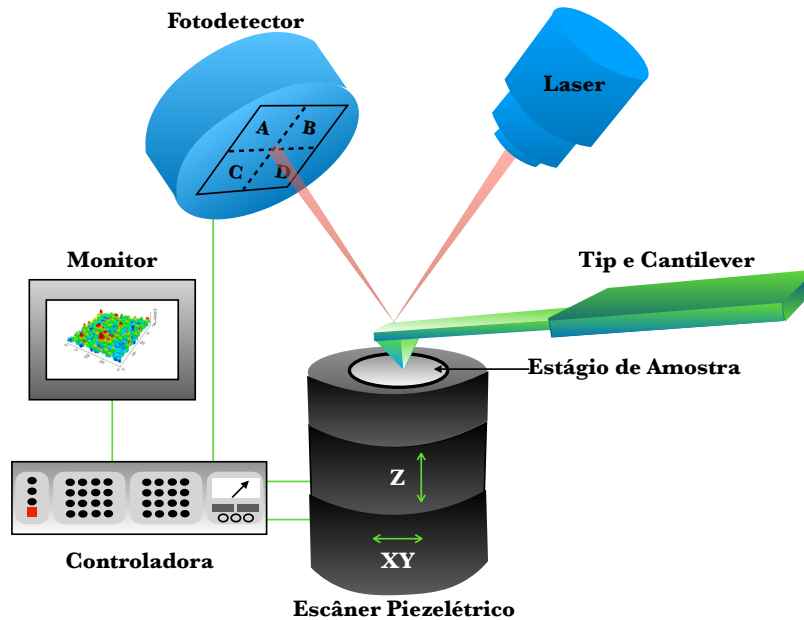
A.1 Conceito Básicos de Microscopia de Força Atômica

A microscopia de força atômica (AFM) é um método da categoria do SPM, ou microscopia de sonda de varredura. O SPM usa uma sonda para examinar uma amostra enquanto obtém mapas da superfície. A partir da Microscopia de Tunelamento de Varredura (STM), que escaneia materiais/amostras em nível atômico é baseada na teoria de tunelamento quântico, e deu origem às técnicas de varredura de sonda [Binnig & Rohrer (1983)]. Os elétrons podem tunelar quando há uma diferença de potencial entre a amostra e a ponta condutora quando ela se aproxima da superfície da amostra a ser examinada. A posição da ponta, a tensão aplicada e a densidade local dos estados da amostra influenciam a corrente de tunelamento resultante. Enquanto a ponta varre a superfície, as informações sobre a amostra são coletadas pelo monitoramento dessa corrente. O resultado é a criação de uma imagem usando esta informação [NobelPrize.org. (2021)].

Quatro componentes principais compõem um AFM: uma sonda de detecção (um cantilever com uma ponta em uma extremidade), normalmente feita de silício ou nitreto de silício; um piezoscanner que realiza o posicionamento relativo entre a sonda e a amostra; um laser de diodo; e um fotodetector que rastreia o deslocamento do laser causado por desvios da sonda em relação à superfície (Figura A.1). As deflexões no cantilever são causadas pelos espaços criados pela sonda AFM e pelas características da superfície durante o escaneamento. Ao direcionar o laser para a extremidade livre da parte traseira

do cantilever, que é refletida na direção do fotodetector, essas deflexões são medidas. O software que opera o AFM recebe o sinal medido pelo fotodetector [Binnig *et al.* (1986); Chang *et al.* (2012)].

Figura A.1: Esquema de funcionamento do Microscópio de Força Atômica.



Fonte: Imagem cedida pela Prof^ª Luciana Alencar.

A detecção de forças entre a sonda e a superfície da amostra é a principal investigação na operação do AFM. A natureza do par, sua separação, a forma da ponta e qualquer contaminação na superfície da amostra influenciam nessas forças. Os átomos no final da ponta interagem com os átomos na superfície da amostra ao longo do processo de varredura [Galembeck *et al.* (1980); PINTO (2013)].

O AFM é capaz de investigar propriedades mecânicas, incluindo adesão, elasticidade e interações de forças magnéticas e eletrostáticas, além de fornecer mapas topográficas. As forças de adesão microscópicas, afetam vários fenômenos físicos, químicos e biológicos, desde a replicação do DNA até a forma como os medicamentos operam no corpo humano [Alencar (2010)].

AFM é uma técnica de microscopia de alta resolução que atinge a escala atômica em amostras duras e a escala molecular em amostras moles como células e tecidos [Chang *et al.* (2012)]. Tem aplicações em diversas áreas de pesquisa, incluindo física, biofísica, bioquímica, química, ciência dos materiais, nanotecnologia, medicina, biologia, etc., possibilitando a obtenção de caracterizações incluindo polímeros, nanoestruturas e

outros materiais e imagens de biomoléculas, células componentes, estruturas celulares e teciduais, trabalhando com nanolitografia e manipulação atômica de tipos unicelulares (*single-cell*), e também estudando estruturas de DNA [Butt *et al.* (2005)].

A.1.1 Forças de Interação Sonda-Amostra

Para entender como o AFM funciona, é necessário entender as forças que atuam entre sistemas microscópicos em distâncias muito pequenas. Essas forças são: Força de Van der Waals, Força de Capilaridade e Força de Adesão. A seguir, discutiremos essas forças individualmente.

A.1.1.1 Forças de Van der Waals

A natureza das forças de Van der Waals é elétrica, decorrente da polarização de moléculas que ocorre através de campos elétricos associados a vizinhos ou dipolos permanentes. Na realidade, essas forças são uma combinação de três forças: (i) Forças de orientação, (ii) Forças indutoras e (iii) Forças dispersivas [Butt *et al.* (2005); PINTO (2013)].

Willem Hendrik Keesom, físico, descreveu matematicamente as forças de orientação em 1921 [Keesom (1921)]. Essa força é o resultado de dois dipolos em interação permanente e depende da orientação relativa dos dipolos. Medimos a atração e repulsão entre eles analisando a interação entre vários dipolos. O nível médio de polarização seria zero se todas as direções fossem executadas com a mesma frequência. Keesom baseou sua teoria na estatística de Boltzmann, que afirma que o sistema tenta coordenar as orientações dos dipolos usando a menor quantidade de energia possível; conseqüentemente, quanto menor a energia necessária para direcionar os dipolos, menor a temperatura do sistema [London (1937)]. Keesom calculou o potencial médio de energia U_K de todas as posições dipolo-dipolo da seguinte maneira:

$$U_K = -\frac{C_K}{r^6} = -\frac{2}{3} \frac{\mu_1^2 \mu_2^2}{r^6} \frac{1}{k_B T}, \quad (\text{A.1})$$

onde r é a distância entre as moléculas e C_K é uma constante definida pelos parâmetros: μ_1 e μ_2 , que são os momentos de dipolos das moléculas, k_B , que é a constante de Boltzmann e T , que é a temperatura.

A equação de A.1 é inválida para pequenas distâncias e/ou baixas temperaturas ($k_B T \leq \frac{\mu_1 \mu_2}{r^3}$). Nessas circunstâncias, as moléculas se alinhariam paralelamente à linha de conexão, produzindo uma energia potencial na forma de:

$$U_K = -2 \frac{\mu_1 \mu_2}{r^3}. \quad (\text{A.2})$$

As equações A.1 e A.2 representam uma força atrativa, conhecida como *Efeito de Orientação* [Butt *et al.* (2005); London (1937)].

As forças de indução são o resultado de uma molécula polar e apolar interagindo uma com a outra. Devido a seus estudos matemáticos e descrições do fenômeno conhecido como Forças de Debye, uma homenagem físico e químico ao Peter Debye [Debye (1920)]. Debye notou que essas forças não deveriam ser únicas depois de descobrir a equação A.1, pois em altas temperaturas a interação de atração entre as moléculas seria nula. Ao contrário, os experimentos de Van der Waals mostram que a interação atrativa não cessa em altas temperaturas [London (1937)].

A distribuição de carga no campo elétrico da molécula apolar é distorcida pelo campo elétrico da molécula polar, resultando na formação de um dipolo e atração entre eles. Esse fenômeno pode ser explicado pela introdução de uma constante α , ou polarização, no potencial médio de energia U_D . Levando em conta um campo de força externo F , a constante de polarização α tem um momento de dipolo induzido M , que é definido como $M = \alpha F$. A sua energia média U_D será dada por:

$$U_D = -\frac{1}{2} M F = -\frac{1}{2} \alpha F^2. \quad (\text{A.3})$$

Quando as duas moléculas (moléculas 1 e 2) estão próximas uma da outra, uma força do seguinte tipo é produzida:

$$F = \frac{\mu_1}{r^3} \sqrt{1 + 3 \cos^2 \theta_1}, \quad (\text{A.4})$$

onde μ_1 é o momento de dipolo da molécula 1 e θ é o ângulo formado entre o eixo do dipolo e a orientação da força do campo elétrico. Esse campo polariza a molécula 2, dando origem à uma energia potencial de Debye U_D , dada por:

$$U_D = -\frac{\alpha_2 \mu_1^2}{2 r^6} (1 + 3 \cos^2 \theta_1), \quad (\text{A.5})$$

que será sempre atrativa, inclusive para temperaturas infinitamente altas. Tomando a média de todos os ângulos $\cos^2\theta = \frac{1}{3}$, temos que:

$$U_D = -\alpha_2 \frac{\mu_1^2}{r^6}. \quad (\text{A.6})$$

A ação da molécula 2 sobre a molécula 1 gera uma quantidade correspondente. Portanto, a interação total das duas moléculas é obtida como:

$$U_D = -\frac{C_D}{r^6} = -\frac{\alpha_2\mu_1^2 + \alpha_1\mu_2^2}{r^6}, \quad (\text{A.7})$$

Caso essas moléculas sejam do mesmo tipo, isto é, $\mu_1 = \mu_2 = \mu$ e $\alpha_1 = \alpha_2 = \alpha$, temos então que:

$$U_D = -\frac{C_D}{r^6} = -\frac{\alpha\mu^2}{r^6}, \quad (\text{A.8})$$

onde C_D é uma constante definida por $\alpha\mu^2$. Essa equação representa o efeito de indução.

As forças dispersivas foram descobertas pelo físico alemão Fritz London durante seus estudos sobre a atração entre átomos de gases nobres [London (1937)]. Por esta razão, eles também são conhecidas como forças de London. Segundo Butt *et al.* [Butt *et al.* (2005)], todas as moléculas são afetadas pela força de dispersão, independentemente de serem polares ou apolares.

Podemos pensar no elétron como um oscilador cuja posição ao redor do núcleo atômico não é fixa. Assim, há uma chance de que os elétrons sejam distribuídos assimetricamente no núcleo elétrico, criando regiões com maior densidade de carga do que em outras. Este fato é a origem dos dipolos instantâneos. O campo gerado interage com as moléculas visuais, causando dipolos instantâneos cujas interações são sempre atrativas. [Butt *et al.* (2005); Leite (2002); London (1937); PINTO (2013)]. O potencial que corresponde à essas forças é dado por:

$$U_L = -\frac{3h\alpha_1\alpha_2}{2r^6} \frac{\nu_1\nu_2}{\nu_1 + \nu_2}, \quad (\text{A.9})$$

onde $h\nu_1$ e $h\nu_2$ são os primeiros potenciais de ionização de cada molécula e h é a constante de Planck. Dado que todos os núcleos atômicos possuem flutuações eletrônicas, as forças de dispersão são extremamente importantes porque atuam sobre todos os materiais [Leite

(2002)].

Finalmente, podemos definir o potencial de Van der Waals, que é dado então como a soma das três contribuições (i, ii e iii):

$$U_{vdw} = - \left(\frac{C_K}{r^6} + \frac{C_D}{r^6} + \frac{C_L}{r^6} \right). \quad (\text{A.10})$$

Os dois primeiros termos da equação A.10 contêm as energias Keesom e Debye. Esses termos atuam apenas entre moléculas polares e são chamados de contribuição polar. O terceiro termo é chamado de contribuição de dispersão, atuando entre todas as moléculas [Butt *et al.* (2005)].

A.1.1.2 Força de Capilaridade

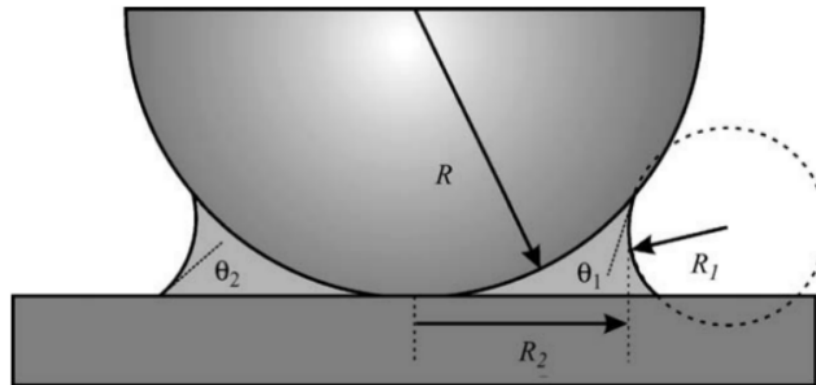
Em condições ambientais, sempre haverá uma camada de contaminação cobrindo a superfície da amostra. Esta camada, composta por poluentes atmosféricos e/ou resíduos gerados durante a preparação do corpo de prova, depende da umidade ambiente. À medida que a sonda se move em direção ao topo da amostra em uma certa altura durante o processo de varrimento, a sonda é fortemente atraída para a camada pela atração da capilaridade. As forças atrativas são significativamente mais fortes nessa situação do que quando não há uma camada contaminada. Este efeito também pode ser visto enquanto a ponta está sendo retraída; a atração da capilaridade retém fortemente a ponta na superfície da amostra [Zanette (1997)]. A força da capilaridade cria meniscos entre a ponta e a superfície da amostra quando esta entra em contato com ela, como mostras a Figura A.2.

Segundo Butt e Huber [Butt *et al.* (2005); Huber *et al.* (2005)], a diferença de pressão entre as fases líquida e vapor circundante é o que causa a força de menisco ou capilar. Há também uma contribuição da tensão superficial do líquido [Butt *et al.* (2005)]. A equação A.11 descreve a força de capilaridade entre uma superfície plana e um indentador robótico:

$$F_c = -\pi R_1^2 \Delta p + 2\pi R_1 \Delta \gamma \cos(\alpha - \theta), \quad (\text{A.11})$$

onde Δp é a diferença de pressão entre a parte interna e externa do menisco, $\Delta \gamma$ é a tensão superficial do líquido. α é o meio-ângulo de abertura da sonda cônica, R_1 é o

Figura A.2: Esquema representando o menisco de água formado entre uma esfera de raio R e uma superfície plana.



Fonte: Retirado de Butt *et al.* (2005)

raio do menisco e θ é o ângulo de contato [Chen & Soh (2008)]. Uma forma de evitar a formação de forças de capilaridade e meniscos é a realização de medidas em meio líquido.

A.1.1.3 Força de Adesão

De acordo com ASTM D907, adesão é definido como "o estado no qual duas superfícies são postas em contato por forças de valência ou forças de ligação interna, ou as duas"em seu contexto científico. O termo adesão fundamental refere-se às forças entre átomos na interseção de duas superfícies; essa adsorção também é conhecida como adesão real (*true adesion*) [Costa (2011)].

As forças entre as duas superfícies que compõem o adeso podem ser atribuídas ao fato de que, nessas regiões, átomos e moléculas têm um nível de reatividade diferente do que se vê quando estão no estado sólido. Neste caso, a interação com as células unitárias vizinhas resulta em um campo de força uniforme sendo experimentado pela célula unitária do material. No entanto, se o sólido é dividido para criar a superestrutura, as forças que atuam nas células unitárias não são tão uniformes. Como resultado de interações perdidas, as células planetárias estão em um estado energético desfavorável. Em outras palavras, a energia livre total do sistema aumenta. Esse aumento é conhecido como "energia livre de superfície".

Os termos "energia de interface" ou "tensão de interface" são usados quando duas superfícies estão em contato. Esses termos são idênticos aos líquidos. O conceito de tensão superficial não é claro para alguns, e os termos "energia de interface" e "tenso de

interface"nem sempre são equivalentes. Certas características dos sólidos, como reduzida mobilidade atômica e molecular e morfologia de superfície irregular , resultam em tensões heterogêneas na superfície. Assim, é mais comum nessas situações usar a expressão "energia de superfície"[Myers, D. (2002)].

Para relacionar as forças de adesão com as medidas de AFM , é necessário explicar o mecanismo de contato , que descreve o contato controlado entre um ponto nanométrico de AFM que indenta a superfície de uma amostra.

Uma vez que o cantilever se comporta como uma mola, a força que ele exerce está de acordo com a lei de Hooke:

$$F = k.d, \quad (\text{A.12})$$

onde k é a constante elástica do cantiléver e d é a sua deflexão.

A lei de Hooke é aplicada satisfatoriamente a amostras que apresentam comportamento linear, ou superfícies retilíneas. O comportamento de amostras com perfis viscoelásticos, entretanto, não é adequadamente descrito por esta equação. Superfícies que são "macias"(como as encontradas na maioria dos materiais biológicos) deformam-se não linearmente sob indentação. Como resultado, uma relação deste tipo será mais adequada para descrever este tipo de sistema [Radmacher (2007)]:

$$F \propto \delta^n, \quad (\text{A.13})$$

onde F é em força externa, δ é a deformação do sistema e n é um expoente relacionado à geometria do indentador. Juntamente com os fatores geométricos, a constante de proporcionalidade descreve as propriedades elétricas do material. Então, estamos lidando com um problema de comunicação mecânica entre duas superfícies.

O primeiro estudo a abordar a questão da comunicação entre dois superfluidos foi escrito por Heinrich Hertz [Hertz (1882)], um pioneiro no campo da mecânica de contato. Ele determinou uma relação entre o contato entre uma superfície plana e uma esfera quando elas são pressionadas uma contra a outra com uma carga P normal. Esta contato ocorreu em um círculo com um raio de contato de a de acordo com a seguinte equação:

$$a = \left(\frac{PR}{K} \right)^{\frac{1}{3}}, \quad (\text{A.14})$$

onde R é o raio da esfera e K é uma constante que relaciona os módulos de Young da esfera e da superfície (E_1 , E_2), considerando a razão de Poisson da esfera e da superfície (ν_1 , ν_2), respectivamente. O parâmetro K é descrito por:

$$K = \frac{4}{3} \left(\frac{1 - \nu_1^2}{E_1} + \frac{1 - \nu_2^2}{E_2} \right). \quad (\text{A.15})$$

O modelo de Hertz tem sido amplamente utilizado na literatura para estudar as propriedades mecânicas de superfícies complexas, como, por exemplo, as células humanas, utilizando como base experimentos de força com o AFM [Alencar (2010)]. Esta teoria descreve a região de interações macroscópicas leves e só é aplicável a materiais que são elásticos, lineares, homogêneos, isotrópicos e não exibem forças superfícies atraídas (adesão). Segundo a teoria de Hertz, a distância entre a Terra e o Sol é muito menor que a distância entre os dois corpos, tornando possível aproximar a órbita da Terra como um parabolóide [Johnson & Johnson (1987)].

Os pesquisadores Johnson, Kendall e Roberts propuseram a teoria JKR em 1971 como uma nova teoria para explicar a conexão entre dois materiais elásticos [Johnson (1971)]. O modelo JKR leva em consideração experimentos cujas áreas de contato são maiores do que as previstas pela teoria de Hertz. A equação A.16 descreve o ponto de contato entre uma esfera e um sólido, levando em consideração a ação da força de adsorção entre eles:

$$a = \left(\frac{R}{K} \left(P + 3\gamma\pi R + \sqrt{6\gamma\pi RP + (3\gamma\pi R)^2} \right) \right)^{\frac{1}{3}}, \quad (\text{A.16})$$

onde γ é o trabalho das forças de adesão, realizado ao separar completamente o indentador da superfície. Esta teoria leva em consideração a tensão de translação na área de contato, com pouca carga normal e uma área de contato diferente de zero. Essa carga mínima pode ser chamada de força *pull-off* ou força adesão, fornecida por:

$$F_{ad}^{(JKR)} = -\frac{3}{2}\pi\gamma R. \quad (\text{A.17})$$

Derjaguin, Muller e Toporov desenvolveram o modelo DMT, que levava em con-

sideração o papel desempenhado pelas forças adesivas na interação dos corpos elásticos [Derjaguin *et al.* (1975)]. De acordo com este modelo, o perfil de contato continua sendo levado em consideração na teoria de Hertz. No entanto, devido à força de adesão, há uma carga geral maior. Este fato corresponde a interações atrativas que separam a esfera da superfície. As informações de contato deste modelo são fornecidas por:

$$a = \left(\frac{R}{K} (P + 2\pi\gamma R) \right)^{\frac{1}{3}}. \quad (\text{A.18})$$

Desta forma, a força de adesão é descrita por:

$$F_{ad}^{(DMT)} = -2\pi\gamma R. \quad (\text{A.19})$$

O modelo JKR descreve com precisão a área de contato quando as forças da superfície são pequenas em comparação com as deformações elásticas resultantes. O modelo DMT é mais apropriado para o limite oposto (ou seja, materiais rígidos, raios esféricos pequenos e forças de adesão fracas e de longo alcance [Lima (2019)]).

No processo de retração da ponta para longe da superfície da amostra, a ponta permanece em contato com a superfície até que a força do cantiléver supere a interação entre o par ponta-amostra. A força sentida pelo cantiléver é medida através da sua deflexão e a força de *pull-off force*, ou adesão, é definida como a força máxima de atração durante a retração da ponta saindo do contato com a superfície. De forma geral, as forças de adesão F_{ad} são uma combinação de forças eletrostáticas F_{el} , de van der Waals F_{vdW} , de capilaridade F_{cap} e forças devido a ligações químicas F_{quim} Butt *et al.* (2005), de acordo com a equação:

$$F_{ad} = F_{el} + F_{vdW} + F_{cap} + F_{quim}. \quad (\text{A.20})$$

A.1.2 Modos de operação do AFM

O AFM pode funcionar de várias maneiras, cada uma operando em uma região de seu potencial de interação, pois as interações entre a sonda do AFM e a superfície da amostra podem ter caráter atrativo ou repulsivo. Os modos de operação (ou varredura) mais comuns no AFM são: modo contato, modo não-contato, contato intermitente (*tapping mode*) e espectroscopia de força.

A interação entre a sonda AFM e a amostra no modo de contato é repulsiva porque o AFM aplica força à amostra. A força de contato faz com que o cantilever se deflexione quando a sonda se move sobre a superfície da amostra ao detectar mudanças na topografia da amostra. O modo contato é indicado para as amostras mais rígidas pois a varredura é feita sempre com a ponta em contato físico com a superfície da amostra e, dependendo do tipo de amostra a ser analisada, a força aplicada deve ser controlada [Alencar (2002)].

No modo não-contato, o cantilever oscila a uma certa distância acima da superfície da amostra. As forças de interação de longo alcance, como forças dipolo eletrostáticas e magnéticas, ajudarão a deflexionar o cantilever e gerar mapas quando aumentada a separação entre a sonda e a amostra [Zanette (1997)].

No modo de contato intermitente (*tapping mode*), o cantiléver oscila em uma frequência próxima da sua frequência de ressonância, enquanto varre a amostra. A sonda é aproximada até que começa a realizar contato intermitente com a amostra (realizando pequenas batidas), eliminando as forças de arraste laterais da sonda com a amostra, permitindo a varredura em amostra macias e com pouca adesão ao substrato. A amplitude de oscilação da sonda durante a varredura é suficiente para que o cantiléver tenha força restauradora que impede que a sonda fique presa na camada de contaminação (forças de menisco ou eletrostáticas) presente na superfície da amostra, especialmente em medidas feitas em ar [Alencar (2002)].

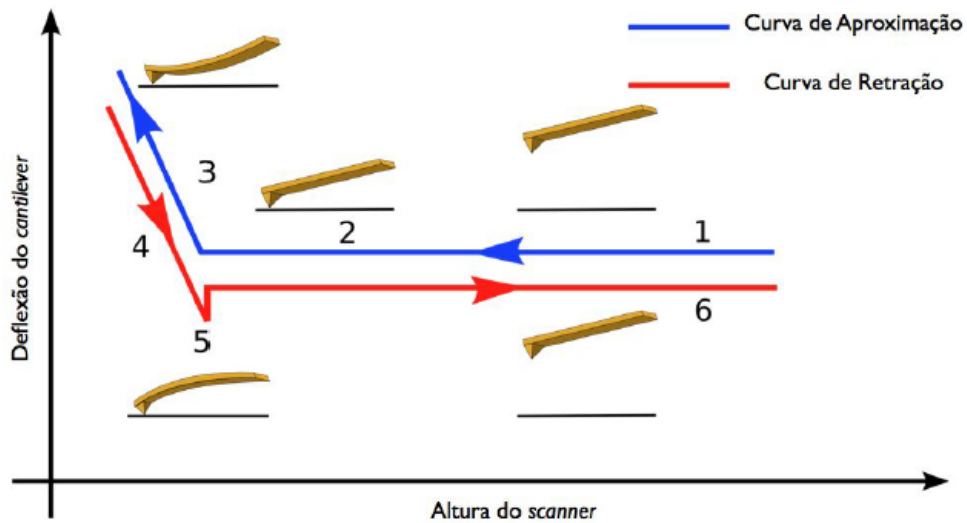
Para discutir o método de espectroscopia de força, é necessário entrar em detalhes sobre como as curvas de força *versus* deflexão do AFM são obtidas. Este procedimento é essencial para a obtenção de informações além da topografia, principalmente propriedades mecânicas em nanoescala. Entraremos em mais detalhes sobre as ideias por trás da espectroscopia de força na próxima seção.

A.1.3 Espectroscopia de Força

Diversas informações podem ser obtidas a partir da relação entre a distância sonda-amostra e as forças medidas nessas distâncias. A análise do gráfico no plano força *versus* distância é chamado de espectroscopia de força.

A curva de força-distância $F(D)$ obtida através de uma medida de AFM nos mostra o comportamento da interação ponta-amostra. A Figura A.3 representa a força de interação ponta-amostra com diferentes modos de operação AFM.

Figura A.3: Típica curva de força produzida por um Microscópio de Força Atômica. Para cada parte da curva de aproximação e de retração está representando o movimento da sonda.



Fonte: Retirado de Alencar (2010).

Curva força-distância idealizada que descreve um ciclo de retração e aproximação da ponta do AFM em relação à superfície. Este ciclo é continuamente repetido durante a varredura. A Figura A.3 ilustra as curvas de aproximação e retração e o comportamento do cantilêver em cada porção da curva. A ponta do AFM está se aproximando da superfície da amostra: (1) A ponta AFM aproxima-se da superfície; (2) o contato inicial é mediado por forças atrativas, que puxam a ponta em direção à superfície (*jump to contact* - salto para o contato); (3) a ponta exerce uma força constante na superfície que leva a uma indentação da amostra e deflexão cantilêver; (4) a ponta tenta retrair-se e se soltar da superfície; (5) várias forças adesivas entre a amostra e a ponta do AFM, no entanto, dificultam a retração da ponta. Essas forças adesivas podem ser medidas diretamente da curva força-distância; (6) a ponta perde o contato com a superfície da amostra ao superar as forças adesivas.

Em distâncias curtas, o cantilêver detecta principalmente forças interatômicas: forças de Born ¹. Em distâncias muito pequenas entre a ponta e amostra, uma força repulsiva aparece entre os átomos da ponta e os da amostra. Esta força ocorre entre

¹As forças de Born são forças que atuam sobre átomos em uma rede iônica. Isto é, como os íons têm tamanho finito, as interações elétron-elétron e núcleo-núcleo ocorrem e dão origem a forças de repulsão e potencial eletrostático, ambas chamadas forças de Born repulsivas e de curto alcance (aprox. 0, 1 nm) e as forças de van der Waals atrativas de longo alcance (até 10 nm) [Housecroft & Sharpe (2018)]

quaisquer dois átomos ou moléculas que se aproximam de tal maneira que seus orbitais de elétrons começam a se sobrepor. Este é um resultado do chamado Princípio de Exclusão de Pauli [Maurice (1996); Ohnesorge & Binnig (1993)]. Quando essa força repulsiva é predominante em uma configuração de AFM, a ponta e a amostra são consideradas em “contato” (regime de modo de contato). O potencial total é obtido assumindo-se um potencial atrativo, $\frac{A}{r^6}$, e um potencial repulsivo, $\frac{B}{r^{12}}$.

As curvas de força fornecem informações valiosas sobre as propriedades do material local, tais como elasticidade, dureza e carga superficial, além da adesão. O resultado de uma medida de força é uma medida da corrente de fotodiodo I_{PSD} versus a posição de altura do piezoelétrico Z . Para obter uma curva de força versus distância, o I_{PSD} e o Z têm que ser convertidos em força e distância [Senden (2001)]. Portanto, dois parâmetros precisam ser conhecidos: a sensibilidade (*sensitivity*) e a distância zero. Na Microscopia de Força Atômica, ambos os parâmetros devem ser inferidos da própria curva de força e não através de um método independente. Praticamente, a parte linear do modo contato é considerada como distância zero e sua inclinação é a *sensitivity* [Butt *et al.* (2005)].

Para obtenção desse gráfico, a ponta é aproximada ao longo do eixo vertical (eixo Z) e a deflexão de cantiléver é medida. A força, a partir da interação entre a ponta e a amostra, é dada pela lei de Hooke de acordo com a equação A.12. A constante de mola do cantiléver é dependente de suas propriedades físicas, de acordo com:

$$k = \frac{Et^3w}{4l^3}, \quad (\text{A.21})$$

onde E é o módulo de Young (referente à elasticidade) e t , w e l a espessura, largura e comprimento, respectivamente, do cantiléver. No entanto, deve-se ter em mente que esta equação dará apenas um valor aproximado para a constante de mola de um cantiléver retangular, devido à formação das extremidades e imperfeições no processo de fabricação [Bowen & Hilal (2009)].

A distância controlada durante a medida não é a distância real entre a amostra e a ponta (D), mas a distância Z entre a superfície da amostra e a posição de repouso do cantiléver. Estas duas distâncias diferem por causa da deflexão do cantiléver d_c e por causa da deformação da amostra d_a . Essas quatro quantidades estão relacionadas da seguinte forma:

$$D = Z - (d_c + d_a). \quad (\text{A.22})$$

A única distância que se pode controlar, ao fazer a medida, é o deslocamento do piezoelétrico (Z), já que os valores de deflexão do cantiléver e as deformações da amostra não são conhecidos de antemão. A curva de força obtida através do AFM não reproduz apenas interações ponta-amostra, mas sim o resultado de duas contribuições: a interação ponta-amostra supramencionada e a força elástica do cantiléver, obtida pela equação A.12. [Cappella & Dietler (1999)].

Para o caso de uma ponta perfeitamente elástica com uma extremidade esférica e uma amostra planar feita do mesmo material, isto é, descrito pelo modelo de Hertz [Hertz (1882)], a força é dada por:

$$F = \delta^{\frac{3}{2}} 2E \frac{\sqrt{R}}{3} (1 - \nu^2). \quad (\text{A.23})$$

Aqui, δ é a indentação, E o módulo de Young, R o raio da ponta e ν é a razão de Poisson.

Ao iniciar o contato, a distância zero equivale a uma distância interatômica, isto é, o ponto de contato entre a sonda e a amostra. Isso, no entanto, não descreve adequadamente a situação. Por essa razão, é mais apropriado usar a indentação em vez da distância, quando estabelecido o contato.

As forças, no contato inicial, são complexas e não totalmente compreendidas, mas incluem forças de Van der Waals (VdW) atrativas e capilares. Se a amostra for movida ainda mais perto da ponta, a força aumenta ao longo da linha diagonal. Se a amostra for movida para baixo, retirando a ponta da amostra, haverá histerese na curva devido a forças de atração entre a ponta e a amostra. A força diminui ao longo da linha diagonal abaixo da linha de *zero force*. Eventualmente, chega-se a um ponto em que a força é mínima e a ponta se desprende. A força, no ponto de descolamento, é conhecida como a força de *pull off* [Weisenhorn *et al.* (1992)]. A maioria das imagens de AFM é realizada no regime repulsivo, com uma força repulsiva entre 10 e 100 nN, e é conhecida como imagem em modo de contato [Maurice (1996); Ohnesorge & Binnig (1993)].

As superfícies medidas em ar contêm uma pequena quantidade de água da umidade do ar, entre outros contaminantes orgânicos. Assim, um menisco se forma entre a ponta e a

amostra. Este menisco resulta em uma força de adesão ou capilar atrativa relativamente forte da ordem de 100 nN [Weisenhorn *et al.* (1992)], além da força de vdW atrativa tipicamente da ordem de 10 nN e forças de contato entre ponta e amostra repulsivas de 10-100 nN [Maurice (1996)].

A.1.4 *PeakForce Quantitative NanoMechanics*

PeakForce Quantitative NanoMechanics (QNM) é uma extensão do modo de operação de contato intermitente. Isso permite a aquisição de curvas de força para cada pixel da imagem (cerca de 65.536 curvas por mapa) em altas frequências (0, 5–2 kHz), possibilitando a quantificação das características das amostras em nanoescala e a produção de mapas de alta resolução (com resoluções comparáveis às de imagens topográficas). As indentações na superfície da amostra são extremamente precisas porque o modo QNM regula a força aplicada à amostra pela ponta, evitando contribuições para os valores, por exemplo, do módulo de Young por influência do substrato.

A.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão - TEM

A Microscopia Eletrônica de Transmissão, do inglês *transmission electron microscope* - TEM, é uma técnica de imagem de alta resolução que utiliza um feixe de elétrons para visualizar detalhes ultrafinos de amostras em escala nanométrica. Para transmitir elétrons através de uma amostra muito fina (menos de 100 nm), o TEM acelera um feixe de elétrons a uma energia alta o suficiente. Os TEMs tradicionais operam de forma semelhante aos microscópios de luz, mas usam um feixe de elétrons que viaja através do vácuo e vem de uma fonte de canhão de elétrons em vez de uma fonte de luz como mostra a Figura A.4 [Glauert & Lewis (1999)]. Ao atravessar a amostra, os elétrons interagem com a estrutura interna da mesma. Algumas partes dos elétrons são espalhadas ou absorvidas pela amostra, enquanto outros passam através dela sem sofrer interações significativas. A diferença na intensidade dos elétrons transmitidos ou espalhados é capturada por um detector eletrônico e convertida em uma imagem de alta resolução da amostra. Ernst Ruska e Max Knoll criaram o primeiro TEM em 1931 [Williams & Carter (1996)], e o primeiro TEM prático foi criado apenas quatro anos depois. Como os microscópios ópticos são limitados pelos limites de resolução e difração dos comprimentos de onda da luz visível,

as limitações do uso de luz para objetos de imagem levaram à invenção do TEM.

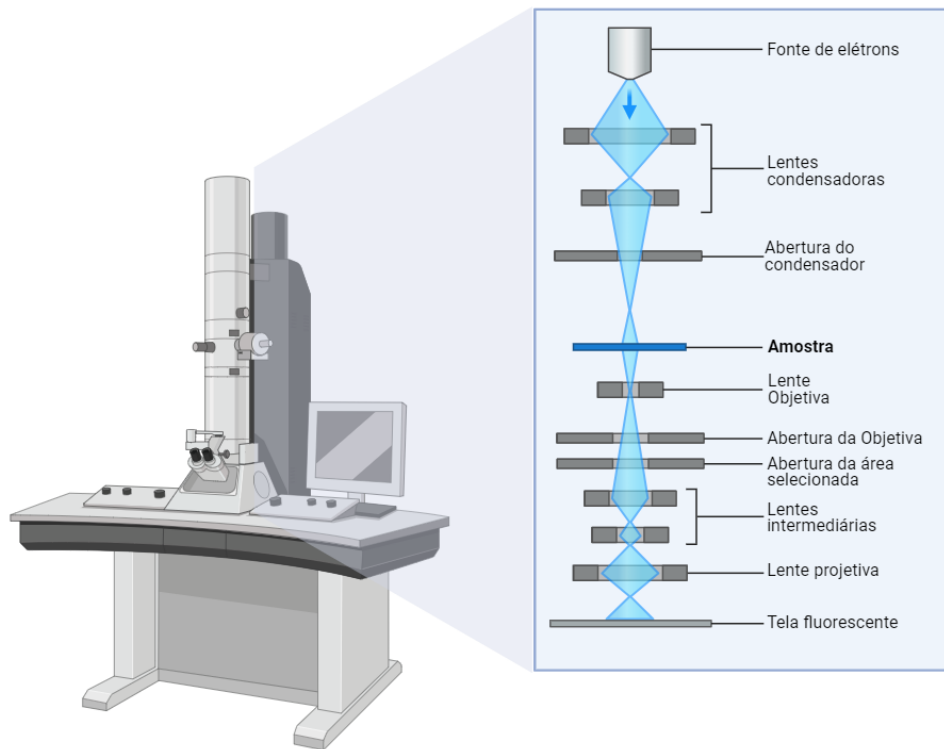


Figura A.4: Diagrama esquemático do feixe de elétrons em um microscópio TEM convencional. Adaptado de TEM (2023)

Na Figura A.4, as principais partes do TEM são representadas esquematicamente junto com o diagrama de raios correspondentes. O canhão de elétrons (a fonte dos elétrons), controles de alinhamento do canhão, lentes condensadoras (lentes magnéticas para colimar o feixe), lente objetiva (para focalizar e inicialmente ampliar a imagem), aberturas (para limitar o diâmetro do feixe de elétrons), lente intermediária, lente projetiva, porta-amostras, tela de visualização e detectores para detectar os sinais primários e secundários são as partes principais. O tamanho da sonda, o ângulo de convergência, a energia do elétron e a corrente da sonda de elétrons são os quatro fatores básicos que controlam o tipo e a qualidade da imagem ou espectro produzido por um TEM [Glauert & Lewis (1999)].

Para qualquer sistema óptico, o limite teórico de resolução da difração, d_0 , é dado pelo critério de Rayleigh (equação A.24). Este critério descreve a menor distância resolúvel entre dois pontos, onde λ é o comprimento de onda da fonte iluminante e NA é a abertura numérica objetiva ($NA = n \sin \theta$ onde n é o índice de refração do meio e θ é o ângulo de abertura).

$$d_0 = \frac{0.61\lambda}{NA} \quad (\text{A.24})$$

Uma maneira fácil de aumentar a resolução seria utilizar uma fonte de luz com comprimento de onda menor, como os elétrons, pois fica claro na equação A.24 que d_0 é proporcional ao comprimento de onda. A pesquisa de Louis de Broglie [de Broglie (1924)] demonstrou que, embora sejam considerados partículas, os elétrons também podem apresentar características ondulatórias.

$$\lambda = \frac{h}{p} = \frac{h}{mv} \quad (\text{A.25})$$

onde h é a constante de Planck, p é o momento do elétron e λ o comprimento de onda de Broglie. Consequentemente, aumentar a velocidade de um feixe de elétrons fará com que seu comprimento de onda diminua, aumentando consideravelmente o limite de resolução acima da luz visível.

Como um elétron (com carga e) viaja através de uma diferença de potencial V em um TEM, sua energia cinética, medida em elétron-volts, é igual à energia do campo, dada por:

$$\frac{mv^2}{2} = eV \quad (\text{A.26})$$

Da equação A.25, substituindo na equação A.26, temos:

$$\frac{1}{2} \left(\frac{h}{m\lambda} \right)^2 = eV \quad (\text{A.27})$$

E reorganizando a equação A.27 dá o comprimento de onda do elétron não relativístico:

$$\lambda = \frac{h}{(2meV)^{\frac{1}{2}}} \quad (\text{A.28})$$

No entanto, devido ao fato de que as velocidades dos elétrons aumentam com a raiz quadrada da tensão de aceleração (equação A.28), o que significa que a uma tensão de aceleração de 100 kV, as velocidades dos elétrons já são mais da metade da velocidade da luz, os efeitos relativísticos não podem ser desconsiderados. Levamos em consideração a forma relativística da energia cinética, E_k , para explicar esse fenômeno:

$$E_k = mc^2 - m_0c^2 \quad (\text{A.29})$$

onde m_0 é a massa de repouso de um elétron e c é a velocidade da luz. Observando novamente que a energia cinética é determinada pela tensão de aceleração ($Ek = eV$), então rearranjando para m , temos:

$$m = \frac{eV + m_0c^2}{c^2} \quad (\text{A.30})$$

Substituindo na equação A.28

$$\lambda = \frac{h}{\left[2m_0eV \left(1 + \frac{eV}{2m_0c^2}\right)\right]^{\frac{1}{2}}} \quad (\text{A.31})$$

O comprimento de onda teórico dos elétrons em um TEM trabalhando em uma tensão de aceleração de 200 kV será em torno de 2, 51 pm (muito menor que o comprimento de onda da luz visível, 550 nm para luz verde). Como resultado, o feixe de elétrons pode teoricamente atingir um limite de resolução menor do que os átomos individuais. Porém, as aberrações na ótica de um TEM, que reduzem a resolução além desse limite teórico, não são levadas em consideração nessa resolução teórica [Williams & Carter (1996)].

A.3 Espectroscopia Vibracional Raman

No ano de 1923 já existiam muitos estudos sobre a dispersão da luz na água, principalmente sobre a cor azul do mar. Até que em 1928, após vários experimentos, um físico indiano chamado Chandrasekhar Venkata Raman, juntamente com seu aluno Krishnan publicou um artigo em que explicavam de forma diferente a coloração azul observada por nós nas águas do mar [C. V. RAMAN (1953)]. E, por esse trabalho, em 1930, já com o título de Sir Raman, recebera o prêmio Nobel de Física. Sir Raman baseou seus trabalhos nos estudos realizados por Rayleigh, porém diferentemente de Rayleigh, que afirmava que a coloração do mar nada mais era do que uma reflexão da cor do céu, para Raman o real motivo era, na verdade, o resultado da interação da luz do sol com as moléculas de água, ou seja, era resultado de um fenômeno próprio ocorrido nas moléculas de água, que posteriormente foi explicado como espalhamento da luz devido à interações

com suas moléculas [Nakamoto & Brown (2003)]. Para justificar a sua afirmativa, Raman confeccionou um experimento bastante simples, mas muito eficiente, que consistia de uma fonte de luz (o sol), um coletor (um telescópio) e um detector (seus próprios olhos). Com este aparato simples, Raman conseguiu comprovar que a luz emanada da amostra era composta por outras componentes de luz, diferentes da incidente. Após essa confirmação experimental, esse fenômeno passou a ser chamado de Espalhamento Raman.

A luz espalhada, portanto, era composta por luz oriunda de dois diferentes mecanismos, um chamado de espalhamento Rayleigh (elástico), que é bem intenso e tem a mesma frequência que da luz incidente (ν_0) e um outro, chamado espalhamento Raman (inelástico), que é bem mais fraco ($\sim 10^{-5}$ da luz incidente) e tem frequências $\nu_0 \pm \nu_{vib}$, onde ν_{vib} é uma frequência de vibração de uma molécula [MEDEIROS & MESQUITA (2003)]. Para entender melhor este efeito, considere a situação pictórica mostrada na Figura A.5, onde um fóton interage com uma molécula de água H_2O . Na parte Figura A.5a está o espalhamento Rayleigh, no qual a molécula permanece na mesma configuração vibracional antes e depois da interação com o fóton, e na parte Figura A.5b está o efeito Raman, no qual a molécula passa a vibrar num dos modos normais de vibração esperados para a molécula de H_2O , enquanto que o fóton é espalhado com sua energia alterada.

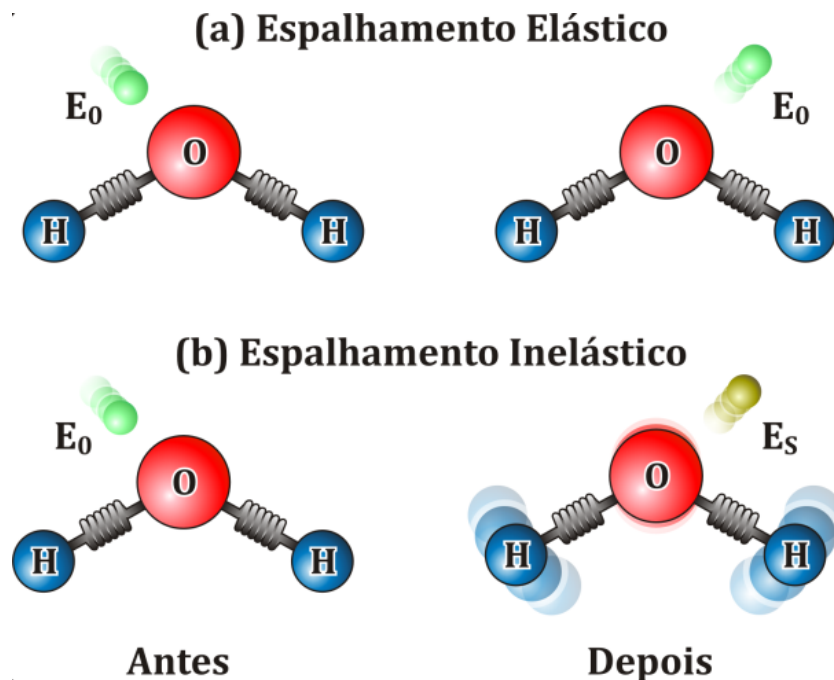


Figura A.5: Em (a), espalhamento elástico (ou Rayleigh) e, em (b), espalhamento inelástico (ou Raman).

As frequências $\nu_0 - \nu_{vib}$ e $\nu_0 + \nu_{vib}$, são chamadas de linhas Stokes e anti-Stokes,

respectivamente, e estão mostradas na Figura A.6.

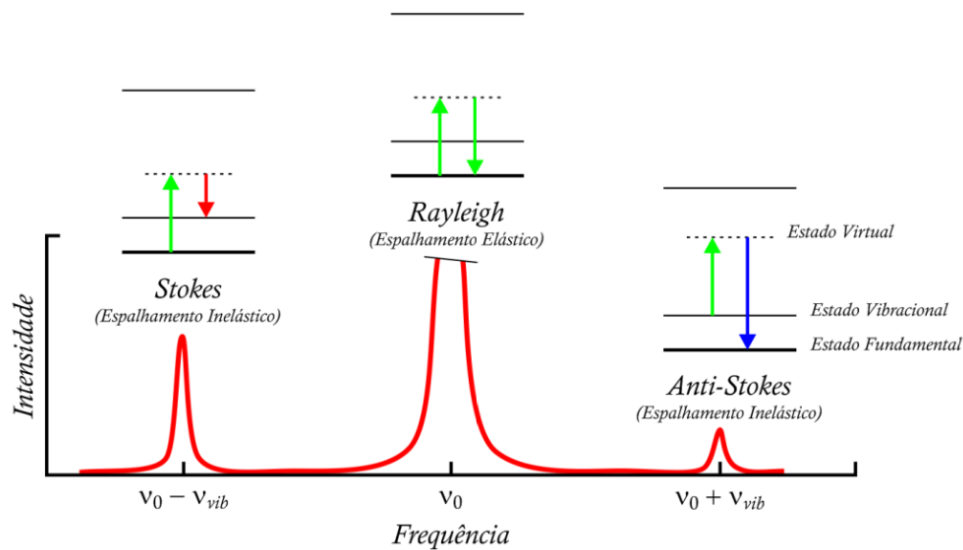


Figura A.6: Representação gráfica das linhas de espectroscopia devido aos espalhamentos Rayleigh e Raman.

Classicamente as duas bandas deveriam ter a mesma intensidade, mas observa-se que as bandas do lado Stokes, que corresponde a uma diminuição de energia, são mais intensas do que a Anti-Stokes, que expressa um aumento de energia, isto porque à temperatura ambiente a quantidade de moléculas que já se encontram em estados vibracionais excitados é maior que aquelas que estão no estado fundamental. Assim, é preferível medir os espectros Raman no lado do espalhamento Stokes. A intensidade relativa das duas linhas relaciona-se com a temperatura da amostra através da seguinte relação:

$$\frac{I_{anti-Stokes}}{I_{Stokes}} = \left(\frac{\nu_0 + \nu_{vib}}{\nu_0 - \nu_{vib}} \right)^4 \exp\left(- \frac{h\nu_0}{k_B T} \right) \quad (A.32)$$

onde k_B a constante de Boltzmann e T é a temperatura da amostra.

Assim, na espectroscopia Raman, medimos a frequência vibracional (ν_{vib}) com uma mudança de frequência do feixe incidente (ν_0) [SESSION JR, Paulo Dantas (2005)]. Pela lei de conservação de energia, o fóton espalhado deve ter uma energia igual a energia do fóton incidente menos a energia do fônon resultante, deste modo:

$$E_e = E_0 \pm E_{vib} \quad (A.33)$$

e que:

- $E_e = h\nu_e \mapsto$ Energia do fóton espalhado,

- $E_0 = h\nu_0 \mapsto$ Energia do fóton incidente,
- $E_{vib} = h\nu_{vib} \mapsto$ Energia do fóton ótico.

e h é a constante de Plank.

De acordo com a teoria clássica, sabemos que o vetor momento de dipolo elétrico induzido oscila com sobreposições de frequências, dado por:

$$\vec{p} = \alpha \vec{E} \quad (\text{A.34})$$

onde α é uma constante de proporcionalidade chamada de polarizabilidade. O espalhamento Raman, como ficará claro, torna-se possível devido ao fato da polarizabilidade eletrônica depender da deformação. Portanto, para pequenas amplitudes de vibração, α pode ser escrita como uma série de potências, em 1ª ordem, nas amplitudes de vibração q , dada por:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q_0 + \dots \quad (\text{A.35})$$

onde α_0 é a polarizabilidade na posição de equilíbrio e $(\partial \alpha / \partial q)_0$ é a taxa de variação de α em relação a amplitude da variação em torno da posição de equilíbrio.

Considerando uma onda eletromagnética, cujo vetor campo elétrico varia com o tempo, conforme a equação abaixo:

$$\vec{E}(t) = \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (\text{A.36})$$

e que a molécula vibra com uma frequência ν_{vib} , cujos deslocamentos dos núcleos são descritos por:

$$q(t) = q_0 \cos(2\pi\nu_{vib} t) \quad (\text{A.37})$$

o momento de dipolo elétrico induzido fica descrito pela seguinte relação:

$$\vec{p} = \alpha \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q_0 \vec{E}_0 \{ \cos[2\pi(\nu_0 - \nu_{vib})t] + \cos[2\pi(\nu_0 + \nu_{vib})t] \} \quad (\text{A.38})$$

O primeiro termo do lado direito desta equação contém apenas a frequência da

radiação incidente e corresponde ao espalhamento Rayleigh (elástico). O segundo termo contém termos que oscilam com frequências $\nu_0 - \nu_{vib}$ e $\nu_0 + \nu_{vib}$ que correspondem aos espalhamentos Raman Stokes e anti-Stokes, respectivamente. Observe que o segundo termo depende do fator $(\partial\alpha/\partial q)_0$, o que evidencia que o efeito Raman ocorre apenas quando há variação de polarizabilidade com a deformação, isto é, apenas quando a estrutura vibra e modifica a polarizabilidade. No entanto, essa não é a única condição para o que o efeito Raman aconteça. É necessário que o modo vibracional investigado atenda a algumas regras de seleção que entram no campo da mecânica quântica.

A.4 Análise Multivariada

Análise multivariada é um conjunto de técnicas estatísticas que tratam dos dados correspondentes às medidas de muitas variáveis simultaneamente, desta forma apresenta alto grau de compressão, correlação e similaridade [Panero *et al.* (2009)].

Uma ferramenta extremamente versátil e útil em diversas áreas do conhecimento. Na análise exploratória de dados, ela permite identificar padrões e relações entre variáveis, facilitando a compreensão dos dados e a tomada de decisões [Bruns & Faigle (1985); Gemperline (2006)]. Já na calibração multivariada, é possível obter modelos mais precisos e confiáveis para prever valores desconhecidos. No processamento de sinais analíticos, a análise multivariada pode ser usada para separar sinais de diferentes fontes e filtrar ruídos. Na otimização de experimentos, ela ajuda a identificar as variáveis mais relevantes e a encontrar as melhores condições para o experimento. No monitoramento e modelagem de processos multivariados, permite detectar desvios e falhas no processo, bem como prever seu comportamento [Bruns & Faigle (1985)].

As técnicas de análise exploratória de dados são fundamentais para compreender e extrair informações valiosas a partir de conjuntos complexos. Ao aplicar essas técnicas, é possível identificar padrões e tendências que podem ser utilizados para tomadas de decisão mais assertivas. Além disso, a redução das informações para uma forma mais compreensível facilita a comunicação desses dados com outros membros da equipe. Outro benefício importante é a capacidade de identificar possíveis *outliers*, que são dados que se diferenciam drasticamente dos demais e podem representar erros ou informações importantes que merecem atenção especial. Com isso, as técnicas de análise exploratória

de dados se tornam ferramentas indispensáveis para empresas e organizações que desejam maximizar o valor dos seus dados e tomar decisões mais informadas [Gemperline (2006)].

Esses métodos exploratórios, como a análise de componentes principais (PCA) e a análise hierárquica de cluster (HCA), são fundamentais para lidar com grandes conjuntos de dados complexos. A PCA é uma técnica estatística que permite reduzir a dimensionalidade dos dados, mantendo as informações mais relevantes. Com isso, é possível visualizar e interpretar os dados de forma mais clara e eficiente. Já a HCA agrupa os dados em *clusters* hierárquicos, permitindo identificar padrões e similaridades entre eles. Essas técnicas são amplamente utilizadas em diversas áreas, como biologia, finanças e marketing. Além disso, elas podem ser combinadas com outras técnicas de análise de dados para obter resultados ainda mais precisos e úteis [Brereton (2007)].

Em uma abordagem exploratória, os dados para análise são organizados de forma que um conjunto de dados (espectros) para algumas amostras ($a_1, a_2 \dots a_m$) seja transformado em uma matriz de dados X com $m \times n$ dimensões, onde m corresponde aos valores das amostras (absorvância, intensidade, etc.) e n as variáveis (número de onda, deslocamento Raman, etc.) como mostrado na Figura A.7 [Gemperline (2006)].

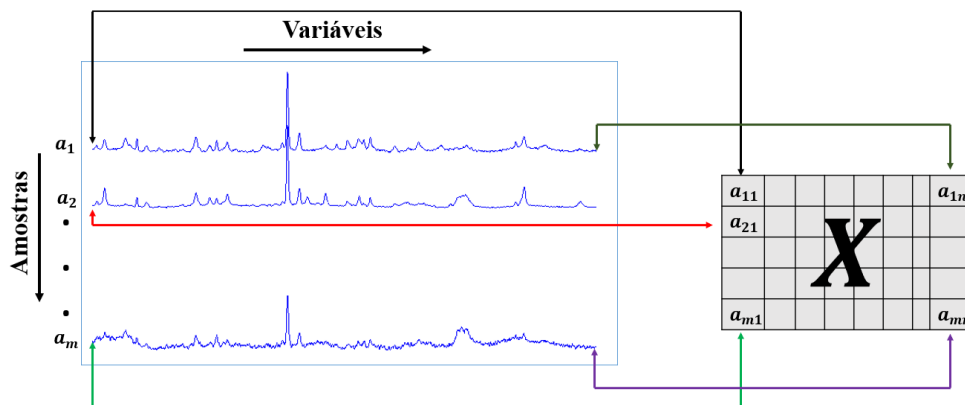


Figura A.7: Representação da organização dos dados em métodos de análise exploratória. Fonte: Imagem elaborada pelo autor (2023).

No que diz respeito aos métodos de calibração, estes métodos permitem estabelecer modelos preditivos quantitativos de determinados componentes de uma amostra [Gemperline (2006)]. Os métodos de calibração podem ser classificados de acordo com a complexidade ou dimensionalidade dos dados da amostra que estão sendo analisados, portanto, existem calibrações de ordem zero, de primeira ordem e de segunda ordem. O método de ordem zero foi usado para analisar uma única medição experimental por amos-

tra, ou seja, foi uma calibração univariada. Na abordagem de segunda ordem, o sistema construído gera uma matriz de dados para cada amostra, ou seja, uma matriz de dados de dimensão $(j \times k)$ (colunas x linhas) é obtida para cada amostra, e para uma análise de " i " amostras, uma matriz de dados de dimensão é o tensor de dados X de $(i \times j \times k)$ [Valderrama *et al.* (2009)].

A.4.1 Análise de Componente Principal - PCA

Desenvolvido por Pearson em 1901 [K. (1901)], o uso da PCA, ou análise de componentes principais, só começou na década de 1970, como um método de análise qualitativa. Desde então, tornou-se uma ferramenta valiosa para revelar anomalias nas amostras, bem como relações entre variáveis medidas e agrupamentos de amostras. Ao reduzir a dimensionalidade dos dados originais, a PCA facilita a observação de padrões e tendências que podem não ser imediatamente aparentes [Brereton (2007)].

O processo de redução dos dados brutos e formação dos principais componentes da PCA é ilustrado na Figura A.8.

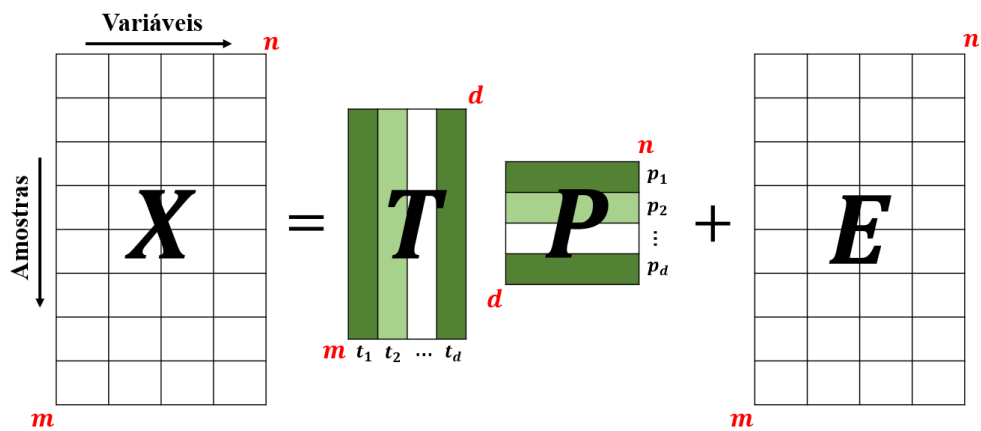


Figura A.8: Representação gráfica da decomposição da matriz X no modelo PCA, sendo X é a matriz de dados com m linhas (amostras) por n colunas (números de onda), T é a matriz de *scores*, P é a matriz de *loadings* e E é a matriz de resíduos. Fonte: Imagem elaborada pelo autor (2023).

A partir da matriz de dados X , ela é decomposta em duas matrizes, uma matriz de *scores* (T) e uma matriz de *loadings* (P). Os *scores* carregam informações sobre as amostras, informando se há similaridade entre as amostras. As *loadings* (pesos) são os cossenos dos ângulos entre as variáveis originais e os componentes principais (PCs) e, portanto, indicam quanto cada variável original contribui para um determinado PC. A

matriz residual (E) é gerada durante o processamento e contém variação inexplicável e residual [Brereton (2007)]. A organização da matriz de dados X se dá de tal forma que cada linha m corresponda à uma amostra e cada coluna n corresponda a variável da amostra, como é vista na Figura A.7.

Matematicamente, essa decomposição da matriz de dados X durante a PCA é dada pela seguinte Equação A.40:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad (\text{A.39})$$

ou

$$\mathbf{X} = \mathbf{t}_1\mathbf{p}_1^t + \mathbf{t}_2\mathbf{p}_2^t + \dots + \mathbf{t}_d\mathbf{p}_d^t + \mathbf{E} \quad (\text{A.40})$$

onde as colunas $t_{1\dots d}$ são os vetores *scores* e as linhas $p_{1\dots d}$ representam os vetores *loadings* [Brereton (2007)].








Como a PCA é uma técnica de redução de dimensionalidade que produz novas variáveis que são combinações lineares das variáveis originais. Essas novas variáveis são ordenadas em termos de sua importância na explicação da variação nos dados. A primeira componente principal contém a maior quantidade de informação e aponta para a direção da maior variância nos dados originais, enquanto a segunda componente principal contém menos informação e assim sucessivamente para as demais componentes. Vale ressaltar que as componentes principais são mutuamente ortogonais, o que significa que elas não estão correlacionadas entre si.

Apêndice B

ARTIGOS PUBLICADOS E PRÊMIOS

Article

Nanomicelles of Radium Dichloride [^{223}Ra]RaCl₂ Co-Loaded with Radioactive Gold [^{198}Au]Au Nanoparticles for Targeted Alpha–Beta Radionuclide Therapy of Osteosarcoma

Bárbara Nayane Rosário Fernandes Souza ¹, Elisabete Regina Fernandes Ramos Ribeiro ¹,
Aline Oliveira da Silva de Barros ¹, Martha Sahylí Ortega Pijera ¹, Hericka Oliveira Kenup-Hernandes ²,
Eduardo Ricci-Junior ³, Joel Félix Silva Diniz Filho ⁴, Clenilton Costa dos Santos ⁴,
Luciana Magalhães Rebelo Alencar ⁴, Mohamed F. Attia ⁵, Sara Gemini-Piperni ⁶
and Ralph Santos-Oliveira ^{1,7,*}

- ¹ Argonauta Nuclear Reactor Center, Nuclear Engineering Institute, Brazilian Nuclear Energy Commission, Rio de Janeiro 21941-906, Brazil; babinayane@gmail.com (B.N.R.F.S.); betebergmaria@gmail.com (E.R.F.R.R.); alinedbcg@gmail.com (A.O.d.S.d.B.); msopijera@gmail.com (M.S.O.P.)
- ² Laboratory of Nanoradiopharmaceuticals and Synthesis of Novel Radiopharmaceuticals, Nuclear Engineering Institute, Brazilian Nuclear Energy Commission, Rio de Janeiro 21941-906, Brazil; hkenup@ien.gov.br
- ³ DEFARMED Laboratory, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-900, Brazil; ricci@pharma.ufrj.br
- ⁴ Laboratory of Biophysics and Nanosystems, Department of Physics, Federal University of Maranhão, São Luís 65080-805, Brazil; joelfelixdiniz@gmail.com (J.F.S.D.F.); cleniltoncs@gmail.com (C.C.d.S.); lucianamagal@gmail.com (L.M.R.A.)
- ⁵ Center for Nanotechnology in Drug Delivery, Eshelman School of Pharmacy, Division of Pharmacoengineering and Molecular Pharmaceutics, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC 27599, USA; mattia@email.unc.edu
- ⁶ Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-902, Brazil; sara.gemini@hotmail.com
- ⁷ Laboratory of Radiopharmacy and Nanoradiopharmaceuticals, Zona Oeste State University, Rio de Janeiro 23070-200, Brazil
- * Correspondence: presidenciaradiofarmacia@gmail.com



Citation: Souza, B.N.R.F.; Ribeiro, E.R.F.R.; da Silva de Barros, A.O.; Pijera, M.S.O.; Kenup-Hernandes, H.O.; Ricci-Junior, E.; Diniz Filho, J.F.S.; dos Santos, C.C.; Alencar, L.M.R.; Attia, M.F.; et al. Nanomicelles of Radium Dichloride [^{223}Ra]RaCl₂ Co-Loaded with Radioactive Gold [^{198}Au]Au Nanoparticles for Targeted Alpha–Beta Radionuclide Therapy of Osteosarcoma. *Polymers* **2022**, *14*, 1405. <https://doi.org/10.3390/polym14071405>

Academic Editor: Dimitrios Bikiaris

Received: 13 March 2022

Accepted: 26 March 2022

Published: 30 March 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Alpha and beta particulate radiation are used for non-treated neoplasia, due to their ability to reach and remain in tumor sites. Radium-223 (^{223}Ra), an alpha emitter, promotes localized cytotoxic effects, while radioactive gold (^{198}Au), beta-type energy, reduces radiation in the surrounding tissues. Nanotechnology, including several radioactive nanoparticles, can be safely and effectively used in cancer treatment. In this context, this study aims to analyze the antitumoral effects of [^{223}Ra]Ra nanomicelles co-loaded with radioactive gold nanoparticles ([^{198}Au]AuNPs). For this, we synthesize and characterize nanomicelles, as well as analyze some parameters, such as particle size, radioactivity emission, dynamic light scattering, and microscopic atomic force. [^{223}Ra]Ra nanomicelles co-loaded with [^{198}Au]AuNPs, with simultaneous alpha and beta emission, showed no instability, a mean particle size of 296 nm, and a PDI of 0.201 (± 0.096). Furthermore, nanomicelles were tested in an in vitro cytotoxicity assay. We observed a significant increase in tumor cell death using combined alpha and beta therapy in the same formulation, compared with these components used alone. Together, these results show, for the first time, an efficient association between alpha and beta therapies, which could become a promising tool in the control of tumor progression.

Keywords: alpha–beta therapy; bone cancer; radium-223 dichloride; radioactive gold nanoparticles; nanomicelles

1. Introduction

Targeted radionuclide therapy consists of a modality of treatment in which a biological effect is obtained by the energy absorbed from the radiation emitted by the radionuclide.

Article

Nanomechanical and Vibrational Signature of Chikungunya Viral Particles

Ruana Cardoso-Lima ¹, Joel Félix Silva Diniz Filho ¹, Maria Luiza de Araujo Dorneles ¹, Renato Simões Gaspar ², Pedro Filho Noronha Souza ^{3,4}, Clenilton Costa dos Santos ¹, Daniela Santoro Rosa ⁵, Ralph Santos-Oliveira ^{6,7} and Luciana Magalhães Rebelo Alencar ^{1,*}

- ¹ Laboratory of Biophysics and Nanosystems, Physics Department, Federal University of Maranhão, Maranhão 65080805, Brazil
² Vascular Biology Laboratory, Heart Institute (InCor), University of Sao Paulo School of Medicine, São Paulo 05468000, Brazil
³ Department of Biochemistry, Federal University of Ceará, Ceará 60430275, Brazil
⁴ Drug Research and Development Center, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Ceará 60430275, Brazil
⁵ Department of Microbiology, Immunology, and Parasitology, Federal University of São Paulo, São Paulo 04023062, Brazil
⁶ Brazilian Nuclear Energy Commission, Nuclear Engineering Institute, Rio de Janeiro 21941906, Brazil
⁷ Laboratory of Nanoradiopharmacy, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro 23070200, Brazil
* Correspondence: luciana.alencar@ufma.br



Citation: Cardoso-Lima, R.; Filho, J.F.S.D.; de Araujo Dorneles, M.L.; Gaspar, R.S.; Souza, P.F.N.; Santos, C.C.d.; Santoro Rosa, D.; Santos-Oliveira, R.; Alencar, L.M.R. Nanomechanical and Vibrational Signature of Chikungunya Viral Particles. *Viruses* **2022**, *14*, 2821. <https://doi.org/10.3390/v14122821>

Academic Editors: Rafael Freitas de Oliveira Franca and Sergio de Paula

Received: 23 November 2022

Accepted: 14 December 2022

Published: 17 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Chikungunya virus (CHIKV) belongs to the genus Alphaviridae, with a single-stranded positive-sense RNA genome of 11.8 kbp encoding a polyprotein that generates both non-structural proteins and structural proteins. The virus is transmitted by the *Aedes aegypti* and *A. albopictus* mosquitoes, depending on the location. CHIKV infection leads to dengue-like musculoskeletal symptoms and has been responsible for several outbreaks worldwide since its discovery in 1952. Patients often experience fever, headache, muscle pain, joint swelling, and skin rashes. However, the ultrastructural and mechanical properties of CHIKV have not been fully characterized. Thus, this study aims to apply a physical approach to investigate CHIKV's ultrastructural morphology and mechanical properties, using atomic force microscopy and Raman spectroscopy as the main tools. Using nanomechanical assays of AFM and a gold nanoparticles substrate for Raman signal enhancement, we explored the conformational plasticity, morphology, vibrational signature, and nanomechanical properties of the chikungunya virus, providing new information on its ultrastructure at the nanoscale and offering a novel understanding of the virus' behavior upon mechanical disruptions besides its molecular composition.

Keywords: CHIKV; physical virology; ultrastructure; AFM; Raman

1. Introduction

Chikungunya virus (CHIKV) is a single-stranded RNA alphavirus with a reported diameter of approximately 70 nm [1]. These viruses have a monopartite positive-sense RNA genome enclosed in an icosahedral symmetry capsid surrounded by an envelope with spicules on the surface. Such spicules comprise heterodimers of E1 and E2 glycoproteins, facilitating attachment to cell surfaces [2–4]. CHIKV infections have been responsible for several outbreaks worldwide since their discovery [5]. Its transmission occurs mainly through the bite of previously infected female *A. albopictus* or *A. aegypti* mosquitoes [6,7]. CHIKV represents a significant threat because it causes abrupt (acute) and prolonged (chronic) symptoms of polyarthralgia and myalgia, which tend to be much more severe than other arboviruses. Importantly, patients might experience long-term sequelae of unclear pathophysiological explanations [7,8].

Ultrastructural Analysis of Cancer Cells Treated with the Radiopharmaceutical Radium Dichloride ($[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$): Understanding the Effect on Cell Structure

Joel Félix Silva Diniz Filho ¹, Aline Oliveira da Silva de Barros ², Martha Sahylí Ortega Pijeira ² , Eduardo Ricci-Junior ³ , Victor Midlej ⁴ , Mariana Pelissari Monteiro Aguiar Baroni ⁵ , Clenilton Costa dos Santos ¹, Luciana Magalhães Rebelo Alencar ¹  and Ralph Santos-Oliveira ^{2,6,*} 

¹ Biophysics and Nanosystems Laboratory, Department of Physics, Federal University of Maranhão, São Luis 65065690, MA, Brazil

² Laboratory of Nanoradiopharmacy and Synthesis of New Radiopharmaceuticals, Brazilian Nuclear Energy Commission, Nuclear Engineering Institute, Rio de Janeiro 21941906, RJ, Brazil

³ School of Pharmacy, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941900, RJ, Brazil

⁴ Laboratory of Structural Biology, Oswaldo Cruz Institute (FIOCRUZ), Rio de Janeiro 21040900, RJ, Brazil

⁵ Department of Natural Science and Mathematics, Federal Institute of Education, Science and Technology (IFSP), Campus São Paulo, São Paulo 01109010, SP, Brazil

⁶ Laboratory of Radiopharmacy and Nanoradiopharmaceuticals, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 23070200, RJ, Brazil

* Correspondence: roliveira@ien.gov.br

Abstract: The use of alpha-particle (α -particle) radionuclides, especially $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ (radium dichloride), for targeted alpha therapy is steadily increasing. Despite the positive clinical outcomes of this therapy, very little data are available about the effect on the ultrastructure of cells. The purpose of this study was to evaluate the nanomechanical and ultrastructure effect of $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ on cancer cells. To analyze the effect of $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ on tumor cells, human breast cancer cells (lineage MDA-MB-231) were cultured and treated with the radiopharmaceutical at doses of 2 μCi and 0.9 μCi . The effect was evaluated using atomic force microscopy (AFM) and transmission electron microscopy (TEM) combined with Raman spectroscopy. The results showed massive destruction of the cell membrane but preservation of the nucleus membrane. No evidence of DNA alteration was observed. The data demonstrated the formation of lysosomes and phagosomes. These findings help elucidate the main mechanism involved in cell death during α -particle therapy.

Keywords: cell death; cell mechanism; targeted alpha therapy; radiopharmaceutical



Citation: Diniz Filho, J.F.S.; de Barros, A.O.d.S.; Pijeira, M.S.O.; Ricci-Junior, E.; Midlej, V.; Baroni, M.P.M.A.; dos Santos, C.C.; Alencar, L.M.R.; Santos-Oliveira, R. Ultrastructural Analysis of Cancer Cells Treated with the Radiopharmaceutical Radium Dichloride ($[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$): Understanding the Effect on Cell Structure. *Cells* **2023**, *12*, 451. <https://doi.org/10.3390/cells12030451>

Academic Editor: Gang Dong

Received: 16 December 2022

Revised: 10 January 2023

Accepted: 30 January 2023

Published: 31 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Alpha particles (α -particles) travel short distances (50–90 μm) due to their high energy [1]. In addition, α -particles are associated with high linear energy transfer (60–230 $\text{keV}/\mu\text{m}$), making these radionuclides excellent choices for therapeutic purposes [1]. The effects of alpha particles on cells can be explained by the interaction of ionizing radiation with biological matter. This radiation can have either a direct effect through the transfer of energy to biomolecules (DNA, lipids, proteins), leading to their ionization, or indirect effects, in which energy is transferred to water, which is then dissociated into reactive oxygen species (ROS), among which the hydroxyl radical HO^\bullet is the most reactive [2]. Alpha particles must cross the cell membrane and cytoplasm, including organelles and nuclear membrane, to reach the nucleus. A single α -particle passing into the cell nucleus has a 20–40% probability of killing the cell [3]. Recent studies have demonstrated some effects of ionizing radiation in these compartments and the contribution of these extranuclear effects to cell death [4–7].

Among the α -emitting radionuclides, radium-223 was the first radionuclide approved for clinical application in 2013 [8]. Radium-223 is used in the chemical form of $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$

7.6±2.6, 4.6±2.5, and undetectable (DFO). Pharmacokinetic parameters were similar between CAT1 and CAT2. Meanwhile FRAP levels were increased in CAT1 and CAT2 vs placebo (p-value<0.001), plasma F2-isoprostanes were similar. Severe AE were not found in any patient.

Conclusion: Designed CAT is suitable to prevent MRI and safe for humans.

doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2023.10.194

182

Protein disulphide isomerase A1 (PDI) supports platelet-endothelium interaction in hyperglycaemia: impacts on endothelial membrane biophysics and secretion of adhesion-related proteins

Renato Gaspar¹, Álefe Roger Silva França², Joel Félix Silva Diniz-Filho², Clenilton Costa dos Santos², L. Teixeira³, Mariana Pereira Massafra⁴, Silvina Bustos⁵, Luciana Magalhães Rebelo Alencar², Graziella Eliza Ronsein⁶, Francisco R Laurindo⁷

^{1 2 5 6 7}University of São Paulo, São Paulo, Brazil

²Physics Department, Laboratory of Biophysics and Nanosystems, Federal University of Maranhão, Brazil

³Fundación Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

⁴Department of Biochemistry, University of São Paulo, Brazil

Diabetes leads to endothelial dysfunction, where platelets can bind to endothelial cells and precipitate thrombus formation. However, which/how surface proteins regulate platelet-endothelium interaction is still unclear. We and others have shown that peri/epicellular (pec) protein disulphide isomerase A1 (pecPDI), a dithiol-disulphide oxidoreductase, influences vascular cells adhesion. Therefore, we hypothesized that pecPDI regulates adhesion molecules on the surface of endothelial cells and/or platelets that influence the binding of these cells in hyperglycaemia. This was tested in vitro using HUVECs exposed to normoglycaemic (5.5 mM) or hyperglycaemic (25 mM) media for 48 hours. First, we show that platelets of healthy donors adhered 2x more to hyperglycaemic HUVECs when compared to normoglycaemic conditions and that inhibition of endothelial, but not platelet, pecPDI abrogated such increase. Since pecPDI modulates integrin activation, we assessed the adhesiveness of HUVECs onto different matrices and found increased adhesion of hyperglycaemic HUVECs onto fibrinogen and collagen surfaces. This was reversed when pecPDI was inhibited. As integrins regulate cytoskeletal reorganization and protein secretion, we investigated these components. Indeed, there were increased cytoskeletal reorganization and hydrogen peroxide production in hyperglycaemic cells, which were reversed when pecPDI was inhibited. These were translated in membrane rigidity and deformation as assessed by atomic force microscopy, corroborating that hyperglycaemic cells were stiffer and that pecPDI regulates cell stiffness. Moreover, a proteomic analysis of secreted proteins evidenced that only hyperglycaemic HUVECs secrete adhesion proteins (namely JAG1, LAMC1 and SLC3A2) potentially implicated in the effects above described. Genetic knockdown of

LAMC1 and SLC3A2, but not of JAG1, decreased platelet-endothelial interaction similar to pecPDI inhibition, suggesting the secretion of LAMC1 and SLC3A2 as a potential mechanism for pecPDI effects. These results indicate a mediator role for pecPDI in enhanced platelet-endothelial cell adhesion in hyperglycaemia and possible mechanisms involved in this effect, opening novel strategies to prevent diabetes-associated thrombosis.

doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2023.10.195

183

Nitro-fatty acids: a pleiotropic therapy for asthma

Victoria Heinrich¹, Crystal Uvalle¹, Michelle Manni¹, Sri Ramya Donepudi¹, Marigny Normann¹, Erica Fong², Steve Mullett¹, Bruce Freeman³, **Stacy Gelhaus**⁴

^{1 4}Pharmacology and Chemical Biology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, USA

²Health Sciences Mass Spectrometry Core, University of Pittsburgh, Pittsburgh, USA

³University of Pittsburgh, Pittsburgh, USA

Asthma is a chronic, complex disease that affects individuals across lifespan. While many persons present with a type 2 (Th2) inflammatory response, it is now recognized that multiple inflammatory pathways shape asthma phenotypes. Individuals with a mixed inflammatory response, including type 1 and type 17, are nonresponsive to steroids. In our murine model of allergic airway disease (AAD) and in a Phase 2 clinical study, we are investigating the use of the nitrated fatty acid electrophile, nitro-oleic acid (NO₂-OA), as a pleiotropic therapeutic that targets host and microbial inflammation and metabolism. NO₂-OA improves lung function in both lean and obese mice; however, the mechanism of action depends on the degree of adiposity. In these studies, age matched C57Bl/6 male and female mice were given standard normal chow or 60% high fat diet chow to induce obesity. Mice were sensitized with the environmental allergen, house dust mite (HDM) and cholera toxin adjuvant to provide a mixed Th2/Th17 inflammatory response. Prior to HDM challenge mice were gavaged with vehicle or 25 mg/kg NO₂-OA. Lung function was measured using the SciReq flexiVent apparatus and disease markers were interrogated by PCR and ELISA. Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry profiling and bulk RNA sequencing were conducted on serum and tissue. Microbial composition and function were determined by 16S sequencing. In lean mice with AAD, NO₂-OA reduced airway resistance, and in lean and obese mice with AAD both tissue elastance and small airway closure were reduced compared to vehicle controls. NO₂-OA had a profound effect gut microbial composition and function, and bile acid metabolism in obese mice with AAD compared to lean mice with AAD and controls. In totality, NO₂-OA is a potential therapy for asthma resulting from Th2/Th17 inflammatory signaling; however, the mechanism of action differs depending on the degree of metabolic dysregulation.

doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2023.10.196



AUTUMN MEETING 2023

BRAZILIAN PHYSICAL SOCIETY

May 21-25, 2023 - Ouro Preto - Minas Gerais

CERTIFICATE

The Organizing Committee awards an Honorable Mention to the Thematic Area Poster "Biomechanics" to Joel Félix Silva Diniz Filho for the work "Inquiry into the biophysical character of penile cancer tissues" by Joel Félix Silva Diniz Filho, Antônio Augusto Lima Teixeira, Ralph Santos-Oliveira, Clenilton Costa dos Santos, Gyl Eanes Barros Silva, Luciana Magalhães Rebelo Alencar presented at the Brazilian Physics Society Autumn Meeting, which took place in Ouro Preto, MG from May 21 to 25, 2023.

243-153-1

Ouro Preto, May 25, 2023

Luiz Gustavo Cançado
Chair

Andrea Latgé
Program Chair



Apêndice C

PARECER CONSUBSTÂNCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INVESTIGAÇÃO TECIDUAL E CELULAR DE TUMORES DE PÊNIS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA, MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E ESPECTROSCOPIA RAMAN

Pesquisador: Gyl Eanes Barros Silva

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

Versão: 1

CAAE: 56809122.0.0000.5086

Instituição Proponente: Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão/HU/UFMA

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO MARANHÃO - FAPEMA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.375.683

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1914203.pdf 16/03/2022 13:31:38.

Resumo:

O câncer de pênis (CaPe) é uma doença de baixa incidência em países desenvolvidos. Em contraste, países de baixa e média renda apresentam maior incidência da doença, especialmente na Ásia, África e América do Sul. Estudos dedicados à busca por fatores preditivos de metástase, bem como por potenciais alvos terapêuticos em CaPe são escassos se comparados a outras neoplasias mais prevalentes. Nesse contexto, o estudo de tecidos e células de CaPe utilizando ferramentas de nanotecnologia, como a Microscopia de Força Atômica (AFM), pode contribuir para a compreensão das propriedades dessas amostras em nanoescala e proposição de terapias a partir do uso de fármacos nanoestruturados. Diante disso, o presente estudo visa caracterizar as propriedades biofísicas, ultra estruturais e vibracionais de células de câncer de pênis. Trata-se de uma pesquisa biomédica com uma etapa

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

E-mail: cep@huufma.br



Continuação do Parecer: 5.375.683

retrospectiva e outra prospectiva de amostragem não-probabilística. Na etapa prospectiva, os sujeitos serão recrutados pelos pesquisadores especializados na área, em três hospitais de referência localizados em São Luís, Maranhão (Hospital Universitário

Presidente Dutra, Hospital do Câncer Aldenora Bello e Hospital de Câncer do Maranhão Dr. Tarquínio Lopes Filho. Esta etapa envolverá coleta de dados sociocomportamentais e coleta de amostras tumorais (tecido). Para esse grupo, serão realizadas as seguintes abordagens: cultivo celular, detecção e genotipagem de HPV, análises biofísicas por Microscopia de Força Atômica, Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia Raman. Na etapa retrospectiva, serão utilizadas amostras provenientes do biorrepositório de pesquisa do Laboratório de Imunofluorescência e Microscopia Eletrônica (LIME) do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA). As amostras foram coletadas à fresco ao longo da execução do projeto de pesquisa intitulado "PERFIL FISIOPATOLÓGICO E MOLECULAR DE TUMORES DE PÊNIS ASSOCIADOS À INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV). As amostras retrospectivas serão utilizadas para: , detecção e genotipagem de HPV, análises biofísicas por Microscopia de Força Atômica, Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia Raman. Espera-se que os resultados deste estudo auxiliem na determinação de marcadores biomecânicos e ultraestruturais de CaPe, aspectos importantes para a busca por potenciais drogas terapêuticas.

Introdução

O câncer de pênis (CaPe) é uma doença de baixa incidência em países desenvolvidos. Em contraste, países de baixa e média renda apresentam maior incidência da doença, especialmente na Ásia, África e América do Sul. Em certas regiões, o CaPe chega a representar 17% de todos os cânceres masculinos, com significativas taxas de morbidade e mortalidade¹. A incidência de câncer de pênis na Europa está na faixa de 0,9 a 2,1 casos por 100.000 homens por ano, e em Israel, 0,1 casos / 100.000 homens. Controversamente, no Maranhão (Brasil), a incidência é de 6,1/100.000 homens, representando a maior incidência global já registrada^{2,3}. Esses dados demonstraram a heterogeneidade da doença e seu impacto no sistema público de saúde. Os fatores de risco para a doença incluem principalmente a fimose, a má higiene e infecção pelo papilomavírus humano (HPV)⁴. Além disso, idade avançada, tabagismo, etilismo, condições de inflamação crônica e número de parceiros sexuais também parecem favorecer o surgimento tumoral⁵⁻⁷. Os métodos terapêuticos em CaPe ainda são incipientes. O mais comumente utilizado é a exérese simples da lesão ou realização de penectomia (amputação do pênis)⁸. A braquiterapia e radioterapia também podem ser adotadas, apesar da frequente resistência dos

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

E-mail: cep@huufma.br



tumores a essas abordagens, e mesmo os casos com boa resposta inicial têm índices significativos de recidiva local 9. O comprometimento inguinal (metástase linfonodal) é o principal fator de pior prognóstico e a busca por ferramentas preditivas de metástase tem sido o maior desafio em CaPe 10. Estudos dedicados à busca por fatores preditivos de metástase, bem como por potenciais alvos terapêuticos em CaPe são escassos se comparados a outras neoplasias mais prevalentes. Nesse contexto, o estudo de tecidos e células de CaPe utilizando ferramentas de nanotecnologia, como a Microscopia de Força Atômica (AFM), pode contribuir para a compreensão das propriedades dessas amostras em nanoescala e proposição de terapias a partir do uso de fármacos nanoestruturados. A maioria dos medicamentos nanotecnológicos para terapia ou diagnóstico de câncer depende de sua aplicabilidade no efeito de permeação e retenção aprimorada (EPR). No tecido normal, o endotélio vascular tem uma distância de cerca de 5 a 10 nm entre suas fenestrações (aberturas entre as células). Em contraste, os novos vasos que surgem por angiogênese no tumor sólido, têm fenestrações entre 100 e 780 nm. Isso ocorre devido a uma combinação complexa de vários fatores, que inclui: (1) ambiente hipóxico, (2) resposta inflamatória, (3) fatores angiogênicos aumentados, (4) inibidores angiogênicos reduzidos e (5) o próprio surgimento de novos vasos. Esses fatores tornam o tecido vascular irregular, resistência ao fluxo sanguíneo, má perfusão e má drenagem linfática 11,12. No presente estudo, realizaremos uma análise ultraestrutural do tecido de CaPe por AFM, mostrando as fenestrações e suas principais características. Outra abordagem interessante é a investigação do CaPe em nível celular. As propriedades mecânicas de células vivas possuem um papel crucial no bom desempenho de suas funções fisiológicas. Porém, nosso conhecimento nesse assunto ainda é limitado. Não é totalmente compreendido como uma célula responde, estrutural e mecanicamente a uma tensão externa ou como a elasticidade das células altera-se em organismos doentes em comparação a organismos saudáveis 13. Recentemente, a biomecânica de células do câncer tem sido apontada como um fator importante que está relacionado à função, adesão, motilidade, transformação e invasão da célula neoplásica. Estudos in vivo mostram que transformações cancerosas introduzem alterações significativas na estrutura e comportamento celular. Essas diferenças também podem causar alterações nas propriedades mecânicas, geralmente levando a uma maior deformabilidade das células 14. A quantificação da alteração de elasticidade, utilizando ensaios mecânicos em conjunto com um exame microscópico, pode tornar-se uma poderosa ferramenta no entendimento do comportamento de CaPe e abrir caminhos para novos tratamentos. A técnica de AFM se apresenta como uma ferramenta importante para a investigação de células e tecidos tumorais, especialmente por sua alta resolução, capacidade de nano-manipulação de superfícies, possibilidade de trabalhar em meios

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

E-mail: cep@huufma.br



Continuação do Parecer: 5.375.683

líquidos e por ser uma técnica não destrutiva 15. Alinhado com o AFM, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica relevante para estudo de sistemas biológicos, pois fornece a morfologia de superfície com alta resolução, podendo ser acoplada a análise química 16. O princípio de funcionamento do MEV é descrito pela irradiação de um fino feixe de elétrons colimado sobre a superfície da amostra e a interação elétron-amostra causa a emissão de uma série de radiações, dentre elas: elétrons secundários, elétrons retroespalhados, raios X característicos, elétrons Auger, entre outros. A radiação de interesse do MEV são os elétrons secundários (elétrons ejetados dos átomos da amostra devido às interações) responsáveis pela formação da imagem e os elétrons retroespalhados (elétrons primários após uma única colisão elástica) responsáveis pela imagem de variação da composição. No estudo de células e tecidos tumorais, o MEV pode acrescentar informações relevantes, especialmente em varreduras com muitos micrômetros quadrados 17. Outra técnica recentemente utilizada para diagnóstico diferencial de câncer é a Espectroscopia Raman (ER), que utiliza amostras de célula/tecido para detecção e está associada à determinação morfológica das células 18. A ER funciona através do espalhamento inelástico da radiação por moléculas polarizadas pelo feixe, e a resposta vibracional das moléculas permite que uma "imagem" seja formada através da espectroscopia 19. Quando gerados, esses picos correspondem à composição química da célula e podem ser usados para identificar alterações de componentes de membrana e tecidos provocadas pela doença. Estudos usando ER na análise do tecido mamário normal e canceroso relatam espectros de tecido não tumoral são atribuídos a moléculas lipídicas, enquanto os espectros de tecido canceroso foram atribuídos a moléculas de proteína 20. Quando um tumor se forma, ocorrem mudanças na estrutura e na concentração de várias biomoléculas que compõem os tecidos e células, como lipídios, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos 21. Normalmente, a ER não requer nenhuma preparação de amostra. Além disso, fortes bandas de água no espectro Raman não se sobrepõem à região da impressão digital, de modo que a ER se adapta melhor às aplicações biológicas do que a espectroscopia por infravermelho 22. A ER fornece informações moleculares de forma não invasiva e in situ sem rotulagem e, portanto, muitos artigos sobre aplicações Raman em assuntos biológicos e médicos têm sido descritos 23. No campo de sua aplicação da ER no diagnóstico de câncer, de fato, vários grupos de pesquisa têm se envolvido na exploração da viabilidade do diagnóstico de câncer em vários órgãos (cólon 24, colo do útero 25,26, esôfago 27, estômago 28, boca 29, pele 30). No estudo do CaPe a ER pode ser bastante útil, especialmente na identificação de modos vibracionais que possam estar associados à infecção pelo papilomavírus humano (HPV), vírus associado ao surgimento da doença, sobretudo no Maranhão 31. Dessa

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

E-mail: cep@huufma.br



Continuação do Parecer: 5.375.683

forma, o estudo propõe-se a investigação das propriedades ultraestruturais e biomecânica de células e tecidos de CaPe, comparando-se com células e tecidos não tumorais, utilizando-se um Microscópio de Força Atômica, juntamente com um Microscópio Eletrônico de Varredura, e seus componentes como ferramentas de caracterização morfológica de alta resolução e caracterização das propriedades biofísicas. Utilizando a Espectroscopia Raman para a identificação dos modos vibracionais dos tecidos de CaPe a fim de comparar com tecidos normais para servir de método diagnóstico.

Metodologia Proposta:

3.2.1 Critérios de inclusão

Serão considerados nesta pesquisa homens maiores de 18 anos com diagnóstico clínico e anatomopatológico de câncer de pênis, que possua indicação de amputação como primeira opção terapêutica. Somente serão considerados aqueles que concordarem em participar do estudo por meio de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

3.2.2 Critérios de exclusão. Não serão incluídos aqueles que realizaram tratamento quimioterápico ou radioterápico anteriormente ao procedimento cirúrgico.

3.2.3 Coleta tecido. As amostras utilizadas serão coletadas em centro cirúrgico da seguinte maneira: fragmentos de tecido fresco contendo amostra tumoral e não tumoral (normal) serão coletados e armazenados nas seguintes soluções: (1) RNAlater (ThermoFisher™), para extração de DNA e detecção de HPV; (2) Formol 10% tamponado: para análises biofísicas; (3) Meio de cultura para cultivo celular.

3.2.4 Detecção e genotipagem do HPV A detecção do HPV será conduzida por PCR (Polymerase Chain Reaction) convencional, em duas etapas (nested PCR), conforme descrito por Gravitt et al. (2002), e Jacobs et al., 1997).

3.2.5 Cultura de células. As amostras de tecido coletadas serão cultivadas em placas de 16 poços com lamínulas de vidro no fundo de cada poço, para posterior remoção e caracterização no AFM. As células serão cultivadas diretamente a partir da amostra de tecido primário e da metástase de linfonodo, de acordo com a metodologia descrita por Naumann e colaboradores 32.

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

E-mail: cep@huufma.br



3.2.6 Preparação para análise de propriedades biofísicas. As amostras coletadas em formol serão processadas, emblocadas em parafina e cortadas com o auxílio de um micrótomo, produzindo cortes de 2.0 mm de espessura. Os cortes serão depositados em lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro e então serão desparafinizados.

3.2.7 Caracterização de células e tecidos por AFM. As amostras de células e tecidos tumorais serão depositadas em lamínulas de 13 mm. As lamínulas serão fixadas com o auxílio de fita dupla face em um disco magnético do equipamento e levadas para o escâner de varredura. Serão utilizadas sondas de AFM com cantilêveres de baixa constante de mola (0.02 N/m), devido às características da amostra.

3.2.8 Obtenção das propriedades biofísicas de células e tecidos. Para os dados do AFM, a análise estatística da rugosidade será baseada na altura de cada pixel da imagem, analisada a partir do mapa de altura. O parâmetro R_q é a rugosidade quadrada média que é extremamente sensível a picos e depressões e é definido pela Equação (1) 22: $R_q = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N z_i^2}$

Os dados serão apresentados em gráficos de dispersão e intervalo, e os valores médios serão apresentados com seus respectivos desvios padrão.

3.2.9 Caracterização de células e tecidos via MEV. Será realizada utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura, marca Zeiss, modelo Evo HD, de pressão variável, equipado com detectores SE de alto vácuo e baixo vácuo, BSE e EDS.

3.2.10 Caracterização de células e tecidos via Espectroscopia Raman infravermelho 22. A ER fornece informações moleculares de forma não invasiva e in situ sem rotulagem e, portanto, muitos artigos sobre aplicações Raman em assuntos biológicos e médicos têm sido descritos 23. No campo de sua aplicação da ER no diagnóstico de câncer, de fato, vários grupos de pesquisa têm se envolvido na exploração da viabilidade do diagnóstico de câncer em vários órgãos (cólon 24, colo do útero 25,26, esôfago 27, estômago 28, boca 29, pele 30). No estudo do CaPe a ER pode ser bastante útil, especialmente na identificação de modos vibracionais que possam estar associados à infecção pelo papilomavírus humano (HPV), vírus associado ao surgimento da doença, sobretudo no Maranhão 31. Dessa forma, o estudo propõe-se a investigação das propriedades

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

E-mail: cep@huufma.br



Continuação do Parecer: 5.375.683

ultraestruturais e biomecânica de células e tecidos de CaPe, comparando-se com células e tecidos não tumorais, utilizando-se um Microscópio de Força Atômica, juntamente com um Microscópio Eletrônico de Varredura, e seus componentes como ferramentas de caracterização morfológica de alta resolução e caracterização das propriedades biofísicas. Utilizando a Espectroscopia Raman para a identificação dos modos vibracionais dos tecidos de CaPe a fim de comparar com tecidos normais para servir de método diagnóstico. Para as medidas de Espectroscopia Raman, após a análise por AFM, as amostras serão investigadas com o auxílio de um espectrômetro Horiba Jobin-Yvon, modelo T64000, com um sistema de detecção do tipo CCD resfriado com nitrogênio líquido. Todas as medidas serão obtidas em geometria de retroespalhamento pelo modo single. A visualização da superfície da amostra realizaremos com o uso de um microscópio da marca Olympus, com câmera de vídeo acoplada.

Metodologia de Análise de Dados:

A caracterização vibracional das amostras de CaPe será feita utilizando um espectrômetro Raman da Horiba modelo T64000. Esse modelo permite o uso de quatro diferentes sinais de excitação, sendo um na região do Ultravioleta (405 nm), dois na região do VIS (532 nm e 633 nm) e um na região do Infravermelho (785 nm). Além disso, devido à base automatizada, serão realizados mapeamentos de determinadas regiões das amostras, que é importante para avaliar diversos fatores em nanoestruturas, como encapsulamento dos compostos. A caracterização morfológica da superfície das nanoestruturas também será realizada por MEV utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura, 16 marca Zeiss, modelo Evo HD, de pressão variável, equipado com detectores SE de alto vácuo e baixo vácuo, BSE e EDS. Com este microscópio imagens com ampliações de até 500 mil vezes poderão ser obtidas. Com o detector EDS, podemos obter informações químicas das amostras, ou seja, podemos identificar os elementos químicos presentes nas amostras. As amostras serão metalizadas para avaliação no MEV. As medidas topográficas e mecânicas de AFM dos tecidos de CaPe serão realizadas usando um microscópio Multimode 8 (Bruker, Santa Barbara, CA) no modo Nanomecânica Quantitativa PeakForce Tapping. Para a análise ultraestrutural dos tecidos de CaPe, serão analisados parâmetros de rugosidade superficial como: Rugosidade superficial média; Rugosidade média quadrática; Assimetria e Curtose. A partir dos dados do AFM, o estudo estatístico da rugosidade é baseado na altura de cada pixel da imagem analisada a partir dos mapas de altura. Os parâmetros de rugosidade média quadrática, curtose e assimetria serão empregados para a análise de rugosidade e características quantitativas da superfície. Esses critérios serão escolhidos por serem mais sensíveis às diferenças

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

E-mail: cep@huufma.br



Continuação do Parecer: 5.375.683

entre picos e vales. Para o cálculo desses parâmetros, todas as imagens passarão por processamentos, como comando Flatten, que é responsável por eliminar ruídos, arcos e inclinações. Para isso, o software Nanoscope 2.0 de análise dos dados de AFM calcula polinômios de ajuste de mínimos quadrados individuais para cada linha. A partir dos dados do AFM, o estudo estatístico da rugosidade é baseado na altura de cada pixel da imagem analisada a partir dos mapas de altura. Os dados de adesão e dureza dos cortes de tecido de CaPe serão calculados a partir de cada uma das curvas de forças obtidas pelo AFM. Os dados de adesão serão obtidos diretamente do software Nanoscope Analysis 2.0. Para o cálculo da adesão, são considerados os valores de força negativos, abaixo da linha horizontal do gráfico, que representa o valor de deflexão e, conseqüentemente, de força nulo. Esses valores são calculados a partir das curvas de retração.

Desfecho Primário:

Determinação de marcadores biomecânicos e ultraestruturais de CaPe.

Desfecho Secundário:

- (1) Caracterização das alterações biofísicas de CaPe com e sem infecção por HPV.
- (2) Entendimento dos aspectos biofísicos entre os casos de câncer de Tamanho da Amostra no Brasil: 100 pênis HPV-positivos e HPV-negativos.
- (3) Fortalecimento os Grupos de pesquisa envolvidos no estudo, com o estreitamento dos laços entre os laboratórios participantes; bem como a formação de recursos humanos com a defesa de uma tese de Doutorado no Programa de Pós-graduação em Física da UFMA.
- (4) Divulgação em revistas indexadas da área de estudo, tal como apresentação dos mesmos em congressos nacionais e internacionais.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Caracterizar as propriedades biofísicas, ultraestruturais e vibracionais de células de câncer de

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

E-mail: cep@huufma.br



Continuação do Parecer: 5.375.683

pênis.

Objetivo Secundário:

- 2.2.1 Caracterizar as propriedades biofísicas, ultraestruturais e vibracionais de células de câncer de pênis por Microscopia de Força Atômica (AFM) e Espectroscopia Raman (ER);
- 2.2.2 Caracterizar a ultraestrutura do tecido tumoral peniano para avaliação de fenestrações tumorais;
- 2.2.3 Quantificar propriedades do tecido tumoral tais como rugosidade, assimetria, curtose, adesão, módulo de Young;
- 2.2.4 Aplicar metodologias de Redes Neurais para comparação das imagens de tecidos tumorais em comparação com tecido adjacente não tumoral;
- 2.2.5 Caracterização de células individuais de tumor de pênis e obtenção de propriedades como rugosidade de membrana, organização do citoesqueleto, adesão e viscoelasticidade;
- 2.2.6 Caracterizar os espectros vibracionais de células e tecidos de câncer de pênis;
- 2.2.7 Comparar as propriedades em nível tecidual e celular por meio do cultivo de células;
- 2.2.8 Comparar as propriedades de acordo com o perfil de infecção por HPV.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com o pesquisador:

Riscos:

Não há riscos diretos aos paciente que prejudique seu segmento hospitalar convencional. Há risco indireto envolvendo a quebra de sigilo e confidencialidade. Para evitar que isto ocorra, os dados pessoais serão mantidos em sigilo, sendo todos os materiais identificados por um código, desde a coleta até o processamento e armazenamento das amostras no laboratório de pesquisa.

Benefícios:

Direto: paciente poderá solicitar ser comunicado de todos os resultados desta pesquisa, especialmente o exame de HPV, podendo estes dados auxiliar indiretamente seu médico a melhor entender o quadro dos pacientes.

Indireto: os resultados poderão ajudar a entender o porquê e de que forma o tumor apareceu e poderá contribuir futuramente para a melhoria do diagnóstico e tratamento dessa doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa biomédica com uma etapa retrospectiva e outra prospectiva de

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

E-mail: cep@huufma.br



Continuação do Parecer: 5.375.683

amostragem não-probabilística. Na etapa prospectiva, os sujeitos serão recrutados pelos pesquisadores especializados na área, em três hospitais de referência localizados em São Luís, Maranhão (Hospital Universitário Presidente Dutra, Hospital do Câncer Aldenora Bello e Hospital de Câncer do Maranhão Dr. Tarquínio Lopes Filho, no período de abril de 2022 a abril de 2024 (sujeito à alteração mediante aprovação no CEP). Na etapa retrospectiva, serão utilizadas amostras provenientes do biorrepositório de pesquisa do Laboratório de Imunofluorescência e Microscopia Eletrônica (LIME) do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA). As amostras prospectivas serão utilizadas para cultivo celular e análise de propriedades biofísicas, enquanto as retrospectivas serão utilizadas somente para análise de aspectos biofísicos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O protocolo apresenta documentos referente aos "Termos de Apresentação Obrigatória": Folha de rosto, Declaração de compromisso em anexar os resultados na plataforma Brasil garantindo o sigilo, Orçamento financeiro detalhado, Cronograma com etapas detalhada, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) ou Termo de Dispensa do TCLE, Autorização do Gestor responsável do local para a realização da coleta de dados e Projeto de Pesquisa Original na íntegra em Word. Atende à Norma Operacional no 001/2013 (item 3/ 3.3). O protocolo apresenta ainda a declaração de responsabilidade financeira e termo de compromisso com a utilização dos dados resguardando o sigilo e a confidencialidade.

Recomendações:

Após o término da pesquisa o CEP-HUUFMA solicita que se possível os resultados do estudo sejam devolvidos aos participantes da pesquisa ou a instituição que autorizou a coleta de dados de forma anonimizada.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O PROTOCOLO não apresenta óbices éticos, portanto atende aos requisitos fundamentais da Resolução CNS/MS nº 466/12 e suas complementares. sendo considerado APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa–CEP-HUUFMA, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº.466/2012 e Norma Operacional nº. 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela APROVAÇÃO do projeto de pesquisa proposto.

Eventuais modificações ao protocolo devem ser inseridas à plataforma por meio de emendas de

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

UF: MA

Telefone: (98)2109-1250

Município: SAO LUIS

CEP: 65.020-070

E-mail: cep@huufma.br



Continuação do Parecer: 5.375.683

forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente após a coleta de dados e ao término do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1914203.pdf	16/03/2022 13:31:38		Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_assinada.PDF	16/03/2022 13:30:51	Gyl Eanes Barros Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	1_projeto.docx	16/03/2022 12:57:28	Gyl Eanes Barros Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	1_projeto.pdf	16/03/2022 12:57:18	Gyl Eanes Barros Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	16/03/2022 12:55:57	Gyl Eanes Barros Silva	Aceito
Outros	anuencia_hospital_geral.pdf	16/03/2022 12:54:25	Gyl Eanes Barros Silva	Aceito
Outros	Anuencia_Aldenora.pdf	16/03/2022 12:53:50	Gyl Eanes Barros Silva	Aceito
Outros	autorizacao_rede_pesquisa.pdf	16/03/2022 12:53:19	Gyl Eanes Barros Silva	Aceito
Declaração do Patrocinador	outorga_FAPEMA.pdf	16/03/2022 12:52:39	Gyl Eanes Barros Silva	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	16/03/2022 12:52:04	Gyl Eanes Barros Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_financeiro.pdf	16/03/2022 12:51:41	Gyl Eanes Barros Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_uso_de_dados.pdf	16/03/2022 12:51:25	Gyl Eanes Barros Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_anuencia_equipe.pdf	16/03/2022 12:51:07	Gyl Eanes Barros Silva	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório /	anuencia_biorrepositorio.PDF	16/03/2022 12:50:39	Gyl Eanes Barros Silva	Aceito

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

E-mail: cep@huufma.br



Continuação do Parecer: 5.375.683

Biobanco	anuencia_biorrepositorio.PDF	16/03/2022 12:50:39	Gyl Eanes Barros Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuencia_fisica.pdf	16/03/2022 12:50:31	Gyl Eanes Barros Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuencia_lime.PDF	16/03/2022 12:50:24	Gyl Eanes Barros Silva	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	16/03/2022 12:48:04	Gyl Eanes Barros Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO LUIS, 28 de Abril de 2022

Assinado por:

**Rita da Graça Carvalho Frazão Corrêa
(Coordenador(a))**

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

E-mail: cep@huufma.br

Apêndice D

GLOSSÁRIO

1. **Aberração Esférica** - Distorção óptica que ocorre em lentes e espelhos.
2. **Adsorção** - Processo pelo qual átomos, íons ou moléculas aderem a uma superfície.
3. **Análise Espectral** - Técnica usada para determinar a composição de uma substância.
4. **Amplificação** - Processo de aumento do sinal ou quantidade de um material genético.
5. **Amplitude** - Extensão máxima de uma vibração ou onda.
6. **Análise de Componentes Principais (PCA)** - Técnica estatística para simplificar dados multidimensionais.
7. **Análise Espectral** - Técnica usada para determinar a composição de uma substância.
8. **Análise Multivariada** - Técnica estatística que lida com múltiplas variáveis simultaneamente.
9. **Anisotropia** - Propriedade de um material de ter características diferentes em diferentes direções.
10. **Anticorpos** - Proteínas do sistema imunológico que
11. **Apoptose** - Processo de morte celular programada.

12. **Baixos Comprimentos de Onda (BCO)** - Referem-se a regiões do espectro eletromagnético com comprimentos de onda mais curtos.
13. **Campo Elétrico** - Região ao redor de uma carga elétrica onde forças elétricas podem ser sentidas.
14. **Carcinoma** - Tipo de câncer que se origina nas células epiteliais.
15. **Catálise** - Aceleração de uma reação química por uma substância chamada catalisador.
16. **Câmara de Vácuo** - Equipamento que permite a criação de um ambiente com pressão extremamente baixa.
17. **Câncer de Mama (CAMA)** - Tipo de câncer que se origina nas células do tecido mamário.
18. **Câncer de Pênis (CAPe)** - Tipo de câncer que se desenvolve nos tecidos do pênis.
19. **Carcinoma de Células Escamosas (CEC)** - Tipo de câncer que se origina nas células escamosas da pele ou das mucosas.
20. **Cromatografia** - Método de separação de misturas.
21. **Cromossomos** - Estruturas que contêm o DNA da célula.
22. **Desnaturação** - Processo de modificação da estrutura de proteínas ou ácidos nucleicos.
23. **Diferenciação Celular** - Processo pelo qual uma célula se especializa.
24. **Difração** - Desvio de ondas ao redor de obstáculos.
25. **DNA (Ácido Desoxirribonucleico)** - Molécula que contém a informação genética.
26. **Endocitose** - Processo de internalização de materiais pela célula.
27. **Espectrômetro** - Instrumento utilizado para medir propriedades de luz.
28. **Espectroscopia Raman (ER)** - Técnica espectroscópica usada para observar modos vibracionais, rotações e outras baixas frequências em um sistema.

29. **Eletroímã** - Ímã cujo campo magnético é produzido por uma corrente elétrica.
30. **Eletroforese** - Técnica para separar moléculas com base em seu movimento em um campo elétrico.
31. **Exocitose** - Processo de exportação de materiais da célula.
32. **Fibroblastos** - Células que sintetizam a matriz extracelular e colágeno.
33. **Fotólise** - Decomposição de moléculas pela ação da luz.
34. **Genoma** - Conjunto completo de genes de um organismo.
35. **Hidrofilicidade** - Afinidade por água.
36. **Hidrofobicidade** - Repelência a água.
37. **Imunohistoquímica** - Técnica para identificar antígenos em células.
38. **Interferometria** - Técnica que utiliza a interferência de ondas para medir pequenas distâncias ou mudanças na estrutura.
39. **Ionização** - Processo pelo qual um átomo ou molécula adquire uma carga elétrica.
40. **Ligação Covalente** - Ligação química que envolve o compartilhamento de pares de elétrons entre átomos.
41. **Ligação de Hidrogênio** - Tipo de atração intermolecular que ocorre entre moléculas polares.
42. **Magnificação** - Aumento aparente do tamanho de um objeto.
43. **Metástase** - Disseminação de células cancerígenas para outras partes do corpo.
44. **Microscopia de Força Atômica (AFM)** - Técnica de imagem que usa uma ponta fina para explorar a superfície de uma amostra com alta resolução.
45. **Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)** - Técnica de microscopia que utiliza um feixe de elétrons transmitido através de uma amostra ultrafina.
46. **Microespectrofotometria** - Técnica que combina microscopia e espectrofotometria para analisar amostras pequenas.

47. **Nefron** - Unidade funcional do rim.
48. **Neoplasia** - Crescimento anormal de tecido, que pode ser benigno ou maligno.
49. **Nucleotídeos** - Blocos de construção do DNA e RNA.
50. **Oncogene** - Gene que tem o potencial de causar câncer.
51. **Polarização** - Orientação das oscilações de uma onda transversal.
52. **Polimerização** - Processo de reação de moléculas pequenas para formar um polímero.
53. **Plasmídeo** - Molécula de DNA independente que pode replicar-se autonomamente.
54. **Potencial Zeta** - Medida da magnitude da carga elétrica na superfície de partículas em suspensão.
55. **Proteossoma** - Complexo que degrada proteínas desnecessárias ou danificadas.
56. **Reatividade Química** - Capacidade de uma substância de sofrer uma reação química.
57. **Resolução** - Capacidade de distinguir detalhes finos em uma imagem.
58. **RNA Mensageiro (mRNA)** - Tipo de RNA que transporta a informação genética do DNA para o ribossomo.
59. **Solubilidade** - Capacidade de uma substância de se dissolver em um solvente.
60. **Telômeros** - Regiões terminais dos cromossomos.
61. **Tomografia** - Técnica de imagem que cria uma seção transversal detalhada de um objeto.
62. **Transcriptômica** - Estudo do conjunto completo de RNA transcrito.
63. **Ultrassom** - Som com frequência acima do alcance da audição humana.
64. **Vacuolo** - Organelo envolvido no armazenamento de substâncias.

REFERÊNCIAS

2019. *Cancer*. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1. Acesso em: 22 Jun. 2023.
2021. *What Is Cancer?* Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>. Acesso em: 22 Jun. 2023.
2023. *Microscópio Eletrônico de Transmissão: Definição, Partes, Princípio de Funcionamento, Aplicações, Vantagens, Desvantagens*. Disponível em: <https://microbiologynote.com/pt/transmission-electron-microscope/>. Acesso em: 24 Jun. 2023.
- Aden, Durre, Zaheer, Sufian, & Raj, Swati. 2022. Challenges faced in the cancer diagnosis and management-COVID-19 pandemic and beyond-Lessons for future. *Heliyon*, **8**(12), e12091.
- Ahrensberg, J M, Olesen, F, Hansen, R P, Schrøder, H, & Vedsted, P. 2013. Childhood cancer and factors related to prolonged diagnostic intervals: a Danish population-based study. *British journal of cancer*, **108**(6), 1280–1287.
- Akers, Clare, & Holden, Fiona. 2020. An overview of the diagnoses and treatments for penile cancer. *British journal of nursing (Mark Allen Publishing)*, **29**(9), S6–S14.
- Al Tanoury, Z., Schaffner-Reckinger, E., Halavatyi, A., Hoffmann, C., Moes, M., Hadzic, E., Catillon, M., Yatskou, M., & Friederich, E. 2010. Quantitative kinetic study of the actin-bundling protein L-Plastin and its impact on actin renewal. *PLoS One*, **5**, e9210.
- Alencar, L. M. R. 2002. *Estudo morfológico e das propriedades elásticas de plaquetas humanas por microscopia de força atômica*. Dissertação (Mestrado em Física), Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

- Alencar, L. M. R. 2010. *Estudo da viscoelasticidade de células de câncer renal por microscopia de força atômica*. Tese (Doutorado em Física), Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- Ansardamavandi, Arian, Tafazzoli-Shadpour, Mohammad, Omidvar, Ramin, & Nili, Fatiemeh. 2020. An AFM-Based Nanomechanical Study of Ovarian Tissues with Pathological Conditions. *International journal of nanomedicine*, **15**, 4333–4350.
- Aro, Jon L, Dinning, Stephen I, Leung, Eugene Y, & Zuckier, Lionel S. 2019. Safe Use of Radium-223 Dichloride ((²²³RaCl₂)) Across a Wide Range of Clinical Scenarios, Incorporating a 10-year Single-Institution Radiation Safety Experience. *Journal of medical imaging and radiation sciences*, **50**(4S1), S36–S40.
- Asadian, S., Mirzaei, H., Kalantari, B. A., Davarpanah, M. R., Mohamadi, M., Shpichka, A., Nasehi, L., Es, H. A., Timashev, P., Najimi, M., Gheibi, N., Hassan, M., & Vosough, M. 2020. α -radiating radionuclides in cancer treatment, novel insight into promising approach. *Pharmacol Res*, **160**(October), 105070.
- Augusto, Antonio, Teixeira, Lima, Pereira, Syomara, Pinho, Jaqueline Diniz, Bastos, Thaís, Sobrinho, Moraes, Moura, Thalita, Rocha, Silva, Rodrigo, Denner, Duarte, Diniz, Barbosa, Liseana De Oliveira, Duarte, Wesleyan Everton, Regina, Marta, Belfort, De Castro, Duarte, Kelly Gomes, Lima, Antonio, Ribamar, José De, Calixto, Rodrigues, Cristiano, Lúcio, Paiva, Paiva, Sérgio, Francisco, Silva, Moura, Machado, Antonio, Junior, Alencar, Khayat, André Salim, Carvalhal, Graça, Corrêa, Frazão, Lages, Joyce Santos, Borges, Rodolfo, Silva, Wilson, Jr, Araújo, Eanes, Gyl, & Silva, Barros. 2022. A comprehensive analysis of penile cancer in the region with the highest worldwide incidence reveals new insights into the disease. *BMC Cancer*, 1–22.
- Auner, G.W., Koya, S.K., Huang, C., & et al. 2018. Applications of Raman spectroscopy in cancer diagnosis. *Cancer Metastasis Rev*, **37**, 691–717.
- Bannik, Kristina, Madas, Balázs, Jarzombek, Marco, Sutter, Andreas, Siemeister, Gerhard, Mumberg, Dominik, & Zitzmann-Kolbe, Sabine. 2019. Radiobiological effects of the alpha emitter Ra-223 on tumor cells. *Scientific Reports*, **9**(1), 18489.
- Bastatas, Lyndon, Martinez-Marin, Dalia, Matthews, James, Hashem, Jood, Lee, Yong J, Sennoune, Souad, Filleur, Stephanie, Martinez-Zaguilan, Raul, & Park, Soyeun. 2012.

- AFM nano-mechanics and calcium dynamics of prostate cancer cells with distinct metastatic potential. *Biochimica et biophysica acta*, **1820**(7), 1111–1120.
- Batani, S. B., Perry, L. M., Zhao, X., Arora, M., Daly, M. E., Stewart, S. L., Bold, R. J., Canter, R. J., & Sauder, C. A. M. 2021. The Role of Radiation Therapy in Addition to Lumpectomy and Hormone Therapy in Men 70 Years of Age and Older with Early Breast Cancer: A NCDB Analysis. *Annals of Surgical Oncology*, **28**(5), 2463–2471. Epub 2020 Oct 22.
- Bergholt, Mads Sylvest, Zheng, Wei, Lin, Kan, Ho, Khek Yu, Teh, Ming, Yeoh, Khay Guan, So, Jimmy Bok Yan, & Huang, Zhiwei. 2011. Characterizing variability in in vivo Raman spectra of different anatomical locations in the upper gastrointestinal tract toward cancer detection. *Journal of biomedical optics*, **16**(3), 37003.
- Bertolet, Alejandro, Ramos-Méndez, José, Paganetti, Harald, & Schuemann, Jan. 2021. The relation between microdosimetry and induction of direct damage to DNA by alpha particles. *Physics in medicine and biology*, **66**(15).
- Beton-Mysur, Karolina, Surmacki, Jakub, & Brożek-Phuska, Beata. 2024. Raman-AFM-fluorescence-guided impact of linoleic and eicosapentaenoic acids on subcellular structure and chemical composition of normal and cancer human colon cells. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **315**, 124242.
- Binnig, G., Quate, C. F., & Gerber, Ch. 1986. Atomic force microscope. *Physical Review Letters*, **56**(9), 930–933.
- Binnig, Gerd, & Rohrer, Heinrich. 1983. Scanning tunneling microscopy. *Surface science*, **126**(1-3), 236–244.
- Boldyrev, P. P., Egorova, B. V., Kokov, K. V., Perminov, Yu A., Proshin, M. A., & Chuvilin, D. Yu. 2018. Physical and chemical processes on the ^{212}Pb radionuclide production for nuclear medicine. *Journal of Physics: Conference Series*, **1099**(1).
- Bouvard, Véronique, Baan, Robert, Straif, Kurt, Grosse, Yann, Secretan, Béatrice, El Ghissassi, Fatiha, Benbrahim-Tallaa, Lamia, Guha, Neela, Freeman, Crystal, Galichet, Laurent, & Coglianò, Vincent. 2009 (apr). *A review of human carcinogens—Part B: biological agents*.

- Bowen, W.Richard, & Hilal, Nidal. 2009. *Atomic Force Microscopy in Process Engineering. Introduction to AFM for Improved Processes and Products*. Butterworth-Heinemann.
- Brechbiel, Martin W. 2007. Targeted α -therapy: past, present, future? *Dalton Trans.*, 4918–4928.
- Brereton, R. G. 2007. *Applied Chemometrics for Scientists*.
- Bruns, Roy E., & Faigle, J.F. G. 1985. *Quimiometria: Quimica Nova*,. Vol. 8.
- Butt, Hans Jürgen, Cappella, Brunero, & Kappl, Michael. 2005. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surf. Sci. Rep.*, **59**(1-6), 1–152.
- C. V. RAMAN. 1953. A new radiation, *Proc. Indian Acad. Sci.*
- Cappella, B., & Dietler, G. 1999. Force-distance curves by atomic force microscopy. *Surf. Sci. Rep.*
- Cazap, Eduardo, Magrath, Ian, Kingham, T. Peter, & Elzawawy, Ahmed. 2016. Structural barriers to diagnosis and treatment of cancer in low- and middle-income countries: The urgent need for scaling up. *Journal of Clinical Oncology*, **34**(1), 14–19.
- Chaichi, Ardalán, Prasad, Alisha, & Gartia, Manas Ranjan. 2018. Raman Spectroscopy and Microscopy Applications in Cardiovascular Diseases: From Molecules to Organs. *Biosensors*, **8**(4).
- Chang, Kai-Chih, Chiang, Yu-Wei, Yang, Chin-Hao, & Liou, Je-Wen. 2012. Atomic force microscopy in biology and biomedicine. *Tzu Chi Medical Journal*, **24**(4), 162–169.
- Chen, Jiao, Weihs, Daphne, Van Dijk, Marcel, & Vermolen, Fred J. 2018. A phenomenological model for cell and nucleus deformation during cancer metastasis. *Biomechanics and modeling in mechanobiology*, **17**(5), 1429–1450.
- Chen, S.H., & Soh, A.K. 2008. The capillary force in micro- and nano-indentation with different indenter shapes. *International Journal of Solids and Structures*, **45**(10), 3122–3137.

- Cheutin, Thierry, & Cavalli, Giacomo. 2019. The multiscale effects of polycomb mechanisms on 3D chromatin folding. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, **54**(5), 399–417.
- Christodoulidou, Michelle, Sahdev, Varun, Houssein, Selda, & Muneer, Asif. 2015. Epidemiology of penile cancer. *Current Problems in Cancer*, **39**(3), 126–136.
- Coelho, Ronald Wagner Pereira, Pinho, Jaqueline Diniz, Moreno, Janise Silva, Garbis, Dimitrius Vidal E Oliveira, do Nascimento, Athiene Maniva Teixeira, Larges, Joyce Santos, Calixto, José Ribamar Rodrigues, Ramalho, Leandra Naira Zambelli, da Silva, Antônio Augusto Moura, Nogueira, Leudivan Ribeiro, de Moura Feitoza, Laisson, & Silva, Gyl Eanes Barros. 2018. Penile cancer in Maranhão, Northeast Brazil: the highest incidence globally? *BMC urology*, **18**(1), 50.
- Cooper, Geoffrey M. 2000. *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition*. Sinauer Associates 2000.
- Costa, E.F. 2011. *Estudo das propriedades mecânicas de ligantes asfálticos por Microscopia de Força Atômica*. Tese (Doutorado em Física), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- Cubilla, Antonio L. 2009. The role of pathologic prognostic factors in squamous cell carcinoma of the penis. *World journal of urology*, **27**(2), 169–177.
- Da Silva, Martha Laysla Ramos, De Albuquerque, Beatriz Helena Dantas Rodrigues, Allyrio, Thales Araújo De Medeiros Fernandes, De Almeida, Valéria Duarte, Cobucci, Ricardo Ney De Oliveira, Bezerra, Fabiana Lima, Andrade, Vania Sousa, Lanza, Daniel Carlos Ferreira, De Azevedo, Jenner Christian Veríssimo, De Araújo, Josélio Maria Galvão, & Fernandes, José Veríssimo. 2021. The role of HPV-induced epigenetic changes in cervical carcinogenesis (Review). *Biomedical reports*, **15**(1), 60.
- de Almeida Gomes, I., da Lima, A. B., da Silva Brito, D. M., Lima, A. Almeida, de Oliveira, F. L., Zelaya, E. A. Espino, Alencar, L. Magalhães Rebello, de Souza Collares Maia, D. Castelo Branco, de Moraes, M. E. Amaral, Mesquita, F. Pantoja, Souza, P. F. Noronha, & Montenegro, R. C. 2024. Chem. Biodiversity 2024. *Chem. Biodiversity*, **21**, e202301840.

- de Broglie, Louis. 1924. *Recherches sur la théorie des Quanta*.
- Debye, P. 1920. Die van der Waalsschen Kohasion-skrafte. *Phys. Zs.*, **21**, 178–187.
- Degiorgio, V., & Corti, M. 1985. *Physics of Amphiphiles: Micelles, Vesicles and Microemulsions*. 1st edn. Annals of the International School of Physics, Enrico Fermi, Course Xc, vol. 1. Elsevier Science Ltd.
- Derjaguin, Boris V, Muller, Vladimir M, & Toporov, Yu P. 1975. Effect of contact deformations on the adhesion of particles. *Journal of Colloid and interface science*, **53**(2), 314–326.
- Dias, Catarina, & Nylandsted, Jesper. 2021. Plasma membrane integrity in health and disease: significance and therapeutic potential. *Cell Discovery*, **7**(1), 4.
- Dias Rates, Erick Rafael, Almeida, Charles Duarte, de Paula Fiod Costa, Elaine, Jansen de Mello Farias, Roberta, Santos-Oliveira, Ralph, & Rebelo Alencar, Luciana M. 2024. Evaluation of biophysical alterations in the epithelial and endothelial layer of patients with Bullous Keratopathy. *Experimental eye research*, **240**(mar), 109791.
- Dodo, Kosuke, Fujita, Katsumasa, & Sodeoka, Mikiko. 2022. Raman Spectroscopy for Chemical Biology Research. *Journal of the American Chemical Society*, **144**(43), 19651–19667.
- Doke, K., Butler, S., & Mitchell, M. P. 2018. Current Therapeutic Approaches to DCIS. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, **23**(4), 279–291. Epub 2018 Sep 29.
- Dornish, Michael, Heier-Baardson, Helene, & Pettersen, Erik. 2008. Cellular effects of alpha particle radiation from radium-223: AlpharadinTM, a new radiopharmaceutical for the treatment of skeletal metastases. *Cancer Research*, **68**(9_Supplement), 5749.
- Douglawi, Antoin, & Masterson, Timothy A. 2019. Penile cancer epidemiology and risk factors : a contemporary review. 145–149.
- Dufrêne, Yves F. 2009. Atomic force microscopy: a powerful molecular toolkit in nano-proteomics. *Proteomics*, **9**(24), 5400–5405.
- Engelsgjerd, Joshua S, & Lagrange, Chad A. 2023. Penile Cancer.

- Ereno, C., Gaafar, A., Garmendia, M., Etxezarraga, C., Bilbao, F.J., & López, J.I. 2008. Basaloid Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: A Clinicopathological and Follow-up Study of 40 Cases and Review of the Literature. *Head Neck Pathol*, **2**, 83–91.
- Feng, Yixiao, Spezia, Mia, Huang, Shifeng, Yuan, Chengfu, Zeng, Zongyue, Zhang, Linghuan, Ji, Xiaojuan, Liu, Wei, Huang, Bo, Luo, Wenping, Liu, Bo, Lei, Yan, Du, Scott, Vuppalapati, Akhila, Luu, Hue H, Haydon, Rex C, He, Tong-Chuan, & Ren, Guosheng. 2018. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes diseases*, **5**(2), 77–106.
- Filho, Joel Félix Silva Diniz, da Silva de Barros, Aline Oliveira, Pijeira, Martha Sahylí Ortega, Ricci-Junior, Eduardo, Midlej, Victor, Baroni, Mariana Pelissari Monteiro Aguiar, dos Santos, Clenilton Costa, Alencar, Luciana Magalhães Rebelo, & Santos-Oliveira, Ralph. 2023. Ultrastructural Analysis of Cancer Cells Treated with the Radiopharmaceutical Radium Dichloride ($[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$): Understanding the Effect on Cell Structure. *Cells*, **12**(3), 451.
- Fletcher, Daniel A, & Mullins, R Dyche. 2010. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, **463**(7280), 485–492.
- Galembeck, Fernando, Costa, Carlos A R, Burgo, Thiago A L, Bernardes, Juliana S, & Gouveia, Rubia F. 1980. Microscopia de sondas : uma caixa de ferramentas da nanotecnologia.
- Gemperline, Paul. 2006. *Practical Guide to Chemometrics*.
- Gheit, Tarik. 2019. Mucosal and Cutaneous Human Papillomavirus Infections and Cancer Biology. *Frontiers in oncology*, **9**, 355.
- Glauert, Audrey M, & Lewis, Peter R. 1999. *Biological Specimen Preparation for Transmission Electron Microscopy*. Princeton: Princeton University Press.
- Gong, Yuxuan, Misture, Scott T, Gao, Peng, & Mellott, Nathan P. 2016. Surface Roughness Measurements Using Power Spectrum Density Analysis with Enhanced Spatial Correlation Length. *The Journal of Physical Chemistry C*, **120**(39), 22358–22364.

- Graham, Lesley, & Orenstein, Jan Marc. 2007. Processing tissue and cells for transmission electron microscopy in diagnostic pathology and research. *2*(10), 2439–2450.
- Gravitt, P E, Peyton, C L, Alessi, T Q, Wheeler, C M, Coutlée, F, Hildesheim, A, Schiffman, M H, Scott, D R, & Apple, R J. 2000. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *Journal of clinical microbiology*, **38**(1), 357–361.
- Group, Targeted Alpha Therapy Working. 2018. Targeted Alpha Therapy, an Emerging Class of Cancer Agents: A Review. *JAMA Oncology*, **4**(12), 1765–1772.
- Guerra, Francisco D C, O’Sullivan, Joe M, McMahon, Stephen J, & Prise, Kevin M. 2020. Targeted Alpha Therapy: Current Clinical Applications. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, **35**(6), 404–417.
- Gupta, B., Bhattacharyya, A., Singh, A., Sah, K., & Gupta, V. 2018. Basaloid Squamous Cell Carcinoma – A Rare and Aggressive Variant of Squamous Cell Carcinoma: A Case Report and Review of Literature. *Natl J Maxillofac Surg*, **9**, 64–68.
- Habiger, C., Jäger, G., Walter, M., Iftner, T., & Stubenrauch, F. 2016. Interferon Kappa Inhibits Human Papillomavirus 31 Transcription by Induction of Sp100 Proteins. *J. Virol.*, **90**(2), 694–704.
- Hertz, HR. 1882. On contact between elastic bodies. *J. Reine Angew. Math*, **92**, 156–171.
- Hong, M, Xu, A, Zhou, H, Wu, L, Randers-Pehrson, G, Santella, R M, Yu, Z, & Hei, T K. 2010. Mechanism of genotoxicity induced by targeted cytoplasmic irradiation. *British journal of cancer*, **103**(8), 1263–1268.
- Housecroft, C.E., & Sharpe, A.G. 2018. *Inorganic Chemistry*. Pearson.
- Huang, H.-S., *et al.* . 2012. New antivirals inhibit early stages of HPV infection. *Antiviral Research*, **93**(2), 280–287.
- Huang, J., Zhang, L., Wan, D., Zhou, L., Zheng, S., Lin, S., & Qiao, Y. 2021. Extracellular Matrix and Its Therapeutic Potential for Cancer Treatment. *Signal Transduct Target Ther*, **6**, 153.
- Huber, Gerrit, Mantz, Hubert, Spolenak, Ralph, Mecke, Klaus, Jacobs, Karin, Gorb, Stanislav N, & Arzt, Eduard. 2005. Evidence for capillarity contributions to gecko adhesion

- from single spatula nanomechanical measurements. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **102**(45), 16293–16296.
- Humphrey, Peter A, Moch, Holger, Cubilla, Antonio L, Ulbright, Thomas M, & Reuter, Victor E. 2016. WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *European urology*, **70**(1), 106–119.
- Hussain, Shah, Mubeen, Iqra, Ullah, Niamat, Shah, Syed Shahab Ud Din, Khan, Bakh-tawar Abduljalil, Zahoor, Muhammad, Ullah, Riaz, Khan, Farhat Ali, & Sultan, Mu-jeeb A. 2022. Modern Diagnostic Imaging Technique Applications and Risk Factors in the Medical Field: A Review. *BioMed research international*, **2022**, 5164970.
- Hutchings, Joanne, Kendall, Catherine, Shepherd, Neil, Barr, Hugh, & Stone, Nicholas. 2010. Evaluation of linear discriminant analysis for automated Raman histological mapping of esophageal high-grade dysplasia. *Journal of biomedical optics*, **15**(6), 66015.
- Ibiyeye, Kehinde Muibat, Nordin, Norshariza, Ajat, Mokrish, & Zuki, Abu Bakar Zakaria. 2019. Ultrastructural Changes and Antitumor Effects of Doxorubicin/Thymoquinone-Loaded CaCO₃ Nanoparticles on Breast Cancer Cell Line. *Frontiers in Oncology*, **9**(July), 1–14.
- Iglehart, J. D., Wolfe, W. G., Vernon, W. B., Shelburne, J. D., & Sabiston, D. C. 1985. Electron microscopy in selection of patients with small cell carcinoma of the lung for medical versus surgical therapy. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, **90**(3), 351–360.
- Ikai, Atsushi. 2009. A Review on: Atomic Force Microscopy Applied to Nano-mechanics of the Cell. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, **119**(04), 47–61.
- INCA. 2002. Falando sobre câncer mama. *Falando sobre câncer de mama*, 12–13.
- INCA. 2021. *Detecção Precoce do Câncer* . Vol. 1.
- INCA. 2022. *Estimativa 2023: incidencia de cancer no Brasil*.
- Ishigaki, Mika, Maeda, Yasuhiro, Taketani, Akinori, Andriana, Bibin B, Ishihara, Ryu, Wongravee, Kanet, Ozaki, Yukihiro, & Sato, Hidetoshi. 2016. Diagnosis of early-stage esophageal cancer by Raman spectroscopy and chemometric techniques. *Analyst*, **141**(3), 1027–1033.

- Jacob, J. M., *et al.* . 2019. Comparative Genomic Profiling of Refractory and Metastatic Penile and Nonpenile Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: Implications for Selection of Systemic Therapy. *J. Urol.*, **201**(3), 541–548.
- Jain, R.K., Martin, J.D., & Stylianopoulos, T. 2014. The Role of Mechanical Forces in Tumor Growth and Therapy. *Annu Rev Biomed Eng*, **16**, 321–346.
- Jermyn, Michael, Desroches, Joannie, Aubertin, Kelly, St-Arnaud, Karl, Madore, Wendy-Julie, De Montigny, Etienne, Guiot, Marie-Christine, Trudel, Dominique, Wilson, Brian C, Petrecca, Kevin, & Leblond, Frederic. 2016. A review of Raman spectroscopy advances with an emphasis on clinical translation challenges in oncology. *Physics in medicine and biology*, **61**(23), R370–R400.
- Johnson, Kenneth Langstreth, & Johnson, Kenneth Langstreth. 1987. *Contact mechanics*. Cambridge university press.
- Johnson, KL. 1971. K. Kendall and AD Roberts. *Proc. Roy. Soc., London A*, **324**.
- Júnior, A. A. L. Teixeira, da Costa Melo, S. P., Pinho, J. D., & et al. 2022. A comprehensive analysis of penile cancer in the region with the highest worldwide incidence reveals new insights into the disease. *BMC Cancer*, **22**, 1063.
- K., Pearson. 1901. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science.*, **2**, 559–572.
- Kamemoto, Lori E, Misra, Anupam K, Sharma, Shiv K, Goodman, Marc T, Luk, Hugh, Dykes, Ava C, & Acosta, Tayro. 2010. Near-infrared micro-Raman spectroscopy for in vitro detection of cervical cancer. *Applied spectroscopy*, **64**(3), 255–261.
- Kanter, Elizabeth M, Vargis, Elizabeth, Majumder, Shovan, Keller, Matthew D, Woeste, Emily, Rao, Gautam G, & Mahadevan-Jansen, Anita. 2009. Application of Raman spectroscopy for cervical dysplasia diagnosis. *Journal of Biophotonics*, **2**(1-2), 81–90.
- Keesom, WM. 1921. Van der Waals attractive force. *Physikalische Zeitschrift*, **22**, 129–141.

- Kidiyoor, Gururaj Rao, Li, Qingsen, Bastianello, Giulia, Bruhn, Christopher, Giovannetti, Irene, Mohamood, Adhil, Beznoussenko, Galina V, Mironov, Alexandre, Raab, Matthew, Piel, Matthieu, Restuccia, Umberto, Matafora, Vittoria, Bachi, Angela, Barozzi, Sara, Parazzoli, Dario, Frittoli, Emanuela, Palamidessi, Andrea, Panciera, Tito, Piccolo, Stefano, Scita, Giorgio, Maiuri, Paolo, Havas, Kristina M, Zhou, Zhong-Wei, Kumar, Amit, Bartek, Jiri, Wang, Zhao-Qi, & Foiani, Marco. 2020. ATR is essential for preservation of cell mechanics and nuclear integrity during interstitial migration. *Nature Communications*, **11**(1), 4828.
- Kim, Grace J, Chandrasekaran, Krish, & Morgan, William F. 2006. Mitochondrial dysfunction, persistently elevated levels of reactive oxygen species and radiation-induced genomic instability: a review. *Mutagenesis*, **21**(6), 361–367.
- Kim, Seongoh, Lee, Yunkyung, Lee, Manhee, An, Sangmin, & Cho, Sang-Joon. 2021. Quantitative Visualization of the Nanomechanical Young's Modulus of Soft Materials by Atomic Force Microscopy. *Nanomaterials*, **11**(6).
- King, J. 2007. Role of Transmission Electron Microscopy in Cancer Diagnosis and Research. *Microscopy and Microanalysis*, **13**(S02), 20–21.
- Kosareva, Ekaterina K, Pivkina, Alla N, & Muravyev, Nikita V. 2022. Atomic force microscopy in energetic materials research: A review. *Energetic Materials Frontiers*, **3**(4), 290–302.
- Lamparter, Lucas, & Galic, Milos. 2020. Cellular Membranes, a Versatile Adaptive Composite Material. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **8**.
- Laschinsky, C., Herrmann, K., Fendler, W., Nader, M., Lahner, H., Hadaschik, B., & Sandach, P. 2022. Onkologische Theranostik in der Nuklearmedizin [Oncological theranostics in nuclear medicine]. *Radiologie (Heidelb)*, **62**(10), 875–884.
- Leite, Fabio de Lima. 2002. *Caracterização de forças de adesão em materiais utilizando a microscopia de força atômica*. Ph.D. thesis, Universidade de São Paulo.
- Levillain, A, Confavreux, C B, Decaussin-Petrucci, M, Durieux, E, Paparel, P, Le-Bail Carval, K, Maillard, L, Bermond, F, Mitton, D, & Follet, H. 2022. Mechanical properties

- of breast, kidney, and thyroid tumours measured by AFM: Relationship with tissue structure. *Materialia*, **25**, 101555.
- Lieber, Chad A, Majumder, Shovan K, Billheimer, Dean, Ellis, Darrel L, & Mahadevan-Jansen, Anita. 2008. Raman microspectroscopy for skin cancer detection in vitro. *Journal of biomedical optics*, **13**(2), 24013.
- Lima, Ruana Cardoso. 2019. *Marcadores de superfície para células de leucemias mieloblásticas: uma proposta através da microscopia de força atômica*. Monografia (Graduação em Física), Universidade Federal do Maranhão, São Luís.
- Liu, Y., *et al.* . 2024. Developing a prognosis and chemotherapy evaluating model for colon adenocarcinoma based on mitotic catastrophe-related genes. *Sci. Rep.*, **14**(1), 1655.
- Liu, Z.-G., & Jiao, D. 2019. Necroptosis, Tumor Necrosis and Tumorigenesis. *Cell Stress*, **4**, 1–8.
- Loitto, V.-M., Forslund, T., Sundqvist, T., Magnusson, K.-E., & Gustafsson, M. 2002. Neutrophil leukocyte motility requires directed water influx. *J. Leukoc. Biol.*, **71**(2), 212–222.
- London, Fritz. 1937. The general theory of molecular forces. *Transactions of the Faraday Society*, **33**, 8b–26.
- Losquadro, William D. 2017. Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, **25**(3), 283–289.
- MacCurtain, Benjamin M, Quirke, Ned P, Thorpe, Stephen D, & Gallagher, Tom K. 2021. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Relating Biomechanics and Prognosis. *Journal of clinical medicine*, **10**(12).
- Manafi-Farid, Reyhaneh, Masoumi, Fardad, Divband, Ghasemali, Saidi, Bahare, Atainia, Bahar, Hertel, Fabian, Schweighofer-Zwink, Gregor, Morgenroth, Agnieszka, & Beheshti, Mohsen. 2020. Targeted Palliative Radionuclide Therapy for Metastatic Bone Pain. *Journal of clinical medicine*, **9**(8).

- Marques, Inês A, Abrantes, Ana M, Pires, Ana S, Neves, Ana R, Caramelo, Francisco J, Rodrigues, Tiago, Matafome, Paulo, Tavares-da Silva, Edgar, Gonçalves, Ana C, Pereira, Cristiana C, Teixeira, João P, Seïça, Raquel, Costa, Gracinda, Figueiredo, Arnaldo, & Botelho, Maria F. 2021. Kinetics of radium-223 and its effects on survival, proliferation and DNA damage in lymph-node and bone metastatic prostate cancer cell lines. *International journal of radiation biology*, **97**(5), 714–726.
- Martins, Vicenilma de Andrade, Pinho, Jaqueline Diniz, Teixeira Júnior, Antonio Augusto Lima, Nogueira, Leudivan Ribeiro, Silva, Fábio França, Maulen, Victor Eduardo, Khayat, André Salim, Calixto, José de Ribamar Rodrigues, Costa, Herikson Araújo, Ramalho, Leandra Naira Zambelli, & Silva, Gyl Eanes Barros. 2018. P16INK4a expression in patients with penile cancer. *PloS one*, **13**(10), e0205350.
- Matthews, Quinn, Jirasek, Andrew, Lum, Julian, Duan, Xiaobo, & Brolo, Alexandre G. 2010. Variability in Raman spectra of single human tumor cells cultured in vitro: Correlation with cell cycle and culture confluency. *Applied Spectroscopy*, **64**(8), 871–887.
- Maurice, Patricia A. 1996. Applications of atomic-force microscopy in environmental colloid and surface chemistry. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **107**, 57–75.
- MEDEIROS, Tatiana, & MESQUITA, Guasque De. 2003. *Estatística do Ganho Dependente da Polarização em Sistemas Ópticos com Amplificação RAMAN*. Ph.D. thesis, Pontifícia Universidade Católica.
- Mehrabi, M., Amini, F., & Mehrabi, S. 2018. Active Role of the Necrotic Zone in Desensitization of Hypoxic Macrophages and Regulation of CSC-Fate: A Hypothesis. *Front. Oncol.*, **8**.
- Meira, DD, Marinho-Carvalho, MM, Teixeira, CA, Veiga, VF, DaPoian, AT, Holandino, C., de Freitas, MS, & Sola-Penna, M. 2005. Clotrimazole decreases human breast cancer cell viability through alterations in cytoskeleton-associated glycolytic enzymes. *Molecular Genetics and Metabolism*, **84**, 354–362.
- Michalczyk, K., Misiak, M., & Chudecka-Głaz, A. 2022. Can adjuvant HPV vaccination

be useful in preventing persistent/recurrent cervical dysplasia after surgical treatment?
-A review of the literature. *Cancers (Basel)*, **14**(18).

Moen, Christian A, Falkenthal, Thea E, Thorkelsen, Tor K, Hopland, Andreas, Rio, Oline E, Honoré, Alfred, Juliebø-Jones, Patrick, Dongre, Harsh N, Costea, Daniela E, Bostad, Leif, Brennan, Paul, Johansson, Mattias, Ferreiro-Iglesias, Aida, Brenner, Nicole, Waterboer, Tim, Nygård, Mari, & Beisland, Christian. 2023. Penile Cancers Attributed to Human Papillomavirus Are Associated with Improved Survival for Node-positive Patients. Findings from a Norwegian Cohort Study Spanning 50 Years. *European urology oncology*, nov.

Morishita, K., Watanabe, K., & Ichijo, H. 2019. Cell Volume Regulation in Cancer Cell Migration Driven by Osmotic Water Flow. *Cancer Science*, **110**, 2337–2347.

Morris, Michael J, Corey, Eva, Guise, Theresa A, Gulley, James L, Kevin Kelly, William, Quinn, David I, Scholz, Arne, & Sgouros, George. 2019. Radium-223 mechanism of action: implications for use in treatment combinations. *Nature reviews. Urology*, **16**(12), 745–756.

Movasaghi, Zanyar, Rehman, Shazza, & Rehman, Ihtesham U. 2007. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, **42**(5), 493–541.

Murrant, CL, & Fletcher, NM. 2022. Capillary communication: the role of capillaries in sensing the tissue environment, coordinating the microvascular, and controlling blood flow. *Am. J. Physiol. Heart Circumference. Physiol.*, **323**(5), H1019–H1036.

Mushtaq, S., Ae, P. J., Kim, J. Y., Lee, K. C., & Kim, K. I. 2023. The role of radiolabeling in BNCT tracers for enhanced dosimetry and treatment planning. *Theranostics*, **13**(15), 5247–5265.

Myers, D. 2002. *Some general concepts about interfaces. Interfaces and colloids (Part 1)*.

Nakamoto, Kazuo, & Brown, Chris W. 2003. *Introductory Raman Spectroscopy*.

Nanobiotechnol, J, Deng, Xiangying, Xiong, Fang, Li, Xiayu, Xiang, Bo, Li, Zheng, Wu, Xu, Guo, Can, & Li, Xiaoling. 2018. Application of atomic force microscopy in cancer research. 1–15.

- Necchi, Andrea. 2021. Penile cancer. *Nature Reviews Disease Primers*.
- Nilsson, Sten, Larsen, Roy H, Fosså, Sophie D, Balteskard, Lise, Borch, Kari W, Westlin, Jan-Erik, Salberg, Gro, & Bruland, Oyvind S. 2005. First clinical experience with alpha-emitting radium-223 in the treatment of skeletal metastases. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **11**(12), 4451–4459.
- NobelPrize.org. 2021. *The Nobel Prize*. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1986/press-release/>. Acesso em: 25 Fev. 2021.
- Noguchi, Masayuki, Hirata, Noriyuki, Tanaka, Tsutomu, Suizu, Futoshi, Nakajima, Hiroshi, & Chiorini, John A. 2020. Autophagy as a modulator of cell death machinery. *Cell Death & Disease*, **11**(7), 517.
- O'Dwyer, Elisabeth, Bodei, Lisa, & Morris, Michael J. 2021. The Role of Theranostics in Prostate Cancer. *Seminars in radiation oncology*, **31**(1), 71–82.
- Ohnesorge, Frank, & Binnig, Gerd. 1993. True atomic resolution by atomic force microscopy through repulsive and attractive forces. *Science*, **260**(5113), 1451–1456.
- Ong, Mei Shan, Deng, Shuo, Halim, Clarissa Esmeralda, Cai, Wanpei, Tan, Tuan Zea, Huang, Ruby Yun-Ju, Sethi, Gautam, Hooi, Shing Chuan, Kumar, Alan Prem, & Yap, Celestial T. 2020. Cytoskeletal Proteins in Cancer and Intracellular Stress: A Therapeutic Perspective. *Cancers*, **12**(1).
- Ong, Yi Hong, Lim, Mayasari, & Liu, Quan. 2012. Comparison of principal component analysis and biochemical component analysis in Raman spectroscopy for the discrimination of apoptosis and necrosis in K562 leukemia cells. *Optics express*, **20**(20), 22158–22171.
- OPAS. 2020. *Cancer*. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/cancer>. Acesso em: 16 Ago. 2023.
- Organization, World Health. 2007. *INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Volume 90 Human Papillomaviruses*. Vol. 90.

- Oster, G. F., & Perelson, A. S. 1987. The Physics of Cell Motility. *J. Cell Sci.*, **1987**(Supplement_8), 35–54.
- Ozawa, M., & Kemler, R. 1998. Altered Cell Adhesion Activity by Pervanadate Due to the Dissociation of Alpha-Catenin from the E-Cadherin.Catenin Complex. *J Biol Chem*, **273**(6166-6170).
- Paiva, Geise Rezende, de Oliveira Araújo, Iguaracyra Barreto, Athanzio, Daniel Abensur, & de Freitas, Luiz Antonio Rodrigues. 2015. Penile cancer: impact of age at diagnosis on morphology and prognosis. *International urology and nephrology*, **47**(2), 295–299.
- Panero, Santos, Fátima, Maria De, Vieira, Pereira, & Fagundes, Ângela Maria. 2009. Aplicação da análise exploratória de dados na discriminação geográfica do quiabo do Rio Grande do Norte e Pernambuco. **1**(3), 228–237.
- Papagiannopoulou, D. 2017. Technetium-99m radiochemistry for pharmaceutical applications. *J Label Compd Radiopharm*, **60**, 502–520.
- Parker, C., Nilsson, S., Heinrich, D., Helle, S.I., O’Sullivan, J.M., Fosså, S.D., Chodacki, A., Wiechno, P., Logue, J., Seke, M., Widmark, A., Johannessen, D.C., Hoskin, P., Bottomley, D., James, N.D., Solberg, A., Syndikus, I., Kliment, J., Wedel, S., Boehmer, S., Dall’Oglio, M., Franzén, L., Coleman, R., Vogelzang, N.J., O’Byrne-Tear, C.G., Staudacher, K., Garcia-Vargas, J., Shan, M., Bruland, Ø.S., & Sartor, O. 2013. Alpha Emitter Radium-223 and Survival in Metastatic Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, **369**(3), 213–223.
- Patel, Aisha. 2020. Benign vs Malignant Tumors. *JAMA oncology*, **6**(9), 1488.
- Penna, L. S., Henriques, J. A. P., & Bonatto, D. 2017. Anti-mitotic agents: Are they emerging molecules for cancer treatment? *Pharmacol. Ther.*, **173**, 67–82.
- Persson, H Lennart, Kurz, Tino, Eaton, John W, & Brunk, Ulf T. 2005. Radiation-induced cell death: importance of lysosomal destabilization. *The Biochemical journal*, **389**(Pt 3), 877–884.
- Pichardo-Molina, J L, Frausto-Reyes, C, Barbosa-García, O, Huerta-Franco, R, González-Trujillo, J L, Ramírez-Alvarado, C A, Gutiérrez-Juárez, G, & Medina-Gutiérrez, C.

2007. Raman spectroscopy and multivariate analysis of serum samples from breast cancer patients. *Lasers in medical science*, **22**(4), 229–236.
- PINTO, Raffael Costa de Figueiredo. 2013. *Caracterização das Propriedades Estruturais de Molibdatos e Óxidos Nanoestruturados Através de Espectroscopia Raman*. Ph.D. thesis.
- Plante, I. 2021. A review of simulation codes and approaches for radiation chemistry. *Phys Med Biol*, **66**.
- Pouget, Jean-Pierre, & Constanzo, Julie. 2021. Revisiting the Radiobiology of Targeted Alpha Therapy. *Frontiers in medicine*, **8**, 692436.
- Pouget, Jean-Pierre, Georgakilas, Alexandros G, & Ravanat, Jean-Luc. 2018. Targeted and Off-Target (Bystander and Abscopal) Effects of Radiation Therapy: Redox Mechanisms and Risk/Benefit Analysis. *Antioxidants & redox signaling*, **29**(15), 1447–1487.
- Radmacher, M. 2007. Studying the Mechanics of Cellular Processes by Atomic Force Microscopy. *Methods in Cell Biology. Cell Mechanics.*, **83**, 347–342.
- Rebelo, L M, de Sousa, J S, Filho, J Mendes, & Radmacher, M. 2013a. Comparison of the viscoelastic properties of cells from different kidney cancer phenotypes measured with atomic force microscopy. *Nanotechnology*, **24**(5), 55102.
- Rebelo, LM, de Sousa, JS, Mendes Filho, J, & Radmacher, M. 2013b. Comparison of the viscoelastic properties of cells from different kidney cancer phenotypes measured with atomic force microscopy. *Nanotechnology*, **24**(5), 055102.
- Rianna, C, & Radmacher, M. 2017. Influence of microenvironment topography and stiffness on the mechanics and motility of normal and cancer renal cells. *Nanoscale*, **9**(31), 11222–11230.
- Ribatti, Domenico, & Pezzella, Francesco. 2021. Overview on the Different Patterns of Tumor Vascularization. *Cells*, **10**(3).
- Rosengren, S., Henson, P. M., & Worthen, G. S. 1994. Migration-associated volume changes in neutrophils facilitate the migratory process in vitro. *Am. J. Physiol. Physiol.*, **267**(6), C1623–C1632.

- Sciences, Molecular. 2021. Transmission Electron Microscopy as a Powerful Tool to Investigate the Interaction of Nanoparticles with Subcellular Structures.
- Senden, Tim J. 2001. Force microscopy and surface interactions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **6**(2), 95–101.
- SESSION JR, Paulo Dantas. 2005. Confinamento de Fónons Ópticos Em Estruturas Piezoelétricas Periódicas E Quase Periódicas. *Universidade Federal do Rio Grande do Norte*.
- Sheth, Maulee, & Esfandiari, Leyla. 2022. Bioelectric Dysregulation in Cancer Initiation, Promotion, and Progression. *Frontiers in Oncology*, **12**, 846917.
- Silva, Diego Filipe Bezerra, Santos, Hellen Bandeira de Pontes, León, Jorge Esquiche, Gomes, Daliana Queiroga de Castro, Alves, Pollianna Muniz, & Nonaka, Cassiano Francisco Weege. 2019 (feb). *Clinicopathological and immunohistochemical analysis of spindle cell squamous cell carcinoma of the tongue: a rare case*.
- Singh, S P, Deshmukh, Atul, Chaturvedi, Pankaj, & Murali Krishna, C. 2012. In vivo Raman spectroscopic identification of premalignant lesions in oral buccal mucosa. *Journal of biomedical optics*, **17**(10), 105002.
- Stroka, K.M., Jiang, H., Chen, S.-H., Tong, Z., Wirtz, D., Sun, S.X., & Konstantopoulos, K. 2014. Water Permeation Drives Tumor Cell Migration in Confined Microenvironments. *Cell*, **157**, 611–623.
- Subbiah, Vivek, Anderson, Peter Meade, Kairemo, Kalevi, Huh, Winston W, Ravi, Vinod, Daw, Najat C, Somaiah, Neeta, Benjamin, Robert S, Hong, David S, Ravizzini, Gregory, & Rohren, Eric. 2016. Alpha particle radium-223 dichloride ($^{223}\text{RaCl}_2$) in high risk osteosarcoma. *Journal of Clinical Oncology*, **34**(15_suppl), 11029.
- Svetličič, Maja, Bomhard, Anton, Sterr, Christoph, Brückner, Fabian, Płodowska, Magdalena, Lisowska, Halina, & Lundholm, Lovisa. 2020. Alpha Radiation as a Way to Target Heterochromatic and Gamma Radiation-Exposed Breast Cancer Cells. *Cells*, **9**(5).
- Takeishi, N., & Imai, Y. 2017. Microparticle capture by bolus flow of red blood cells in capillaries. *Sci. Rep.*, **7**(1), 5381.

- Talari, Abdullah Chandra Sekhar, Movasaghi, Zanyar, Rehman, Shazza, & Rehman, Ihtesham Ur. 2015. Raman spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, **50**(1), 46–111.
- Thomas, A., Necchi, A., Muneer, A., Tobias-Machado, M., Tran, A.T.H., Van Rompuy, A.-S., Spiess, P.E., & Albersen, M. 2021. Penile Cancer. *Nat Rev Dis Primers*, **7**, 1–24.
- Thuler, Luiz C. Santos. 2016. *ABC do Câncer, Abordagens Básicas para o controle do Câncer*.
- Tonnemacher, Susanne, Eltsov, Mikhail, & Jakob, Burkhard. 2020. Correlative Light and Electron Microscopy (CLEM) Analysis of Nuclear Reorganization Induced by Clustered DNA Damage Upon Charged Particle Irradiation. *International journal of molecular sciences*, **21**(6).
- Vahabi, Surena, Nazemi Salman, Bahareh, & Javanmard, Anahita. 2013. Atomic force microscopy application in biological research: a review study. *Iranian journal of medical sciences*, **38**(2), 76–83.
- Valderrama, Patrícia, Braga, Jez W. B., & Poppi, Ronei J. 2009. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. *Química Nova*, **32**, 1278–1287.
- van der Doelen, Maarten J, Isaacsson Velho, Pedro, Sloombeek, Peter H J, Pamidimarri Naga, Samhita, Bormann, Maren, van Helvert, Sjoerd, Kroeze, Leonie I, van Oort, Inge M, Gerritsen, Winald R, Antonarakis, Emmanuel S, & Mehra, Niven. 2020. Impact of DNA damage repair defects on response to radium-223 and overall survival in metastatic castration-resistant prostate cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, **136**(9), 16–24.
- Velázquez, EF, Melamed, J., Barreto, JE, Agüero, F., & Cubilha, AL. 2005. Sarcomatoid Carcinoma of the Penis: A Clinical Pathological Study of 15 Cases. *Am J Surg Pathol*, **29**, 1152–1158.
- Volz, J. B., Geibert, W., Köhler, D., van der Loeff, M. M. R., & Kasten, S. 2023. Alpha radiation from polymetallic nodules and potential health risks from deep-sea mining. *Sci Rep*, **13**(1), 7985.

- Wanick, Fabiana Braga França, Teichner, Tullia Cuzzi, Silva, Rosane, Magnanini, Mônica Maria Ferreira, & de Azevedo, Lucia Maria Soares. 2011. Squamous cell carcinoma of the penis: clinicopathologic study of 34 cases. *An Bras Dermatol*, **31**(SUPPL. 1), 17–20.
- Weber, Andreas, dM. Vivanco, Maria, & Toca-Herrera, José L. 2023. Application of self-organizing maps to AFM-based viscoelastic characterization of breast cancer cell mechanics. *Scientific Reports*, **13**(1), 3087.
- Weisenhorn, AL, Maivald, P, Butt, H-J, & Hansma, PK. 1992. Measuring adhesion, attraction, and repulsion between surfaces in liquids with an atomic-force microscope. *Physical Review B*, **45**(19), 11226.
- Williams, David B, & Carter, C Barry. 1996. *The Transmission Electron Microscope*. Boston, MA: Springer US. Pages 3–17.
- Williams, Vonetta M, Filippova, Maria, Soto, Ubaldo, & Duerksen-Hughes, Penelope J. 2011. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. *Future virology*, **6**(1), 45–57.
- Wyszomirska, A. 2012. Iodine-131 for therapy of thyroid diseases. Physical and biological basis. *Nucl Med Rev Cent East Eur*, **15**(2), 120–123.
- Xu, Jiabao, Yu, Tong, Zois, Christos E, Cheng, Ji-Xin, Tang, Yuguo, Harris, Adrian L, & Huang, Wei E. 2021. Unveiling Cancer Metabolism through Spontaneous and Coherent Raman Spectroscopy and Stable Isotope Probing. *Cancers*, **13**(7).
- Xu, S., Xu, H., Wang, W., Li, S., Li, H., Zhang, W., Yu, X., & Liu, L. 2019. The role of collagen in cancer: from bench to bedside. *Journal of Translational Medicine*, **17**, 309.
- Yane, H., *et al.* . 2019. Efficient inhibition of human papillomavirus infection by L2 minor capsid-derived lipopeptide. *MBio*, **10**(4).
- Yim, Eun-Kyoung, & Park, Jong-Sup. 2005. The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis. *Cancer research and treatment*, **37**(6), 319–324.
- Yu, Weibo, Sharma, Shivani, Rao, Elizabeth, Rowat, Amy C, Gimzewski, James K, Han, Dong, & Rao, Jianyu. 2022. Cancer cell mechanobiology: a new frontier for cancer research. *Journal of the National Cancer Center*, **2**(1), 10–17.

- Zanette, SI. 1997. Funcionamento de um microscópio de força atômica. *Notas do curso ministrado no CBPF*.
- Zemla, J., Danilkiewicz, J., Orzechowska, B., Pabijan, J., Seweryn, S., & Lekka, M. 2018. Atomic Force Microscopy as a Tool for Assessing the Cellular Elasticity and Adhesiveness to Identify Cancer Cells and Tissues. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **73**, 115–124.
- Zheng, Feng, Qin, Yejun, & Chen, Kun. 2007. Sensitivity map of laser tweezers Raman spectroscopy for single-cell analysis of colorectal cancer. *Journal of biomedical optics*, **12**(3), 34002.
- Zhu, Xinyao, Qin, Rui, Qu, Kaige, Wang, Zuobin, Zhao, Xuexia, & Xu, Wei. 2023. Atomic force microscopy-based assessment of multimechanical cellular properties for classification of graded bladder cancer cells and cancer early diagnosis using machine learning analysis. *Acta biomaterialia*, **158**(mar), 358–373.