

Aplicações biomédicas com feixes de iões

Teresa Pinheiro

Instituto Tecnológico e Nuclear & Centro de Física Nuclear da Universidade de Lisboa

Neste artigo, as potencialidades da utilização de feixes de iões para estudos biomédicos serão ilustradas com vários exemplos nas áreas de Toxicologia e Saúde Ambiental, Fisiologia e Patologias Humanas. As técnicas com feixes de iões permitem a análise de quantidades vestigiais de elementos nos tecidos biológicos e o seu mapeamento à escala micrométrica. Estas técnicas têm sido exploradas no ITN, desde há 30 anos, acompanhando activamente o progresso científico neste domínio.

Introdução

Feixes de iões, normalmente prótons de milhares de electrão-Volt (MeV), produzidos em aceleradores de pequenas dimensões (2-10 m), encontram aplicação em múltiplas áreas das Ciências Biológicas e Médicas no estudo de fluidos biológicos, tecidos e células.

Apesar de os aceleradores de partículas serem utilizados desde a década de 30, o grande salto qualitativo na aplicação das técnicas de feixes de iões remonta aos anos 70, quando Sven Johansson, da Universidade de Lund, na Suécia, demonstrou que a interacção de partículas aceleradas com os átomos presentes numa amostra induzia a produção de raios X permitindo a detecção dos elementos presentes nessa amostra mesmo em quantidades diminutas, da ordem de 10^{-9} g.

A técnica foi designada por PIXE (do inglês, *Particle Induced X-ray Emission*) e é desde então referência na análise elementar em amostras biológicas. Na década seguinte, primeiro John Cookson em Harwell e depois Geoff Grime e Frank Watt, na Universidade de Oxford, desenvolveram sistemas de lentes electrostáticas e electromagnéticas capazes de focar um feixe de iões a dimensões próximas de $1 \mu\text{m}$ de diâmetro. O varrimento da amostra com estes feixes de iões e a utilização de vários sistemas de detecção (raios X, dispersão de iões e electrões secundários), possibilita a geração de imagens da morfologia da amostra e de mapas de distribuição de elementos químicos com elevada resolução espacial e em tempo real. Este arranjo experimental é usualmente designado por Microsonda Nuclear ou Microscopia Nuclear.

A típica combinação de técnicas destes sistemas inclui a análise elementar com PIXE e RBS (do inglês, *Rutherford Backscattering Spectrometry*) e a análise morfológica utilizando técnicas de STIM (do inglês, *Scanning Transmission Ion Microscopy*) e de detecção de electrões secundários. Estas técnicas espectrométricas baseiam-se em princípios de Física Atómica. No caso do PIXE e da emissão de electrões secundários, a emissão de raios X ou electrões resulta de excitação atómica induzida pelo feixe de partículas aceleradas. No caso do RBS e STIM, a perda de energia da partícula incidente ao ser retrodispersa ou ao atravessar a amostra dá informação sobre a composição, espessura e densidade. O mapeamento permite obter imagens de densidade com resolução msub-micrométricas, obter imagens de distribuição elementar com limites de detecção na ordem dos mg/kg, e estabelecer perfis de concentrações.

Estas técnicas têm vindo a ser desenvolvidas nos Aceleradores Van de Graaff e Tandem do Instituto Tecnológico e Nuclear (Figura 1) há cerca de três décadas, e utilizadas em estudos Biológicos e Biomédicos, nas áreas da Toxicologia



Fig. 1 - Pormenor do acelerador Tandem de 2.5 MeV do ITN.

e Saúde Ambiental, Cardiologia e Dermatologia. Algumas destas aplicações serão seguidamente apresentadas de modo a ilustrar o valioso contributo das técnicas de feixes de iões na investigação biológica e biomédica.

Toxicologia ambiental

Os organismos vivos podem ser utilizados como indicadores de poluição ambiental, metálica e orgânica, fornecendo informação relevante sobre o risco de exposição a esses poluentes e sobre a qualidade dos ecossistemas. De um modo geral, a exposição prolongada a poluentes resulta na sua acumulação em tecidos e órgãos. A toxicidade dos metais está relacionada com a sua capacidade de gerarem radicais de oxigénio, que por sua vez oxidam as cadeias lipídicas e proteicas alterando as suas funções, por vezes de um modo irreversível. As células possuem, no entanto, mecanismos bioquímicos antioxidantes, que incluem enzimas como a superóxido dismutase (SOD) e a glutathione S transferase (GST). Estudar a relação entre a acumulação de metais nos órgãos e a actividade destes sistemas antioxidantes pode ajudar a compreender os efeitos de poluentes metálicos e o risco ambiental que representam para os sistemas vivos. Esta estratégia foi utilizada para estudar a contaminação de ecossistemas terrestres e marinhos em Portugal, utilizando-se a técnica de PIXE para a determinação das concentrações elementares nas amostras biológicas e ambientais a par com métodos bioquímicos para avaliação da resposta biológica.

Os efeitos tóxicos resultantes da extracção de minério de cobre foram avaliados numa espécie de peixe de água doce (*Leuciscus alburnoides complex*). Estudou-se a bio-acumulação de elementos no fígado, comparando populações de áreas contaminadas e não contaminadas, na mesma região geográfica e climática. Observaram-se níveis muito elevados de cobre e selénio no fígado dos peixes da área contaminada e um aumento moderado da actividade das enzimas SOD e GST, quando comparados com a população oriunda da zona de referência (Figura 2), o que indica uma boa adaptação metabólica da espécie às condições ambientais adversas.

A disponibilidade ambiental de chumbo em três regiões

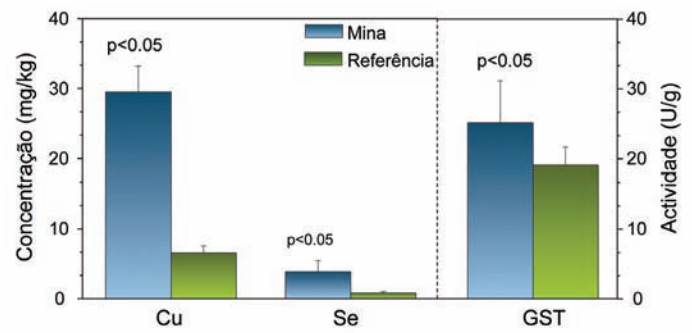


Fig. 2 - Concentrações de Cu e Se e actividade da enzima GST nas populações de *L. alburnoides* capturadas na área poluída (Mina) e numa região não poluída de referência. Valores significativamente diferentes, $p < 0.05$.

da costa Portuguesa –Viana do Castelo, Cascais e Santa Luzia – foi estimada utilizando o polvo (*Octopus vulgaris*) como bioindicador, por ser um animal benthico na base da cadeia alimentar, ubíquo em múltiplos habitats e com valor edível. No músculo, a única parte edível deste animal, o teor de Pb foi inferior a 1 mg/kg (valor limite regulamentado), mas bastante relevante em órgãos com funções metabó-

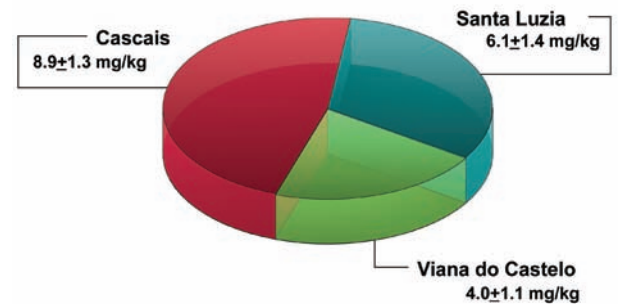


Fig. 3 - Concentração média de Pb nos órgãos de excreção (coração branquial e glândula digestiva) em três regiões da costa Portuguesa. Em Cascais a acumulação de Pb foi significativamente maior ($p < 0.05$).

licas e de excreção (Figura 3), reflectindo o enriquecimento em Pb dos sedimentos marinhos. A concha vestigial, estrutura mineralizada que se desenvolve ao longo da vida do animal por crescimento de anéis concêntricos, apresentou uma deposição diferenciada de P, Cl, Ca, Cu e Fe: o núcleo, correspondente à fase juvenil, com teores mais elevados de P e Ca; os anéis exteriores correspondentes à fase adulta, com concentrações decrescentes destes elementos e um aumento progressivo de Cl (Figura 4). Nos anéis exteriores observaram-se ainda inclusões de Cu e Fe. Estas variações poderão reflectir factores ambientais e fisiológicos que influenciam o ciclo de vida desta espécie.

Saúde ambiental

Estudos realizados nas últimas décadas têm chamado a atenção para a relação entre o particulado em suspensão na atmosfera e o aumento de mor-

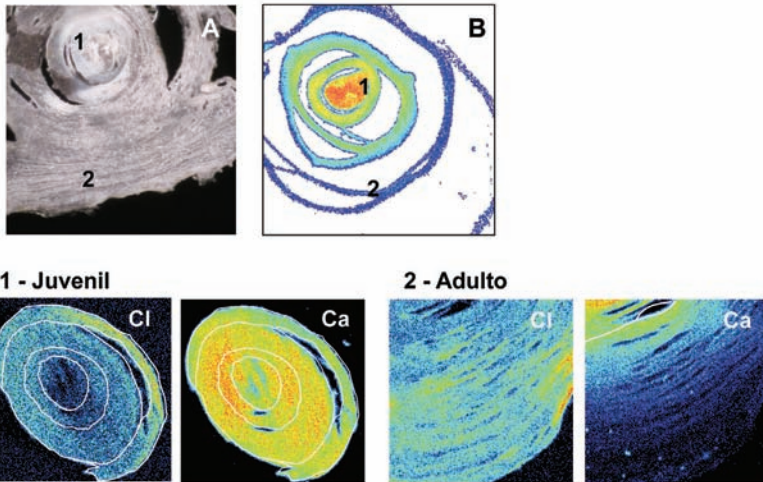


Fig. 4 - Imagens da morfologia de uma secção da concha vestigial de *O. vulgaris* observada por microscopia óptica (a) e por microsonda nuclear (b). A estrutura é formada por anéis concêntricos : 1) fase juvenil correspondente ao núcleo com um número reduzido de anéis (evidenciados pelas linhas desenhadas a branco) e 2) fase adulta correspondente a múltiplos anéis de crescimento exteriores. As imagens de Cl e Ca evidenciam o gradiente ao longo das fases de crescimento (azul - concentração mínima; vermelho - concentração máxima). Áreas de varrimento de $530 \times 530 \mu\text{m}^2$.

bilidade e mortalidade nas populações expostas. A toxicidade das partículas inaladas está dependente do tamanho e da composição química, factores que poderão influir na sua penetração, deposição e interacção com as células dos tecidos respiratórios. A partir de secções com $10 \mu\text{m}$ de espessura de tecidos respiratórios humanos obtidos post mortem, obtiveram-se mapas de distribuição elemental. Identificaram-se partículas isoladas de 2 a $10 \mu\text{m}$

de diâmetro na mucosa do epitélio da traqueia, aglomerados de partículas de dimensões inferiores nos alvéolos pulmonares e internalizados em macrófagos (Figura 5). Na traqueia a maior parte das partículas eram constituídas por Al, Si, Ca, Ti e Fe, elementos associados à composição da crosta terrestre (Figura 5A). Nas regiões distais do sistema respiratório, quer na superfície do epitélio brônquico e cavidades alveolares, quer nos tecidos adjacentes e células macrófagicas, observaram-se aglomerados com composição elemental diversa, e.g., V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Pb, na maior parte elementos com toxicidade reconhecida (Figuras 5B e C).

A informação obtida com as técnicas de microscopia nuclear é assim extremamente valiosa, por indicar simultaneamente, a dimensão das partículas, locais de deposição, composição elemental, mobilidade para os tecidos adjacentes e mecanismos de remoção, como por exemplo através da sua internalização nos macrófagos.

Biomarcadores de doenças humanas

A patogénese da doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) não se encontra ainda completamente esclarecida, nem existem até hoje marcadores sistémicos para esta patologia. A DPOC é responsável por cerca de 5% da morbilidade em Portugal, causando inflamação das vias aéreas e disfunção pulmonar progressiva.

Foram estudadas as variações de um conjunto de indicadores de lesão oxidativa e resposta anti-oxidante (parâmetros bioquímicos e elementos químicos) na circulação sanguínea de doentes e de indivíduos saudáveis. Registou-se um aumento da concentração de carbonilos proteicos e tióis totais (que são indicadores de danos oxidativos de proteínas) e uma diminuição da actividade de enzimas antioxidantes como o glutatióno peroxidase, nos doentes. As concentrações de Se no plasma também se encontravam reduzidas relativamente ao grupo controlo, especialmente nos indivíduos com níveis muito baixos de pressão de oxigénio arterial (Figura 6). Estas variações não eram influenciadas por hábitos de vida, como por exemplo hábitos tabágicos. Deste modo, as alterações observadas reflectem os danos induzidos por processos oxidativos e a alteração da homeostase electrolítica, podendo ser interpretadas como marcadoras da DPOC.

Permeabilidade da pele a nanopartículas

Nos últimos anos tem-se verificado um aumento significativo da exposição das populações humanas a nanopartículas (NPs) sintéticas. Estudos de difusão destas NPs na pele são essenciais para avaliar os riscos para a saúde e estimar níveis de segurança para a sua utilização. Um dos exemplos é a utilização de NPs de TiO_2 e ZnO como agentes físicos que dispersam ou reflectem a radiação ultravioleta em cremes protectores solares. Para determinar a localização e a eventual penetração de NPs de TiO_2 e ZnO nas formulações cosméticas, em condições *in vivo* e que reflectissem a habitual utilização dos cremes, delinearam-se protocolos clínicos

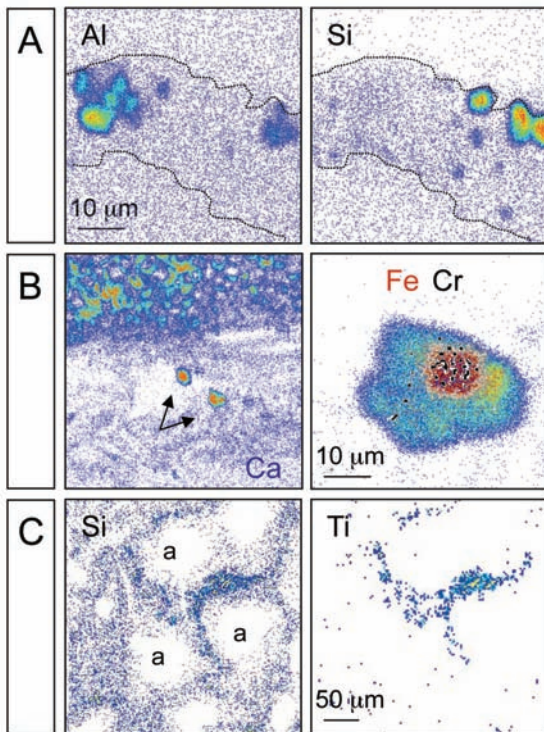


Fig. 5 (a) - Distribuição de Si e Ca (teores representados por um gradiente de cores) evidenciando partículas individualizadas na mucosa do epitélio da traqueia humana (área delimitada pelas linhas a tracejado); (b) células macrófagicas na parede brônquica (setas) visíveis no mapa de distribuição de Ca; à esquerda ampliação de uma das células com inclusões de Fe, mapa de distribuição a vermelho) e Cr (preto), sobrepostos ao mapa de Ca; (c) mapas de Si e Ti evidenciando aglomerados de partículas nas paredes das cavidades alveolares (a).

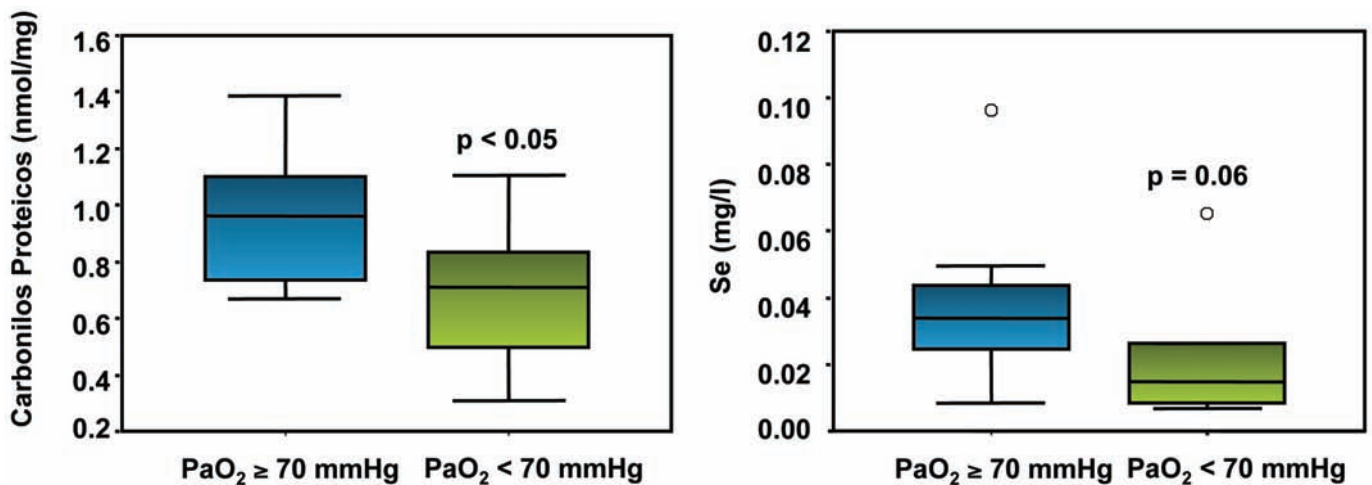


Fig. 6 - Concentração de carbonílios proteicos e de Se no plasma de doentes em função de duas classes de pressão de oxigénio arterial (PaO₂). Os gráficos representam medianas (linha divisória da caixa), interquartil de 25% e 75% (caixa) e os limites mínimos e máximos (barras verticais). Os valores extremos estão representados por um círculo. As diferenças significativas estão indicadas no gráfico.

específicos tendo em conta a quantidade, o modo de aplicação corrente, e recorreu-se à microsonda nuclear para análise morfológica e determinação dos perfis de concentração de Ti e Zn na pele normal. As amostras de pele foram recolhidas por biopsia (3 mm), congeladas imediatamente a -198 °C e seccionadas em micrótomos de congelação. Imagens de alta resolução da morfologia da pele obtidas

primeira camada de células viáveis da epiderme, o stratum granulosum. A profundidade de penetração foi estimada tendo como limite mínimo de concentração o valor médio dos níveis fisiológicos de Zn na epiderme (3.0 μmol.g⁻¹) e o valor do limite de detecção no caso do Ti (<0.3 μmol.g⁻¹), dado não se conhecer nenhuma função fisiológica para este elemento no organismo. Este estudo permitiu avaliar pela primeira vez em condições próximas do in vivo, os perfis de penetração de NPs de TiO₂ e ZNO na pele humana e confirmar que a sua utilização em formulações tópicas não apresenta riscos para a saúde humana.

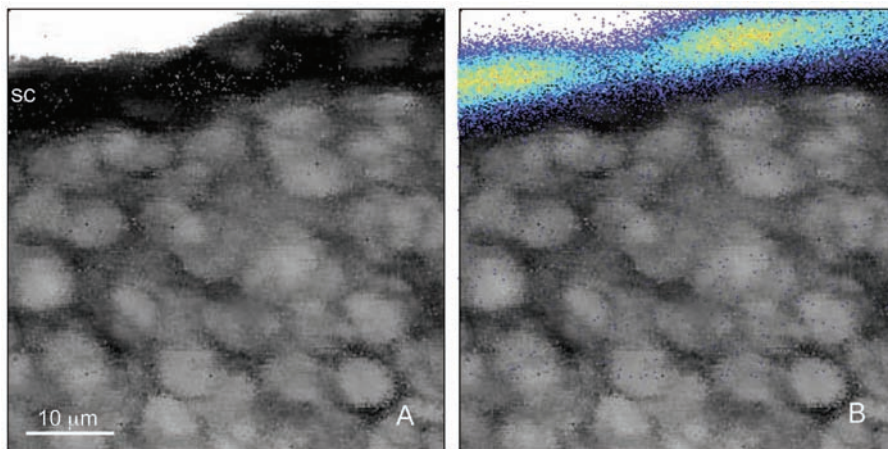


Fig. 7 - Corte transversal de pele tratada com um creme solar com nanopartículas de TiO₂. A- Imagem da distribuição de densidade obtida com STIM de alta resolução, onde se pode observar a camada externa, stratum corneum (sc) - região de maior densidade (preto), e as camadas inferiores de células (queratinócitos) da epiderme. B - mapa de distribuição de Ti sobreposto à imagem de densidade, representado por um gradiente de cores (azul - mínimo, vermelho - máximo). A penetração de nanopartículas (TiO₂) na camada córnea não chega a atingir a epiderme.

com STIM e da distribuição elementar com PIXE e RBS permitiram determinar os perfis de concentração de Ti e Zn na pele e a profundidade de penetração das NPs (Figura 7). Verificou-se que a penetração de Ti não ultrapassou 78% da extensão total da camada córnea (estratos queratinizados da epiderme), enquanto que o Zn não excedeu 88%, mesmo para exposições superiores a 72 horas. Em ambos os casos não chegou a haver contacto das NPs com a

Perspectivas futuras

A utilização de microscopia nuclear representa actualmente uma mais valia significativa em estudos biomédicos por permitir a análise in vivo de tecidos e células, sem recorrer a contrastes ou requerer preparação da amostra por processos químicos, métodos que de um modo geral, modificam a estrutura e alteram a distribuição de metabolitos. Desenvolvimentos tecnológicos e instrumentais recentes permitem a utilização de novas técnicas, como por exemplo a fluorescência induzida pelos electrões secundários (produzidos pela interacção do feixe de partículas com os átomos) e obter resoluções inferiores a 100 nm. As imagens de fluorescência, quer sejam por emissão natural ou induzida, possibilitam a identificação de células, tecidos, fluoróforos, NPs, etc, com resoluções cerca de 10 vezes superiores à microscopia convencional. Estas imagens podem

ser combinadas com as de PIXE (distribuição elemental) ou de STIM (morfologia), o que abre imensas possibilidades em estudos de fisiologia celular e transporte membranar.

Agradecimentos

Os estudos foram realizados com o apoio financeiro da Fundação para a Ciência e Tecnologia e da Comunidade Europeia, em colaboração com investigadores do Centro de Biologia Ambiental da Faculdade de Ciências e da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, do Hospital de Santa Maria, e Universidades de Bordeaux (França), Lund (Suécia), Madrid (Espanha) e Oxford (Inglaterra).

Para saber mais

P. Filipe et al., *Skin Pharmacol. Physiol.* 22, 266-275 (2009); doi: 10.1159/000235554

S. A. E. Johansson e T. B. Johansson, *Nucl. Instr. Meth.* 137, 473-516 (1976); doi:10.1016/0029-554X(76)90470-5

P. A. Lopes et al., *Sc. Total Environ.* 280, 153-163 (2001); doi:10.1016/S0048-9697(01)00822-1

P. Napoleão et al., *Sc. Total Environ* 345, 41-49 (2005); doi: 10.1016/j.scitotenv.2004.10.026

T. Pinheiro et al., *Nucl. Instr. Meth. B* 158, 499-504 (1999); doi:10.1016/S0168-583X(99)00369-9

T. Pinheiro et al., *Nucl. Instr. Meth. B* 267, 2140-2143 (2009); doi:10.1016/j.nimb.2009.03.064

M. Ren, et al., *J. Appl. Phys* 103, 014902 (2008); doi:10.1063/1.2827106

M. C. Santos et al., *Biomarkers* 9, 461-469 (2004); doi: 10.1080/13547500400024768 5087(82)90119-3

M. D. Ynsa et al., *J. Microscopy* 224, 298-305 (2006); doi:10.1111/j.1365-2818.2006.01705.x



Teresa Pinheiro é Investigadora Auxiliar do Instituto Tecnológico e Professora Associada Convidada do Departamento de Física do Instituto Superior Técnico. É licenciada em Biologia pela Faculdade de Ciências e Doutorada em Fisiologia Animal (1995) pela

Universidade de Lisboa. No início dos anos 90 participou nas experiências iniciais de aplicações biomédicas com microscopia nuclear na Universidade de Lund, Suécia. Tem actualmente colaborações neste domínio, com o Hospital de Santa Marta em Lisboa, a Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, e com as Universidades de Madrid e Singapura. A sua actividade recente no domínio das Ciências Biomédicas centra-se em aspectos relacionados com as alterações fisiológicas de tecidos e células em patologias humanas.