



**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**  
**Autarquia Associada à Universidade de São Paulo**

**Caracterização espectroscópica de adenocarcinoma mamário cultivado  
em 3D submetido à radiação de baixa energia**

**NOEMY RODRIGUES SANTOS**

**Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do Grau de  
Mestre em Ciências na Área  
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

**Orientador:  
Prof. Dr. Daniel Perez Vieira**

**São Paulo  
2023**

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**  
**Autarquia Associada à Universidade de São Paulo**

**Caracterização espectroscópica de adenocarcinoma mamário cultivado  
em 3D submetido à radiação de baixa energia**

**Versão Corrigida**

**Versão Original disponível no IPEN**

**NOEMY RODRIGUES SANTOS**

**Dissertação apresentada como parte  
dos requisitos para obtenção do Grau  
de Mestre em Ciências na Área  
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

**Orientador:  
Prof. Dr. Daniel Perez Vieira**

**São Paulo  
2023**

Fonte de Financiamento: Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN)

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Como citar:

SANTOS, N. R. ***Caracterização espectroscópica de adenocarcinoma mamário cultivado em 3D submetido à radiação de baixa energia***. 2023. 74 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo. Disponível em: <<http://repositorio.ipen.br/>> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Santos, Noemy Rodrigues

Caracterização espectroscópica de adenocarcinoma mamário cultivado em 3D submetido à radiação de baixa energia / Noemy Rodrigues Santos; orientador Daniel Perez Vieira. -- São Paulo, 2023.

74 f.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2023.

1. irradiação. 2. fluorescência. 3. Raman. 4. adenocarcinoma mamário. 5. cultura celular 3D. I. Vieira, Daniel Perez, orient. II. Título.

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

Autora: Noemy Rodrigues Santos

Título: Caracterização espectroscópica de adenocarcinoma mamário cultivado em 3D submetido à radiação de baixa energia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: 01/09/2023

### **Banca Examinadora**

Prof. Dr.: Daniel Perez Vieira

Instituição: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr.: Norberto Sanches Gonçalves

Instituição: Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Julgamento: Aprovado

Profa. Dra.: Paula Silvia Haddad Ferreira

Instituição: Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Julgamento: Aprovado

## AGRADECIMENTOS

À Deus;

À família;

Ao Dr. Daniel Perez Vieira;

À Dra. Roseli Künzel;

À Dra. Lilia Coronato Courrol;

Ao Dr. Ronaldo Savarino Levenhagen;

À Dra. Maria da Penha Albuquerque Potiens;

Ao grupo de pesquisa em Radiobiologia do Centro de Biotecnologia  
CEBIO - IPEN;

Aos técnicos do Centro de Metrologia das Radiações responsáveis pelas  
irradiações CMR - IPEN;

Ao Setor de Transporte do IPEN - CNEN, em especial os motoristas;

À Comissão Nacional de Energia Nuclear – CNEN, pela concessão da bolsa;

À Universidade de São Paulo – USP;

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN;

Ao Centro de Biotecnologia – CEBIO;

Ao Centro de Metrologia das Radiações - CMR;

À Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP – Campus Diadema  
Unidade José De Filippi.

## RESUMO

SANTOS, N. R. *Caracterização espectroscópica de adenocarcinoma mamário cultivado em 3D submetido à radiação de baixa energia*. 2023. 74 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo. Disponível em: <<http://repositorio.ipen.br/>> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

O câncer de mama é a neoplasia que mais acomete mulheres no Brasil e no mundo. Seu diagnóstico precoce é realizado através da mamografia a cada dois anos por mulheres entre 50 a 69 anos de idade. Comparada a outras modalidades de radiodiagnóstico, a mamografia utiliza feixes de radiação de baixas doses e baixa energia. Neste trabalho buscou-se investigar a relação entre efeitos induzidos pela radiação de baixa energia e o surgimento de danos nos tecidos mamários. Realizou-se a caracterização espectroscópica de um modelo tridimensional de adenocarcinoma mamário, desenvolvido através da cultura celular da linhagem MCF7, a partir da técnica de sobreposição líquida. A irradiação foi realizada com a qualidade de um feixe mamográfico com parâmetros e critérios de qualidade implantados no sistema Pantak/Seifert, com rastreabilidade ao laboratório primário alemão, Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB). Um conjunto de amostras não irradiadas também foi utilizado para fins de comparação. Para a caracterização dos aglomerados, foram utilizadas as técnicas de fluorescência “steady state” capaz de avaliar a alteração nos espectros de emissão dos principais fluoróforos presentes na amostra, e a técnica de espectroscopia Raman capaz de detectar alterações nas vibrações moleculares, indicando alterações ocasionadas pela radiação ionizante. Os resultados obtidos mostram que as técnicas foram altamente sensíveis para detectar alterações importantes no triptofano, colágeno, elastina, NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo), FAD (Flavina Adenina Dinucleotídeo), polissacarídeos, glicogênio, ácidos nucleicos, grupo fosfato, proteínas e lipídeos. As modificações encontradas revelam associações importantes com a agressividade e a expansão metastática tumoral, metabolismo energético, radiorresistência e tecido de origem da linhagem tumoral em estudo.

Palavras-chave: irradiação, fluorescência, Raman, adenocarcinoma mamário, cultura celular 3D.

## ABSTRACT

SANTOS, N. R. *Spectroscopic characterization of 3D-cultured breast adenocarcinoma subjected to low-energy radiation*. 2023. 74 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo. Disponível em: <<http://repositorio.ipen.br/>> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Breast cancer is the neoplasm that most affects women in Brazil and worldwide. Its early diagnosis is performed through mammography every two years for women between 50 and 69. Compared to other radiodiagnosis modalities, mammography uses low-dose and low-energy radiation beams. This work investigates the potential relationship between effects induced by low-energy radiation and the appearance of damage to breast tissue. Spectroscopic characterization of a three-dimensional breast adenocarcinoma model was adopted, designed through cell culture of the MCF7 lineage, using the liquid superimposition technique. The irradiation of the cells was performed by mammography X-ray beams with parameters and quality criteria implemented in the Pantak/Seifert system, with traceability to the German primary laboratory, Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB). A set of non-irradiated samples was also used for comparison purposes. The “steady state” fluorescence techniques were employed to evaluate changes in the emission spectra of the main fluorophores in the non-irradiated and irradiated clusters. The Raman spectroscopy technique evaluated changes in the main molecular vibrations, indicating modifications induced by ionizing radiation. The results show that the employed spectroscopic techniques were highly sensitive to detecting modifications in tryptophan, collagen, elastin, NADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide), FAD (Flavin Adenine Dinucleotide), polysaccharides, glycogen, nucleic acids, phosphate group, proteins, and lipids. The modifications suggest significant associations with tumor aggressiveness and metastatic expansion, energy metabolism, radioresistance, and tissue of origin of the tumor lineage under study.

Key words: irradiation, fluorescence, Raman, mammary adenocarcinoma, 3D cell culture.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Categoria BI-RADS® com base no grau de suspeição.....	21
Tabela 2 – Interações possíveis de ocorrer para radiação eletromagnética ionizante raios- X, raios gama e fótons de aniquilação – e consequências das interações.....	24
Tabela 3 – Dose Glandular Média (DGM) para mamografia.....	32
Tabela 4 – Parâmetros e qualidade implantada no sistema Pantak/Seifert.....	45
Tabela 5 – Identificação das bandas Raman e dos grupos funcionais observados nos espectros dos aglomerados de células MCF7 não irradiados e irradiados.....	52
Tabela 6 – Principais fluoróforos identificados. Excitação 320nm.....	63



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diferentes tipos de câncer de mama .....	17
Figura 2 – Representação esquemática do grau crescente de agressividade de tumores classificados conforme assinaturas moleculares de receptores hormonais e expressão de proteínas características.....	18
Figura 3 – Espectros produzidos por tubo de raios X com ânodo de tungstênio e molibdênio representados pela curva contínua e tracejada respectivamente.....	22
Figura 4 – Gráfico que apresenta os valores de número atômico e de energia demonstrando a probabilidade de ocorrência do efeito fotoelétrico .....	25
Figura 5 – Hierarquia do sistema metrológico.....	29
Figura 6 – Estrutura do modelo tridimensional com diferentes zonas de células com os esquemas de oxigenação, nutrição e remoção de CO <sub>2</sub> . Modelo tridimensional de dentro para fora. As regiões são zona necrótica (mais interna), zona celular viável quiescente (meio) e zona proliferativa (mais externa) .....	33
Figura 7 – Ilustração do espalhamento Raman .....	36
Figura 8 – Espectro Raman a) tecido mamário normal e b) tumor, excitação em 830 nm .....	38
Figura 9 - Diagrama de Jablonski (ou diagrama de níveis de energia) que ilustra os processos sofridos por uma molécula excitada por luz, em que “Ex” corresponde à absorção (excitação), “F” e “P”, à fluorescência e à fosforescência, respectivamente (ambos processos de decaimento radiativos), e “IC” e “ISC”, à conversão interna e ao cruzamento intersistemas, respectivamente (ambos processos de decaimento não radiativos) .....	39
Figura 10 - Espectros de absorção (esquerda) e emissão (direita) dos principais fluoróforos do tecido biológico .....	40
Figura 11 – Etapas de cultivo celular.....	41
Figura 12 – Processo de tratamento das placas de 24 poços com solução de Pluronic® F-127 (0,5g/mL em 2-propanol) .....	42
Figura 13 – Etapa de plaqueamento com representação típica dos aglomerados formados após 72 horas em incubadora .....	42
Figura 14 – Representação esquemática das etapas de coloração, excitação/emissão das amostras na microscopia de fluorescência .....	43
Figura 15 – Esquema de sistema de radiação para calibração de medidores utilizados em radiodiagnóstico no LCI no Radiações CMR/IPEN .....	44
Figura 16 - Esquema de irradiação relacionando dose e energia .....	46
Figura 17 - Aspecto típico dos agregados de células MCF7 obtidos. (A), fluorescência – azul (Hoescht 33342); verde (SYTOX Green). (B): campo claro .....	49
Figura 18 - Espectro médio dos agregados de células de MCF7 irradiados (5,91 mGy, 35kV) e não irradiados.....	51

Figura 19 - Espectro médio dos agregados de células de MCF7 irradiados (17,73 mGy, 35 kV) e não irradiados.....	51
Figura 20 – Gráfico de dispersão dos dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) dos dados de MCF7 expostas a dose de radiação de 5,91 e 17,73 mGy, 35 Kv e loadings de PC1 e PC2 dos espectros de MCF7.....	57
Figura 21 - Espectro médio dos grupos controle e irradiados. Excitação 283 nm.....	58
Figura 22 - Derivada segunda do espectro médio dos grupos controle e irradiados. Excitação 283 nm.....	59
Figura 23 - Espectro médio dos grupos controle e irradiados. Excitação 320 nm.....	61
Figura 24 - Derivada segunda do espectro médio dos grupos controle e irradiados 1X. Excitação 320 nm. ....	61
Figura 25 - Derivada segunda do espectro médio dos grupos controle e irradiados 3X. Excitação 320 nm.....	62
Figura 26 - Representação das formas oxidadas e reduzidas das moléculas de NADH e FAD.....	64

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>1.1 Objetivo</b> .....	13
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	14
<b>2.1 O que é câncer?</b> .....	14
<b>2.2 Estatística do câncer no Brasil</b> .....	14
<b>2.3 Fatores de risco para o câncer de mama</b> .....	14
<b>2.4 Classificações do câncer de mama</b> .....	16
2.4.1 Subtipos de câncer de mama.....	17
2.4.2 Linhagem celular MCF7 (ATCC HTB-22) .....	19
<b>2.5 Mamografia</b> .....	19
2.5.1 Feixes de Raios X produzidos por um sistema de mamografia.....	22
2.5.2 Interação da radiação com a matéria.....	23
<b>2.6 Efeitos biológicos das radiações ionizantes</b> .....	25
2.6.1 Interação das espécies reativas de oxigênio (EROs) com lipídeos e proteínas.....	27
2.6.2 Efeitos determinísticos e estocásticos.....	27
2.6.3 Risco carcinogênico por baixas doses.....	28
<b>2.7 Sistema Internacional de Metrologia</b> .....	28
2.7.1 Série de Relatórios Técnicos nº 457 – Dosimetria em Radiologia Diagnóstica: Um código Internacional de Prática.....	29
2.7.2 Norma IEC 61267.....	30
2.7.3 Portaria Federal nº453, de 1 de junho de 1998.....	31
2.7.4 Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 330, de 20 de dezembro de 2019. RDC nº 330, de 20 de dezembro de 2019.....	31
2.7.5 Instrução Normativa - IN nº 92, de 27 de maio de 2021.....	31
<b>2.8 Modelo de células 3D</b> .....	32
<b>2.9 Espectroscopia Raman</b> .....	35
<b>2.10 Espectroscopia de Fluorescência</b> .....	38
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	41
<b>3.1 Cultivo celular</b> .....	41
<b>3.2 Produção de agregados celulares</b> .....	41
<b>3.3 Microscopia de Fluorescência</b> .....	43
<b>3.4 Irradiação</b> .....	44
<b>3.5 Espectroscopia Raman</b> .....	46
3.5.1 Análise de componentes principais.....	47
<b>3.6 Fluorescência “steady-state”</b> .....	48

<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	49
<b>4.1 Microscopia de Fluorescência</b> .....	49
<b>4.2 Espectroscopia Raman</b> .....	50
4.2.1 Análise de componentes principais.....	56
<b>4.3 Fluorescência “steady-state”</b> .....	57
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	65
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	66

## 1 INTRODUÇÃO

Dentre os dez principais tipos de tumores malignos, o câncer de mama possui maior incidência ao redor do mundo e com maior taxa de mortalidade. No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), para o ano de 2023 a estimativa é de 73.610 novos registros, o que corresponde a 30,1% dos casos, sendo as regiões do sul e sudeste as que apresentam maior índice (INCA, 2022).

Apesar de não serem bem estabelecidos os mecanismos que levam ao surgimento da doença, estudos realizados apontam cada vez mais para causas comportamentais, hormonais, genéticas, hereditárias e ambientais (particularmente a exposição à radiação ionizante), como fatores de risco que favorecem seu desenvolvimento, além, da recente pandemia de coronavírus (COVID-19) a qual retardou significativamente triagens, diagnósticos e tratamentos (SERGIUSZ et al., 2021; KASHYAP et al., 2022; SMOLARZ et al., 2022).

Entre as principais técnicas utilizadas no rastreamento de patologias mamárias, a mamografia é a das modalidades de exames radiológicos mais comumente usada. Realizada a cada dois anos por mulheres entre 50 a 69 anos de idade, possibilita a detecção precoce de alterações no tecido mamário como por exemplo, nódulos e microcalcificações. Estes exames são realizados usando radiação de baixas energias e baixas doses quando comparadas a outras modalidades de exames diagnóstico (FDA, 2023; NCI, 2023; INCA, 2023).

Como forma de garantir o controle de qualidade dos equipamentos e a aplicação dos princípios de proteção radiológica, são definidos os Padrões Básicos Internacionais de Segurança para Proteção contra Radiação Ionizante e para a Segurança de Fontes de Radiação. Estas normas fornecem requisitos para estabelecer um programa de garantia de qualidade em radiologia médica, assegurando que os níveis de dose e a qualidade das imagens radiográficas realizadas em equipamentos de radiologia estejam dentro dos padrões estabelecidos pelas normas, respeitando os princípios do padrão ALARA (As Low As Reasonably Achievable) (TRS N° 457, 2007).

A incidência da radiação ionizante ocasiona uma série de efeitos bioquímicos (HAVAKI et al, 2015), danificando estruturas celulares de forma direta, atingindo moléculas de DNA desordenando o processo de reparo levando as células ao estresse oxidativo e nitrosativo, o que acarreta modificações no genoma

e conseqüentemente mutações (DUIJF et al, 2019; POHJOISMAKI et al, 2022) e de forma indireta pelo processo denominado radiólise da água, o qual produz espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Desta forma, os efeitos bioquímicos expressam-se em estágios posteriores de dano celular, pois moléculas afetadas pela radiação ionizante continuam o processo de síntese com a produção de íons, elétrons e radicais livres resultando em disfunções metabólicas modificando as vias de sinalização das estruturas que contém estas espécies químicas (REISZ et al, 2014).

Os efeitos da radiação dependem da dose, energia, tipo de radiação e do tipo de célula ou tecido atingido (MCBRIDE & SCHAUE, 2020). As células atingidas pela radiação podem gerar ou induzir células tumorais à medida que vão sofrendo divisões; este processo ocorre por intermédio de diversos efeitos biológicos, físicos, químicos e orgânicos após absorção da radiação. O que se observa é que a probabilidade da indução do câncer a partir de células irradiadas é superior à probabilidade de ocorrência deste processo a partir de células não irradiadas (KHODAMORADI et al., 2020).

Um dos métodos mais amplamente utilizados para se realizar estudos a nível molecular é o cultivo celular tridimensional (3D). Neste modelo a interação célula-célula e célula-matriz aproxima-se das condições encontradas no microambiente *in vivo*, emulando em certa medida as características morfológicas, fisiológicas, de proliferação e função do tecido podendo receber diversas aplicações biomédicas (PARK et al, 2022; HUANG et al, 2022). Este ambiente dinâmico permite a análise do comportamento de diferentes compostos afetados pela radiação ionizante e o efeito de baixas doses e baixas energias em células de mama.

Diversas técnicas espectroscópicas têm sido sugeridas, entre elas a fluorescência e espectroscopia Raman têm sido estudadas como potencial ferramenta de diagnóstico, a fim, de detectar alterações teciduais antes mesmo que elas se manifestem fisiologicamente (CHARWAT et al, 2015; PANSARE et al, 2020; HANNA et al, 2022; LEE et al, 2021). Essas técnicas possibilitam a detecção de marcadores tumorais específicos para cada tipo de linhagem celular identificando também diferenças no metabolismo de células saudáveis e de carcinoma o que pode auxiliar na detecção de variações importantes (POSPÍŠILOVÁ et al, 2023; PENDERS et al, 2021).

Diversos tecidos biológicos contêm moléculas que possuem capacidade de fluorescer mediante excitação específica, permitindo a avaliação sem a necessidade de biópsia, tais como triptofano, colágeno, NADH (Nicotinamida adenina dinucleotídeo), FAD (flavina adenina dinucleotídeo) e porfirinas (ENGELS et al, 1997; RAMANUJAM, 2000). Tais fluoróforos nativos podem ser indicadores únicos, confiáveis e não subjetivos para a detecção de efeitos da radiação sobre as células expostas. Da mesma forma, a espectroscopia Raman pode indicar mudanças estruturais do tecido a partir de alteração de vibrações moleculares resultantes da incidência da radiação (KORTUM et al, 1996; SCHIE et al., 2015; HARDER et al, 2016).

Essas técnicas apresentam a vantagem de serem minimamente invasivas com potencial de utilização no pré-tratamento e no monitoramento precoce de alterações biomoleculares relacionadas à resposta à radiação nas células tumorais e tecidos (HARDER et al, 2016). Os espectros Raman registrados na faixa entre 400 e 1800  $\text{cm}^{-1}$  fornecem uma impressão digital do conteúdo biomolecular das amostras biológicas. A espectroscopia Raman e a fluorescência óptica podem, portanto, ser aplicadas para detectar alterações celulares resultantes de processos metabólicos e possuem potencial para identificar respostas nos tecidos induzidas por radiação de forma não invasiva e não-destrutiva.

## 1.1 Objetivo

Com o intuito de elucidar a relação entre efeitos induzidos pela radiação de baixa energia e o surgimento de danos em tecidos biológicos, o presente trabalho buscou estudar as alterações causadas em nível molecular, com o auxílio de técnicas não destrutivas, contribuindo para o entendimento da relação entre a dose de radiação e os danos celulares.

Para isso, foram utilizados aglomerados de células de adenocarcinoma de mama humana (MCF7), que após irradiação, forneceram material para investigação dos efeitos causados por feixes de raios X na faixa de energia usados em exames de mamografia, usando as técnicas espectroscópicas de fluorescência e espectroscopia Raman.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 O que é câncer?**

O câncer é uma das patologias mais agressivas e complexas que atinge milhares de pessoas ao redor do mundo. É caracterizado como uma doença desencadeada por mutações celulares que são capazes de modificar o metabolismo e a sinalização de células saudáveis, causando desequilíbrio em sua divisão. Este desequilíbrio, resulta em uma proliferação contínua e desregulada das células anormais em uma série de processos, os quais, influenciam no crescimento do tumor maligno, modificando o funcionamento do organismo à medida que atinge os níveis moleculares, celular, tecidual e orgânico (COOPER, 2000; UPADHYAY, 2020).

### **2.2 Estatística do câncer no Brasil**

No Brasil, para o ano de 2023, dos dez tipos de neoplasias mais incidentes em mulheres, estima-se o câncer de mama com a maior taxa percentual, representando 30,1% dos novos casos. Seguido do câncer de cólon e reto (9,7%); colo do útero (7,0%); traquéia, brônquio e pulmão (6%); glândula tireoide (5,4%); estômago (3,3%); corpo do útero (3,2%); ovário (3,0%); pâncreas (2,3%) e linfoma não Hodgkin (2,3%).

De todos os tipos diagnosticados, a neoplasia da mama configura no panorama nacional a maior causa de morte por câncer. O registro das taxas de mortalidade no país nos últimos dez anos, indica aumento em todas as regiões com exceção da região norte (INCA, 2022).

### **2.3 Fatores de risco para o câncer de mama**

Diversos fatores de risco têm sido estudados como precursores para o desenvolvimento do câncer de mama mesmo que com baixo risco. Dentre os fatores causadores reportados na literatura estão:

*Fatores genéticos:* as mutações germinativas que ocorrem em genes associados ao câncer de mama, são um importante fator causal de predisposição genética para o desenvolvimento do câncer de mama hereditário. Dos tipos de gene



identificados, o BRCA1 e BRCA2 apresentam maiores probabilidades de desenvolver a doença em seus portadores, configurando 90% dos casos de câncer de mama hereditário. (MAHDAVI et al, 2019).

*Densidade da mama:* a densidade da mama é um fator de risco relevante para o desenvolvimento de patologias mamárias (BODEWES et al, 2022). Apesar dos questionamentos sobre os métodos adotados para se estimar a densidade mamária e sua possível relação com o câncer de mama, estudos apontam que tem sido um fator prognóstico importante de risco e de triagens em exames de imagens (DUFFY et al, 2018).

*Sobrepeso / obesidade e falta de atividade física:* os altos índices de massa corpórea aumentam os riscos de desenvolvimento de patologias mamárias principalmente em mulheres na pós menopausa, uma vez que o acúmulo de gordura aumenta os processos inflamatórios provocando alterações hormonais (FEIGELSON et al, 2021; LUKASIEWICZ et al, 2021). Essas alterações hormonais também são evidentes no que tange a atividade física, a qual, diminui significativamente a probabilidade de incidência, seu papel protetor se identifica devido a diminuição à exposição hormonal, alterando respostas imunológicas (GUO et al, 2020; LUKASIEWICZ et al, 2021).

*Uso de contraceptivos hormonais:* o uso de contraceptivos hormonais e os seus riscos carcinogênicos tem sido vastamente estudado (WHITE, 2018). Apesar dos efeitos que desencadeia o câncer de mama não ser bem elucidado, e da maior necessidade de estudos, o que se tem observado é um maior risco associado, mesmo que pequeno, como aponta recente estudo de cientistas britânicos (FITZPATRICK, 2023). A duração do uso de tais contraceptivos e sua continuidade ao longo da vida das mulheres também foi associado ao aumento do risco (MORCH et al, 2017).

*Exposições às radiações ionizantes:* as radiações ionizantes desencadeiam uma série de efeitos em células e tecidos. Além de danos agudos, efeitos com manifestações clínicas tardias, muitos meses ou anos após a exposição são previstos. Diversos estudos indicam o desenvolvimento do câncer de mama

devido à incidência localizada de radiações ionizantes, em uma série de efeitos que promovem danos ao DNA e conseqüentemente mutações; as células cancerígenas quando atingidas sofrem alterações assim como seu microambiente tumoral podendo favorecer ao surgimento de câncer secundário em um processo pós metastático (ZWICKER et al, 2019; SUNDAHL et al, 2018; HELM et al, 2020).

## 2.4 Classificações do câncer de mama

Existem diferenças fundamentais entre tumores benignos e malignos; enquanto o primeiro, conserva as características de células normais e se mantém localizado em sua origem sem invadir tecidos subjacentes, os tumores malignos mais comumente conhecidos como cânceres, possuem a propriedade de invadir outros tecidos e acometer diferentes órgãos se espalhando por meio do sistema circulatório e linfático em um processo denominado metástase (COOPER, 2000).

São classificados conforme o tipo de célula e tecido nos quais se originam, podendo ser carcinomas (90% dos tipos; originário de células epiteliais), sarcomas (ocorre raramente; originário de tecido conjuntivo, ósseo, cartilagens e tecido fibroso), leucemia e linfomas (8% dos tipos; surgem de células do sangue e do sistema imunológico) (FENG et al, 2018).

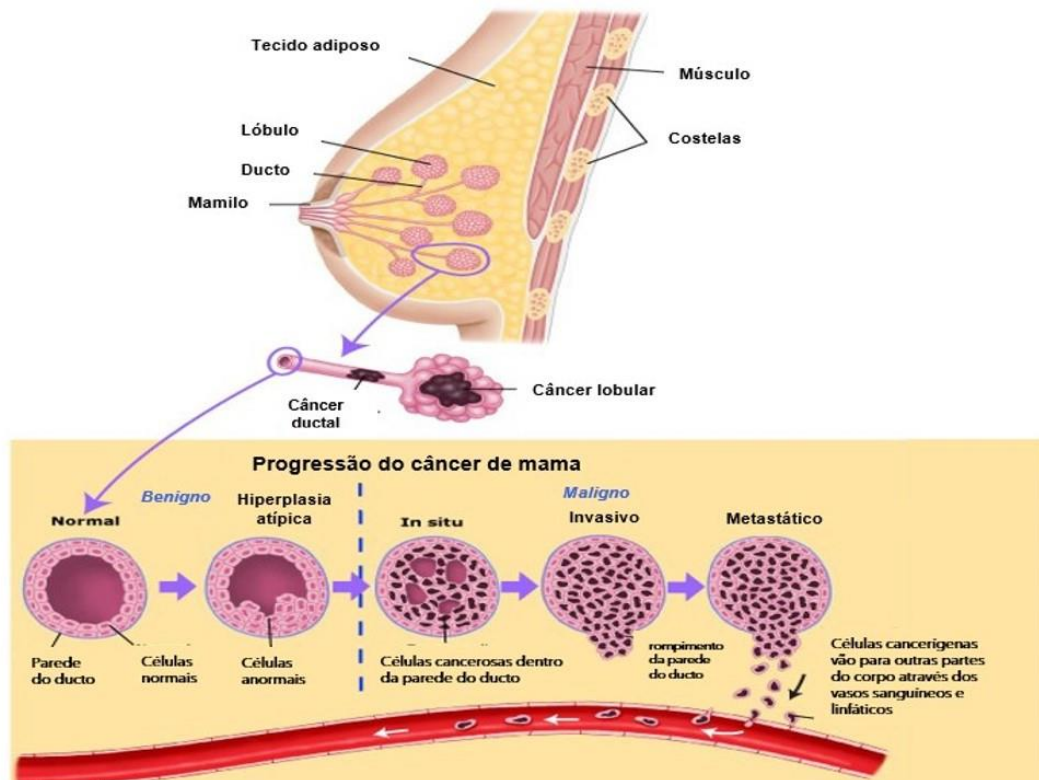
Das quatro principais classificações que um tumor maligno pode receber, o câncer de mama pode ser categorizado entre carcinomas e sarcomas, apesar desta classificação ser limitante devido à complexidade de células envolvidas em um processo de gênese tumoral. A grande maioria das neoplasias malignas da mama são enquadradas no grupo dos carcinomas e podem ter seu desenvolvimento inicial em diferentes áreas da mama como os ductos, os lóbulos ou o tecido intermediário (FENG et al, 2018; AKRAM et al, 2017).

O tipo ductal *in situ* é um câncer de mama não invasivo ou pré-invasivo, que se desenvolve dentro dos ductos das glândulas. Os tipos mais prevalentes em mulheres são os do tipo invasivo ou infiltrativo, onde células cancerígenas dos lóbulos e ductos invadem o tecido mamário estromal. O carcinoma ductal invasivo cujas células cancerígenas se originam dos ductos da mama é o mais comum diagnosticado em mulheres seguido do carcinoma lobular invasivo cujas células cancerígenas se originam dos lóbulos da mama. À medida que estas células

malignas vão se espalhando para outras regiões do organismo, pode ocorrer o denominado câncer metastático (FENG et al, 2018; AKRAM et al, 2017).

Tipos mais raros também são citados na literatura, como cânceres de mama inflamatórios, cânceres de mama em homens, crianças e adolescentes, doença de Paget da mama, carcinoma papilífero, tumor filodes e angiossarcoma da mama (FENG et al, 2018).

Figura 1 – Diferentes tipos de câncer de mama.



Fonte: Adaptado de Saint John`s Cancer Institute.

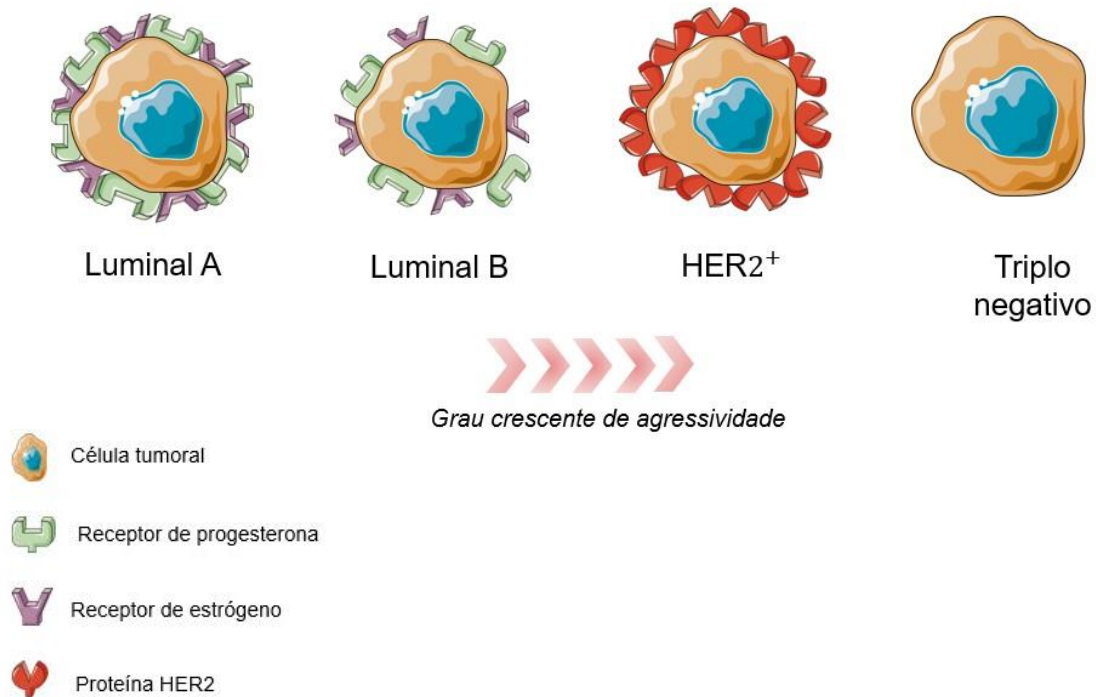
#### 2.4.1 Subtipos de câncer de mama

Os carcinomas mamários apresentam subtipos intrínsecos com assinaturas moleculares de receptores hormonais e expressão de proteínas características, as quais, são amplamente conhecidos clinicamente e classificados por técnicas de imuno-histoquímica. São eles: luminal A, luminal B, HER2 e triplo-negativo.

Essa caracterização do tipo de carcinoma é importante, pois, auxilia no planejamento do tratamento realizado e na previsão de uma potencial

agressividade do tumor. A divisão molecular dos tumores os classifica conforme grau de agressividade como representado no esquema abaixo:

Figura 2 – Representação esquemática do grau crescente de agressividade de tumores classificados conforme assinaturas moleculares de receptores hormonais e expressão de proteínas características.



Fonte: figura criada pela autora usando a Servier Medical Art, fornecida pela Servier

O tipo luminal A possui elevado nível de receptores hormonais de estrógeno (RE) e progesterona (RP) e nenhuma expressão da proteína HER2. O tipo luminal B, possuem receptores de estrógeno e progesterona na membrana celular, porém, em níveis mais baixos quando comparados ao tipo A e não apresentam a expressão da proteína HER2. O subtipo HER2 expressa esta proteína independente do estado dos receptores, em alguns casos quando os níveis da proteína são mais elevados, a classificação recebida é HER2<sup>+</sup>. Já o subtipo basal ou triplo negativo é conhecido como o carcinoma de mama mais agressivo por não expressar receptores hormonais nem a proteína HER2 (TYANOVA et al, 2016; FENG et al, 2018; CAMILLERI et al 2022).

#### 2.4.2 Linhagem celular MCF7 (ATCC HTB-22)

MCF7 (ATCC HTB-22)<sup>1</sup> é uma linhagem celular de câncer de mama que foi isolada pela primeira vez no ano de 1970 e estabelecida em 1973 pelo pesquisador Herbert Soule e seus colaboradores no Instituto de Detroit. As siglas referem-se à Michigan Cancer Foundation-7 o qual deu o nome à linhagem celular.

As células humanas isoladas são oriundas de um adenocarcinoma mamário de uma mulher branca de 69 anos. São células de morfologia e tipagem epitelial extraídas do tecido da mama, especificamente glândula mamária e que preservam suas características como o processamento de estrogênio na forma de estradiol via receptores de estrogênio citoplasmáticos (ER), além de receptores de progesterona e glicocorticoides. São derivadas de um derrame pleural de um câncer em processo metastático (CAMARILLO et al, 2014; BCRJ; ATCC).

#### 2.5 Mamografia

A mamografia é um exame de rastreamento de patologias mamárias, que produz uma imagem de raios X da mama, através de um equipamento denominado mamógrafo. Utiliza feixes de radiação ionizante composto de fótons de baixas energias e baixas doses quando comparado à outras modalidades radiológicas, por esta razão, os sistemas são específicos para aquisição de imagens mamárias. (BUSHBERG et al, 2001; SHAPIRO, 2002).

No Brasil, a avaliação das Diretrizes para a Detecção Precoce do Câncer de Mama, recomenda que o exame seja realizado em mulheres na faixa etária de 50 a 69 anos, a cada dois anos (Diretrizes INCA, 2022). É utilizada para detectar alterações no tecido da mama ainda sem a presença de sintomas, recebendo a denominação de mamografia de rastreamento. Já a mamografia diagnóstica é realizada no paciente que possui um achado na mama ou apresenta algum sintoma necessitando de investigação (BUSHBERG et al, 2001).

A mamografia é capaz de detectar nódulos que não podem ser palpáveis, assimetrias e microcalcificações (depósitos de cálcio no tecido da mama) (SHAPIRO, 2002); o exame é realizado posicionando a mama em um suporte, seguido da compressão da mesma por uma bandeja de compressão, este

---

<sup>1</sup> MCF-7: Michigan Cancer Foundation – 7; ATCC: American Type Culture Collection; HTB-22: Human Tissue Breast -22.

procedimento reduz a sobreposição dos tecidos minimizando aberrações e movimentações, permitindo melhor contraste (SHAPIRO, 2022).

Os laudos mamográficos, passam por controle de qualidade que tem por objetivo principal estabelecer padrões para que não haja divergências acentuadas na interpretação dos laudos realizados. Para isso, médicos e radiologistas fazem uso do sistema internacional Breast Imaging-Reporting and Data System (BI-RADS®) do American College of Radiology (ACR) (CBR, 2016).

Os laudos obtidos classificam de uma forma geral a composição da mama descrevendo possíveis lesões não calcificadas e calcificadas com suas correspondentes características. Os achados são analisados recebendo um grau de suspeita de malignidade conforme referências do sistema ACR BI-RADS®. Da mesma forma, ocorre com exames, os quais, não foram encontrados achados suspeitos (CBR, 2016). A tabela simplificada com as categorias e suas possíveis interpretações associado ao risco percentual de câncer é apresentado a seguir.

Tabela 1 – Categoria BI-RADS® com base no grau de suspeição.

<b>BI-RADS®</b>	<b>Interpretação</b>	<b>Risco de câncer (%)</b>
<b>0</b>	Exame não foi capaz de avaliar corretamente a mama.	Exame incompleto.
<b>1</b>	Exame normal.	0%
<b>2</b>	Achado benigno.	0%
<b>3</b>	Provavelmente benigno.	≤ 2%
<b>4A</b>	Baixa suspeita de malignidade	2-10%
<b>4B</b>	Suspeita moderada de malignidade	10-50%
<b>4C</b>	Alta suspeita de malignidade	50-95%
<b>5</b>	Achado altamente suspeito.	≥ 95%
<b>6</b>	Malignidade comprovada por biópsia conhecida.	100%

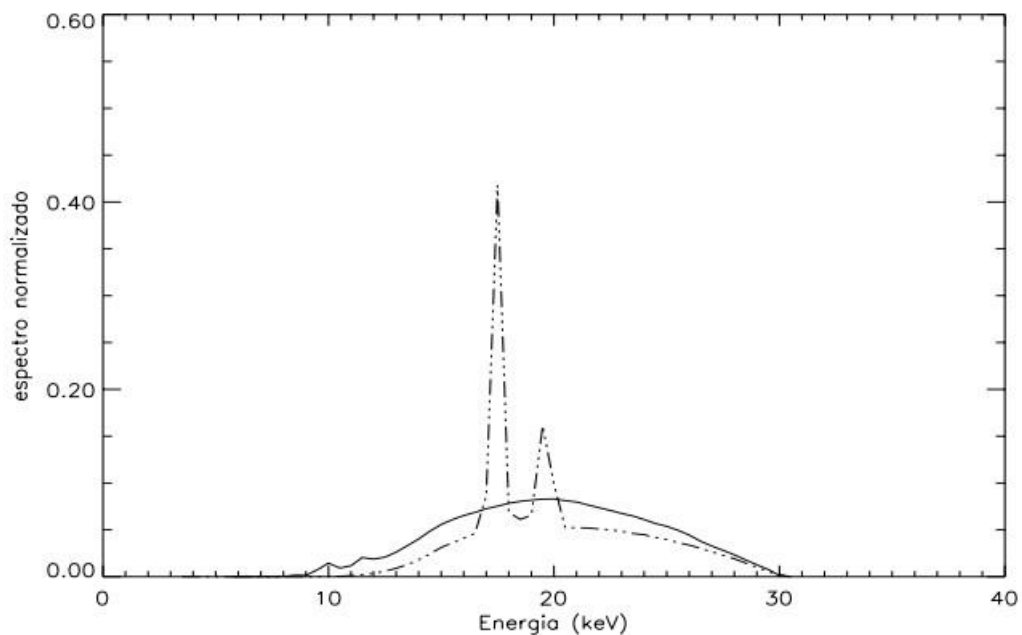
Fonte: Adaptado de ACR BI-RADS® Atlas Fifth Edition Quick Reference.

### 2.5.1 Feixes de Raios X produzidos por um sistema de mamografia

No sistema de mamografia o equipamento de raios X conta com sistema capaz de identificar alterações que possam sugerir tumores em estágios ainda iniciais de desenvolvimento. Para isso, a radiação é caracterizada pela baixa energia dos fótons incidentes que permite uma maior diferenciação entre tecidos saudáveis e tumorais (SHAPIRO, 2022).

O espectro de raios X produzidos por um sistema composto por um tubo com ânodo de tungstênio, é formado principalmente por radiação contínua (*Bremsstrahlung*). Para que este tubo com alvo de tungstênio seja utilizado nesta modalidade de radiodiagnóstico é necessário a utilização de filtros de absorção (*K-edge*) na faixa de energia adequada para que haja subtração da parte espectral de fótons com elevada energia, os quais são responsáveis pela má qualidade das imagens; a parte do espectro de fótons de baixa energia que aumentam a dose recebida pelo paciente e que não contribuem para a formação da imagem também são subtraídos pelo efeito da borda *K* (KUNZEL, 2006).

Figura 3 – Espectros produzidos por tubo de raios X com ânodo de tungstênio e molibdênio representados pela curva contínua e tracejada, respectivamente.



Fonte: Künzel, 2006.



### 2.5.2 Interação da radiação com a matéria

A radiação eletromagnética ionizante pode ser definida como qualquer radiação com ou sem massa de repouso capaz de remover elétrons de átomos e moléculas; a ação dessa força de remoção seguido do seu efeito em um meio, é entendido como a interação da radiação com a matéria. Essa interação é dependente do meio absorvedor e energia da radiação incidente (YOSHIMURA, 2009).

Diversas partículas compõem a radiação ionizante (RI), podendo elas ser atômicas ou subatômicas, são elas: prótons, nêutrons, elétrons, partícula alfa, beta, gama, etc. Segundo a teoria da física moderna de Planck, Einstein e Louis de Broglie a partícula é associada a uma onda que se propaga em forma de pacotes - os fótons (OKUNO, 2013).

Há uma grandeza de força aplicada (momento), associado a cada energia de um fóton, que através de colisões favorecem a transferência de energia e momento para outras partículas presentes no átomo (YOSHIMURA, 2009; DANCE et al, 2014; KHAN et al, 2014).

As principais interações da radiação com a matéria na faixa de poucos keV até dezenas de MeV estão representadas na tabela a seguir:

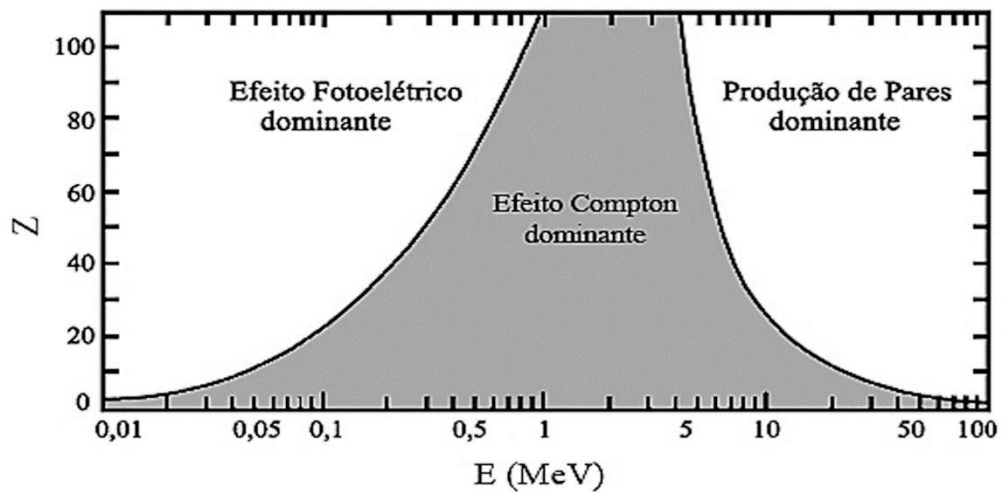
Tabela 2 - Interações possíveis de ocorrer para radiação eletromagnética ionizante – raios X, raios gama e fótons de aniquilação – e consequências das interações.

Interação – símbolo da seção de choque	O que muda no meio	O que muda na radiação incidente	Radiação ionizante produzida
Espalhamento Coerente (espalhamento da radiação pelo átomo)		Direção de propagação (mantém energia)	REM espalhada de mesma energia
Fotoelétrico (ejeção de elétron ligado)	Ionização e excitação do átomo, recuo do núcleo	Fóton é absorvido	Elétron rápido, raios X característicos, elétrons Auger
Compton (espalhamento do fóton por um elétron)	Ionização do átomo	Fóton perde energia e muda de direção	Elétron rápido, fóton com menor energia, espalhado
Produção de Par - (energia do fóton é consumida na criação do par.	Recuo do núcleo; aniquilação do pósitron	Fóton é absorvido	Elétron e pósitron rápidos, raios X de aniquilação

Fonte: Adaptado de Yoshimura, 2009.

Como os tecidos mamários e grande parte das patologias da mama possuem níveis de absorção de raios X semelhantes, devido ao número atômico e densidades próximas (BROWN et al, 2018) além das irradiações da mamografia ocorrerem na faixa de energia de 35 kV, existe a maior probabilidade de ocorrer o efeito fotoelétrico da RI com os tecidos da mama (Figura 4).

Figura 4 – Gráfico que apresenta os valores de número atômico e de energia demonstrando a probabilidade de ocorrência do efeito fotoelétrico.



Fonte: Yoshimura, 2009.

Ao interagir com o átomo, o fóton incidente o coloca em estado de excitação, ocorrendo, a ejeção de elétrons ligados ao núcleo – os fotoelétrons, os quais são removidos dos átomos com energia cinética ( $E$ ). Caso a energia do fóton incidente ( $h\nu$ ) for superior à energia de ligação do elétron, ocorre o denominado efeito fotoelétrico (DANCE et al, 2014).

## 2.6 Efeitos biológicos das radiações ionizantes

Embora os efeitos das radiações ionizantes (RIs) irem além de danos ao DNA e moléculas de água através de processos diretos e indiretos no organismo humano, é consensual de que os danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA) estão entre os principais efeitos biológicos da RI (HALL et al, 2019).

Após interação com os tecidos biológicos, há probabilidade de interação e modificação de estruturas celulares através de uma cadeia de eventos que ocasiona uma série de modificações biológicas com ações diretas e indiretas (HALL et al, 2019).

**Ação direta:** Na ação direta, após absorção de um fóton dos raios X originar um elétron secundário (elétrons gerados como produto de uma ionização), o mesmo atinge diretamente as moléculas de DNA, produzindo efeitos (HALL et al, 2019).

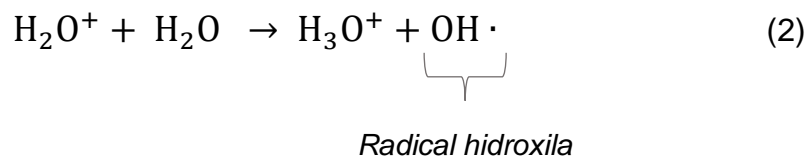
Ação indireta: Na ação indireta, ocorre a produção de radicais livres, a partir da interação da radiação com moléculas de água. Esses radicais posteriormente atingem moléculas de DNA danificando-as (HALL et al, 2019).

Um radical livre pode ser definido como uma estrutura (átomo ou molécula), que possui um elétron desemparelhado em sua orbital externa, isso significa que o elétron, sem par, para girar no sentido oposto, com a ausência de um spin faltante, passa a estar em desequilíbrio químico, com alto grau de reatividade. A equação (1) exemplifica a reação de ionização da molécula de água ( $H_2O$ ).

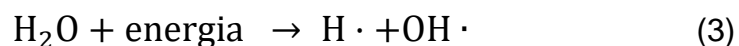


Estes radicais possuem um tempo de vida muito curto e decaem rapidamente (aproximadamente  $10^{-10}$  s) em um radical não carregado, porém, ainda com um elétron desemparelhado.

No entanto, as reações continuam a ocorrer no organismo como representado na equação subsequente (2):



As células de mamíferos, em sua composição contém em torno de 80-90% de água, em uma ação indireta da RI a transferência de energia dos elétrons para moléculas de  $H_2O$  é suficiente para modificá-las em hidrogênio e radicais livres, conforme equação (3) (ANTHONY et al, 2013).



Os radicais livres formados, promovem alterações na química de átomos e moléculas que compõem os tecidos quebrando ligações, posteriormente ocorrendo efeitos biológicos que podem ocorrer horas, dias, meses, anos ou até mesmo por gerações. Esse tempo de exposição e a identificação de neoplasias se denomina período de latência (HALL et al, 2019).

Esses efeitos, certamente são considerados críticos no que tange a interação da radiação ionizante com tecidos biológicos, no entanto, estudos realizados apontam para outros mecanismos que se traduzem em mutações, carcinogênese ou morte celular (REISZ et al, 2014).

### **2.6.1 Interação das espécies reativas de oxigênio (EROs) com lipídeos e proteínas**

As espécies reativas de oxigênio, tem a capacidade de danificar estruturas da bicamada lipídica, a qual, compõem as membranas celulares. Através do processo de peroxidação lipídica, em particular, a peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados, as membranas tornam-se mais permeáveis, alterando o gradiente de espécies químicas que atravessam a membrana e alterando funções, atividades e expressões proteicas. Os ácidos graxos insaturados, por sua vez, oxidam-se com facilidade em um processo de reação com radicais (REISZ et al, 2014).

### **2.6.2 Efeitos determinísticos e estocásticos**

Os efeitos desencadeados pela radiação ionizante nos tecidos, resultam em consequências que podem ser tardias ou precoce (também chamados de efeitos agudos). Com grau de gravidade dependente da dose e dos danos ocasionados (HALL et al, 2019; ANTHONY et al, 2013).

Os efeitos determinísticos (precoce), geralmente ocorrem em faixas de dose relativamente altas, por períodos curtos. A síndrome aguda da radiação (SAR) levando o indivíduo à morte e queimaduras radioativas principalmente na pele e retina são exemplos destes efeitos. Estas exposições são características de acidentes nucleares como os que ocorreram em Chernobyl e de bombas atômicas como em Hiroshima e Nagasaki (HALL et al, 2019; ANTHONY et al, 2013).

Os efeitos estocásticos por sua vez, se diferem do anterior pela probabilidade de surgimento com a dose, porém sem um limiar. Isso significa que

um indivíduo que recebe uma dose maior de radiação quando comparado a outro adquire maiores chances de desenvolver uma carcinogênese, no entanto, devido a diversos fatores, não se descarta a probabilidade de ocorrência em casos de menor dose de exposição. Desenvolvimento de tumores são os exemplos mais clássicos de efeitos tardios da radiação ionizante (HALL et al, 2019; ANTHONY et al, 2013).

### **2.6.3 Risco carcinogênico por baixas doses**

A indução do câncer por radiação ionizante, incluindo baixas doses, geralmente é estudada por intermédio de eventos humanos, os quais ocorreram na história seguindo modelos de dados coletados. Riscos carcinogênicos e suas relações com a exposição à radiação ionizante revelam elevada incidência (HALL et al, 2019).

Pesquisas sobre os efeitos da radiação ionizante de baixa dose, se mostram cada vez mais importantes à medida que, estudos epidemiológicos apontam aumento de desenvolvimento de câncer a partir de baixas doses (< 100 mGy) (HAUPTMANN et al, 2020). É fundamental, para aplicação dos princípios básicos de proteção radiológica, uma vez que grande parte da população é exposta a exames e procedimentos médicos ou mesmo de modo ocupacional (HAUPTMANN et al, 2020).

## **2.7 Sistema Internacional de Metrologia**

Para que haja controle de qualidade nos equipamentos que fazem uso das radiações ionizantes, existem algumas normas internacionais e nacionais que devem ser seguidas.

Para isso, o sistema internacional de metrologia (ISM), por intermédio de programas internacionais de rastreabilidade, fornece meios para a manutenção das medições na dosimetria das radiações, pela disseminação aos usuários, calibrações de instrumentos rastreáveis à padrões primários (TRS 457, 2007). A representação do sistema ilustrado na figura 5, esquematiza a pirâmide que é estruturada no Bureau Internacional de Pesos e Medidas (BIPM), laboratórios nacionais de dosimetria, tanto primários quanto secundários e os usuários que estruturam a base hierárquica (TRS 457, 2007).

Figura 5 – Hierarquia do sistema metrológico.



Fonte: Adaptado de Inmetro.

Segundo a série de relatórios técnicos (TRS 457) de 2007 da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA), os padrões primários podem ser definidos como os que possuem a mais alta qualidade metrológica permitindo a determinação da unidade de uma grandeza e sua definição, cuja, precisão foi realizada por comparações com instituições do mesmo nível, enquanto que os padrões secundários são definidos por serem calibrados por intermédio de um padrão primário (TRS 457, 2007 p.13).

### 2.7.1 Série de Relatórios Técnicos nº 457 – Dosimetria em Radiologia Diagnóstica: Um código Internacional de Prática

Em 2007, a Agência Internacional de Energia Atômica publicou a série de relatórios técnicos nº 457, em que traz um código de práticas internacionais para aplicação em dosimetria em radiodiagnóstico. Este documento se originou do programa de dosimetria de radiação ionizante proposto pela Agência, o qual, tem por objetivo auxiliar os membros nas calibrações e medições de instrumentos radiológicos e suas aplicações nas áreas radiológicas que envolve os diversos setores, médicos, industriais, institucionais, entre outros.

Além das divulgações de padrões estabelecidos para as medições, a AIEA, promove auditorias e comparações nas medições, dissemina técnicas dosimétricas e fornece treinamentos e orientações de dosimetria.

Nessa estrutura coopera AIEA juntamente com a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a rede de Laboratórios de Dosimetria de Padrões Secundários (SSDL).

Para a modalidade de exames de mamografia, o documento apresenta as qualidades de radiação que possuem padrões associados à tensão (kV), camada semi redutora (CSR) e combinação alvo/filtro com suas respectivas espessuras. Assim como outras especificações que são aplicadas para calibração de mamógrafos.

### **2.7.2 Norma IEC 61267**

Em 2005, a IEC publicou a norma 61267 intitulada “Medical diagnostic X-ray equipment - Radiation conditions for use in the determination of characteristics” (Equipamento de raios X para diagnóstico médico – condições de radiação a serem usadas na determinação de características). A norma tem por finalidade estabelecer padrões de operação de equipamentos de raios X para diagnóstico médico e investigações física.

Nela são encontrados as características e propriedades dos feixes de radiação utilizados em equipamentos para que haja condições precisas e congruentes dos padrões utilizados mundialmente em equipamentos de raios X. A norma visa auxiliar fabricantes, usuários, pacientes e autoridades de proteção à saúde no que tange a resolução de problemas, proporcionando boa comunicação de métodos e testes adotados internacionalmente.

Desta forma, os ensaios incluiriam segundo a norma, testes de controle de qualidade pelos fabricantes; testes de instalação e aceitação; calibração de instrumentação de teste; inspeção e testes por autoridades reguladoras e institutos de testes; estudos físicos e médicos em laboratórios físicos e instalações médicas.

A respeito dos laboratórios de calibração, a norma fornece as qualidades para implantação de feixes de mamografia até então não apresentadas por normas anteriores. Apresentando todas as qualidades de feixe de mamografia, tanto de entrada quanto de saída.



### **2.7.3 Portaria Federal nº453, de 1 de junho de 1998**

Em 1998, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a Portaria Federal nº453, de 1 de junho de 1998, aprovando o “Regulamento Técnico que estabelecia diretrizes básicas de proteção radiológica em radiodiagnóstico médico e odontológico”.

Em observância à constituição e a Lei 8.080, de 19 de outubro de 1990, ao avanço do uso da radiação ionizante no território nacional e aos riscos associados ao uso, que requeriam condições otimizadas de proteção.

No documento, são apresentados os princípios básicos de proteção radiológica: Justificação, Otimização e Limitação de doses, seguido dos requisitos operacionais de operações básicas de equipamentos e instalações. Registro de equipamentos, licenciamento, treinamentos, controle ocupacional e de áreas, garantia de qualidade entre outras providencias a serem adotadas e suas respectivas infrações de natureza sanitária caso haja descumprimento dos requisitos estabelecidos sujeitando o infrator ao processo e penalidades previstas na legislação.

### **2.7.4 Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 330, de 20 de dezembro de 2019**

No ano de 2019, a ANVISA revogou a até então portaria vigente publicando a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 330, de 20 de dezembro de 2019. Com esta nova resolução novos parâmetros foram estabelecidos, particularmente aos exames radiológicos e suas modalidades.

### **2.7.5 Instrução Normativa - IN nº 92, de 27 de maio de 2021**

Em maio de 2021, foi estabelecida a normativa IN nº 92 que estabelece quesitos de segurança e qualidade para os sistemas de mamografia. Exigindo que haja testes de controle de qualidade com periodicidades, tolerâncias e níveis de restrições. No anexo I da normativa são encontradas todas as especificações para as mamografias convencionais - C, mamografias computadorizadas – CR, mamografias digitalizadas – DR e geral - G.

Dentre outras alterações apresentadas na normativa, destaca-se a proposta de substituir o cálculo de dose de entrada na pele (DEP) que utilizava

simuladores de mama de polimetilmetacrilato (PMMA) de 4,5 cm de espessura pelo cálculo da dose glandular média (DGM) com diversas espessuras de PMMA, relacionadas com a espessura da mama.

Os padrões de dose (mGy) e espessura (cm) dispostos no documento podem ser consultados na tabela 3.

Tabela 3 – Dose Glandular Média (DGM) para mamografia.

Espessura (cm)		DGM (mGy)	
PMMA	Mama equivalente	Referência	Tolerância
2	2,1	0,6	<1,0
3	3,2	1,0	<1,5
4	4,5	1,6	<2,0
4,5	5,3	2,0	<2,5
5	6	2,4	<3,0
6	7,5	3,6	<4,5

Fonte: Instrução Normativa - nº 92, de 27 de maio de 2021.

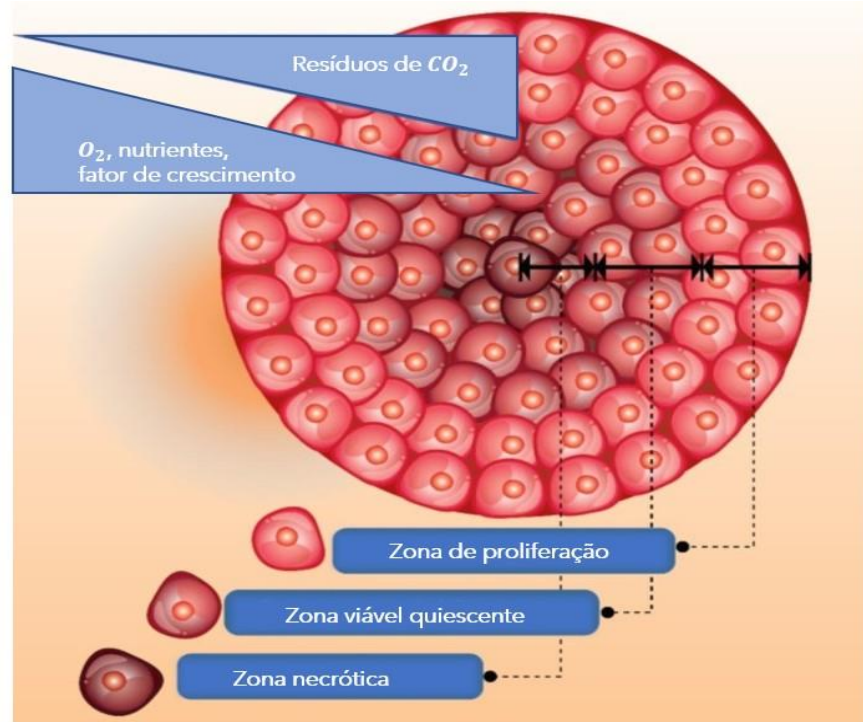
## 2.8 Modelo de células 3D

Os modelos de culturas tridimensionais de células tumorais são descritos na literatura como culturas de células em três dimensões que se organizam de tal modo que se assemelham a modelos de tumores *in vivo*.

Estes modelos, tem contribuído significativamente para as áreas biomédicas e farmacológicas, proporcionando grandes progressos na pesquisa sobre o câncer, à medida que, o método torna o cultivo celular cada vez mais dinâmico, reproduzindo tumores em condições laboratoriais (CACCIAMALI et al, 2022; CHAICHAROENAUDOMRUNG et al, 2019).

As estruturas desses aglomerados possuem um ambiente com gradientes de oxigênio, pH, estrutura heterogênea e diversas subpopulações celulares assim como em estruturas tumorais. Na imagem 6 é ilustrado todas as regiões de um aglomerado, onde se formam células quiescentes, anóxicas, hipóxicas e necróticas (HARI et al, 2019).

Figura 6 - Estrutura do modelo tridimensional com diferentes zonas de células com os esquemas de oxigenação, nutrição e remoção de  $CO_2$ . Modelo tridimensional de dentro para fora. As regiões são zona necrótica (mais interna), zona celular viável quiescente (meio) e zona proliferativa (mais externa).



Fonte: Adaptado de Chaicharoenaudomrung et al, 2019.

Modelos de cultura 3D são vantajosos sobre os sistemas 2D convencionais (cultura celular em monocamada), por uma série de características que reproduzem um modelo celular *in vivo*, em suas funções tanto morfológicas quanto bioquímicas. O microambiente tecidual formado por esse modelo é conveniente ao estudo dos efeitos ocasionados pela radiação ionizante à nível celular sem a necessidade de utilizar modelos animais (HUANG et al, 2022).

Dentre as principais características do modelo 3D destacam-se:

1. Preservação natural da forma e crescimento celular;
2. Crescimento em aglomerados/esferoides 3D que possuem várias camadas;
3. Centro dos aglomerados, geralmente são mais necróticos devido ao baixo nível de oxigênio e fatores de crescimento, igualmente às células tumorais *in vivo*;

4. Contato célula-célula permite a comunicação entre ambas por intermédio da troca de íons, pequenas moléculas e correntes elétricas;
5. Proliferação celular de assemelham ao real, e podem variar conforme técnica utilizada e linhagem celular;
6. Expressões gênicas e proteicas são semelhantes aos de células *in vivo*;
7. Modelo dinâmico de cultura celular, proliferação e diferenciação celular imitando o *in vivo*.

Existem diferentes técnicas aplicadas para se construir uma estrutura tridimensional, as quais, podem ser aprimoradas em conformidade com a aplicação e objetivo de estudo, dentre elas destacam-se: a técnica de gota suspensa (hanging drop), levitação magnética, uso de hidrogéis, biorreator de frasco giratório, andaime, bioimpressão, além da sobreposição líquida.

A técnica de sobreposição líquida, é simples e econômica quanto comparada a outras técnicas 3D. O método consiste na cobertura da superfície com substrato inerte. Ao impedir a adesão celular na superfície, as células formam agregados celulares. A dificuldade da técnica se encontra na padronização dos tamanhos e volumes dos aglomerados formados (CHAICHAROENAUDOMRUNG et al, 2019; JENSEN et al, 2020).

## 2.9 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica espectroscópica vibracional que ocorre com a interação da luz com a matéria em um processo físico de espalhamento. Esse fenômeno foi previsto por Smekal em 1923, mas somente em 1928 Raman e Krishnan demonstraram o efeito, o qual, recebeu o nome de efeito Raman. No ano de 1930, o físico indiano Chandrasekhar Raman recebeu o prêmio Nobel de física pela descoberta (RAMAN et al, 1928).

A técnica é capaz de identificar a composição química de uma amostra a partir de sua interação com a radiação eletromagnética. A radiação eletromagnética interage com a matéria através dos fótons (partículas elementares que compõem a luz), os fótons, ao interagir com os átomos presentes nas moléculas, têm modificação na trajetória inicial, o chamado espalhamento (LIANG et al, 2023).

Existem dois tipos possíveis de espalhamento que pode ocorrer com um fóton: elástico (espalhamento Rayleigh) e inelástico (espalhamento Raman).

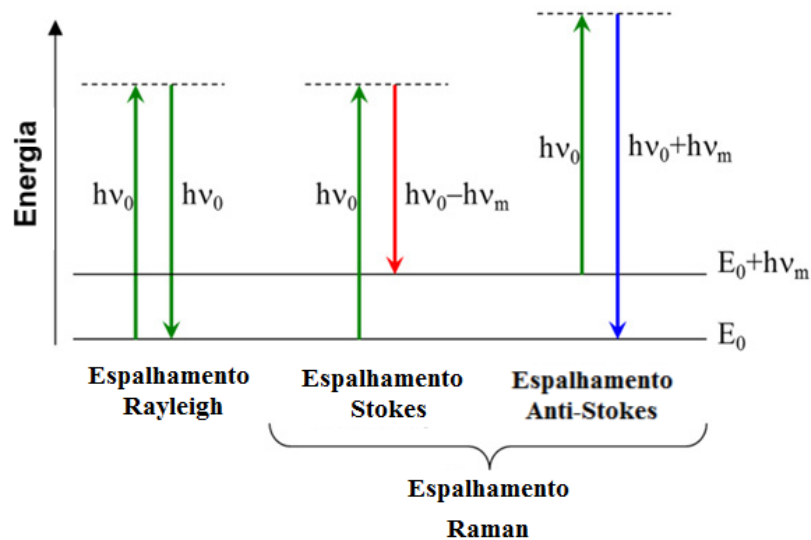
O espalhamento elástico é definido como a conservação da energia interna do sistema. Neste caso, a partícula que colide com o(s) átomo(s) das moléculas tem sua trajetória alterada sem sofrer qualquer perda ou ganho de energia, ou seja, a energia inicial é igual a energia final (SALETNIK et al, 2021)

No espalhamento inelástico, o que ocorre é a perda ou ganho de energia interna da partícula, com trocas de energia ente o fóton e os átomos da molécula. Neste caso, a energia inicial é diferente da energia final (SALETNIK et al, 2021)

A espectroscopia Raman consiste no estudo do fenômeno de espalhamento inelástico de radiação monocromática que incide numa molécula. É a diferença dessas frequências vibracionais que indicam como os átomos estão arranjados, permitindo analisar a composição química da matéria (SHARMA et al, 2016).

Quando o espalhamento resulta em frequências menores que a frequência da radiação incidente, diz-se que ocorreu o espalhamento Stokes. Se o deslocamento resultar na emissão de frequências maiores é chamado de espalhamento Anti-Stokes. A figura 7 mostra esquematicamente o mecanismo para o espalhamento Raman (inelástico) e para o espalhamento Rayleigh (elástico).

Figura 7 – Ilustração do espalhamento Raman.



Fonte: Adaptado de <https://bwtek.com/raman-theory-of-raman-scattering>.

A espectroscopia Raman tem se destacado como uma ferramenta importante para a análise de tecidos biológicos, inclusive como auxiliar no estudo do câncer (RALBOVSKY, 2019). A técnica proporciona análise não destrutiva sem a necessidade de usar biomarcadores, é promissora no diagnóstico *in vivo* com potencial redução de biópsias (EMBER et al, 2017).

Normalmente, na espectroscopia Raman a energia da radiação espalhada é menor que a energia da radiação incidente (espalhamento Stokes). Este padrão de deslocamento energético (Raman Shift  $\text{cm}^{-1}$ ) devido aos fótons incidentes e refletidos é conhecido como fingerprint. O fingerprint da amostra ou impressão digital é a característica que define exclusivamente uma única espécie química (SHARMA et al, 2016; EMBER et al, 2017).

As características espectrais, as quais, relacionam a área e posição dos picos podem indicar alterações importantes nos tecidos, auxiliando em sua diferenciação como mostrado na figura 8.

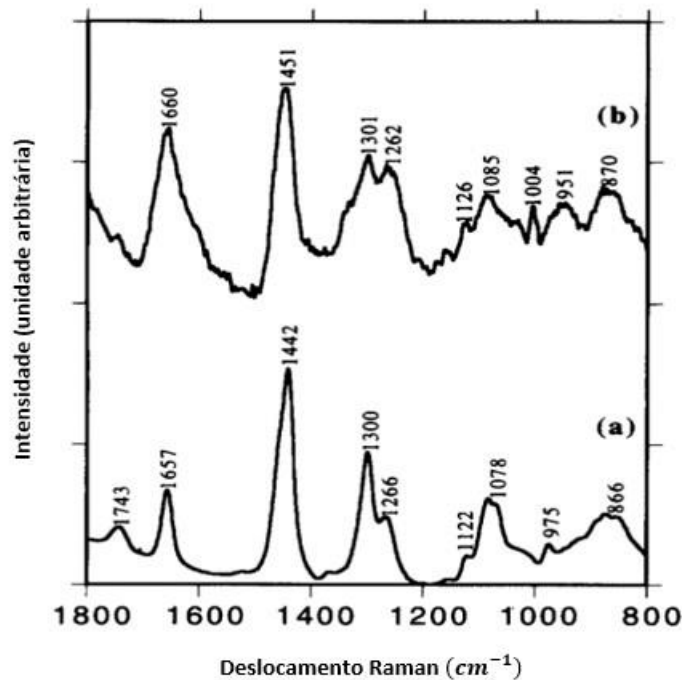
As frequências observadas são específicas do material que está sendo analisado. Dessa forma, as frequências, a intensidade e as larguras dos picos fornecem informações importantes sobre os tecidos biológicos analisados, indicando processos patológicos e alterações bioquímicas em diferentes regiões.

A análise dos tecidos humanos e de animais por espectroscopia Raman fornece informações sobre os modos vibracionais de moléculas excitadas por fótons, proporcionando a identificação de espectros que correspondem à composição química, biológica e morfológica dos tecidos estudados (LYNG et al., 2019). Dentre as propriedades da espectroscopia Raman destacam-se:

1. Técnica não invasiva;
2. Informações detalhadas sobre a composição e estruturas moleculares do tecido;
3. Possibilidade de monitoramento das camadas superficiais e mais profundas da derme.

Diversos estudos publicados descrevem a composição de tecidos da mama, tanto maligno como normal (ABRAMCZYK et al, 2009; ABRAMCZYK et al, 2011; ABRAMCZYK et al, 2012; BROZEK-PLUSKA et al, 2008; BROZEK-PLUSKA et al,2012). As principais diferenças entre as alterações que ocorrem no tecido mamário são nos grupos de lipídeos e proteínas (MANOHARAN et al, 1996). Os lipídeos são mais abundantes em tecidos mamários normais, enquanto as proteínas predominam tecidos em que há proliferação de células anormais sejam elas benignas ou malignas (FRANK et al,1994).

Figura 8 – Espectro Raman a) tecido mamário normal e b) tumor, excitação em 830 nm.



Fonte: Adaptado de Manoharan *et al.*, 1996.

## 2.10 Espectroscopia de Fluorescência

Os métodos baseados em fluorescência e fosforescência são aqueles nos quais a excitação da molécula é obtida por intermédio da absorção de fótons. Neste caso, a molécula é promovida para um estado eletrônico de maior energia, cujo retorno ao estado fundamental é acompanhado pela emissão de radiação eletromagnética conforme ilustra o diagrama de Jablonski (ALBRECHT, 2008) (Figura 9).

Dentre as propriedades importantes da fluorescência são destacadas:

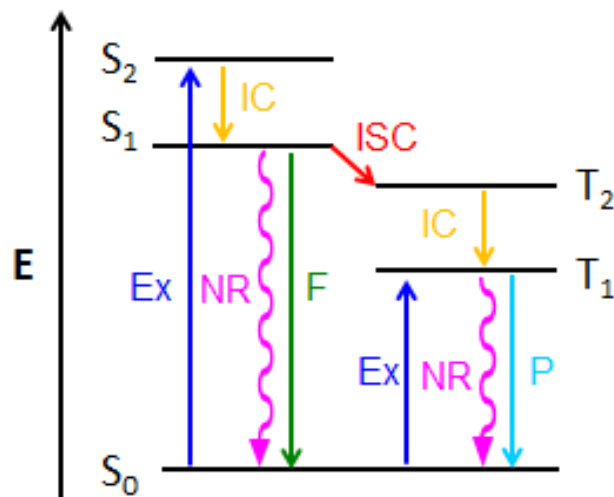
1) alta sensibilidade e baixos limites de detecção, os quais normalmente se encontram na faixa de  $\text{ng mL}^{-1}$ , em virtude do baixo sinal de fundo que as medidas fluorescentes apresentam;

2) seletividade, as moléculas fluorescentes apresentam comprimento de onda característico de excitação e/ou emissão;



3) ampla faixa linear de resposta; simplicidade instrumental e o baixo custo de manutenção e análise, quando comparados com outros métodos analíticos (ENGELS et al., 1997).

Figura 9 – Diagrama de Jablonski (ou diagrama de níveis de energia) que ilustra os processos sofridos por uma molécula excitada por luz, em que “Ex” corresponde à absorção (excitação), “F” e “P”, à fluorescência e à fosforescência, respectivamente (ambos processos de decaimento radiativos), e “IC” e “ISC”, à conversão interna e ao cruzamento intersistemas, respectivamente (ambos processos de decaimento não radiativos).



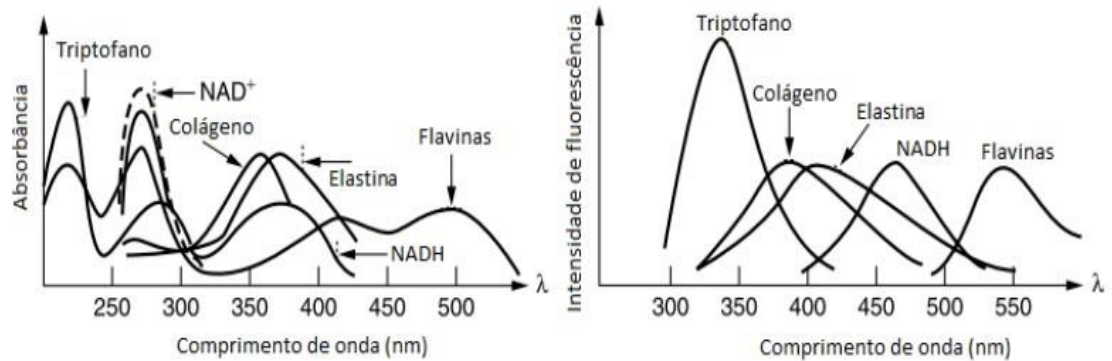
Fonte: Chemical Principles Lectures.

Os fluoróforos são compostos que emitem luz após serem excitados em determinado comprimento de onda, geralmente por excitação com luz ultravioleta ou azul. Eles são encontrados, naturalmente, em tecidos biológicos contribuindo para a autofluorescência tecidual. Alguns exemplos que são encontrados são: nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), elastina, colágeno, triptofano e porfirinas (BACHMANN et al, 2006).

Fluoróforos endógenos como a elastina e o colágeno compõem matrizes estruturais, já o metabolismo celular, por exemplo, é composto principalmente de NADH, FAD e lipopigmentos. (SKALA *et al.*, 2007). Além destes, existem muitos outros fluoróforos endógenos que emitem em vários comprimentos de onda do UV e do visível do espectro eletromagnético. É o caso do triptofano e porfirinas.

Os espectros de absorção e emissão dos principais fluoróforos do tecido biológico são apresentados na Figura 10.

Figura 10 – Espectros de absorção (esquerda) e emissão (direita) dos principais fluoróforos do tecido biológico.



Fonte: Alfano et al, 2011 apud Faria, 2017.

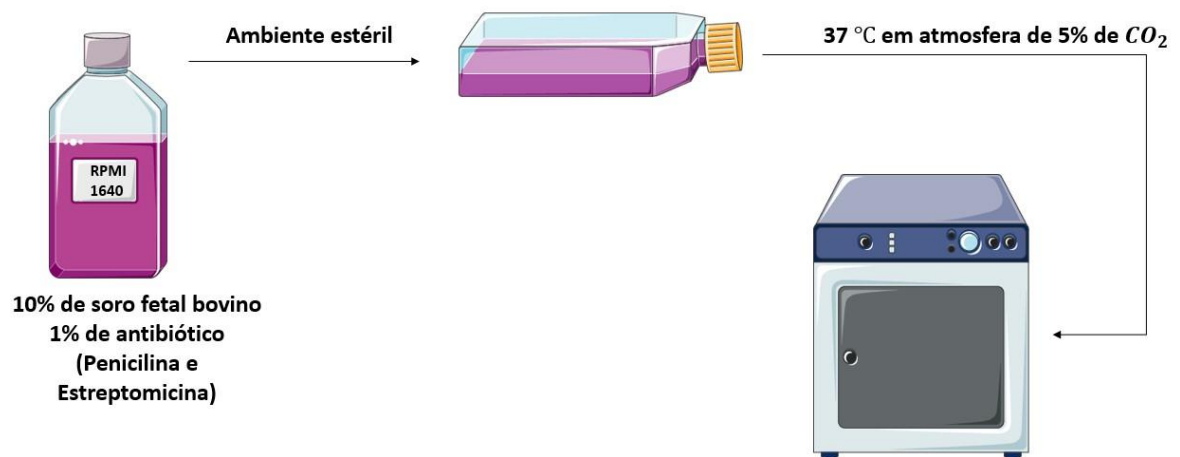
O uso da técnica tem ganhado amplo espaço no estudo de alterações teciduais, devido as alterações na fluorescência de compostos que indicam estados de deterioração tanto morfológicas como bioquímica dos tecidos. A interpretação da emissão de luz dos diferentes fluoróforos contribuem na caracterização de lesões cancerígenas e tecidos normais, assim como possíveis alterações que não apresentam ainda modificações morfológicas detectáveis por outros métodos (HAMDY et al, 2022).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Cultivo celular

Células MCF7 (ATCC HTB-22) foram cultivadas em garrafas de cultivo de 25cm<sup>2</sup>, em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e mistura de antibióticos (10.000 UI/mL de penicilina, 10 mg/mL estreptomicina) e foram mantidas em incubadora a 37°C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>.

Figura 11 – Etapas de cultivo celular.



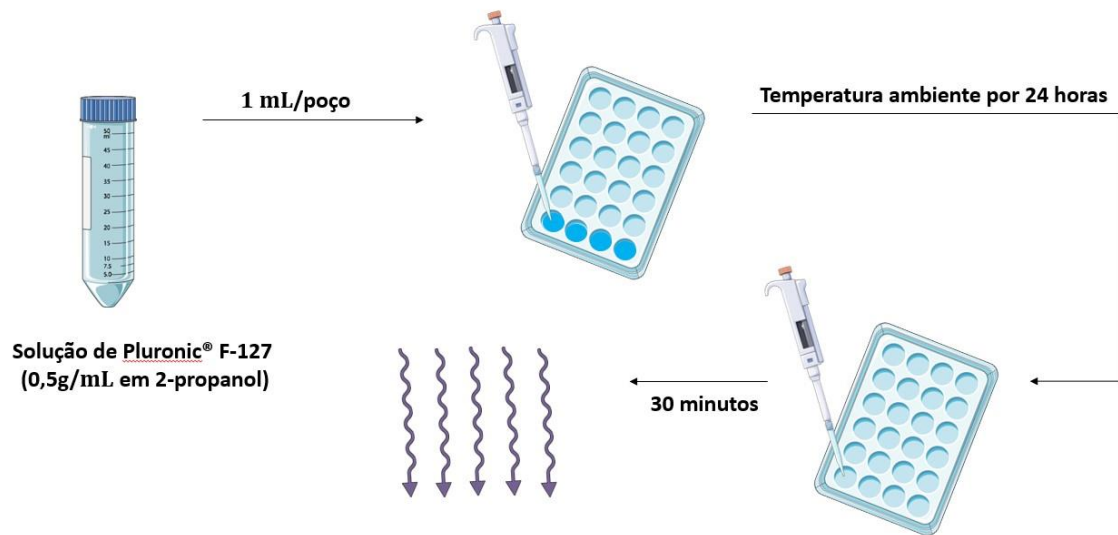
Fonte: figura criada pela autora usando a Servier Medical Art, fornecida pela Servier

#### 3.2 Produção de agregados celulares

Placas de cultura celular com 24 poços foram pré-tratadas com solução de Pluronic® F-127 (0,5g/mL em 2-propanol). Cada poço recebeu 1mL e permaneceu em temperatura ambiente por 24 horas. Com este procedimento, as moléculas do copolímero se arranjam em configuração “pancake” (NEJADNIK et al., 2009), com sua porção hidrofóbica direcionada para o centro do poço, impedindo assim a adesão celular no plástico de cultura.

Após este período, o máximo possível de líquido foi sugado e as placas foram postas para secagem em capela de fluxo laminar estéril e sob irradiação UV por 30 minutos para eliminar o risco de contaminação.

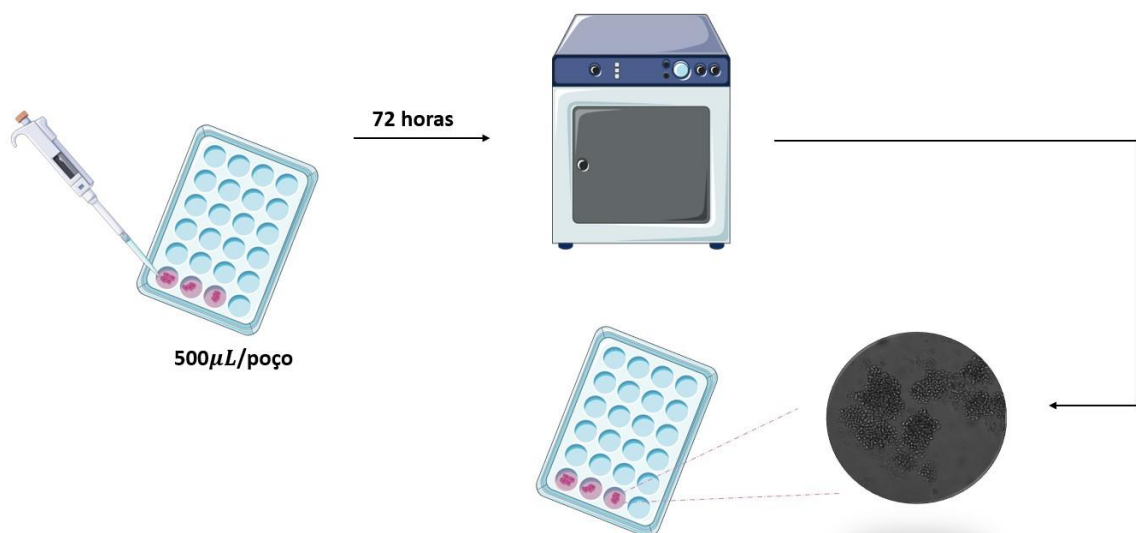
Figura 12 – Processo de tratamento das placas de 24 poços com solução de Pluronic® F-127 (0,5g/mL em 2-propanol).



Fonte: figura criada pela autora usando a Servier Medical Art, fornecida pela Servier

Em cada poço foi adicionado meio de cultura (500µL/poço) com  $10^5$  células por poço. Os agregados celulares foram formados por agregação espontânea, uma vez que as células foram impedidas de aderir às placas pela ação repelente do Pluronic® F-127.

Figura 13 – Etapa de plaqueamento com representação típica dos aglomerados formados após 72 horas em incubadora.



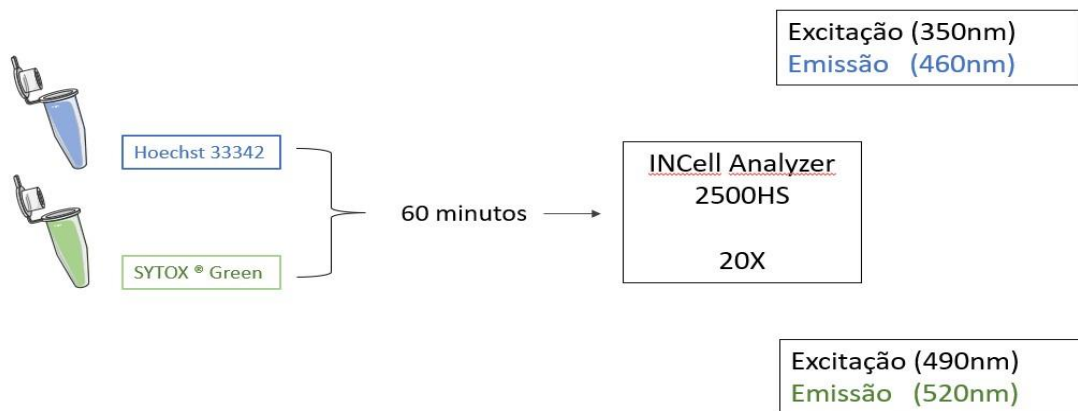
Fonte: figura criada pela autora usando a Servier Medical Art, fornecida pela Servier

### 3.3 Microscopia de Fluorescência

Agregados celulares foram corados por incorporação dos corantes Hoechst 33342 (10 $\mu$ g/mL) e SYTOX® Green (0,04mM) por 60 minutos. Hoechst 33342 é um corante pan-nuclear, que se incorpora ao DNA de todas as células da amostra, e após excitação (350nm), é visualizado emitindo fluorescência azul (460nm). SYTOX® Green só penetra em células mortas, e se incorpora ao seu DNA. É excitado a 490nm e emite fluorescência verde em 520nm. Este protocolo permite discriminar células viáveis (azuis) das não viáveis (verdes).

Após a coloração, os agregados foram visualizados no INCell Analyzer 2500HS presente no CEBIO/IPEN, utilizando aumento de 20X.

Figura 14 – Representação esquemática das etapas de coloração, excitação/emissão das amostras na microscopia de fluorescência.



Fonte: autora

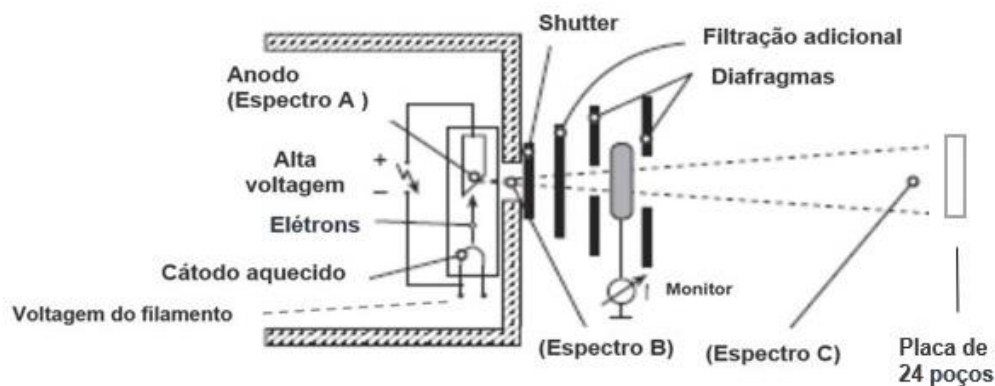
Foram realizadas 36 aquisições, distanciadas por 1 $\mu$ m e que percorreram 36  $\mu$ m de profundidade no material, permitindo sua análise volumétrica e espacial. Uma renderização em 3D de uma das amostras está disponível no endereço: <https://www.youtube.com/watch?v=C0CdG2gLgs8>. Acessível também pelo QR Code abaixo:



### 3.4 Irradiação

Após 72 horas da semeadura das células, os agregados celulares foram irradiados em um sistema de radiação para calibração de medidores utilizados em radiodiagnóstico no laboratório de calibração de instrumentos (LCI) no Centro de Metrologia das Radiações (CMR/IPEN), conforme ilustra o arranjo na figura 15.

Figura 15 – Esquema de sistema de radiação para calibração de medidores utilizados em radiodiagnóstico no LCI do CMR/IPEN.



Fonte: Adaptado de Laboratório de Calibração de Instrumentos (LCI).

Para que o material fosse irradiado dentro do campo de 12 cm de diâmetro fez-se necessário dispor as placas na posição vertical, para isso, cada poço foi sugado cuidadosamente sem que houvesse danos ao material biológico, aproximadamente 300  $\mu\text{L}$  de meio de cultura / poço.

As placas foram posicionadas a um metro de distância da saída do feixe (conforme determinam as normas) dentro do campo de radiação (12 cm de diâmetro) com o auxílio de lasers devidamente calibrados.

A qualidade de feixe que simula a faixa de energia de um mamógrafo possui radiação de referência para mamografia implantada no sistema Pantak/Seifert com rastreabilidade ao laboratório primário alemão, Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB). A qualidade RQR - 4M é um feixe de radiação de entrada. Parâmetros estão relacionados na Tabela 4

Tabela 4 - Parâmetros e qualidade implantada no sistema Pantak/Seifert.

Qualidade	kV	mA	CSR (mmAl)	Filtração (mm)	Taxa de kerma no ar (mGy/min)
RQR - 4M	35	10	0,41	0,07Mo	19,2

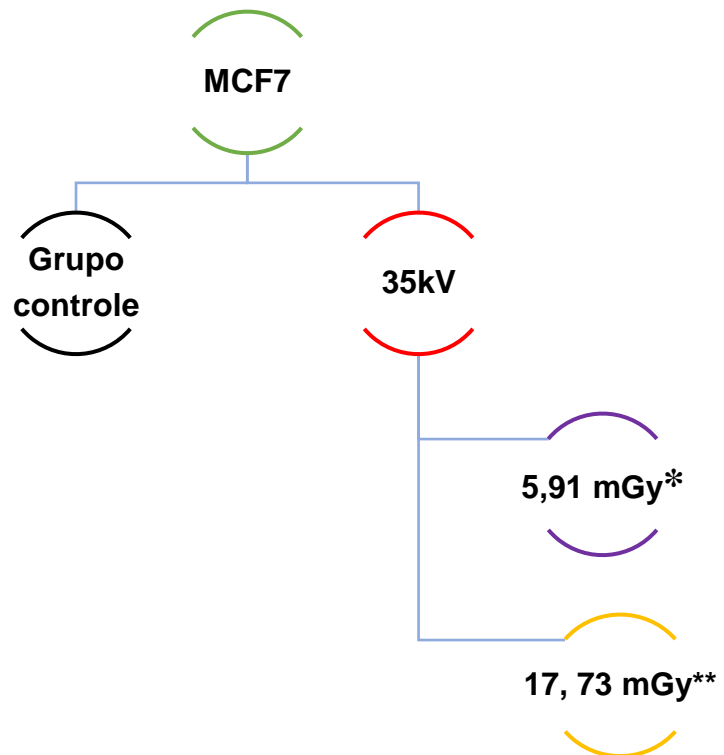
Fonte: Laboratório de Calibração de Instrumentos (LCI).

Para a determinação das características do feixe de raios X foi utilizada uma câmara de ionização padrão Radcal RC6M Série: 9231- Calibrada no PTB, com medida de incerteza  $\pm 0,96\%$ ; Eletrômetro Keithley 6517A – Série: 0989665; (Norma IEC61267). No certificado =  $\pm 2,0\%$ ; Distancia da fonte = 1m; colimador 1 = 34 mm; colimador 2 = 50,8 mm; campo = 12 cm de diâmetro.

As doses utilizadas para irradiar o material, foram baseadas na Instrução Normativa - n° 92, de 27 de maio de 2021, a qual apresenta nova proposta de dose glandular média, com o intuito de utilizar doses dentro do espectro estabelecidas na legislação e aplicadas em exames.

As doses foram calculadas a partir da taxa de kerma no ar (mGy/min) do feixe padrão e do tempo necessário para se obter uma dose aproximada de 5 mGy, ao passo de que foi obtido o valor de 18 segundos de exposição para atingir a dose de entrada na pele. O padrão calibrado no PTB possui incerteza de 0,77%. A incerteza na medição é de 1,5%. A Figura 16 demonstra o esquema de radiação relacionando dose-energia.

Figura 16 - Esquema de irradiação relacionando dose e energia.



\* Dose = 5,91 mGy (1 exposição)

\*\* Dose = 17,73 mGy (3 exposições com intervalos de dez minutos).

Fonte: autora.

Após o período aproximado de duas horas do material ter sido irradiado iniciava-se as medidas espectroscópicas.

### 3.5 Espectroscopia Raman

Os espectros Raman foram registrados na faixa entre 100 a 3200  $\text{cm}^{-1}$ . As medidas foram realizadas em um microscópio da marca Renishaw, modelo InVia, que possui um detector CCD e fonte laser com emissão em comprimentos de onda em 632,8 nm e 830 nm, pertencente à central multiusuários da UNIFESP-Diadema. A excitação com laser de 830nm foi utilizada por fornecer melhores resultados para análise de amostras biológicas. O espectrômetro Raman foi



calibrado usando uma fonte padrão de silício, cuja, a posição de emissão deve ocorrer no intervalo entre  $520\text{cm}^{-1}$  e  $521\text{cm}^{-1}$ , segundo fabricante.

Para aquisição dos espectros Raman, os aglomerados foram colocados em um suporte de alumínio, para evitar o espalhamento e a fluorescência da luz do laser. A intensidade do laser na amostra foi de 100%, com aquisição espectral no modo estático, usando 1 acúmulo e exposições de dez segundos, objetiva de 20X e grade de difração de 1.200 l/mm.

Os dados foram analisados a fim de identificar os picos e as bandas Raman correspondentes às biomoléculas presentes nas amostras. Os espectros Raman dos aglomerados celulares não irradiados foram comparados aos espectros obtidos para os irradiados.

### 3.5.1 Análise de componentes principais

A análise de componentes principais (*Principal Component Analysis*, PCA) é um dos principais métodos empregados para reconhecimento de padrões, identificação de agrupamentos naturais entre amostras, classificação e calibração multivariadas. Este método estatístico permite reduzir o número de variáveis em um pequeno número de componentes com um percentual da covariância dos dados. Para verificar o efeito da irradiação nas células MCF7 realizou-se uma análise exploratória dos espectros empregando o método PCA. Inicialmente, os espectros foram tratados computacionalmente removendo o fundo devido à fluorescência por meio do ajuste de uma função polinomial. Posteriormente, os espectros foram suavizados (*smoothing*) e normalizados para área unitária. A partir dos dados apresentados nas figuras 18 e 19, percebe-se que a maior variação nos espectros Raman ocorre na faixa ente 370 a  $2000\text{ cm}^{-1}$ . Para cada tipo de aglomerados celulares utilizou-se 30 espectros experimentais. Posteriormente, utilizou-se um código desenvolvido em Python para o cálculo das componentes principais e também dos *loadings*. Os dados foram separados em dois conjuntos: (a) amostras controle e amostras irradiadas com 5,91 mGy e b) amostras controle e amostras irradiadas com 17,73 mGy a fim de calcular os escores e os *loadings* para cada conjunto de dados.

### 3.6 Fluorescência “steady-state”

Para a autofluorescência dos tecidos é necessário o conhecimento amplo dos espectros de emissão com diferentes tipos de excitação e comprimentos de onda de emissão para determinado tipo de tecido biológico, para a obtenção do “branco”, ou seja, a média dos espectros dos diversos fluoróforos. Foram medidas principalmente as emissões do triptofano (excitação 283 nm e emissão em 350 nm), NADH (excitação em 320 nm e emissão 450 nm) e FAD (excitação em 320 nm e emissão em 535 nm). O “branco” foi obtido a partir de uma média de diversas medidas obtidas com o material após o estabelecimento de um protocolo inicial. Este protocolo indicou os melhores parâmetros de medida (comprimento de onda de excitação, resolução, tipo de porta amostra, etc.).

Foi estabelecido que o melhor comprimento de onda de excitação das amostras se encontra em 283 nm e 320 nm, uma vez que este comprimento de onda excita importantes fluoróforos como triptofano, colágeno, elastina, NADH e FAD.

Desta maneira a fluorescência dos tecidos irradiados foi realizada com um fluorímetro Horiba-Jobin Yvon, Fluorolog 3, em comprimento de onda de 283 nm com varredura entre 310 nm e 545 nm e comprimento de onda de 320nm, com varredura entre 350 nm a 595 nm, obturador de entrada 4mm e obturador de saída 3mm.

As medidas foram feitas utilizando o sistema de entrega de feixe de luz, que consiste em uma fibra bifurcada, a qual, transporta a luz de excitação, sendo emitida para uma segunda fibra, de forma que o sinal é processado dentro do próprio aparelho. As amostras foram analisadas com o feixe de luz excitando a amostra disposta em um suporte opaco a fim de evitar efeitos ópticos indesejados.

Todas as medidas foram realizadas sob mesmas condições experimentais.

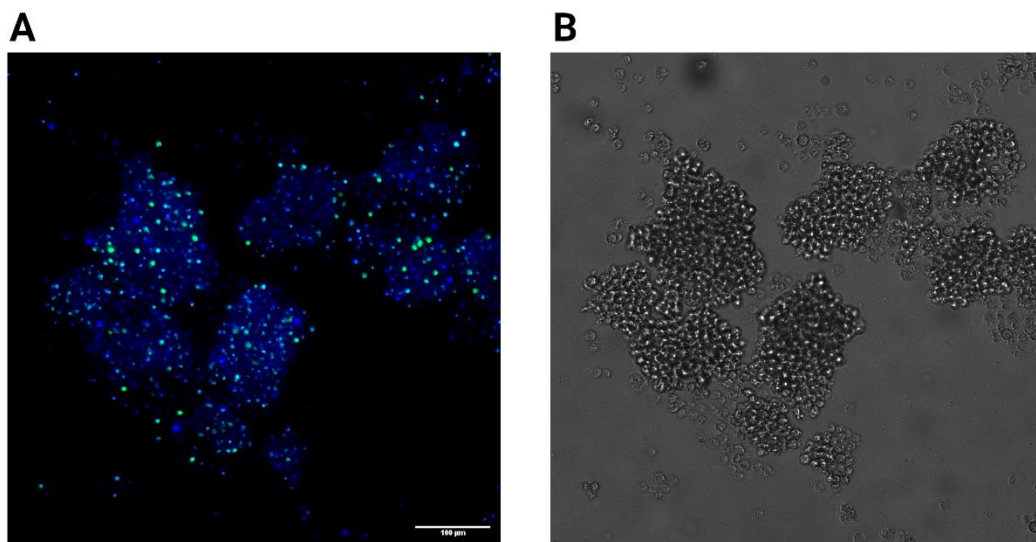
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Microscopia de Fluorescência

A Figura 17 mostra uma imagem típica de um agregado de células MCF7, em aumento 20X.

Foram formados agregados com cerca de 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro, em média. A quantidade de células inviáveis (positivas para SYTOX Green) foi considerada razoável e não foi considerada um interferente nos experimentos.

Figura 17 - Aspecto típico dos agregados de células MCF7 obtidos. (A), fluorescência – azul (Hoescht 33342); verde (SYTOX Green). (B): campo claro.



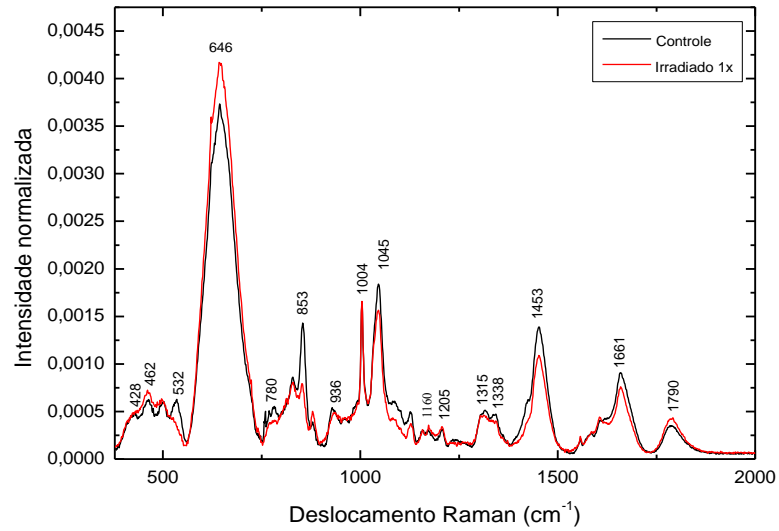
Fonte: autora

## 4.2 Espectroscopia Raman

Agregados de adenocarcinoma mamário (MCF7) não irradiados e irradiados com uma dose de 5,91 mGy e 17,73 mGy para um feixe de mamografia gerado com tensão de 35 kV foram analisadas por Espectroscopia Raman a fim de identificar possíveis mudanças na composição bioquímica ou estrutura dos grupos funcionais na faixa entre  $370 - 2000 \text{ cm}^{-1}$ .

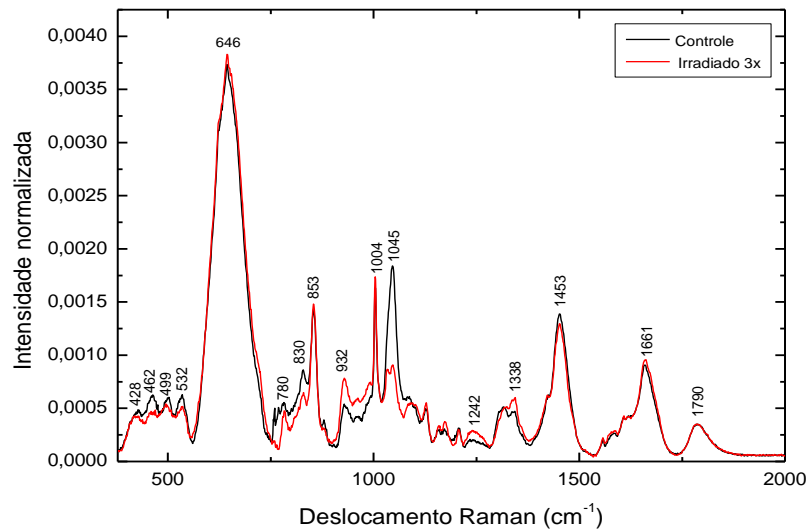
Para cada grupo de amostras foram realizadas 30 aquisições a fim de utilizar o espectro médio nas referidas análises. Os dados experimentais foram processados realizando a remoção do fundo devido à fluorescência da amostra e posteriormente normalizados pela área (área unitária) a fim de corrigir possíveis variações nos espectros induzidos por diferenças nas espessuras das amostras. Os espectros Raman para as amostras não irradiadas e irradiadas estão ilustrados nas Figuras 18 e 19. O número de onda central de cada pico foi determinado por meio do ajuste de uma função Gaussiana a cada um dos picos observados no espectro. Os dados para cada conjunto representam a média calculada sobre 30 espectros. Posteriormente, foram observados os picos Raman das amostras irradiadas e não irradiadas, as frequências atribuídas estão dispostas nas figuras 18 e 19, e a partir dos dados da literatura, os grupos funcionais presentes nas amostras foram identificados, e estão dispostos na Tabela 5.

Figura 18 – Espectro médio dos agregados de células de MCF7 irradiados (5,91 mGy, 35Kv) e não irradiados.



Fonte: autora

Figura 19 – Espectro médio dos agregados de células de MCF7 irradiados (17,73 mGy, 35Kv) e não irradiados.



Fonte: autora

Tabela 5 – Identificação das bandas Raman e dos grupos funcionais observados nos espectros dos aglomerados de células MCF7 não irradiados e irradiados.

Deslocamento Raman (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
428	Vibração de alongamento simétrico de $\nu_2 PO_4^{3-}$ (fosfato de HA)
462	Polissacarídeos
499	Glicogênio
532	L-alanina
646	C-C modo de torção de tirosina
780	Modo “breathing” em anel à base de uracil
830	Prolina, hidroxiprolina, tirosina, trecho $\nu_2 PO_2^-$ de ácidos nucleicos
850	vibrações de estiramento de ligação simples para os aminoácidos e valina e polissacarídeos
853	Modo “breathing” do anel de tirosina e alongamento C-C do anel de prolina
884	Proteínas, incluindo colágeno I
936	Eixo C -C Prolina (colágeno I)
939	Estiramento C-C
1004/1005	Fenilalanina (de colágeno); Fenilalanina (proteínas)
1045	$\nu_3 PO_4^{3-}$ alongamento simétrico, vibração de $\nu_3 PO_4^{3-}$ de HA
1073	Vibração de alongamento simétrico de carbonato de apatita de carbonato de cálcio
1084	Grupos fosfodiéster em ácidos nucleicos
1129	$\nu$ C-C acil em lipídeos
1160	Vibrações deformantes do anel quinóide
1184	Citosina, Guanina, Adenina
1205	Diferenças em quantidade de colágeno
1242	Amida II (folha $\beta$ )
1315	Guanina (marcador – B, Z)
1338	Triptofano CH <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> modo de torção de colágenos e lipídeos CH <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> modo em colágeno, ácido nucleico e triptofano.
1453	Banda de proteínas, modo metoxil (4); Modos estruturais de proteínas tumorais
1457	Desoxirribose
1609	Citosina (NH <sub>2</sub> )
1661	Amida I
1790	Amida I

O resultado do espectro Raman do grupo controle comparado ao espectro do grupo irradiado 1x (dose de 5,91 mGy), revela alterações sutis na intensidade das bandas atribuídas, conforme mostra a figura 18. Os dados obtidos revelam que a intensidade de alguns picos aumenta enquanto que em outros decresce devido aos efeitos da radiação ionizante.

A alteração da frequência Raman das bandas mais visíveis dos espectros, que demonstram um aumento na intensidade, promovidas pela radiação ionizante, podem corresponder às seguintes estruturas: 428  $\text{cm}^{-1}$  (fosfato de HA), 462  $\text{cm}^{-1}$  (polissacarídeos), 646  $\text{cm}^{-1}$  (tirosina), 1004  $\text{cm}^{-1}$  (fenilalanina), 1790  $\text{cm}^{-1}$  (amida I).

Enquanto que dentre os principais picos que apresentam decréscimo visível em sua intensidade, atribui-se os seguintes componentes: 532  $\text{cm}^{-1}$  (L-alanina), 780  $\text{cm}^{-1}$  (uracil), 853  $\text{cm}^{-1}$  (prolina), 936  $\text{cm}^{-1}$  (proteínas), 1045  $\text{cm}^{-1}$  (fosfato), 1453  $\text{cm}^{-1}$  (proteínas), 1661  $\text{cm}^{-1}$  (amida I).

A figura 19 compara a média dos espectros Raman do grupo controle com amostras irradiadas 3x com intervalos de 10 minutos dada cada exposição (dose de 17,73 mGy), revelando aumento e diminuição da intensidade de frequência nos picos atribuídos aos componentes biológicos correspondentes.

O resultado mostra que os picos 646  $\text{cm}^{-1}$  (tirosina), 853  $\text{cm}^{-1}$  (prolina), 932  $\text{cm}^{-1}$  (proteína), 1242  $\text{cm}^{-1}$  (amida II), 1338  $\text{cm}^{-1}$  (triptofano), 1661  $\text{cm}^{-1}$  (amida I), apresentam aumento da intensidade Raman, ao passo de que os picos correspondentes a 428  $\text{cm}^{-1}$  (fosfato de HA), 462  $\text{cm}^{-1}$  (polissacarídeos), 499  $\text{cm}^{-1}$  (glicogênio), 532  $\text{cm}^{-1}$  (L-alanina), 780  $\text{cm}^{-1}$  (uracil), 830  $\text{cm}^{-1}$  (ácidos nucleicos), 1045  $\text{cm}^{-1}$  (fosfato), apresentam decréscimo da intensidade Raman.

Foi observado que as amostras expostas a energia de 35 kV para ambas as doses apresentam mudanças na intensidade dos espectros revelando modificações estruturais nos componentes biológicos do modelo tridimensional de adenocarcinoma mamário.

Ao analisar a sobreposição média dos espectros é evidente que os efeitos são distintos conforme dose de exposição. Quando comparado o grupo irradiado 1x com o grupo irradiado 3x, os componentes com os picos registrados em 428  $\text{cm}^{-1}$  (fosfato de HA), 462  $\text{cm}^{-1}$  (polissacarídeos), 499  $\text{cm}^{-1}$  (glicogênio), 830  $\text{cm}^{-1}$  (ácidos nucleicos) e 1790  $\text{cm}^{-1}$  (amida I), diminuem sua intensidade quando

irradiados 3x enquanto que quando irradiado 1x, observa-se que estas mesmas estruturas aumentam sua intensidade.

Já, os picos correspondentes ao deslocamento Raman em  $853\text{ cm}^{-1}$  (prolina),  $932\text{ cm}^{-1}$  (colágeno),  $1242\text{ cm}^{-1}$  (amida II),  $1338\text{ cm}^{-1}$  (triptofano),  $1453\text{ cm}^{-1}$  (proteínas),  $1661\text{ cm}^{-1}$  (amida I), ao serem irradiados 3x aumentam sua intensidade e diminuem quando irradiadas 1x.

A análise evidencia que a incidência da radiação ionizante de baixa energia e baixa dose é capaz de promover alterações nos grupos correspondentes a aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos.

Considerando as principais variações que ocorreram ao longo do espectro foram observados na literatura, estudos sobre diferentes compostos biológicos e sua relação com carcinoma mamário.

Pesquisas realizadas com auxílio de espectroscopia Raman em tecidos biopsados, apontam o aparecimento do grupo fosfato ( $428\text{ cm}^{-1}$  e  $1045\text{ cm}^{-1}$ ) como um indicativo associado a lesões malignas e benignas, sendo, portanto, dois importantes grupos na diferenciação de microcalcificações (tipo I e tipo II) (HANNA et al, 2022).

Nanopartículas de HA são estudadas como radiosensibilizadores de tumores, aumentando o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) no microambiente tumoral, mas não nas células sadias circunvizinhas *in vivo* (HAN et al, 2014) ou *in vitro* (SOLEIMANI et al 2020, FUKADA et al, 2023). A presença intratumoral de hidroxiapatita é relacionada à capacidade de metastatização (HE et al, 2017), consistente com a origem da linhagem celular, isolada de perfusão pleural de uma paciente de carcinoma ductal invasivo (SOULE et al, 1973).

Além disso, os picos que correspondem aos polissacarídeos e ao glicogênio, respectivamente ( $462\text{ cm}^{-1}$  e  $499\text{ cm}^{-1}$ ), caracterizam a propriedade de radorresistência deste tipo de linhagem celular (MILLIGAN et al 2021). Doses de radiação induziram a produção de glicogênio em células MCF7, as quais apresentaram fosforilação de GSK-3 (glicogênio sintase quinase 3 beta) detectável por espectroscopia Raman (MATTHEWS et al, 2015), proteína associada à sobrevivência celular após exposições à radiações ionizantes (KWON et al, 2008; LIN et al, 2020; REN et al, 2018). Outras glicogênio sintases estão sendo consideradas importantes alvos terapêuticos (DE HEER et al, 2023).



As bandas associadas às proteínas, como a tirosina em ( $646\text{ cm}^{-1}$ ) e a amida I em ( $1790\text{ cm}^{-1}$ ), aumentam a intensidade em ambas as exposições realizadas. Conforme estudos que caracterizaram tecido mamário normal, observou-se que à medida que ocorre malignidade há também um aumento na quantidade de proteínas (HANNA et al, 2022), apesar deste estudo não ser suficiente para inferir a respeito do metabolismo tumoral da MCF7 irradiada, é fato que, sutis alterações ocorreram nas proteínas, enfatizando uma alteração relevante.

Os picos relacionados aos ácidos nucleicos em ( $780\text{ cm}^{-1}$  e  $1084\text{ cm}^{-1}$ ) indicam que ocorreram quebras às moléculas de DNA, devido as alterações na intensidade para ambas as amostras irradiadas. O efeito das radiações ionizantes em células, e também em tecidos tumorais, é majoritariamente a produção, direta ou indiretamente, de quebras complexas no DNA (WILKINSON et al, 2023). No entanto, é necessário o acúmulo de quebras não-reparadas para a mortalidade celular ou para a indução de seu potencial carcinogênico. De Chadwick & Leenhouts (CHADWICK & LEENHOUTS, 1973) a Mothersill & Seymour (MOTHERSILL & SEYMOUR, 2019), esta noção é dominante, mudando apenas as faixas de dose; os últimos autores trouxeram a ideia e a adaptaram às baixas doses.

Nos picos de colágeno (no eixo C-C da banda do colágeno localizada em  $936\text{ cm}^{-1}$  e  $939\text{ cm}^{-1}$ ) a resposta à irradiação varia com a dose, sendo que para a menor dose ocorre diminuição da intensidade dos picos enquanto que para a maior há um acréscimo, o que torna evidente que ambas as doses de radiação produzem efeitos nas fibras colágenas. Um recente estudo que traça o perfil do microambiente tumoral de mama demonstra um importante papel do colágeno associado a metástases, destacando a importância de sua distribuição e organização assim como da quantidade. O que se identifica neste estudo é que o colágeno XII altera o colágeno I favorecendo a metástase a partir de um microambiente pró-invasivo (PAPANICOLAOU et al, 2022).

O processo oxidativo ocasionado pela radiação ionizante tem a propriedade de alterar a estrutura de ligação de biomoléculas alterando o comprimento e ângulo de ligação destas espécies químicas. As doses e energia empregadas neste estudo não foram capazes de alterar a bioquímica celular, mas induziram sensíveis mudanças no comportamento espectral de diversas

biomoléculas nas amostras em análise. A espectroscopia Raman por sua vez mostrou-se sensível nas detecções de alterações promovidas pela radiação.

#### 4.2.1 Análise de componentes principais

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada para análise de dados dos grupos em estudo expostos a diferentes doses em comparação com o grupo controle. A redução da dimensão dos dados permite sua visualização em poucas dimensões representadas pelos eixos PC1 e PC2 (Delfino et al, 2019). Para isso foi utilizado um código desenvolvido utilizando a linguagem Python.

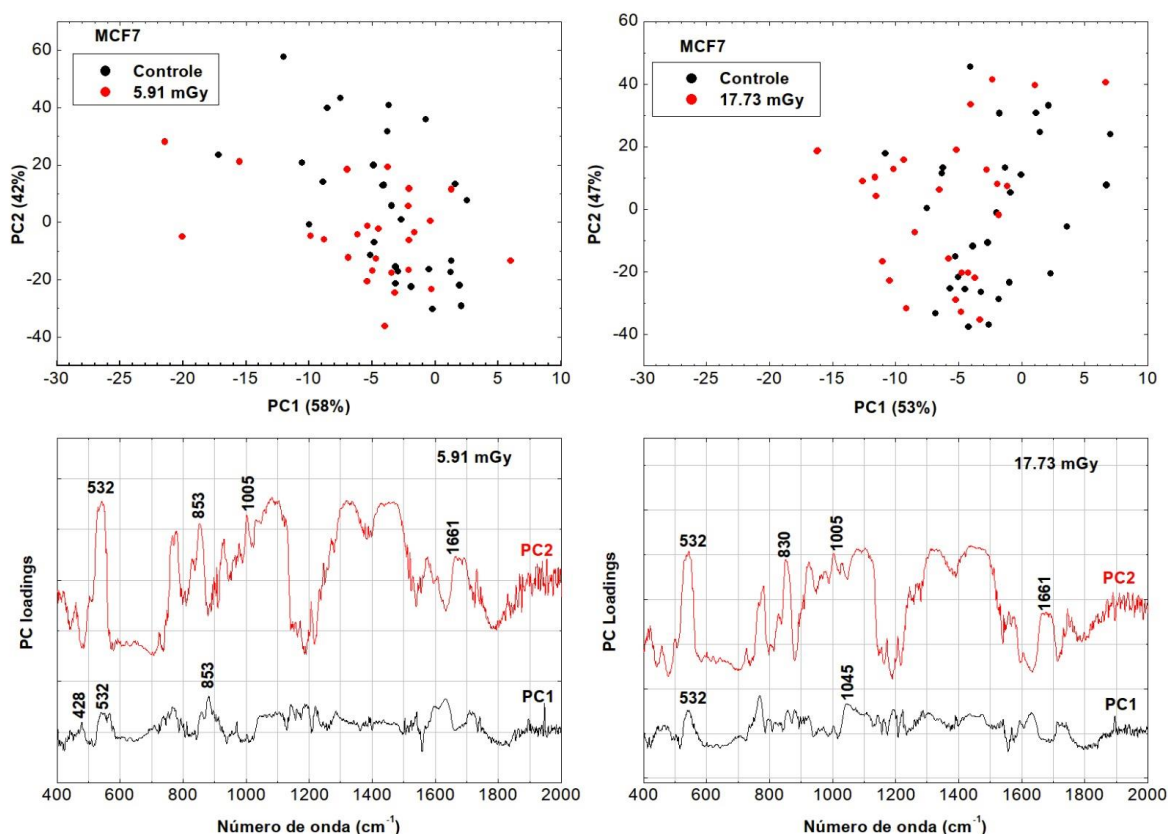
A figura 20 ilustra os escores (PC1 e PC2) obtidos entre o grupo controle e as amostras irradiadas a 5,91 mGy e 17,73 mGy respectivamente. A análise foi realizada na faixa entre  $600\text{ cm}^{-1}$  a  $1775\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a faixa onde ocorre a maior variação nas bandas vibracionais devido ao efeito da radiação. Os resultados obtidos mostram que os escores PC das amostras irradiadas e das amostras controle exibem um certo grau de separação como consequência da irradiação das amostras.

Os resultados ainda mostram que a amostra irradiada com 5,91 mGy estão deslocadas para a região de PC1 positivas em relação ao grupo não irradiado. Por outro lado, as amostras irradiadas com 17,73 mGy estão deslocadas para a região de PC1 negativas em relação ao controle.

A figura 20 também mostra o *PC loading* relativo a cada uma das amostras irradiadas em relação as amostras de controle e evidencia quais os principais compostos que contribuem para a diferenciação dos grupos. Nas figuras estão identificadas algumas bandas vibracionais que contribuem positivamente ou negativamente para PC1 e PC2. Algumas bandas que contribuem positivamente para PC1 podem ser relacionadas a proteínas, incluindo colágeno I ( $884\text{ cm}^{-1}$ ), vibrações de fosfato de hidroxiapatita em ( $1045\text{ cm}^{-1}$ ).

As bandas que contribuem positivamente para PC2 podem ser associadas com grupos fosfodiéster em ácidos nucleicos ( $1084\text{ cm}^{-1}$ ) e a fenilalanina ( $1004/1005\text{ cm}^{-1}$ ), enquanto outras contribuem negativamente.

Figura 20 – Gráfico de dispersão dos dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) dos dados de MCF7 expostas a dose de radiação de 5,91 e 17,73 mGy, 35 Kv e loadings de PC1 e PC2 dos espectros de MCF7.



Fonte: autora

### 4.3 Fluorescência “steady-state”

Para os três grupos de amostras foram feitas excitações em 283 nm.

Para a identificação das principais bandas na faixa espectral de 310 - 545 nm, foi realizada a segunda derivada do espectro médio das amostras não irradiadas e irradiadas.

Os efeitos produzidos pela radiação ionizante nos aglomerados podem ser observados a partir dos espectros médios e pela segunda derivada formados pelos grupos irradiados ( $n=8$ ) e não irradiado ( $n=8$ ) conforme ilustrados nas figuras 21 e 22.

A figura 21 ilustra o espectro médio para a excitação em 283 nm. O espectro é formado por um pico alargado com emissão máxima em aproximadamente 350 nm. A fim de identificar os principais fluoróforos que contribuem para a formação do espectro representado na Figura 21, cujas bandas

podem estar superpostas, foi calculada a segunda derivada dos espectros para a amostra controle e para as amostras irradiadas. Para o cálculo da segunda derivada, inicialmente foi necessário realizar a suavização das curvas experimentais aplicando-se a função “smoothing” utilizando-se o software OriginLab. A figura 22 ilustra os espectros da derivada segunda dos espectros da Figura 21. O espectro da segunda derivada ( $d^2y/dx^2$ ) tem como principal característica as bandas de valor negativo cujos mínimos ocorrem no mesmo comprimento de onda do máximo da banda de ordem zero (espectro experimental da Figura 21). Na figura 22 são possíveis identificar 5 picos de mínimo que ocorrem em 341 nm, 354 nm, 452 nm, 468 nm e 495 nm tanto para a amostra controle quanto para as submetidas a uma exposição (irradiada 1 x) e a três exposições (irradiada 3x). Os resultados ilustrados nas figuras 21 e 22 indicam que para a excitação em 283 nm não houve modificação no perfil de fluorescência das amostras irradiadas com relação a amostra controle, todos os picos de emissão ocorreram em aproximadamente o mesmo comprimento de onda. Com relação a intensidade observa-se uma diminuição para a amostra submetida a uma exposição, enquanto que para a amostra submetida a três exposições, a intensidade fotoluminescente é a mesma que a observada para a amostra não exposta à radiação ionizante.

Figura 21 – Espectro médio dos grupos controle e irradiados. Excitação 283 nm.

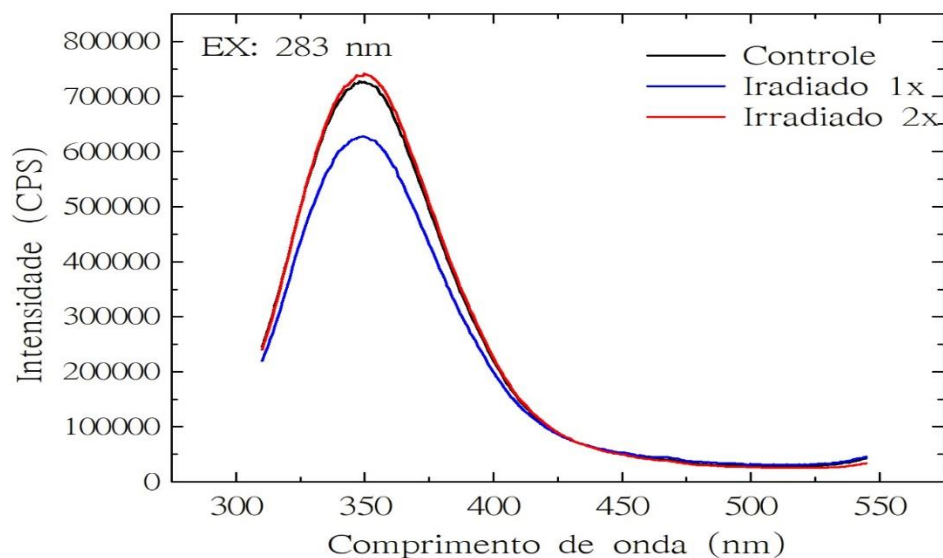
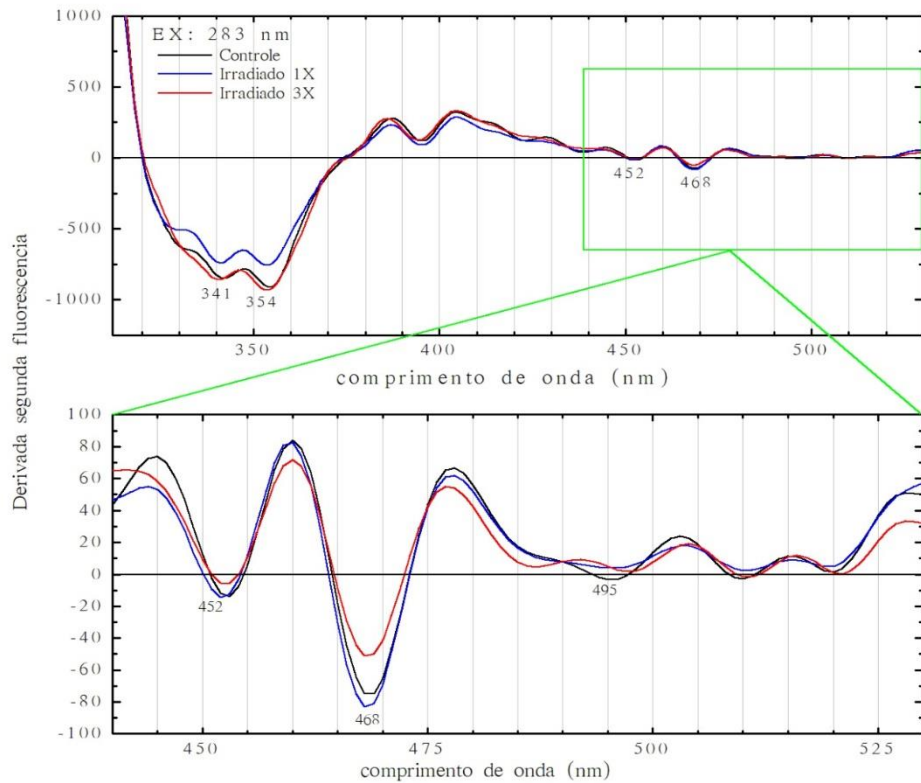


Figura 22 – Derivada segunda do espectro médio dos grupos controle e irradiados. Excitação 283 nm.



Fonte: autora

A partir da análise dos picos de mínimo observados nos espectros da segunda derivada foi possível identificar que os principais picos de emissão ocorrem na região 341-354 nm, podem ser atribuídos ao fluoróforo triptofano. Este aminoácido possui atribuição para a fluorescência na região de 280 a 350 nm (ACHETIB et al, 2023.; RAMANUJAM, 2000.; CROCE et al, 2014.; BREWER et al, 2022). Também foram identificadas pequenas emissões em torno de 452-468 nm, característico para bandas de NADH, com predomínio de emissão em uma faixa correspondente a 420-480 nm (ZHANG et al, 2014). Já as bandas correspondentes a faixa espectral de 495-525 nm correspondem a citoqueratinas (proteínas fibrosas intracelulares) conforme descrito por CROCE et al, 2014.

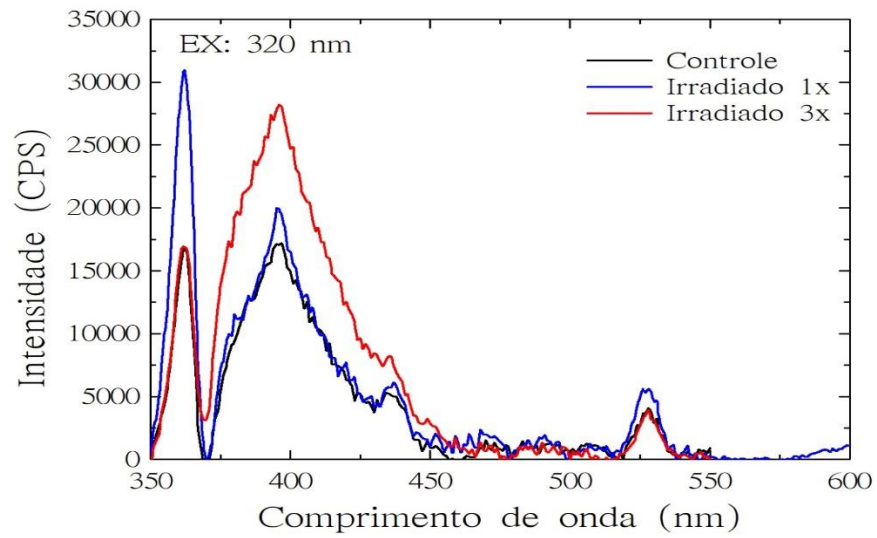
O triptofano é consumido avidamente por tumores (PEREZ-CASTRO et al, 2021). Sua captura a partir do plasma sanguíneo é derivada da ativação da síntese de transportadores, em especial o LAT1(*leucine amino acid transporter 1*), e após sua captura, os tumores podem superexpressar os imunomoduladores

indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO) e a triptofano-2,3-dioxigenase (TDO) (LIU & ZHAI, 2021). Em tumores mamários, níveis aumentados de IDO são relacionados à progressão tumoral e maior nível de expansão metastática (LEVINA et al, 2021). TDO é ligado ao estímulo ao receptor de aril-hidrocarbonetos (AhR) (NOVIKOV et al, 2016), receptor intracelular envolvido nos tumores mamários (KORZENIWESKI et al, 2010; GOODE et al, 2013; LI et al, 2014), com possível estímulo à progressão metastática (CHEN et al, 2014; PARKS et al, 2014). O aumento observado nos agregados irradiados a 17,73 mGy pode indicar o estímulo a estas cadeias, mas não explicaria a depleção observada nos agregados irradiados a 5,91 mGy, conforme ilustram as figuras 21 e 22.

O espectro de fluorescência também foi registrado para excitações em 320 nm com varredura da faixa de emissão entre 350-595 nm para as amostras irradiadas e para a amostra controle, conforme ilustrado na figura 23. O espectro registrado mostra a presença de dois picos localizados em torno de 362 nm e 528 nm e podem ser atribuídas respectivamente a elastina e ao FAD. O espectro na faixa entre 370 nm a 517 nm possui um pico intenso localizado em 396 nm, outro de menor intensidade localizado em 436 nm. O espectro de fluorescência nessa faixa deve-se a contribuição de diferentes fluoróforos. A fim de determinar a localização dos picos de emissão fluorescente e identificar os compostos fluorescentes, foi realizada o alisamento das curvas no intervalo entre 370 nm a 517 nm e posteriormente foi calculada a derivada segunda a partir do espectro médio das amostras não irradiadas e irradiadas.

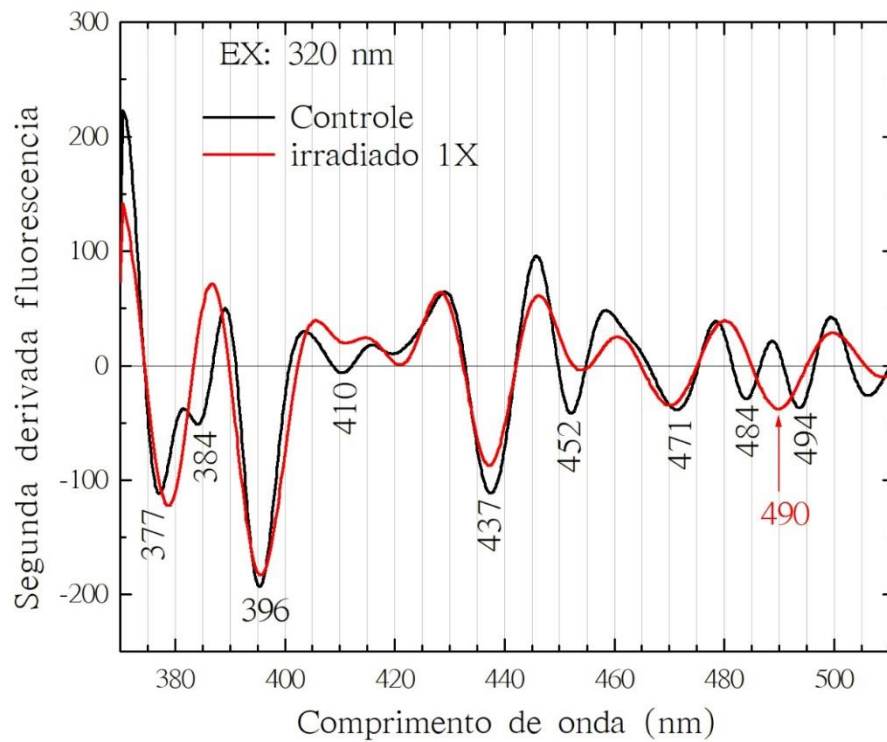
Os efeitos produzidos pela radiação ionizante nos aglomerados de células podem ser observados a partir dos espectros, ilustrados na Figura 23, e pela derivada segunda ilustrada nas figuras 24 e 25. Cada espectro foi obtido a partir de um grupo de oito espectros tanto para as amostras irradiadas (n=8) e para a amostra não irradiada (n= 8).

Figura 23 – Espectro médio dos grupos controle e irradiados. Excitação 320 nm



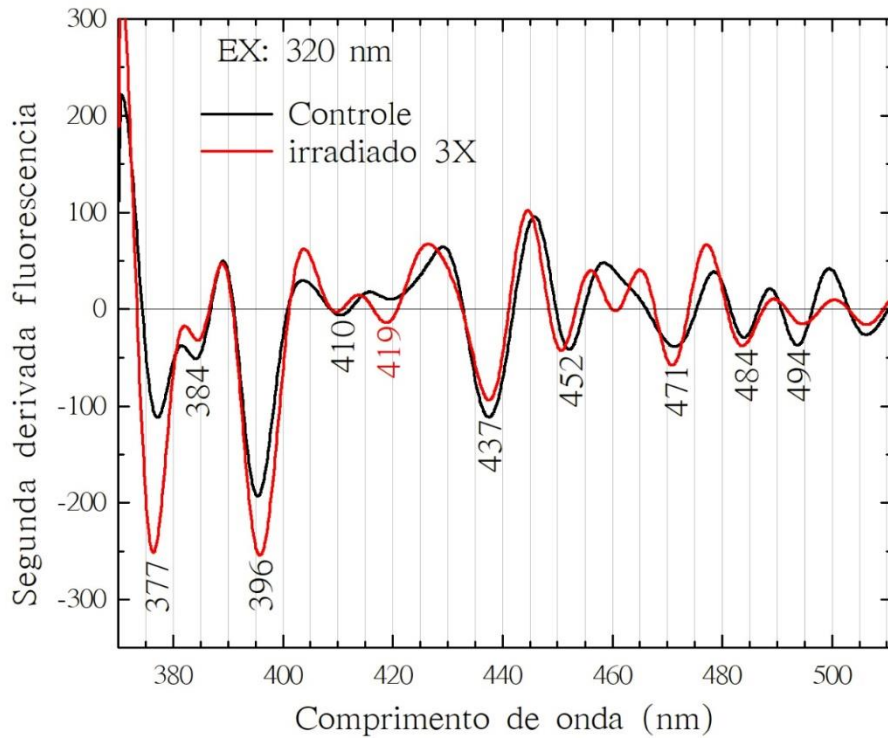
Fonte: autora

Figura 24 - Derivada segunda do espectro médio dos grupos controle e irradiados 1X. Excitação 320 nm.



Fonte: autora

Figura 25 - Derivada segunda do espectro médio dos grupos controle e irradiados 3X. Excitação 320 nm.



Fonte: autora

As principais emissões das amostras, excitadas em 320 nm, observadas na faixa espectral entre 350 nm a 595 nm, tanto para amostras controle quanto para as amostras irradiadas estão dispostas e identificadas na tabela 6. Os resultados mostram que os espectros fluorescentes registrados com excitação de 320 nm mostram a presença de diversos fluoróforos incluindo a elastina, colágeno, NADH, ácidos graxos e FAD.



Tabela 6 – Principais fluoróforos identificados. Excitação 320nm.

Fluoróforos	Faixa de emissão (nm)
Elastina	362 - 396
Colágeno	410
NADH	<b>419</b>
NADH/Colágeno	437 - 452
Ácidos graxos	452-484
Colágeno/NADH	<b>490</b>
Colágeno/NADH	494
FAD	528

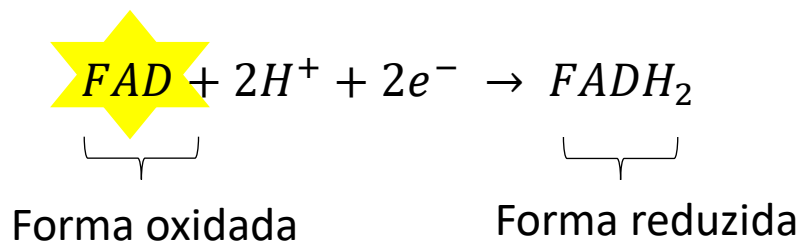
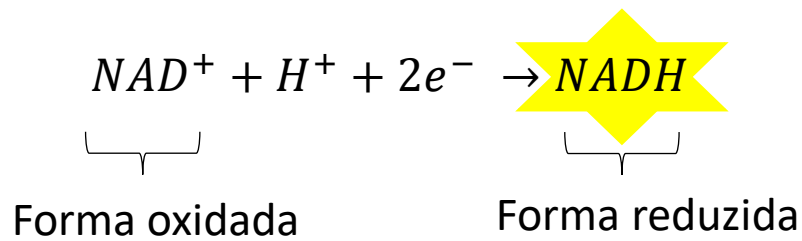
Os resultados da derivada segunda também mostram que o número de picos bem como as suas posições são similares para a amostra controle e para as amostras irradiadas, com algumas discrepâncias. As amostras expostas a três exposições (irradiada 3x) apresentam um pico de emissão localizado no comprimento de onda de 419 nm e que não é observado na amostra controle e na amostra submetida a uma exposição (irradiada 1x). Por outro lado, a emissão observada no comprimento de onda de 490 nm para as amostras submetidas a uma irradiação (irradiado 1x) desaparece nas amostras submetidas a três irradiações sucessivas (irradiado 3x). Os resultados sugerem que o processo de irradiação induziu a formação de novos picos de NADH aumentando a contribuição desse composto no espectro de fluorescência.

Os picos de emissão observados a partir de 400 nm são atribuídos principalmente aos compostos fluorescentes colágeno, NADH e FAD (ACHETIB et al, 2023.; RAMANUJAM, 2000.; CROCE et al, 2014.; BREWER et al, 2022).

A molécula NAD e FADH ao perder ou ganhar elétrons em um processo químico de oxirredução, apresenta alterações estruturais, as quais, interferem diretamente na propriedade fluorescente da coenzima formada (POSPÍŠILOVÁ et al, 2023).

A coenzima NADH (forma reduzida) torna-se fluorescente, enquanto que, a coenzima NAD<sup>+</sup> (forma oxidada) não é fluorescente. Da mesma forma, ocorre com as moléculas de FAD (forma oxidada) e FADH<sub>2</sub> (forma reduzida), sendo a primeira fluorescente e a segunda não, conforme ilustra a figura 26 (POSPÍŠILOVÁ et al, 2023).

Figura 26 – Representação das formas oxidadas e reduzidas das moléculas de NADH e FAD.



Fonte: Autora

A alteração da fluorescência dessas moléculas relaciona-se diretamente com a proliferação celular, uma vez que, fazem parte do mecanismo energético mitocondrial de células normais e cancerígenas. Através do aumento do NAD a glicólise também é elevada proliferando as células tumorais. A disponibilidade do NAD no citoplasma, determina as taxas de NADH (considerado um transportador primordial de elétrons no metabolismo) e o fluxo de piruvato para as mitocôndrias, aumentando assim as taxas de glicólise (SANTOS et al, 2021) (POSPÍŠILOVÁ et al, 2023).

O ATP é sintetizado pelo NAD no citosol através da glicólise por intermédio da fosforilação oxidativa, esta fosforilação origina a molécula NADP, que é capaz de controlar a síntese de lipídios, aminoácidos e nucleotídeos e a defesa contra espécies reativas de oxigênio pela glutathiona (GSH) (SANTOS et al, 2021).

A autofluorescência do NADH, já foi estudada para estudar células de câncer de mama, demonstrando que as emissões de triptofano e NADH são mais elevados em células malignas metastáticas (PRADHAN et al, 1995).

## 5 CONCLUSÕES

As observações deste trabalho corroboraram a noção de que as técnicas espectroscópicas empregadas possuem alta sensibilidade para detectar mudanças sutis no nível molecular de agregados celulares irradiados em baixas doses.

Não foi possível determinar se as doses foram energeticamente suficientes para que seu número sobrepujasse a capacidade de reparo das células, ou que pudessem alterar significativamente o metabolismo celular. Além disso, nenhum fenômeno biológico foi detectado neste trabalho por metodologias que não as espectroscópicas. No entanto, alguns detalhes podem ser ressaltados.

A presença de hidroxiapatita é consistente com a linhagem metastática utilizada, assim como o aumento do sinal do glicogênio e das modificações nos grupos fosfato, indicando ações sobre o DNA, também se encaixam num contexto de exposição do tumor de mama às radiações ionizantes. As alterações da fluorescência do colágeno foram bastante expressivas mas são em certa medida inexplicáveis nesta escala de dose, constituindo assim uma situação aparentemente pouco explorada pelos autores, e que precisa de análises mais aprofundadas.

Outro fenômeno importante foi a depleção da fluorescência do triptofano em agregados irradiados a 5,91 mGy, indicando possível ativação de vias importantes do metabolismo do triptofano pelo tumor, efeito deveras indesejável, e que precisa ser investigado com mais detalhes e em dilatado tempo experimental.

Foram também observadas alterações na fluorescência das coenzimas NADH e FAD que possuem papel importante no metabolismo energético celular. As alterações destas moléculas evidenciam a detecção do processo de oxido redução no modelo estudado pelas técnicas espectroscópicas.

A detecção de emissões de citoqueratinas no material, também contribuem para a fluorescência como método diagnóstico, uma vez que estas proteínas fornecem informações do tipo de tecido de origem da linhagem MCF7.

As técnicas espectroscópicas utilizadas são complementares e se mostraram importantes, contribuindo para o estudo de diagnósticos e tratamentos ópticos em desenvolvimento e para o estudo de radiação ionizante de baixa energia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMCZYK, H.; SURMACKI, J.; BROZEK-PLUSKA, B.; MORAWIEC, Z.; TAZBIR, M. The hallmarks of breast cancer by Raman spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, v.924, p.175-182, 2009.
- ABRAMCZYK, H.; BROZEK-PLUSKA, B.; SURMACKI, J.; JABLONSKA, J.; KORDEK. The label-free Raman imaging of human breast cancer. *Journal of Molecular Liquids*, v.164, p.123-131, 2011.
- ABRAMCZYK, H.; BROZEK-PLUSKA, B.; SURMACKI, J.; JABLONSKA-GAJEWICZ, J.; KORDEK, R. Raman optical biopsy of human breast. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, v.108, p.74-81, 2012.
- ACHETIB N, FALKENA K, SWAYAMBHU M, AALDERS MCG, VAN DAM A. Specific fluorescent signatures for body fluid identification using fluorescence spectroscopy. *Scientific Reports*, 2023.
- ACR BI-RADS® ATLAS FIFTH EDITION QUICK REFERENCE.  
Disponível em: < <https://www.acr.org/-/media/ACR/Files/RADS/BI-RADS/BIRADS-Reference-Card.pdf>>. Acesso em: 10 mai. 2023.
- AKRAM, M.; IQBAL, M.; DANİYAL, M.; KHAN, A. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological Research*, 2017.
- ALBRECHT, C; JOSEPH, R.; LAKOWICZ: *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3.ed. Berlin/Heidelberg, 2008.
- AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION– ATCC. [Site]. Organização sem fins lucrativos que coleta, armazena e distribui microrganismos de referência padrão, linhas celulares e outros materiais para pesquisa e desenvolvimento. Disponível em: < <https://www.atcc.org/products/htb-22#detailed-product-information> >. Acesso em: 23 mar. 2023.
- BACHMANN, L.; ZECELL, D.; RIBEIRO, A.; GOMES, L.; ITO, A. Fluorescence spectroscopy of biological tissues-A review. *Applied Spectroscopy Reviews*, v.41, p.575-590, 2006.
- BANCO DE CÉLULAS DO RIO DE JANEIRO– BCRJ. [Site]. Centro de referência e excelência em cultura de células no Brasil. Disponível em: <<https://bcRJ.org.br/celula/mcf7> >. Acesso em: 23 mar. 2023.
- B&W Tek. [Site]. Disponível em: <<https://bwtek.com/raman-theory-of-raman-scattering>>. Acesso em: 04 mai. 2023.
- BODEWES, F.; VAN ASSELT, A.; DORRIUS, M.; GREUTER, M.; DE BOCK, G. Mammographic breast density and the risk of breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *The Breast*, p.62-68, 2022.
- BOTTIROLI, G.; CROCE, A.; MANTI, L.; LASALVIA, M.; LEPORE, M. Autofluorescence spectroscopy and imaging: a tool for biomedical research and diagnosis *European Journal of Histochemistry*, v.58, 2014.
- BUSHBERG, J.; SEIBERT, J.; LEIDHOLDT, E.; BOONE, J. *The essential Physics of medical Imaging*. 2.ed. 2001.
- BROWN, J.; FELICIANO, M.; CAAN, B. The evolution of body composition in oncology-epidemiology, clinical trials, and the future of patient care: facts and numbers. *Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle*, v. 9, p. 1200-1208, 2018.

BREWER, M.; UTZINGER, U.; LI, Y.; ATKINSON, EM.; SATTERFIELD, W.; AUERSPERG, N.; RICHARDS-KORTUM, R.; FOLLEN, M.; BAST, R. Fluorescence spectroscopy as a biomarker in a cell culture and in a nonhuman primate model for ovarian cancer chemopreventive agents. **Journal of Biomedical Optics**, 2002.

BROZEK-PLUSKAB.; PLACEK, I.; KURCZEWSKI, K.; MORAWIEC, Z.; TAZBIR, M.; ABRAMCZYK, H. Breast cancer diagnostics by Raman spectroscopy. **Journal of Molecular Liquids**, v.141, p.145-148, 2008.

BROZEK-PLUSKA, B.; MUSIAL, J.; KORDEK, R.; BAILO, E.; DIEINGT.; ABRAMCZYKH. Raman spectroscopy and imaging: applications in human breast cancer diagnosis. **Analyst**, v.137, p.3773-3780, 2012.

CACCIAMALI, A.; VILLA, R.; DOTTI, S. 3D Cell Cultures: Evolution of an Ancient Tool for New Applications. **Frontiers Physiology**, 2022.

CAMARILLO, I.; XIAO, F.; MADHIVANAN, S.; SALAMEH, T.; NICHOLS, M.; REECE, M.; LEARY, J.; OTTO, K.; NATARAJAN, A.; RAMESH, A.; SUNDARAJAN, R. Electroporation-Based Therapies for Cancer From Basics to Clinical Applications. **Low and high voltage electrochemotherapy for breast cancer: na in vitro model study**, 2014.

Disponível em: <https://doi.org/10.1533/9781908818294.55>

CAMILLERI, J.; FARRUGIA, L.; CURTO, S.; RODRIGUES, D.; FARINA, L.; DINGLI, G.; BONELLO, J.; FARHAT, I.; SAMMUT, C. Review of Thermal and Physiological Properties of Human Breast Tissue. **Sensors (Basel)**, 2022.

CHADWICK, K.; LEENHOUTS, H. A molecular theory of cell survival. **Physics in Medicine And Biology**, p.78-87,1973.

CHAICHAROENAUDOMRUNG, N.; KUNHORM, P.; NOISA, P. Three-dimensional cell culture systems as an *in vitro* platform for cancer and stem cell modeling. **World Journal of Stem Cells**. p.1065-1083, 2019.

CHARWAT, V.; SCHUTZE, K.; HOLNTHONER, W.; LAVRENTIEVA, A.; GANGNUS, R.; HOFBAUER, P.; HOFFMANN, C.; ANGRES, B.; KASPER, C. Potential and limitations of microscopy and Raman spectroscopy for live - cell analysis of 3D cell cultures. **Journal of Biotechnology**, v.205, p.70-81, 2015.

CHEMICAL PRINCIPLES LECTURES. [Site]. Disponível em: <<https://agora.cs.wcu.edu/~huffman/lectures/chemicalprinciples.html>>. Acesso em: 03 mai. 2023.

CHEN, J. Y., LI, C. F., KUO, C. C., TSAI, K. K., HOU, M. F., & HUNG, W. C. Cancer/stroma interplay via cyclooxygenase-2 and indoleamine 2, 3-dioxygenase promotes breast cancer progression. **Breast Cancer Research**, p.1-14, 2014.

COLÉGIO BRASILEIRO DE RADIOLOGIA E DIAGNÓSTICO POR IMAGEM – CBR. **Sistema de Laudos e Registro de Dados de Imagem da Mama**. 2016. 5.ed. BI-RADS® MAMOGRAFIA. p. 9-20. Disponível em: <<https://cbr.org.br/wp-content/uploads/2017/07/BI-RADS-Apresenta%C3%A7%C3%A3o.pdf>>

COOPER, G. The Cell: A Molecular Approach. 2ª edição. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. **The Development and Causes of Cancer**. Disponível: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>

CROCE, AC.; BOTTIROLI, G. Autofluorescence spectroscopy and imaging: a tool for biomedical research and diagnosis. **European Journal of Histochemistry**, 2014.

DANCE, D.; CHRISTOFIDES, S.; MAIDMENT, A.; MCLEAN, I.; NG, K. **Diagnostic Radiology Physics**. IAEA: International Atomic Energy Agency, 2014.

- DE HEER, EC.; ZOIS, CE.; BRIDGES, E.; VAN DER VEGT, B.; SHELDON, H.; VELDMAN, WA.; ZWAGER, MC.; VAN DER SLUIS, T.; HAIDER, S.; MORITA, T.; BABA, O.; SCHRÖDER, CP.; DE JONG, S.; HARRIS, AL.; JALVING, M. Glycogen synthase 1 targeting reveals a metabolic vulnerability in triple-negative breast cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR**, 2023.
- DUFFY, S.; MORRISH, O.; ALLGOOD, P.; BLACK, R.; GILLAN, M.; WILLISHER, P.; COOKE, J.; DUNCAN, K.; MICHELL, M.; DOBSON, H.; MARONI, R.; LIM, Y.; PURUSHOTHAMAN, H.; SUARIS, T.; ASTLEY, S.; YOUNG, K.; TUCKER, L.; GILBERT, F. Mammographic density and breast cancer risk in breast screening assessment cases and women with a family history of breast cancer. **European Journal of Cancer**. p.48-56, 2018.
- DUIJF, P.; NANAYAKKARA, D.; NONES, K.; SRIHARI, S.; KALIMUTHO, M.; KHANNA, K. Mechanisms of Genomic Instability in Breast Cancer. **Trends in Molecular Medicine**, v.25, p.595-611, 2019.
- EMBER, K.; HOEVE, M.; MCAUGHTRIE, S.; BERGHOLT, M.; DWYER, B.; STEVENS, M.; FAULDS, K.; FORBES, S.; CAMPBELL, C. Raman spectroscopy and regenerative medicine: a review. **NPJ Regenerative Medicine**, 2017.
- ENGELS, S.; KLINTEBERG, C.; SVANBERG, K.; SVANBERG, S. In vivo fluorescence imaging for tissue diagnostics. **Physics in medicine & Biology**, v. 42, p. 815-824, 1997.
- FARIA, C. **Distribuições de limiar de dose e suas causas e consequências em terapia fotodinâmica**. 2017.88f. Tese (Mestrado) –Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- FEIGELSON, H.; BODELON, C.; POWERS, J.; CURTIS, R.; BUIST, D.; VEIGA, L.; BOWLES, E.; GONZALEZ, A.; GIERACH, G. Body Mass Index and Risk of Second Cancer Among Women With Breast Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**. p.1156-1160, 2021.
- FENG, Y.; SPEZIA, M.; HUANG, S.; YUAN, C.; ZENG, Z.; ZHANG, L.; JI, X.; LIU, W.; HUANG, B.; LUO, W.; LIU, B.; LEI, Y.; DU, S.; VUPPALAPATI, A.; LUU, H.; HAYDON, R.; HE, T.; REN, G. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes & Diseases**. p. 77-106, 2018.
- FITZPATRICK, D.; PIRIE, K.; REEVES, G.; GREEN, J.; BERAL, V. Combined and progestagen-only hormonal contraceptives and breast cancer risk: A UK nested case-control study and meta-analysis. **Plos Medicine**, 2023.
- FUKADA, M.; CHHETRI, T.; SURESH, A.; UPENDRAN, A.; AFRASIABI, Z. Size and Morphology-Mediated Antiproliferative Activity of Hydroxyapatite Nanoparticles in Human Breast Cancer Cells. **Journal of Nanotechnology**, 2023.
- FRANK, J.; REDD, D.; GANSLERT.; SANDMCCREERY, R. Characterization of human breast biopsy specimens with near-ir raman-spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v.66, p. 319-326, 1994.
- GOODE, G. D., BALLARD, B. R., MANNING, H. C., FREEMAN, M. L., KANG, Y., & ELTOM, S. E. Knockdown of aberrantly upregulated aryl hydrocarbon receptor reduces tumor growth and metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cell line. **International journal of cancer**, p. 2769-2780, 2013.
- GUO, W.; FENSOM, G.; REEVES, G.; KEY, T. Physical activity and breast cancer risk: results from the UK Biobank prospective cohort. **British Journal of Cancer**. p. 726-732, 2020.
- HALL, E.; GIACCIA, A. **Radiobiology for the Radiologist**. 8.ed. 2019.
- HAMDY, O.; ABDEL-SALAM, Z.; ABDEL-HARITH, M. Optical Characterization of Biological Tissues Based on Fluorescence, Absorption, and Scattering Properties. **Diagnostics (Basel)**, 2022.

HAN, Y.; LI, S.; CAO, X.; YUAN, L.; WANG, Y.; YIN, Y.; QIU, T.; DAI, H.; WANG, X. Different Inhibitory Effect and Mechanism of Hydroxyapatite Nanoparticles on Normal Cells and Cancer Cells In Vitro and In Vivo. **Scientific Reports**, 2014.

HANNA, K.; KRZOSKA, E. SHAABAN, A.; MUIRHEAD, D.; ABU-EID.; SPEIRS, V. Raman Spectroscopy: current applications in breast cancer diagnosis, challenges and future prospects. **Nature, British Journal of Cancer**, p. 1125–1139, 2022.

HARDER, S.; ISABELLE, M.; DEVORKIN, L.; SMAZYNSKI, J.; BECKHAM, W.; BROLO, A.; LUM, J.; JIRASEK, A. Raman spectroscopy identifies radiation response in human non-small cell lung cancer xenografts. **Scientific Reports**, 2016.

HARI, N.; PATEL, P.; ROSS, J.; HICKS, K.; VANHOLSBECK, F. Optical coherence tomography complements confocal microscopy for investigation of multicellular tumour spheroids. **Scientific Reports**. 2019.

HAUPTMANN, M.; DANIELS, R.; CARDIS, E.; CULLINGS, H.; KENDALL, G.; LAURIER, D.; LINET, M.; LITTLE, M.; LUBIN, J.; PRESTON, D.; RICHARDSON, D.; STRAM, D.; THIERRY-CHEF, I.; SCHUBAUER-BERIGAN, M.; GILBERT, E.; BERRINGTON, A. Epidemiological Studies of Low-Dose Ionizing Radiation and Cancer: Summary Bias Assessment and Meta-Analysis. **Journal of the National Cancer Institute. Monographs**. p.188-200, 2020.

HAVAKI, S.; KOTSINAS, A.; CHRONOPOULOS, E.; KLETSAS, D.; GEORGAKILAS, A.; GORGOLIS, V. The role of oxidative DNA damage in radiation induced bystander effect. **Cancer Letters**, v. 356, p. 43-51, jan. 2015.

HE, F.; CHIOU, AE.; LOH, HC.; LYNCH, M.; SEO, BR.; SONG, YH.; LEE, MJ.; HOERTH, R.; BORTEL, EL.; WILLIE, BM.; DUDA, GN.; ESTROFF, LA.; MASIC, A.; WAGERMAIER, W.; FRATZL, P.; FISCHBACH, C. Multiscale characterization of the mineral phase at skeletal sites of breast cancer metastasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. p. 10542-10547, 2017.

HELM, J.; RUDEL, R. Adverse outcome pathways for ionizing radiation and breast cancer involve direct and indirect DNA damage, oxidative stress, inflammation, genomic instability, and interaction with hormonal regulation of the breast. **Archives of Toxicology**. p. 1511-1549, 2020.

HUANG, X.; HUANG, Z.; GAO, W.; GAO, W.; HE, R.; LI, Y.; CRAWFORD, R.; ZHOU, Y.; XIAO, L.; XIAO, Y. Current Advances in 3D Dynamic Cell Culture Systems. **Gels**, 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER– INCA. [Site]. O INCA é o órgão auxiliar do Ministério da Saúde no desenvolvimento e coordenação das ações integradas para a prevenção e o controle do câncer no Brasil. Disponível em: < <https://www.inca.gov.br/>>. Acesso em: 02 mar. 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER– INCA. [Site]. O INCA é o órgão auxiliar do Ministério da Saúde no desenvolvimento e coordenação das ações integradas para a prevenção e o controle do câncer no Brasil. Disponível em: < <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros>>. Acesso em: 02 mar. 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER– INCA. **Diretrizes para a detecção precoce do câncer de mama no Brasil** preparado por Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015. Disponível em: <[https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//diretrizes\\_deteccao\\_precoc\\_e\\_cancer\\_mama\\_brasil.pdf](https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//diretrizes_deteccao_precoc_e_cancer_mama_brasil.pdf)>. Modificado em: 03.11.2022. Acesso em: 04 abr. 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER– INCA. **Dados e números para sobre câncer de mama- Relatório anual 2022**. preparado por Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015. Disponível em: < [https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/dados\\_e\\_numeros\\_site\\_cancer\\_mama\\_setembro2022.pdf](https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/dados_e_numeros_site_cancer_mama_setembro2022.pdf) >. Acesso em: 04 abr. 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA – INMETRO. [Site]. O Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - Inmetro - é uma autarquia federal, vinculada ao Ministério do Desenvolvimento, Indústria, Comércio e Serviços. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/metcientifica/estrutura.asp>>. Acesso em: 29 mar. 2023.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Dosimetry in Diagnostic Radiology: Na International Code of Practice**. Vienna: IAEA, 2007. (Technical Report Series No. 457).

INTERNATIONAL ELECTROTECHNICAL COMMISSION. **Medical Diagnostic X-ray Equipment – Radiation Conditions for use in the Determination of Characteristics**, IEC 61267, Geneva, 2005.

JENSEN, C.; TENG, Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? **Frontiers in Molecular Biosciences**, 2020.

KASHYAP, D.; PAL, D.; SHARMA, R.; KUMAR, V.; GOEL, N.; KOUNDAL, D.; ZAGUIA, A.; KOUNDAL, S.; BELAY, A. Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures. **BioMed Research International**, 2022.

KHAN, F.; GIBBONS, J. **The Physics of Radiation Therapy**. 5.ed. 2014.

KHODAMORADI, E.; GHAHFAROKHI, M.; AMINI, P.; MOTEVASALI, E.; SHABEEB, D.; MUSA, A.; NAJAFI, M.; FARHOOD, B. Targets for protection and mitigation of radiation injury. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2020.

KORTUM, R.; MURACA, E. Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis. **Annual Review of Physical Chemistry**, v.47, p. 555-606, 1996.

KORZENIEWSKI, N.; WHEELER, S.; CHATTERJEE, P.; DUENSING, A.; DUENSING, S. A novel role of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in centrosome amplification - implications for chemoprevention. **Molecular Cancer**, 2010.

KÜNZEL, R. **Espectrometria de raios X em mamografia aplicada à proteção radiológica**. 2006. 97 p. Tese (Doutorado em física) Instituto de Física da Universidade de São Paulo, São Paulo.

KWON, O.; KIM, KA.; HE, L.; KIM, SO.; KIM, MS.; CHA, EY.; YOON, BD.; SOK, DE.; JUNG, M.; AHN, JS.; KIM, BY. Ionizing radiation can induce GSK-3beta phosphorylation and NF-kappaB transcriptional transactivation in ATM-deficient fibroblasts. **Cellular Signalling**, 2007.

LEE, J.; KIM, B.; PARK, B.; WON, Y.; KIM, S.; LEE, S. Real-time cancer diagnosis of breast cancer using fluorescence lifetime endoscopy based on the pH. **Scientific Reports**, 2021.

LEVINA, V.; SU, Y.; GORELIK, E. Immunological and nonimmunological effects of indoleamine 2,3-dioxygenase on breast tumor growth and spontaneous metastasis formation. **Clinical & Developmental Immunology**, 2012.

LIANG, H.; SHI, R.; WANG, H.; ZHOU, Y. Advances in the application of Raman spectroscopy in haematological tumours. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 2023.

LIN, J.; SONG, T.; LI, C.; MAO, W. GSK-3 $\beta$  in DNA repair, apoptosis, and resistance of chemotherapy, radiotherapy of cancer. **Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research**, 2020.

LIU, XH.; ZHAI, XY. Role of tryptophan metabolism in cancers and therapeutic implications. **Biochimie**, p. 131-139, 2021.

LI, ZD.; WANG, K.; YANG, XW.; ZHUANG, ZG.; WANG, JJ.; TONG, XW. Expression of aryl hydrocarbon receptor in relation to p53 status and clinicopathological parameters in breast cancer. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, 2014.



ŁUKASIEWICZ, S.; CZECZELEWSKI, M.; FORMA, A.; BAJ, J.; SITARZ, R.; STANISŁAWEK, A. Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review. **Cancers (Basel)**, 2021.

LYNG, F.; TRAYNOR, D.; NGUYEN, T.; MEADE, D.; RAKIBF, AL-SAADY, R.; GOORMAGHTIGH, E.; AL-SAAD K.; ALI, M. Discrimination of breast cancer from benign tumours using Raman spectroscopy. **Plos One**, v.14, 2019.

MAHDAVI, M.; NASSIRI, M.; KOOSHYAR, M.; VAKILI-AZGHANDI, M.; AVAN, A.; SANDRY, R.; PILLAI, S.; LAM, A.; GOPALAN, V. Hereditary breast cancer; Genetic penetrance and current status with BRCA. **Journal of Cellular Physiology**. p. 5741-5750, 2019.

MANOHARAN, R.; WANG, Y.; FELD, S. Histochemical analysis of biological tissues using Raman spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.52, p.215-249, 1996.

MATTHEWS, Q.; ISABELLE, M.; HARDER, S.J.; SMAZYNSKI, J.; BECKHAM, W.; BROLO, AG.; JIRASEK, A.; LUM, J.J. Radiation-Induced Glycogen Accumulation Detected by Single Cell Raman Spectroscopy Is Associated with Radioresistance that Can Be Reversed by Metformin. **PLoS One**, 2015.

MCBRIDE, W.; SCHAUE, D. Radiation-induced tissue damage and response. **The Journal of Pathology**, v.250, p.647-655, 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Portaria Federal 453. “**Diretrizes básicas de proteção radiológica em radiodiagnóstico médico e odontológico**”. Brasília: Diário Oficial da União. 02 Jun, 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, **Instrução Normativa - IN n° 92**. 27 mai, 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n° 330**. 20 dez, 2019.

MILLIGAN, K.; DENG, X.; SHREEVES, P.; ALI-ADEEB, R. Raman spectroscopy and group and basis-restricted non negative matrix factorisation identifies radiation induced metabolic changes in human cancer cells. **Nature, Scientific reports**, 2021.

MØRCH, L.; SKOVLUND, C.; HANNAFORD, P.; IVERSEN, L.; FIELDING, S.; LIDEGAARD, Ø. Contemporary Hormonal Contraception and the Risk of Breast Cancer. **The New England journal of medicine**. p. 2228-2239, 2017.

MOTHERSILL, C.; SEYMOUR, C. Targets, pools, shoulders, and communication - a reflection on the evolution of low-dose radiobiology. **International Journal Radiation Biology**, p.851-860, 2019.

NATIONAL CANCER INSTITUTE – NCI. [site]. Informações precisas, atualizadas e abrangentes sobre o câncer da principal agência do governo dos EUA para pesquisa sobre o câncer. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/types/breast/mammograms-fact-sheet>>. Acesso em: 10 mar. 2023.

NEJADNIK, M. R.; OLSSON, A. L. J.; SHARMA, P. K.; VAN DER MEI, H. C.; NORDE, W.; BUSSCHER, H. J. Adsorption of pluronic F-127 on surfaces with different hydrophobicities probed by quartz crystal microbalance with dissipation. **Langmuir**, v. 25, n. 11, p. 6245–6249, 2009.

NOVIKOV, O.; WANG, Z.; STANFORD, EA.; PARKS, AJ.; RAMIREZ-CARDENAS, A.; LANDESMAN, E.; LAKLOUK, I.; SARITA-REYES, C.; GUSENLEITNER, D.; LI, A.; MONTI, S.; MANTEIGA, S.; LEE, K.; SHERR, DH. An Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Amplification Loop That Enforces Cell Migration in ER-/PR-/Her2- Human Breast Cancer Cells. **Molecular Pharmacology**, p. 674-688, 2016.

OKUNO, E. Efeitos biológicos das radiações ionizantes. Acidente radiológico de Goiânia. **Estudos avançados**, v.23, 2013.

- PANSARE, K.; SINGH, S.; CHAKRAVARTHY, V.; GUPTA, N.; HOLE, A.; GERA, P.; SARIN, R.; KRISHNA, C. Raman Spectroscopy: An Exploratory Study to Identify Post- Radiation Cell Survival. *Applied Spectroscopy*, v.74, p.553-562, 2020.
- PAPANICOLAOU, M.; PARKER, A. YAM, M.; NADALINI, A.; HASTINGS, D. Temporal profiling of the breast tumour microenvironment reveals collagen XII as a driver of metastasis. *Nature Communications*, p. 1-21, 2022.
- PEREZ-CASTRO, L.; GARCIA, R., VENKATESWARAN, N., BARNES, S.; CONACCI-SORRELL, M. Tryptophan and its metabolites in normal physiology and cancer etiology, *The FEBS Journal*, p.1-21, 2021.
- PARK, S.; HONG, H.; LEE, H. Fabrication of Cell Spheroids for 3D Cell Culture and Biomedical Applications. *BioChip Journal*, v.17, p.24-43, 2022.
- PARKS, A. J., POLLASTRI, M. P., HAHN, M. E., STANFORD, E. A., NOVIKOV, O., FRANKS, D. G., SHERR, D. H. In silico identification of an aryl hydrocarbon receptor antagonist with biological activity in vitro and in vivo. *Molecular pharmacology*, p. 593-608, 2014.
- PENDERS, J.; NAGELKERKE, A.; CUNNANE, E.; PEDERSEN, S.; PENCE, I.; COOMBES, R.; STEVENS, M. Single Particle Automated Raman Trapping Analysis of Breast Cancer Cell-Derived Extracellular Vesicles as Cancer Biomarkers. *AcsNano*, v. 15, p.18192-18205, 2021.
- POHJOISMAKI, J.; GOFFART, S. Adaptive and Pathological Outcomes of Radiation Stress – Induced Redox Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*, v.37, p.336-348, 2022.
- POSPISILOVÁ, M.; KALÁBOVÁ, H.; KUNCOVÁ, G. Distinguishing Healthy and Carcinoma Cell Cultures Using Fluorescence Spectra Decomposition with a Genetic-Algorithm-Based Code. *Biosensors*, 2023.
- PRADHAN, A.; PAL, P.; DUROCHER, G.; VILLENEUVE, L.; BALASSY, A.; BABAI, F.; GABOURY, L.; BLANCHARD, L. Steady state and time-resolved fluorescence properties of metastatic and non-metastatic malignant cells from different species. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 1995.
- RALBOVSKY, N.; LEDNEV, I. Raman spectroscopy and chemometrics: A potential universal method for diagnosing cancer. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v.219, p.463-487, 2019.
- RAMAN, C.; KRISHNAN, K. A new type of a secondary radiation. *Nature*. v.121, p. 501-502, 1928.
- RAMANUJAM, N. Fluorescence spectroscopy of neoplastic and non-neoplastic tissues. *Neoplasia*, v.2, p. 89-117, jan. 2000.
- REISZ, J.; BANSAL, N.; QIAN, J.; ZHAO, W.; FURDUI, C. Effects of Ionizing Radiation on Biological Molecules - Mechanisms of Damage and Emerging Methods of Detection. *Antioxidants & Redox Signaling*, v.21, p.260-292, 2014.
- REN, J.; LIU, T.; HAN, Y.; WANG, Q.; CHEN, Y.; LI, G.; JIANG, L. GSK-3 $\beta$  inhibits autophagy and enhances radiosensitivity in non-small cell lung cancer. *Diagnostic Pathology*, 2018.
- SAINT JOHN'S CANCER INSTITUTE (SJCI) [Site]. Disponível em:  
< <https://www.saintjohnscancer.org/breast/breast-cancer/types-of-breast-cancer/>>. Acesso em: 16 mar. 2023.
- SALETNIK, L.; WESOLOWSKI, R. Fluorescent spectroscopy of collagen as a diagnostic tool in medicine. *Journal of Medical Science*, p. 64-7, 2022.
- SALETNIK, A.; SALETNIK, B.; PUCHALSKI, C. Overview of Popular Techniques of Raman Spectroscopy and Their Potential in the Study of Plant Tissues. *Molecules*, 2021.

- SANTOS, N.; KÜNZEL, R.; FREITAS, M.; LEVENHAAGEN, R.; MARQUES, A.; COURROL, L. Raman and fluorescence Profiles Modifications of Muscular and Adipose Tissues Exposed to Low Energy X-ray Beams. **Applied Spectroscopy**, 2021.
- SCHIE, I.; KRAFFT, C.; POPP, J. Applications of coherent Raman scattering microscopies to clinical and biological studies. **Analyst**, v. 140, p. 3897-3909, 2015.
- SHAPIRO, J. **Radiation Protection. A guide for Scientists, Regulators, and Physicians**. Harvard University Press, 4.ed. 2002.
- SHARMA, A.; SHARMA, S.; ZARROW, A.; SCHWARTZ, R.; LAMBERT, W. Raman Spectroscopy: Incorporating the Chemical Dimension into Dermatological Diagnosis. **Indian Journal of Dermatology**, 2016.
- SKALA, M.; RICHING, K.; FITZPATRICK, A.; EICKHOFF, J.; ELICEIRI, K.; WHITE, J.; RAMANUJAM, N. In vivo multi photon microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence life times, and cellular morphology in precancerous epithelia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.104, p.19494-19499, 2007.
- SMOLARZ, B.; NOWAK, A.; ROMANOWICZ, H. Breast Cancer - Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature). **Cancers**, v.14, 2022.
- SOLEIMANI, M.; ELMI, F.; MOUSAVIE, ANIJAN.; SH, MITRA.; ELMI, M. Evaluating the Radiosensitization Effect of Hydroxyapatite Nanoparticles on Human Breast Adenocarcinoma Cell Line and Fibroblast. **Iranian Journal of Medical Sciences**, p. 368-379, 2020.
- SOULE, H.; VAZGUEZ, J.; LONG, A.; ALBERT, S.; BRENNAN, M. A Human Cell Line From a Pleural Effusion Derived From a Breast Carcinoma, JNCI: **Journal of the National Cancer Institute**, v.51, p. 1409-1416,1973.
- SUNDAHL, N.; DUPREZ, F.; OST, P.; DE NEVE, W.; MAREEL, M. Effects of radiation on the metastatic process. **Molecular Medicine**, 2018.
- PU, Y.; TANG, GC.; WANG, WB.; SAVAGE, HE.; SCHANTZ, SP.; ALFANO, RR. Native fluorescence spectroscopic evaluation of chemotherapeutic effects on malignant cells using nonnegative matrix factorization analysis. **Technology in Cancer Research & Treatment**, 2011.
- TYANOVA, S.; ALBRECHTSEN, R.; KRONQVIST, P.; COX, J.; MANN, M.; GEIGER, T. Proteomic maps of breast cancer subtypes. **Nature Communications**, 2016.
- UPADHYAY, A. Cancer: An unknown territory; rethinking before going ahead. **Genes & Diseases**. p. 655-661, 2020.
- U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION – FDA. [site]. FDA é a agência federal norte americana responsável por proteger a saúde pública, garantindo a segurança, eficácia e proteção de medicamentos e produtos. Disponível em: <<https://www.fda.gov/consumers/womens-health-topics/mammography>>. Acesso em: 10 mar. 2023.
- WILKINSON, B.; HILL, MA.; PARSONS, JL. The Cellular Response to Complex DNA Damage Induced by Ionising Radiation. **International Journal of Molecular Sciences**, 2023.
- WHITE, N. Hormonal Contraception and Breast Cancer Risk. **American Journal of Lifestyle Medicine**. p. 224-226, 2018.
- WOLBARST, A.; CAPASSO, P.; WYANT, A. **Medical Imaging: Essentials for Physicians**. 2013.
- YOSHIMURA, E. Radiation Physics: interaction of radiation with matter. **Associação Brasileira de Física Médica**, p. 51-67, 2009.

ZHANG, L.; PU, Y.; XUE, J.; PRATAVIEIRA, S.; XU, B.; ACHILEFU, S.; ALFANO RR. Tryptophan as the fingerprint for distinguishing aggressiveness among breast cancer cell lines using native fluorescence spectroscopy. ***Journal of Biomedical Optics***, 2014.

ZWICKER, F.; KIRCHNER, C.; HUBER, P.; DEBUS, J.; ZWICKER, H.; KLEPPER, R. Breast cancer occurrence after low dose radiotherapy of non-malignant disorders of the shoulder. ***Scientific Reports***, 2019.

---

---

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**  
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000  
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908  
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil  
<http://www.ipen.br>

**O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.**

---

---