UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA E INFORMÁTICA INDUSTRIAL

THAMARA CRISTINA COZER

# ANÁLISE DE ELEMENTOS TRAÇO PRESENTES EM TECIDOS MAMÁRIOS CANINO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

DISSERTAÇÃO

CURITIBA

2016

THAMARA CRISTINA COZER

# ANÁLISE DE ELEMENTOS TRAÇO PRESENTES EM TECIDOS MAMÁRIOS CANINO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, ênfase em Engenharia Biomédica, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Coelho Conceição.

Coorientador: Prof. Dr. Sergei Anatolyevich Paschuk.

CURITIBA

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ministério da Educação
**Universidade Tecnológica Federal do Paraná**
Campus Curitiba

CPGEI
Programa de Pós Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial

## TERMO DE APROVAÇÃO

ANÁLISE DE ELEMENTOS TRAÇO PRESENTES EM TECIDOS MAMÁRIOS CANINO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

por

THAMARA CRISTINA COZER

Esta Dissertação foi apresentada em 30 de março de 2016 como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial – Ênfase em Engenharia Biomédica. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

_____
André Luiz Coelho Conceição
Prof. Dr. Orientador

_____
Prof. Dr. Martin Eduardo Poletti

_____
Prof. Dr. Hugo Reuters Schelin

_____
Prof. Dr. Marcelo Antoniassi

- O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Programa

A Deus, por me conduzir nesta jornada em busca do conhecimento.

A minha família, que me incentivou a não fraquejar e seguir sempre em frente à procura do meu objetivo.

À Universidade, em especial aos professores do CPGEI, que me orientaram em todo o processo de Pós-Graduação.

## AGRADECIMENTOS

A Deus: por me dar a chance de vir a este mundo.

Aos professores: André Luiz Coelho Conceição, que aceitou orientar meu projeto e me ajudou consideravelmente durante todo o seu desenvolvimento e que teve a iniciativa para que este projeto se tornasse real; Sergei Anatolyevich Paschuk que ajudou na coorientação deste projeto; Anna Silva Setti da Rocha, que teve papel fundamental em toda a pesquisa, me ajudando e orientando em momentos difíceis, além de oferecer grandes oportunidades de pesquisa.

Aos colegas: Priscila Resmer Castilho e Catarina Torres, que me ensinaram a manusear o equipamento no laboratório da Universidade além de ajudarem na metodologia aplicada do mesmo.

Aos amigos: Alana Caroline França Fagundes, que sem dúvida alguma merece mérito exclusivo neste trabalho pois me ajudou em todos os momentos do mesmo, desde a confecção de padrões de calibração à revisão bibliográfica vencendo comigo todos os obstáculos encontrados durante o percurso; Karla Rimanski Maciel e Gustavo Reikidal Oliveira Pimentel, que em todo o decorrer do trabalho realizaram iniciação científica comigo e ajudaram nas pesquisas deste.

Ao químico: Rodrigo Machado Fagundes que nos ajudou a confeccionar os padrões líquidos, desde o processo de pesagem à diluição da solução mãe, para que obtivéssemos o valor desejado da concentração no padrão.

Ao Laboratório Werner & Werner: em especial à Dra. Juliana Werner, ao Dr. Pedro R. Werner e Fabiane Milano, que disponibilizaram as amostras para serem analisadas neste trabalho.

À clínica VetSan: em especial à Dra. Cynthia Cristina Venâncio da Silva, Patologista Clínica e à Dra. Emanoele Bittencourt Gerceski, Clínica Médica e Cirúrgica, que ajudaram a visualizar macroscopicamente a região tumoral a ser analisada e assim dar maior credibilidade ao trabalho e ao Dr. Adolfo Yoshiaki Sasaki, Clínico Médico e Cirúrgico que disponibilizou o espaço da sua clínica para reuniões.

À Universidade Federal do Paraná (UFPR): a qual disponibilizou seu tempo e conhecimento para auxiliar a pesquisa nos momentos finais da mesma.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR): especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial (CPGEI)

por meio dos professores membros desta Instituição que proporcionaram o desenvolvimento e a conclusão de toda a minha Pós-Graduação, por todo o apoio e orientação durante todo o processo.

A Capes: por financiar esta pesquisa e tornar possível a conclusão da mesma.

Aos demais profissionais: os quais tive o imenso prazer de trabalhar e conviver neste período de tempo em que estive no programa, os quais lembrarei com carinho pelos ensinamentos que me passaram durante todo o período do mestrado e que me ajudaram e me deram a oportunidade de aprender, conviver e vivenciar um trabalho de pesquisa incrível.

Aos familiares: não deixando nem um pouco atrás de qualquer agradecimento, quero deixar aqui registrado meu maior agradecimento aos meus pais Júlio César Cozer e Raquel Cabral Cozer, minha irmã querida Stephane Caroline Cozer, meu amado noivo Heitor de Azevedo Nowakowski e demais familiares e amigos que me ajudaram durante esses anos com todo carinho e dedicação em tudo que eu necessitasse, e que compreenderam minha ausência em certas ocasiões durante este processo de crescimento e amadurecimento profissional.

*“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”.*

Marcel Proust

# RESUMO

COZER, Thamara Cristina. Análise de elementos traço presentes em tecidos mamários canino através da técnica de fluorescência de raios X. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2016.

Estudos realizados com cães apontam que dos grupos tumorais analisados, os de mama representam cerca de 25% a 50% dos tipos de tumores. Deste total, metade é considerado maligno. Apesar de representar um valor considerável de malignidade, estudos nesta área são poucos representativos e escassos na literatura. É de conhecimento que os tumores são causados por mudanças químicas e bioquímicas que ocorrem na célula. Atualmente, pesquisas são realizadas para entender o comportamento dessas alterações e por este motivo é de grande valia conhecer os elementos traço presentes nestes tecidos. Para esta finalidade a técnica mais empregada é a de ED-XRF (Fluorescência de Raios X de Dispersão de Energia), uma vez que é uma técnica analítica não destrutiva que permite determinar e quantificar a composição elementar das amostras, porém não identifica elementos com baixos números atômicos (menor que Z=10). Foram analisadas 56 amostras de tecido mamário canino benignas e malignas, fixadas em formalina a 10% tamponada e mantida à temperatura ambiente. Primeiramente para a quantificação dos elementos traço Ca, Fe, Cu e Zn foram determinadas as curvas de calibração de padrões diluídos em água, com concentrações de Ca, Fe, Cu e Zn, variando de 400 mg/kg a 35 mg/kg, de 20 mg/kg a 2 mg/kg, de 10 mg/kg a 1 mg/kg e de 100 mg/kg a 9 mg/kg, respectivamente. As medições foram submetidas à técnica de ED-XRF utilizando um tubo de raios X com ânodo de prata e técnica de exposição de 30 kV e 100 uA e um tempo de exposição de 1000 segundos (incerteza ≤ 3%). O código XRMC (X-Ray Monte Carlo) foi utilizado para validação do método experimental, que tem o objetivo de simular computacionalmente as respostas esperadas para os ensaios experimentais validando assim a eficácia da metodologia. As concentrações dos elementos traço obtidas foram analisadas estatisticamente onde verificou-se uma variação significativa do elemento Zn, estando este presente em maior concentração no tecido mamário maligno do que no benigno. Este resultado pode estar relacionado à presença deste elemento nas matrizes de metaloproteinases, e em neoplasias malignas estão mais concentradas porque há característica de invasão tumoral neste tipo de neoplasia. Em outra comparação estatística pode-se verificar que os elementos traços Fe, Cu e Zn tem concentração equivalente tanto na região central do tumor tanto quanto na periferia, com exceção do Ca, este concentrando-se mais na região tumoral o que pode se dever às calcificações. Estudos nessa área são de grande potencial por permitir um melhor entendimento do processo patológico em tumores mamários caninos.



**Palavras-chave:** Fluorescência de raios X, elementos traço, câncer de mama canina, tecido mamário canino.

# ABSTRACT

COZER, Thamara Cristina. Analysis of trace elements present in canine breast tissue by fluorescence X-ray technique. Dissertation – Graduate Program in Electrical Engineering and Industrial Informatics emphasis in Biomedical Engineering of Technology Federal University – Paraná (UTFPR). Curitiba, 2016.

Studies with dogs show that the breast cancer represent about 25% to 50% of tumor types. Of this total, half is considered malignant. Despite representing a considerable amount of malignancy, studies in this area are few representative and scarce in the literature. It is known that tumors are caused by chemical and biochemical changes that occur in the cell. Currently, surveys are conducted to understand the behavior of these changes and for this reason, it is of great value to know the trace elements present in these tissues. For this purpose, the most common technique is to ED-XRF (X-Ray Fluorescence Energy Dispersion) since it is a non-destructive analytical technique to determine and quantify the elemental composition of the samples, although it doesn't identify elements with low atomic numbers (less than Z= 10). Were analyzed 56 samples of canine breast tissue benign and malignant, fixed in 10% buffered formalin and kept at ambient temperature. First, for the measurement of trace elements Ca, Fe, Cu and Zn were determined standards for calibration curves diluted in water to concentrations of Ca, Fe, Cu and Zn, ranging from 400 mg/kg to 35 mg/kg, from 20 mg/kg to 2 mg/kg, from 10 mg/kg to 1 mg/kg and from 100 mg/kg to 9 mg/kg, respectively. Measurements were subjected to ED-XRF technique using an X-ray tube with silver anode and exposure technique of 30 kV and 100 uA and exposure time of 1000 seconds (uncertainty ≤ 3%). The XRMC code (X-Ray Monte Carlo) was used for validation of experimental method, which is intended to simulate by computer the expected responses for experimental tests, therefore validating the methodology efficiency. The concentrations of trace elements obtained were analyzed statistically where there was a significant variation of Zn element, the latter being present in higher concentration in malignant breast tissue than benign. This result may be related to the presence of this element in the matrix metalloproteinases, and malignant neoplasms are more concentrated because there are characteristic of tumor invasion in this type of neoplasm. In another statistical comparison it can be seen that the trace elements Fe, Cu and Zn is equivalent concentration both in the central region of the tumor as well as in the periphery, with the exception of Ca, this focusing more on the tumor region may be due to calcifications. Studies in this area are of great potential for allowing a better understanding of the disease process in canine mammary tumors.



**Keywords:** X-Ray Fluorescence, trace elements, canine breast cancer, canine breast tissue.

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Disposição Anatômica da cadeia mamária de cadela. ..... 26
Figura 2 - Esquema do padrão de uma glândula mamária canina. ..... 27
Figura 3 - Drenagem linfática e principal irrigação sanguínea das glândulas mamárias de cadelas. Lado A) drenagem linfática das glândulas mamárias e lado B) principal irrigação sanguínea das glândulas mamárias. 1- linfonodos axilares; 2- linfonodo inguinal superficial; 3- ramos esternais da artéria torácica interna; 4- artéria torácica lateral; 5- artéria epigástrica superficial cranial; 6- artéria epigástrica superficial caudal; 7- artéria pudenda externa. ..... 28
Figura 4 - Glândula mamária normal. As células epiteliais apresentam-se bem diferenciadas, com uma relação núcleo/citoplasma normal e com o núcleo em posição basal. ..... 38
Figura 5 - Células neoplásicas de mama em cadela. À esquerda uma célula benigna e à direita uma célula maligna. ..... 38
Figura 6 - Comparativo entre imagens histológicas de tecido mamário de cães com presença de neoplasias malignas. 1) Carcinoma in situ. 2) Carcinoma tubular 3) Carcinoma tubular com considerável pleomorfismo nuclear e celular. 4) Carcinoma tubulopapilífero. 5) Carcinoma cribriforme. 6) Carcinoma micropapilar. 7) Carcinoma sólido. 8) Comedocarcinoma. 9) Carcinoma anaplásico. 10) Carcinoma anaplásico. 11) Carcinoma em tumor mamário misto benigno. 12) Carcinoma complexo. ..... 42
Figura 7 - Comparativo entre imagens histológicas de tecido mamário de cães com presença de neoplasias benignas e hiperplasias. 25) Adenoma intraductal papilar. 26) Adenoma ductal. 27) Fibroadenoma. 28) Mioepitelioma. 29) Adenoma complexo. 30) Tumor misto benigno. 31) Hiperplasia lobular. 32) Hiperplasia lobular com fibrose. 33) Hiperplasia lobular com atipia. 34) Hiperplasia epitelial. 35) Papiloma ductal. 36) Fibroadenoma. ..... 45
Figura 8 - Espectro de raios X de freamento e raios X característicos para kVp de 60, 90 e 120. ..... 50
Figura 9 - Dominância das interações da radiação com a matéria conforme o número atômico do material absorvedor e a energia do fóton incidente em MeV. ..... 52
Figura 10 - Cinemática do Efeito Fotoelétrico ..... 53

Figura 11 - Direção de distribuição do efeito fotoelétrico por unidade do ângulo sólido, para energias classificadas nas curvas. ..... 54
Figura 12 - Configuração esquemática de um equipamento de Fluorescência de Raios X. ..... 58
Figura 13 – Imagens macroscópicas de três amostras analisadas das alterações mais comumente encontradas. Em a) neoplasia maligna, em b) neoplasia benigna e em c) hiperplasia. ..... 62
Figura 14 - Imagem do equipamento de Fluorescência de Raios X do Laboratório de Espectroscopia de Raios X da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. ..... 64
Figura 15 - Imagem do porta amostra sem água destilada. Utilizado como uma das primeiras partes do processo para verificar o branco da análise. ..... 74
Figura 16 - Imagem do porta amostra com água destilada. Utilizado como uma das primeiras partes do processo para verificar o branco da análise. ..... 74
Figura 17 - Espectro do elemento químico Zn obtida com o padrão líquido deste elemento. Pode-se perceber na figura anterior a presença do pico Zn, bem como o seu valor de energia = 8,63 e a área do fotopico = 439,078. ..... 76
Figura 18 - Concentração do elemento Ca em tecido normal periférico e neoplásico (imagem superior) e em tecido diverso e neoplásico (imagem inferior) presente em tecido mamário de cadelas. O ponto azul que aparece no gráfico (outliers) representa valores de concentração que ficaram fora dos limites inferiores e superiores. ..... 84
Figura 19 - Concentração do elemento Fe em tecido normal periférico e neoplásico (imagem superior) e em tecido diverso e neoplásico (imagem inferior) presente em tecido mamário de cadelas. O ponto azul que aparece no gráfico (outliers) representa valores de concentração que ficaram fora dos limites inferiores e superiores. ..... 85
Figura 20 - Concentração do elemento Cu em tecido normal periférico e neoplásico (imagem superior) e em tecido diverso e neoplásico (imagem inferior) presente em tecido mamário de cadelas. O ponto azul que aparece no gráfico (outliers) representa valores de concentração que ficaram fora dos limites inferiores e superiores. ..... 86
Figura 21 - Concentração do elemento Zn em tecido normal periférico e neoplásico (imagem superior) e em tecido diverso e neoplásico (imagem inferior) presente em tecido mamário de cadelas. O ponto azul que aparece no gráfico (outliers) representa valores de concentração que ficaram fora dos limites inferiores e superiores. ..... 87

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Amostras de tecido mamário canino recebidas para análise. Consta em tabela tipo de tecido, o grau da neoplasia quando houver, a raça e a idade dos animais. .....60
Tabela 2 - Desempenho da espectroscopia do equipamento de fluorescência de raios X marca Amptek®. .....65
Tabela 3 - Exemplo do cálculo para encontrar o peso molecular do sal inorgânico CaSO4.2H2O. .....67
Tabela 4 - Valor em gramas dos sais inorgânicos para pesagem na balança analítica para obter a quantidade de mg/kg desejada. .....68
Tabela 5 - Valores de concentração do elemento químico Ca. .....69
Tabela 6 - Teste de Normalidade Shapiro-Wilk para a distribuição dos valores de concentração de Ca, Fe, Cu e Zn, em tecidos neoplásicos (TNeo), tecidos normais periféricos (TNP) e tecidos diversos (TD). Os valores destacados representam valores que não seguem uma distribuição normal. .....88
Tabela 7 - Teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras pareadas, para representação da variância entre as concentrações de Ca, Fe, Cu e Zn nos tecidos analisados (tecido normal periférico e tecido neoplásico). .....89
Tabela 8 - Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparar dois universos de amostras. O primeiro grupo é de tecido diverso (TD) e o segundo grupo de tecido neoplásico (TNeo). .....91
Tabela 9 - Teste de Correlação de Spearman. As relações entre os elementos Ca/Fe, Ca/Cu, Ca/Zn, Fe/Cu, Fe/Zn e Cu/Zn foram analisadas no grupo de tecido normal periférico, tecido diverso e tecido neoplásico. Valor de significância α = 0,05. .....93

# LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação básica das Neoplasias.....36
Quadro 2 - Classificação Histopatológica de tumores de mama em cadelas conforme critérios de OMS-AFIP – MISDORP 2002.....37
Quadro 3 - Principais características que diferem um tecido benigno de um tecido maligno.....37

# LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva de calibração para o elemento Ca. .....77
Gráfico 2 - Curva de calibração para o elemento Fe. .....78
Gráfico 3 - Curva de calibração para o elemento Cu. .....79
Gráfico 4 - Curva de calibração para o elemento Zn. .....80
Gráfico 5 - Comparação Simulado vs Experimental para o elemento Ca. .....81
Gráfico 6 - Comparação Simulado vs Experimental para o elemento Fe. .....81
Gráfico 7 - Comparação Simulado vs Experimental para o elemento Cu. .....82
Gráfico 8 - Comparação Simulado vs Experimental para o elemento Zn. .....82

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ-XRF – μ X-Ray Fluorescence – Microfluorescência de Raios X

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

e.v.a. – Espuma vinílica acetinada

ED-XRF – Energy Dispersive X-Ray Fluorescence – Fluorescência de Raios X por Dispersão em Energia

*In natura* – na mesma natureza

In situ – no local

INCA – Instituto Nacional do Câncer

OH – Ovário Histerictomia

OMS – AFIP – Organização Mundial da Saúde – Instituto de Patologia das Forças Armadas Americanas

Pet – Animal de estimação

ppm – Parte por milhão

ppb – Parte por bilhão

Si(Li) – Semicondutor de silício e lítio

TR-XRF – Total Reflection X-Ray Fluorescence – Fluorescência de Raios X por Reflexão Total

UTFPR – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

WD-XRF – Wavelength Dispersive X-Ray Fluorescence – Fluorescência de Raios X por Dispersão de Comprimento de Onda

# LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu^{-1}$ – Caminho livre médio

$H_2O$ – Água

® – Marca registrada

μ/ρ – Coeficiente de atenuação de massa

μA – microamperagem

μm – Micrometro

Ag – Prata

As – Arsênio

Be – Berílio

Ca – Cálcio

Cd – Cádmio

Cl – Cloro

cm – Centímetro

Co – Cobalto

Cr – Cromo

Cu – Cobre

e – Carga do elétron

E – Energia incidente do elétron

F – Flúor

Fe – Ferro

g – Grama

Ge – Germânio

Hg – Mercúrio

I – Intensidade

I – Iodo

K – Potássio

K,L,M,N,O,P,Q – Camadas eletrônicas

keV – quiloeletrovoltagem

kV – quilovoltagem

kVp – quilovoltagempico

MeV – Megaeletrovolt

Mg – Magnésio

mg/kg – Concentração elementar

Mn – Manganês

Mo – Molibdênio

n – Índice de refração do meio

N – Núcleo

Na – Sódio

Ni – Níquel

Pb – Chumbo

Pt – Platina

Sb – Antimônio

Se – Selênio

Si – Silício

Sn – Estanho

V – Diferença de potencial

Vn – Vanádio

W – Potência

x – Espessura

Z – Número atômico

Zn – Zinco

$\gamma$ – Radiação gama

$\theta$ – Ângulo

$\kappa$ – Probabilidade de ocorrência da Produção de Pares

$\lambda$ – Comprimento de onda

$\pi$ – Radianos (3,14)

$\sigma$ – Probabilidade de ocorrência do efeito Compton

$\tau$ – Probabilidade de ocorrência do efeito Fotoelétrico

# SUMÁRIO


1 INTRODUÇÃO ..... 20
1.1 OBJETIVOS ..... 21
1.1.1 Objetivo Geral ..... 21
1.1.2 Objetivo Específico ..... 21
1.2 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO ..... 22
1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA ..... 23
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA ..... 26
2.1 ANATOMOFISIOLOGIA DA GLÂNDULA MAMÁRIA CANINA ..... 26
2.2 NEOPLASIAS ..... 29
2.3 NEOPLASIA MAMÁRIAS CANINAS ..... 31
2.3.1 Incidência ..... 31
2.3.2 Correlação Entre Tumor de Mama de Cadelas e de Humano ..... 32
2.3.3 Etiologia ..... 33
2.3.4 Características Clínico Patológicas ..... 35
2.3.5 Nomenclatura e Classificação Histológica ..... 35
2.3.6 Tumores Mamários ..... 39
2.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS TUMORES DE MAMA E ELEMENTOS TRAÇO ..... 46
2.5 MECANISMOS DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X ..... 49
2.5.1 Produção de Raios X em um Tubo de Raios X ..... 49
2.6 INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO COM A MATÉRIA ..... 50
2.7 EFEITO FOTOELÉTRICO ..... 52
2.7.1 Cinemática ..... 52
2.7.2 Seção de Choque ..... 54
2.8 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X ..... 55
2.9 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X ..... 55
2.9.1 Técnica de Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia ..... 56
3 MATERIAIS E MÉTODOS ..... 60
3.1 AMOSTRAS ..... 60
3.2 ARRANJO EXPERIMENTAL ..... 63
3.2.1 Equipamento para ED-XRF ..... 63
3.2.2 Calibração do Detector ..... 65
3.3 METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE ELEMENTOS ..... 65
3.3.1 Padrões de Calibração: Método do Padrão Externo ..... 65
3.3.2 Curvas de Calibração ..... 70
3.3.3 Validação do Método: Código X-Ray Monte Carlo (XRMC) ..... 70
3.3.4 Irradiação das Amostras ..... 71
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA ..... 72
3.5 CONTRIBUIÇÕES ESPÚRIAS E LIMITE DE DETECÇÃO ..... 73
3.5.1 Porta Amostras e Porta Amostras + Água ..... 73
3.5.2 Limites de Detecção ..... 75
3.6 CURVAS DE CALIBRAÇÃO ..... 75
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES ..... 77
4.1 CURVAS DE CALIBRAÇÃO ..... 77
4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ..... 80
4.3 VALORES DE CONCENTRAÇÃO ..... 83

4.4 TESTES ESTATÍSTICOS ..... 88
4.4.1 Teste de Normalidade ..... 88
4.4.2 Comparação Entre Grupos de Amostras ..... 89
4.4.3 Comparação Entre Neoplasia Benigna e Maligna ..... 92
4.4.4 Correlação Entre Elementos Traços ..... 93
5 CONCLUSÕES ..... 95
5.1 CONCLUSÕES GERAIS ..... 95
5.1.1 Sobre Padrões de Calibração ..... 95
5.1.2 Sobre a Validação Experimental ..... 95
5.1.3 Sobre as Amostras de Tecido Mamário Canino ..... 96
5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS ..... 96
REFERÊNCIAS ..... 98
ANEXO A – Parecer Consubstanciado Da CEUA ..... 108
ANEXO B – Exemplo De Laudo Histopatológico ..... 110
APÊNDICE A – Imagem Macroscópica De Grupo De Amostras Neoplásicas E Grupo De Amostras Diversos ..... 111
APÊNDICE B – Códigos X-Ray Monte Carlo Utilizados Neste Trabalho ..... 113
APÊNDICE C – Tabelas Que Representam Um Resumo Dos Resultados Para Cada Elemento Traço Estudado ..... 117

# 1 INTRODUÇÃO

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a população de cães em todo o território brasileiro é de aproximadamente 52,2 milhões. No estado do Paraná, 60,1% das residências possuem pelo menos um cão como animal de estimação (IBGE, 2015). Atrelado a isso, um aumento de 8% no Brasil em 2014 referente ao mercado voltado aos *"Pets"* foi observado. Neste ramo o Brasil é considerado o segundo maior mercado do mundo, perdendo apenas para os Estados Unidos da América (30%) (Pet Brasil, 2015).

Nas últimas décadas houve um aumento na expectativa de vida destes animais, devido a maiores cuidados com vacinação correta, dieta equilibrada e consultas médicas veterinárias periódicas, entretanto o aparecimento de doenças relacionadas à idade, como neoplasias, também foi verificado (PAOLONI e KHANNA, 2008). Das doenças que acometem a raça canina, o mais representativo é o câncer de mama, sendo este mais comum em cadelas. Este tipo de neoplasia representa um total de 25% a 50% dos tipos de tumores presente em cães. Deste total, metade é considerado maligno (DALECK, FRANCESCHINI, *et al.*, 1998). Ainda, por haver uma boa similaridade entre os tecidos de mama humano e canino, este último pode ser utilizado como um bom modelo comparativo, pois segundo Grego e Rosa (2012) eles apresentam os mesmos agentes etiológicos, ou seja, as mesmas causas de desenvolvimento de neoplasias humanas. Ademais, pesquisas com tumores espontâneos em cães, por questões éticas, podem servir de modelo para o ser humano em substituição a animais como ratos e camundongos, visto que estes últimos necessitam da indução de tumores (GUPTA, SOOD, *et al.*, 2012).

Estudos recentes em tumores de seres humanos, mais especificamente em mudanças químicas e bioquímicas que ocorrem nas células deste tecido, vem sendo feitos para entender o motivo dessas alterações. Para entender o que ocorre com o tecido, é de grande valia então verificar os elementos químicos presentes no mesmo e analisar se há alguma alteração (ROBBINS e CONTRAN, 2010). O estudo dos elementos traço está correlacionado na busca por possíveis causas do câncer e sua contribuição no diagnóstico, tratamento e prognóstico da doença (CARVALHO, MAGALHÃES, *et al.*, 2007). Neste sentido a técnica de Fluorescência de Raios X (X-

Ray Fluorescence) apresenta-se como possibilidade para obter informações de elementos químicos presentes nas amostras, sendo a Fluorescência de Raios X Dispersiva em Energia (EDXRF – Energy Dispersive X-Ray Fluorescence) a técnica utilizada neste trabalho (SIMABUCO, 1993).

A ED-XRF é uma técnica para análise multielementar que se baseia na excitação dos átomos presentes em uma amostra após a exposição a um feixe de raios X com certa energia, e com isto detecta-se a radiação característica emitida, sendo esta proporcional à concentração dos elementos que constituem a amostra. Uma grande vantagem desta é ser uma técnica analítica não destrutiva, mantendo as propriedades químicas e estruturais da mesma, visto que não há a necessidade de destruição do material para análise (GERAKI, FARQUHARSON e BRADLEY, 2002).

Apesar do alto índice de malignidade, da similaridade com os tecidos mamários humanos e as questões éticas, estudos sobre os fatores que influenciam este tipo de tumor e suas características ainda são escassos na literatura (OLIVEIRA, OLIVEIRA, *et al.*, 2003). Portanto, neste trabalho será aplicada a técnica de ED-XRF para identificação e quantificação dos elementos traço presentes em tecidos mamários normais e neoplásicos caninos.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem por objetivo identificar e determinar a concentração dos elementos traço Ca, Fe, Cu e Zn, presentes em tecido mamário canino, visto uma prevalência nas pesquisas destes elementos, com provável potencial carcinogênico em tecidos de mama humana.

### 1.1.2 Objetivo Específico

Este trabalho apresenta como objetivos específicos:

- Coleta e classificação das amostras de tecido mamário canino em grupos de tecido normal periférico, tecido neoplásico benigno e maligno e tecido diverso;
- Confecção de padrões de calibração para os elementos traço Ca, Fe, Cu e Zn;
- Irradiação dos padrões líquidos e construção das curvas de calibração para cada elemento traço estudado;
- Validação experimental através de simulação computacional com método Monte Carlo;
- Aplicação da técnica ED-XRF nas amostras de tecido mamário canino;
- Determinação das concentrações de elementos traço nas amostras de tecido mamário canino;
- Estudo estatístico dos resultados encontrados;

## 1.2 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação foi organizada da seguinte maneira:

No capítulo 2 é apresentada a fundamentação teórica utilizada como base para a metodologia científica aplicada. Nesta seção serão abordados: os aspectos clínicos envolvidos no estudo, como a anatomofisiologia da glândula mamária canina, a neoplasia em geral, as neoplasias mamárias caninas, como as incidências, correlação entre cadelas e humanos em relação ao tumor de mama, sua etiologia, as características clínico patológicas, a nomenclatura dos tumores de mama de cadelas, diferenças entre neoplasias malignas e benignas, bem como outras alterações.

Também no capítulo 2 será abordado brevemente sobre a composição química dos tumores de mama, relacionando a presença dos elementos traço nestes tecidos, e começará a ser explicado sobre a fluorescência de raios X, envolvendo a produção de raios X, a interação da radiação com a matéria juntamente com os efeitos desta interação e suas probabilidades de ocorrência. Logo após esta explicação será

iniciado os procedimentos utilizados para caracterização elementar através de técnicas espectroscópicas utilizadas para análise de amostras e métodos para posterior análise quantitativa destes elementos.

No capítulo 3 será abordado a metodologia e os materiais utilizados nesta pesquisa, como as técnicas espectroscópicas de fluorescência de raios X, o arranjo experimental, a metodologia para quantificação dos elementos, como os padrões de calibração, as curvas de calibração e a validação da metodologia pelo código X-Ray Monte Carlo.

O capítulo 4 foi reservado para discorrer sobre os resultados obtidos nas análises realizadas juntamente com a discussão dos mesmos.

O capítulo 5 refere-se às conclusões obtidas após a aplicação de toda a metodologia e a obtenção dos resultados, além de orientação para trabalhos futuros.

Finaliza-se o trabalho com o referencial bibliográfico utilizado e possíveis apêndices e anexos.

## 1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Visando entender o que ocorre em tecido mamário devido a existência de neoplasia, estudos recentes em tumores de seres humanos têm associado mudanças químicas e bioquímicas que acontecem nas células deste tecido com a presença desta patologia. Neste sentido, é de grande valia, determinar e quantificar os elementos traço presentes nestes tecidos (ROBBINS e CONTRAN, 2010).

Rizk e Sky-Peck (1984) estudaram 25 amostras de tecido mamário humano em EDXRF e encontraram diferença significativa ($p < 0,001$) entre tecido mamário neoplásico e tecido normal, sendo aquele com maior concentração de elementos traço. Os elementos estudados neste estudo foram Ca, V, Cu, Zn, Se e Rb.

Ng, Bradley e Looi (1997) utilizaram a técnica de Análise por Ativação de Neutrôns para estudar os elementos Al, Br, Ca, Cl, Co, Cs, Fe, K, Mn, Na, Rb e Zn em um total de 46 amostras de tecidos mamários humanos. Houve diferença significativa para estes elementos em maior concentração nos tecidos neoplásicos ($p < 0,001$), com exceção do Co ($p < 0,003$). Foi observado também que o aumento de

concentração destes elementos pode estar relacionado com o processo de calcificação do tumor.

Geraki, Farquharson e Bradley (2002) analisaram através de técnica de fluorescência de raios X com radiação síncrotron a quantidade de Fe, Cu e Zn em amostras de tecido mamário. Verificou que em tecidos neoplásicos essa concentração desses elementos apresentava-se elevada se comparada com células de tecido de mama normais.

Poletti e colaboradores (2004) fizeram um estudo preliminar com 9 amostras de tecido mamário humano normal e neoplásico utilizando a técnica de EDXRF utilizando radiação síncroton para analisar concentrações de Ca, Cu, Fe, K, Mn e Zn. Confeccionaram padrões de calibração de solução aquosa destes elementos para a quantificação elementar e observaram uma maior concentração destes elementos traço em tecido neoplásico.

Siddiqui *et al.* (2006) estudaram 75 amostras de tecido mamário humano com a técnica de Espectroscopia por Absorção Atômica. Os elementos analisados foram Pb, Ca, Fe, Cu e Zn. Como resultado verificaram um aumento significativo das concentrações destes elementos presentes em tecidos neoplásicos, porém o Cu não teve uma diferença significativa.

Silva (2007) em sua dissertação, analisou 101 amostras de tecidos mamários humanos normais e neoplásicos através da técnica de EDXRF com feixes polienergéticos e feixes monoenergéticos. Nas medidas com feixe polienergético obteve diferença significativa entre a concentração de Cu e Zn, e nas medidas com feixe monoenergético foi observada diferença significativa na concentração de todos os elementos estudados (Ca, Fe, Cu e Zn).

Silva e colaboradores (2013) estudaram o papel dos elementos traço em tecidos mamários humanos combinando técnicas de fluorescência de raios X com a imunohistoquímica. Como resultado verificaram que os elementos Fe e Cu estão relacionados com o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), e que as distribuições de Ca e Zn estão correlacionadas com a expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs) e inibidores (TIMPs).

Porém, os tecidos mamários humanos apresentam grande similaridade anatômica e fisiológica com os dos caninos (PAOLONI e KHANNA, 2008). No entanto, estudos sobre os fatores que influenciam este tipo de tumor e suas características em

caninos ainda são escassos na literatura, sendo apenas o trabalho desenvolvido por Sakamoto (2011) de conhecimento até o momento.

Sakamoto (2011), estudou o papel dos elementos traço presente em tecido neoplásico mamário canino e relacionou os resultados encontrados com histopatologia e prognóstico de vida. No total, 51 amostras foram analisadas através da técnica ED-XRF. Foram observadas diferenças significativas dos elementos Ca, Fe e Zn quando comparados ao tecido mamário neoplásico canino de um grupo controle.

# 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

## 2.1 ANATOMOFISIOLOGIA DA GLÂNDULA MAMÁRIA CANINA

A glândula mamária é uma glândula sudorípara modificada que secreta leite para nutrir seus descendentes. Tem sua origem no espessamento linear e bilateral do ectoderma ventrolateral o qual ocorre na parede abdominal e forma as linhas lácteas. Nestas linhas que se formarão o botão mamário e dará origem a porção funcional da glândula mamária (SOARES, 2003).

A cadela apresenta cinco pares de glândulas mamárias, que são distribuídas em duas cadeias, localizadas nas linhas paramedianas ventrais direita e esquerda, e estende-se da região peitoral até a inguinal. Mamas supranumerárias, ou três a quatro pares de mama também aparecem em cadelas (GETTY, 1986).

Estes cinco pares de mamas são denominados torácicas craniais (1), torácicas caudais (2), abdominais craniais (3), abdominais caudais (4) e inguinais (5) (QUEIROGA e LOPES, 2002a), e sua disposição anatômica pode ser visualizada na Figura 1 a seguir:

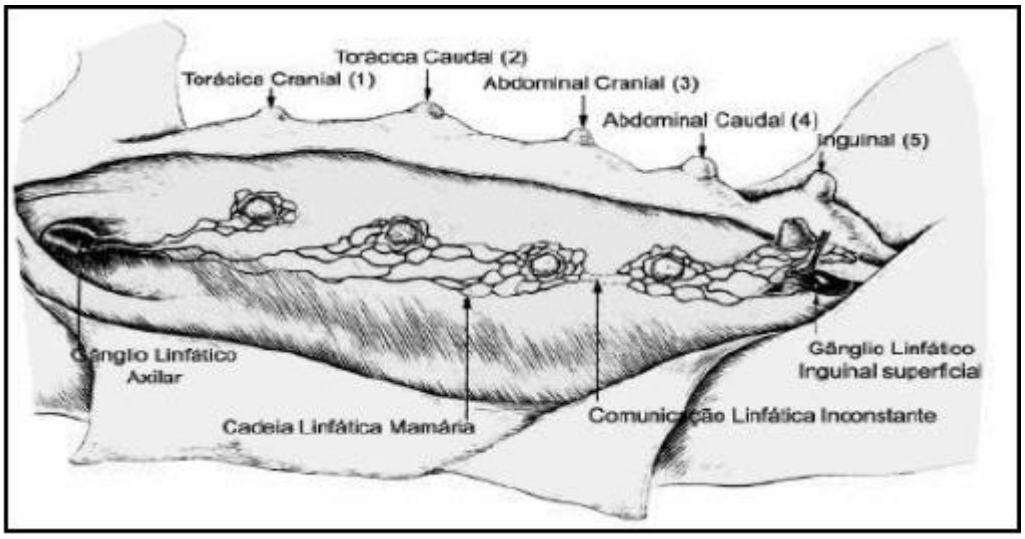



**Figura 1 - Disposição Anatômica da cadeia mamária de cadela.**
**Fonte: Queiroga e Lopes (2002a).**

As glândulas mamárias são formadas por lóbulos, ductos, alvéolos e tecido conjuntivo. Os lóbulos são separados por septos conjuntivos e os ductos são revestidos por epitélio duplo, podendo a célula ser cilíndrica ou cúbica. Os alvéolos são revestidos também por epitélio luminal (sintetizam e secretam proteínas do leite e lipídeo) e basal (pela ação da ocitocina, contraem e expelem leite). A sustentação do tecido mamário é feita por tecido fibroso (fibroblasto) e tecido adiposo (ZUCCARI, SANTANA e ROCHA, 2001). Na Figura 2 a seguir está representado um esquema da estrutura glandular mamária em cães:

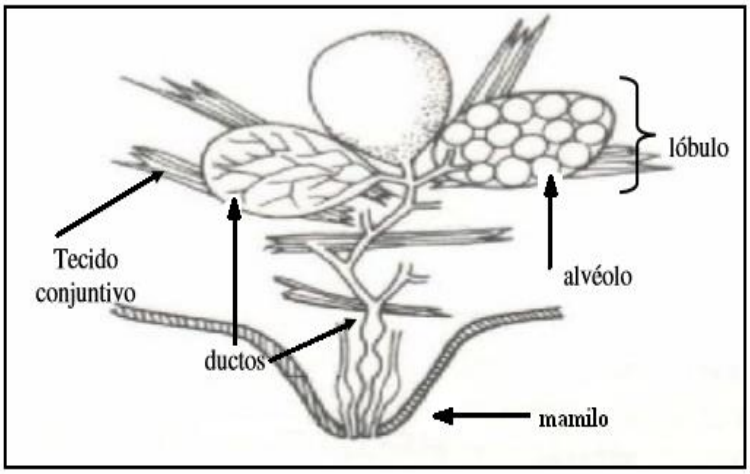



**Figura 2 - Esquema do padrão de uma glândula mamária canina.**
**Fonte: Delouis e Richard (1991).**

A irrigação sanguínea das duas cadeias mamárias acontece através de diversas artérias, como: torácica interna, intercostal, torácica lateral, epigástrica superficial cranial, epigástrica superficial caudal, epigástrica profunda cranial, abdominal segmentada, labial e ilíaca circunflexa profunda (DYCE, SACK e WENSING, 1997). A drenagem linfática das mamas é realizada pelos linfonodos: cervicais superficiais, esternais, axilares e inguinais superficiais. Os linfonodos cervicais superficiais são responsáveis pela drenagem das três primeiras glândulas mamárias; os linfonodos axilares drenam a musculatura, os ossos locais e também as três primeiras glândulas; os linfonodos inguinais drenam a pele e o tecido subcutâneo da mama, além de outros tecidos (GETTY, 1986).

Segundo Pereira (2005), a irrigação linfática da mama nos cães ocorre heterogeneamente, pois em estudo com cadelas sadias verificou que o número de

linfonodos envolvidos na drenagem pode variar de 1 a 7 linfonodos, e o comportamento de cada linfonodo varia também conforme o animal.

A Figura 3 a seguir exemplifica as principais irrigações sanguíneas na mama canina e a drenagem linfática que ocorre na mesma.

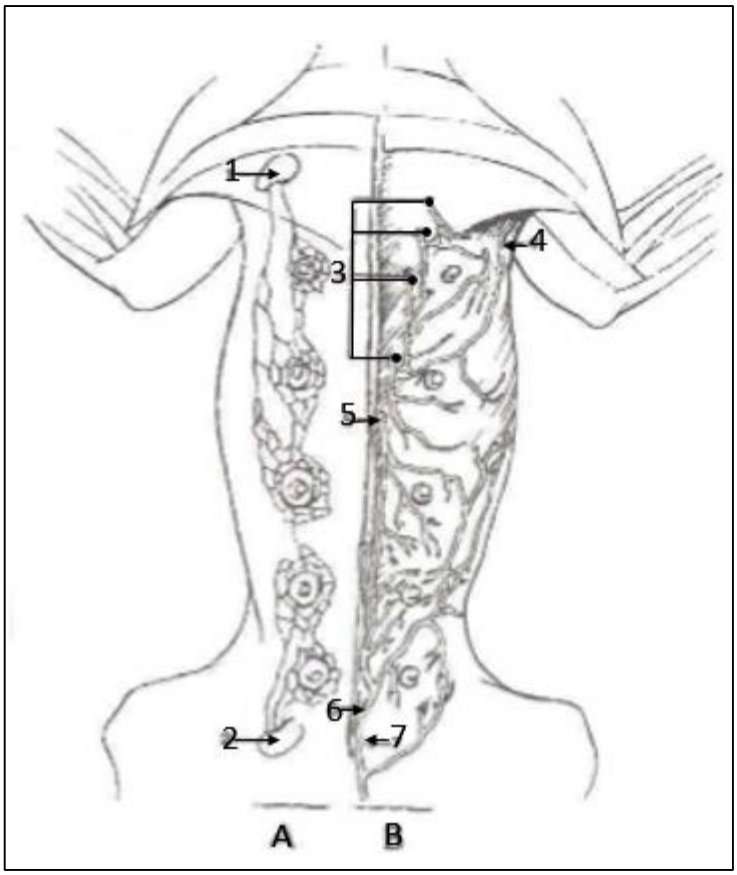



**Figura 3 - Drenagem linfática e principal irrigação sanguínea das glândulas mamárias de cadelas. Lado A) drenagem linfática das glândulas mamárias e lado B) principal irrigação sanguínea das glândulas mamárias. 1- linfonodos axilares; 2- linfonodo inguinal superficial; 3- ramos esternais da artéria torácica interna; 4- artéria torácica lateral; 5- artéria epigástrica superficial cranial; 6- artéria epigástrica superficial caudal; 7- artéria pudenda externa.**
**Fonte: Slatter (1998).**

A glândula mamária nos cães cresce na mesma velocidade que o crescimento do animal, o que ocorre até a puberdade. No início a glândula apresenta grande quantidade de tecido adiposo e poucos ductos epiteliais. Quando o animal atinge a puberdade, o hormônio estrogênio começa a atuar e os canais mamários são produzidos (ZANGANI, DARCY, *et al.*, 1999). Nesta fase o hormônio progesterona também atua e promove o desenvolvimento das glândulas, aumentando o número das

células epiteliais na porção terminal dos ductos intralobulares. Depois desta fase a progesterona atua na formação dos alvéolos secretores (DELOUIS e RICHARD, 1991).

O ciclo estral do animal ocorre de 60 a 100 dias, e durante todo esse tempo o hormônio mais atuante nas cadelas é a progesterona, caracterizando-o como um dos hormônios mais importantes nas glândulas mamárias caninas (DELOUIS e RICHARD, 1991).

Na gestação canina há um considerável aumento de produção de tecido lobular que substitui o tecido adiposo da mama. Em estudo de Delouis e Richard (1991), demonstrou-se que cadelas no fim da gestação apresentavam 90% de tecido lobular, enquanto as mesmas no início da gestação tinham cerca de apenas 10% do mesmo tecido.

## 2.2 NEOPLASIAS

O termo neoplasia vem do grego antigo (νεοπλάσμα), o qual significa formação, criação (COOPER, 1992). Neoplasia pode ser conceituada como a proliferação desordenada de células, as quais tendem para um crescimento único e progressivo, e com perda de diferenciação da célula original (CORRÊA, 2000).

Segundo Willis (1952), "um neoplasma é uma massa anormal de tecido, cujo crescimento excede e é descoordenado com o do tecido normal e persiste no mesmo modo excessivo depois da cessação do estímulo que provocou a alteração". Este estímulo, citado por Willis, também pode ser considerado como agente causador da neoplasia, e devido à complexidade das alterações que ocorrem em uma neoplasia não se consegue isolar o agente agressor.

Sabe-se que as alterações no crescimento celular estão relacionadas ao DNA (ácido desoxirribonucleico – *deoxyribonucleic acid*) e as mudanças causadas no mesmo. Essas alterações podem ser causadas diretamente ao DNA, onde o agente agressor sobrepuja os mecanismos de reparação do DNA que estão existentes na célula e a mesma não consegue se reorganizar, havendo então mutação genética e tornando-se então neoplásica (ROBBINS e CONTRAN, 2010). Vale lembrar que são

necessárias inúmeras mutações para que uma célula se torne neoplásica, pois segundo Guidugli-Neto (1997) cerca de 1.000.000 (um milhão) de mutações ocorrem em um ciclo celular normal, por causa de imperfeições no mecanismo de reparo do DNA, e este quadro não configura uma célula neoplásica (GUIDUGLI-NETO, 1997).

Os oncogenes, genes ativos da mutação genética, desregulam o controle mitótico celular, sendo este responsável pela divisão celular. Assim as células se dividem de maneira desordenada. Se esta consegue preservar a função e a origem do tecido tem-se uma neoplasia classificada como benigna. Já se outras células começam a se reproduzir de maneira descontrolada, com alteração de sua fisiologia inicial e, as vezes com invasão de tecido periférico, tem-se uma neoplasia classificada como maligna (INCA, 2015).

Se há um crescimento rápido, infiltrativo e com destruição de tecido normais periféricos, além da migração das células que constituem o tecido com colonização em outra região do corpo – este fenômeno conhecido como metástase – da recidiva tumoral após a retirada do mesmo por cirurgia e de um decaimento contínuo das condições gerais do indivíduo, caracterizado como caquexia tumoral (síndrome complexa e multifatorial, que se caracteriza pela perda de proteína muscular precoce, perda de peso, com predominante perda de massa corpórea e tecido adiposo), considera-se essa alteração como um tumor maligno (BOGLIOLO, 1972). Se há um crescimento lento e expansivo, sem proliferação de metástases, não havendo recidiva após retirada do tumor cirurgicamente e nem síndrome de caquexia tumoral, considera-se esta alteração como um tumor benigno (BOGLIOLO, 1972).

Para uma análise microscópica entre os tumores, a maior diferença entre as duas classes está no estroma e no parênquima da célula. O estroma está relacionado a nutrição celular e ao seu suporte, que contém os vasos, nervos e ductos excretores. O estroma de tumores malignos se apresenta mais desestruturado e destruído, o que promove e facilita o transporte de produto neoplásico para outras células através da corrente sanguínea, e o estroma em tumores benignos apresenta-se de maneira encapsulada, não havendo este transporte (BECKER, 1997).

O parênquima em tumores malignos apresenta-se indiferenciado e perde sua função de origem. Já em tumores benignos o parênquima mantém sua estrutura histológica original, preservando sua diferenciação (BECKER, 1997).

Outra característica observada é a morfologia celular neoplásica. Segundo Bogliolo e Filho (2011), a célula neoplásica é geralmente mais volumosa do que a

célula normal que a deu origem, por aquela apresentar uma maior concentração de água em seu interior do que esta. Se houver um aumento no volume nuclear, para manter a constância entre o volume citoplasmático e o volume nuclear, o volume celular aumentará. Em consequência disso, células neoplásicas malignas podem ter um volume maior se comparado com uma célula normal. Vale ressaltar aqui que esta variação não é constante e não pode ser considerada como regra geral, porém é observado que um aumento de água está presente em tecidos neoplásicos se comparados com tecido normal (BOGLIOLO e FILHO, 2011).

## 2.3 NEOPLASIA MAMÁRIAS CANINAS

### 2.3.1 Incidência

Neoplasias mamárias em cadelas são estudadas com frequência pois apresentam uma importância significativa em Medicina Veterinária, principalmente por servir de modelo para comparações entre o tecido de mama humana (MARTINS e FERREIRA, 2003), e porque os tumores de mama em cadelas representam de 25% a 50% do total dos tumores que acometem a raça canina, além de que mais da metade deste valor é classificado como maligno (DALECK, FRANCESCHINI, et al., 1998; ANDRADE, AQUINO, *et al.,* 2001; D'OLIVEIRA, IBANEZ, *et al.,* 2001; OLIVEIRA, OLIVEIRA, *et al.*, 2003; FILGUEIRA, 2003). De todas as espécies de mamíferos estudadas, a cadela possui maior incidência para neoplasias de mama (DONNAY, RAUIS, *et al.*, 1989).

Um forte indicativo para a incidência de tumor de mama em cães é o fator hormonal, haja visto a diminuição de neoplasias deste tipo em cadelas castradas das que não são castradas. Se a ovário-histerectomia (OH) for realizada antes do primeiro estro (ciclo reprodutivo) reduz o risco de neoplasia mamária neste animal em 0,5% se comparado com um animal não castrado. Porém se este procedimento for realizado após o primeiro estro, o risco aumenta para 8%, aumentando muito mais se realizado após o segundo estro, no qual apresenta um risco de 26%. Quando o animal atinge

dois anos e meio, esta proteção obtida pela esterilização não é mais observada (FONSECA e DALECK, 2000).

Sobre a idade dos cães e a incidência de neoplasias mamárias, foi constatado um pico entre os dez e onze anos (JOHNSTON, 1998), porém a média de idade para o aparecimento do tumor varia de 7,8 anos a 8,8 anos (MOE, 2001).

Sobre predisposição racial, Boxer e Beagle são as raças que apresentam menor risco de desenvolvimento de câncer de mama (QUEIROGA e LOPES, 2002b), enquanto Cocker Spaniel e Poodle são apontadas como predispostas (WHITE, 2007).

### 2.3.2 Correlação Entre Tumor de Mama de Cadelas e de Humano

Segundo alguns autores (MISDORP, 2002; TERZIAN, ZUCCARI e PEREIRA, 2005; ANTUOFERMO, MILLER, *et al.*, 2007) estudar tumores de mama em cadelas pode ser utilizado como modelo para investigar e correlacionar as neoplasias mamárias que acometem a espécie humana através de correlação clínico-patológica, diagnóstica e prognóstica.

Os tumores de mama caninos espontâneos, independentemente do tipo histológico encontrado, apresenta diversas características clínicas, biológicas epidemiológicas, e provavelmente genética, que são semelhantes as que são encontradas em tumores de mama humana (SFACTERIA, BERTANI, *et al.*, 2003). Silva, Serakides e Cassali (2004) demonstrou que neoplasias mamárias de cadelas apresentam genótipo antigênico que pode ser comparado com os que foram encontrados em lesões de mama humano com similitude em ambos os genes (SILVA, SERAKIDES e CASSALI, 2004).

Para citar algumas dessas semelhanças sobre o aparecimento de tumor de mama em cadelas e de mama humana pode-se considerar:

- O aparecimento de tumores de mama em cadelas segundo Sfacteria (2003) ocorre com predominância na fase adulta, a partir dos 6 anos de idade, e pouquíssimas ocorrendo em cadelas com menos de 2 anos de idade, e os tumores de mama em humanos apresenta predominância também na fase adulta, a partir dos 35 anos segundos dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2015); outro estudo também demonstrou que

esta predominância ocorre em animais adultos de meia idade, com maior incidência aos 8 anos e com pico entre os 9 e 11 anos de idade, já em animais idosos (WHITE, 2007), o que corrobora uma maior incidência de câncer de mama também em mulheres idosas;

- O tipo morfológico do tumor é semelhante tanto em tumores de mama de cães quanto em tumores de mama humano (SFACTERIA, BERTANI, *et al.*, 2003);
- O efeito protetor ao aparecimento da neoplasia de mama com a ovariectomia (extirpação cirúrgica do ovário ou de cistos do ovário) na prevenção do tumor ocorre em ambos os casos (MOULTON, 1990);
- Os órgãos alvo para metástase são primeiramente, nos dois casos, de linfonodos regionais e pulmão, e depois em demais órgão como rins, baço, encéfalo, esqueleto, e sarcomas por metástase via corrente sanguínea (CAVALCANTI e CASSALI, 2006);
- Presença de receptores de estrogênio e progesterona na análise tumoral está presente tanto em mama canina como mama humana (GERALDES, GÃRTNER e SCHMITT, 2000).

### 2.3.3 Etiologia

A indução de nódulos benignos em animais jovens é consequência de hiperplasias de elementos mioepiteliais e secretórios causada pela síntese do hormônio de crescimento da glândula mamária canina que é realizado pela progesterona (SILVA, SERAKIDES e CASSALI, 2004). Receptores de estrogênio, progesterona, prolactina, andrógenos além dos receptores responsáveis pelo fator de crescimento epidermal, já foram observados em mama de cadelas, e uma correlação neoplásica foi verificada com a presença destes receptores. Estudos para verificar esta correlação, segundo Silva *et al.* (2004) são de grande importância para analisar se há relação no número de receptores e a capacidade de proliferação neoplásica.

Em outro estudo pode ser observado que o estrogênio e a progesterona, sendo esta em menor grau, podem estimular a replicação celular tanto em tumores que apresentaram receptores de estrogênio e progesterona tanto os que não

apresentaram. Esta verificação foi realizada in vitro para verificar a influência destes hormônios sobre parâmetros cinéticos em tumores de mama em cadelas (LESPAGNARD, KISS e DANGUY, 1987).

A prolactina, hormônio responsável pela produção de leite, facilita a mitose do estrogênio, o que causa um aumento de receptores deste na célula. A hiperprolactinemia, excesso de produção de prolactina, pode ser um indicativo desfavorável ao prognóstico de câncer de mama em humanos, devido ao fato de que este sintoma está relacionado à agressividade do tumor e também ao aparecimento precoce de metástases (VONDERHAAR, 1999).

Estudos de toxicidade e epidemiológicos demonstraram que a administração de esteroides ovarianos aos cães, aumentam a ocorrência de tumores de mama em cadelas (RUTTEMAN e MISDORP, 1993), o que comprova novamente a grande influência no desenvolvimento de tumores de mama em cadelas a relação dos hormônios, sendo esta a hipótese mais aceita. O uso de anticoncepcionais a base de progesterona, segundo Zuccari, Santana e Rocha (2001), promove, a longo prazo, desenvolvimento de nódulos hiperplásicos, o que pode predispor uma transformação maligna.

Outra hipótese sobre o que pode ser promotor da carcinogênese mamária em cadelas é a nutrição dos cães. Segundo Queiroga e Lopes (2002), cadelas entre os 9 e os 11 meses de idade que são obesas apresentam maior probabilidade de terem câncer de mama na fase adulta do que cadelas não obesas.

A alimentação caseira, rica de ingestão de carne bovina e suína, apresenta correlação positiva no desenvolvimento de neoplasias em cadelas (ZUCCARI, SANTANA e ROCHA, 2001; FERRI, 2003). Uma dieta com restrição calórica promove uma redução no desenvolvimento de tumores mamários em animais (WILLETT, 2000), e em contrapartida, se a dieta do animal for rica em gordura, principalmente gordura poliinsaturada, como óleos e sementes, possui um efeito de promover o aparecimento do tumor (WILLETT, 2000). Em um estudo de HATAKA *et al.* (2002), foi observado que das cadelas portadoras de neoplasias mamárias, 55% eram alimentadas a base de comida caseira-ração e 31% eram alimentadas apenas com comida caseira.

Pode ser verificado também nos cães uma relação direta do dano causado ao DNA e o aparecimento tumoral. As mutações aparecem quando há um dano ao DNA e o mesmo não consegue fazer o reparo celular. Desta maneira ocorrem alterações

nos protooncogenes (genes responsáveis pela divisão celular) originando oncogenes ativos (genes causadores de neoplasias), que causarão divisões celulares desordenadas e contínuas (COTRAN, KUMAR, *et al.*, 1996; JONES, HUNT e KING, 2000; LOEB, 2001).

Outra hipótese relacionada ao aparecimento de tumor de mama em cães pode estar relacionado a uma origem viral, porém estudos mais aprofundados neste caso devem ser realizados, pois não se pode comprovar com certeza esta teoria, mas também a mesma não pode ser descartada (ZUCCARI, SANTANA e ROCHA, 2001; FILGUEIRA, 2003; SAKAMOTO, 2011; DAMASCENO, 2012).

### 2.3.4 Características Clínico Patológicas

O grau de proliferação, a neovascularização, a resposta inflamatória e a invasão são resultantes da combinação de diversos fatores e indicam as características clínica e patológica dos tumores (MARTINS, TAMASO e GUERRA, 2002).

Dentre os tumores benignos que acometem a raça canina, a maioria é classificada como fibroadenoma (tumor misto). Já dentre os tumores malignos, quase todos são classificados como adenocarcinoma, e alguns sarcomas também representam esta classe de tumores (O'KEFFE, 1997).

Morris *et al.* (1998) verificou que das cadelas que apresentam tumores de mama benignos, 26% desenvolvem tumor mamário em outra cadeia mamária, e que cadelas com vários nódulos mamários podem apresentar tanto neoplasias malignas quanto neoplasias benignas concomitantemente.

### 2.3.5 Nomenclatura e Classificação Histológica

A nomenclatura tumoral dá-se de acordo com a origem celular e o tecido em si – epitelial, mesenquimatoso – com o padrão do crescimento do tecido – papiliforme, glandular – e o comportamento biológico – benigno, maligno. Para indicar uma neoplasia benigna um sufixo -OMA é acrescentado no fim do prefixo do tipo celular,

como pode ser observado no seguinte exemplo: o tipo celular é adenoide, e o tecido foi classificado como benigno, então trata-se de um adenoma. Porém se o sufixo –OMA visto anteriormente estiver combinado com um qualificador CARCINO- (carcinoma) ou um prefixo SARC- (sarcoma), significa que se tem uma neoplasia maligna, sendo o carcinoma uma neoplasia maligna de células epiteliais e o sarcoma uma neoplasia de células mesenquimatosas (JONES, HUNT e KING, 2000).

Desta maneira pode-se então classificar as neoplasias em quatro grandes grupos, conforme exposto no Quadro 1:

| NEOPLASIA | ORIGEM | NOME |
|---|---|---|
| Benigna | Epitelial | Adenoma, Papiloma |
| Benigna | Mesenquimal | Fibroma, Lipoma |
| Maligna | Epitelial | Carcinoma |
| Maligna | Mesenquimal | Sarcoma |

**Quadro 1 – Classificação básica das Neoplasias.**
**Fonte: Adaptado de Filgueira (2003).**

Se as neoplasias mamárias forem constituídas de tecido epitelial e mesenquimal ao mesmo tempo, são classificados como tumores mistos. Segundo Johnston *et al.* (2001), 50% a 66% das cadelas acometidas por tumor de mama apresentam tumores de mama mistos.

Para padronizar o exame diagnóstico e ampliar a classificação histológica, o Instituto de Patologia das Forças Armadas Americanas (OMS-AFIP – MISDORP, 2002) utiliza como critérios para diagnóstico uma classificação em que as neoplasias mamárias caninas são divididas em tumores malignos, tumores benignos, tumores sem classificação e hiperplasia/displasia mamária, com posterior divisão, conforme Quadro 2. É uma classificação amplamente divulgada e com grande adesão em laboratórios de patologia veterinária.

| NEOPLASIAS MALIGNAS | NEOPLASIAS BENIGNAS |
|---|---|
| **1. Carcinoma não infiltrativo**<br>**2. Carcinoma Complexo**<br>**3. Carcinoma Simples** | **1. Adenoma**<br>Adenoma Simples<br>Adenoma Complexo<br>Adenoma Basalóide |

| | |
|---|---|
| Tubular/Tubulopapilífero<br>Carcinoma Sólido<br>Carcinoma Anaplásico<br>**4. Tipos especiais de Carcinomas**<br>Carcinoma de Células Fusiformes<br>Carcinoma de Células Escamosas<br>Carcinoma Mucinoso<br>Carcinoma Rico em Lipídeos<br>**5. Sarcoma**<br>Fibrossarcoma<br>Osteossarcoma<br>Outros Sarcomas<br>**6. Carcinossarcoma**<br>**7. Carcinoma ou Sarcoma em Tumor Benigno** | **2. Fibroadenoma**<br>Fibroadenoma com baixa celularidade<br>Fibroadenoma com alta celularidade<br>**3. Tumor Misto Benigno**<br>**4. Papiloma Ductal**<br>**TUMORES SEM CLASSIFICAÇÃO**<br>**HIPERPLASIAS MAMÁRIAS E DISPLASIAS**<br>Hiperplasia Ductal<br>Hiperplasia Lobular<br>Cistos<br>Ectasia Ductal<br>Ginecomastia |

**Quadro 2 - Classificação Histopatológica de tumores de mama em cadelas conforme critérios de OMS-AFIP – MISDORP 2002.**
**Fonte: Adaptado de Misdorp (2002).**

Segundo Johnston *et al.* (2001), cerca de 37% das cadelas que são acometidas por neoplasia mamária apresentam ao mesmo tempo neoplasias benignas e malignas. As principais diferenças entre as neoplasias malignas e as neoplasias benignas podem ser visualizadas no Quadro 3 a seguir:

| CARACTERÍSTICA | BENIGNA | MALIGNA |
|---|---|---|
| Diferenciação/Anaplasia | Bem diferenciado | Falta de diferenciação |
| Taxa de Crescimento | Progressivo e lento, com formas mitóticas raras | Figuras mitóticas numerosas e anormais |
| Invasão Local | Massas bem demarcadas, sem invasão do tecido | Invasão local e infiltração de tecidos adjacentes |
| Metástase | Ausente | Frequente |
| Estroma | Abundante | Escasso |
| Recidiva | Rara | Frequente |

**Quadro 3 - Principais características que diferem um tecido benigno de um tecido maligno.**
**Fonte: Adaptado de Cotran *et al.* (1996).**

As neoplasias mamárias se apresentam macroscopicamente como nódulos circunscritos de vários tamanhos e consistência firme, os quais podem ser detectáveis

em exames clínicos. Estas formações neoplásicas podem ser múltiplas e se localizarem em uma única mama ou em diversas mamas da cadeia mamária, além de apresentar tipos histológicos variados (MITCHELL *et al.,* 1974; MISDORP, 2002).

A Figura 4 a seguir representa a histologia de uma glândula mamária normal, no qual é possível verificar um epitélio bem diferenciado e sua estrutura normal. Já na Figura 5 pode-se perceber uma diferença na estrutura da glândula mamária de células neoplásicas se comparadas com a normal, bem como uma diferença entre elas

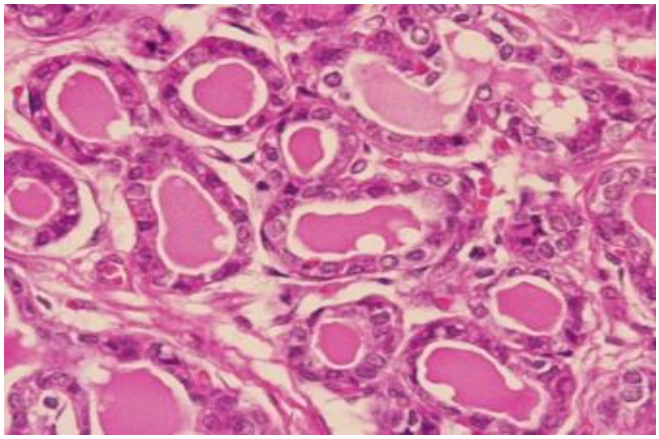


**Figura 4 - Glândula mamária normal. As células epiteliais apresentam-se bem diferenciadas, com uma relação núcleo/citoplasma normal e com o núcleo em posição basal.**
**Fonte: Costa (2010).**

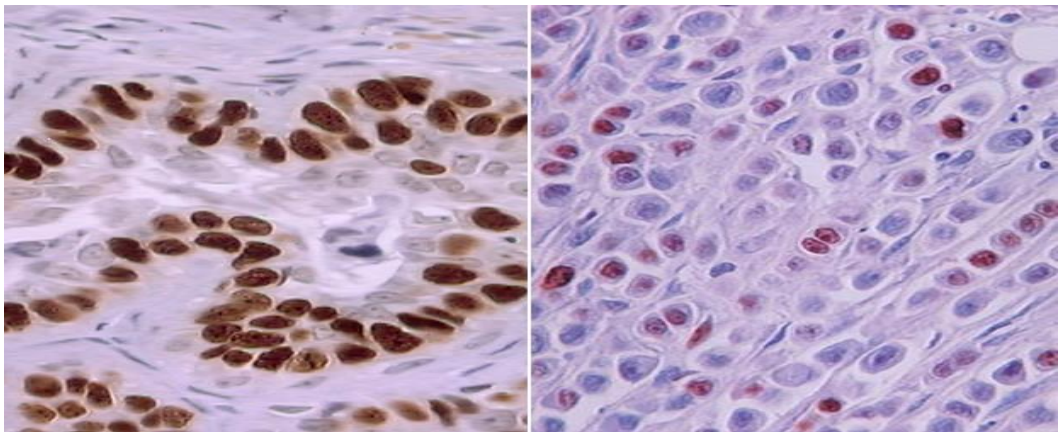


**Figura 5 - Células neoplásicas de mama em cadela. À esquerda uma célula benigna e à direita uma célula maligna.**
**Fonte: Cassali (2000).**

As neoplasias mamárias nos cães ocorrem com maior frequência nas glândulas inguinais, e posteriormente nas abdominais caudais e nas craniais (RIBEIRO, 2009). As inguinais e as abdominais caudais são mais acometidas pois apresentam maior

quantidade tecidual e estão em uma região mais predisposta a traumas físicos (QUEIROGA e LOPES, 2002). Segundo White (2007), cerca de 65% dos casos de neoplasias mamárias são provenientes destas glândulas.

Os tipos histológicos de neoplasias mamárias caninas que aparecem com maior frequência são, nas neoplasias benignas, adenoma, papiloma, fibroma, lipoma, fibroadenoma (tumor misto), mioepitelioma, e nas neoplasias malignas, adenocarcinoma, sarcoma e carcinossarcoma (JOHNSTON, 1998).

### 2.3.6 Tumores Mamários

Os tumores mamários caninos que já foram nomeadas e classificadas no tópico anterior serão descritas neste tópico com um pouco mais de detalhes, e seguindo a proposta de classificação histológica de Misdorp *et al.* (1999), sendo esta a mais utilizada pelos patologistas.

É possível verificar a presença de quatro grandes grupos nesta classificação, sendo: neoplasias malignas, neoplasias benignas, tumores sem classificação e hiperplasias mamárias e displasias, sendo que cada grupo apresenta subgrupos, os quais apresentam critérios para apresentarem esta divisão. Estes critérios e o que é cada tumor será explicitado brevemente a seguir

#### 2.3.6.1 Neoplasias malignas

Também chamados de carcinomas mamários, são subdivididos conforme o seu grau de malignidade, considerando uma ordem crescente do mesmo. A ordem se segue da seguinte maneira: carcinoma não infiltrativo (*in situ*), carcinoma complexo e carcinoma simples, sendo que o carcinoma simples também apresenta as subdivisões de carcinoma tubular/tubulopapilífero, sólido e anaplásico. Na classificação de neoplasias malignas também se encontram os tipos especiais de carcinoma (carcinoma de células fusiformes, escamoso, mucinoso e rico em lipídeos), sarcomas

(fibrossarcoma, osteossarcoma, outros sarcomas), carcinossarcoma e carcinoma ou sarcoma em tumor benigno (COSTA, 2010).

*Carcinoma não infiltrativo (in situ):* é um carcinoma que apresenta características de malignidade na célula mamária, porém não há invasão da membrana basal dos ductos mamários.

*Carcinoma complexo:* constituído por dois componentes principais, epitélio luminal (superficial) e mioepitelial (entre a lâmina basal e a célula secretora, sendo células epiteliais fusiformes e de forma estrelada). A invasão dos vasos linfáticos não é frequente.

*Carcinoma simples:* também composto por células epiteliais do tipo luminal ou mioepitelial, porém está presente apenas um dos dois. Aproximadamente 50% dos tumores nesta classificação, segundo Costa (2010), apresentam infiltração nos tecidos periféricos e invasão dos vasos sanguíneos e linfáticos. A subdivisão desta classificação também é feita de forma crescente referente à malignidade:

- Carcinoma tubular/tubulopapilífero: ocorre a formação de projeções tubulares (arquitetura do tecido apresentando túbulos) e/ou projeções papilíferas (arquitetura do tecido apresentando papilas).
- Carcinoma sólido: as células neoplásicas estão dispostas de maneira grupal, dando forma de cordões ou ninhos sólidos.
- Carcinoma anaplásico: é um tipo de carcinoma altamente infiltrativo, com grandes diferenciações celulares, apresentando núcleos celulares desordenados, ricos em cromatina, multinucleares. Podem estar dispostos em grupo ou espalhadas, sem uma ordem correta a seguir. Apresentam alta chance de recidiva e metástase.

*Tipos especiais de carcinoma:*

- Carcinoma de células fusiformes: é composto por células fusiformes, podendo estar dispostas em forma de padrão sólido, ou em formatos de túbulos, porém mais raro. Podem apresentar também origem mioepitelial.
- Carcinoma escamoso: a disposição do padrão celular é sólido e apresenta áreas de diferenciação escamosa. O tecido periférico deste tipo de tumor apresenta células basalóides e a parte central contém células tumorais em processo de necrose.

- Carcinoma mucinoso: sua característica principal é apresentar abundante presença de mucina (glicoproteína rica em serina, treonina e tirosina, que são os principais componentes do muco), do tipo simples ou do tipo complexo.
- Carcinoma rico em lipídeos: a constituição celular deste tumor é de células do citoplasma contendo grande quantidade de lipídeos neutros.

*Sarcomas:*

- Fibrossarcoma: tumor dos fibroblastos, sendo composto por células fusiformes e fibras de colágeno e reticulina.
- Osteossarcoma: caracterizado pela formação de osteóide (matriz óssea recém-formada e não calcificada) ou osso por parte das células neoplásicas. A atividade mitótica e a capacidade de modificar sua forma celular são características comuns neste tipo de tumor.
- Outros sarcomas: condrossarcomas e lipossarcomas, com alta raridade.

*Carcinossarcoma:* sua morfologia celular é idêntica aos componentes dos tecidos epiteliais e mesenquimal. Suas metástases podem ser do tipo sarcomatoso, carcinomatoso ou misto.

*Carcinoma ou sarcoma em tumor benigno:* acomete os tumores benignos do tipo adenoma complexo e tumor misto benigno. Difícil distinguir se a malignidade surgiu associada ao tumor benigno ou se a mesma invadiu o tumor benigno, tornando-o maligno (COSTA, 2010).

A Figura 6 a seguir ilustrará a histologia das células neoplásicas malignas presente em tecido mamário de cães. Foi um estudo realizado por Goldschmidt (2011) no qual fez uma revisão na classificação histológica destes tecidos que foram publicadas em 1974 e em 1999.

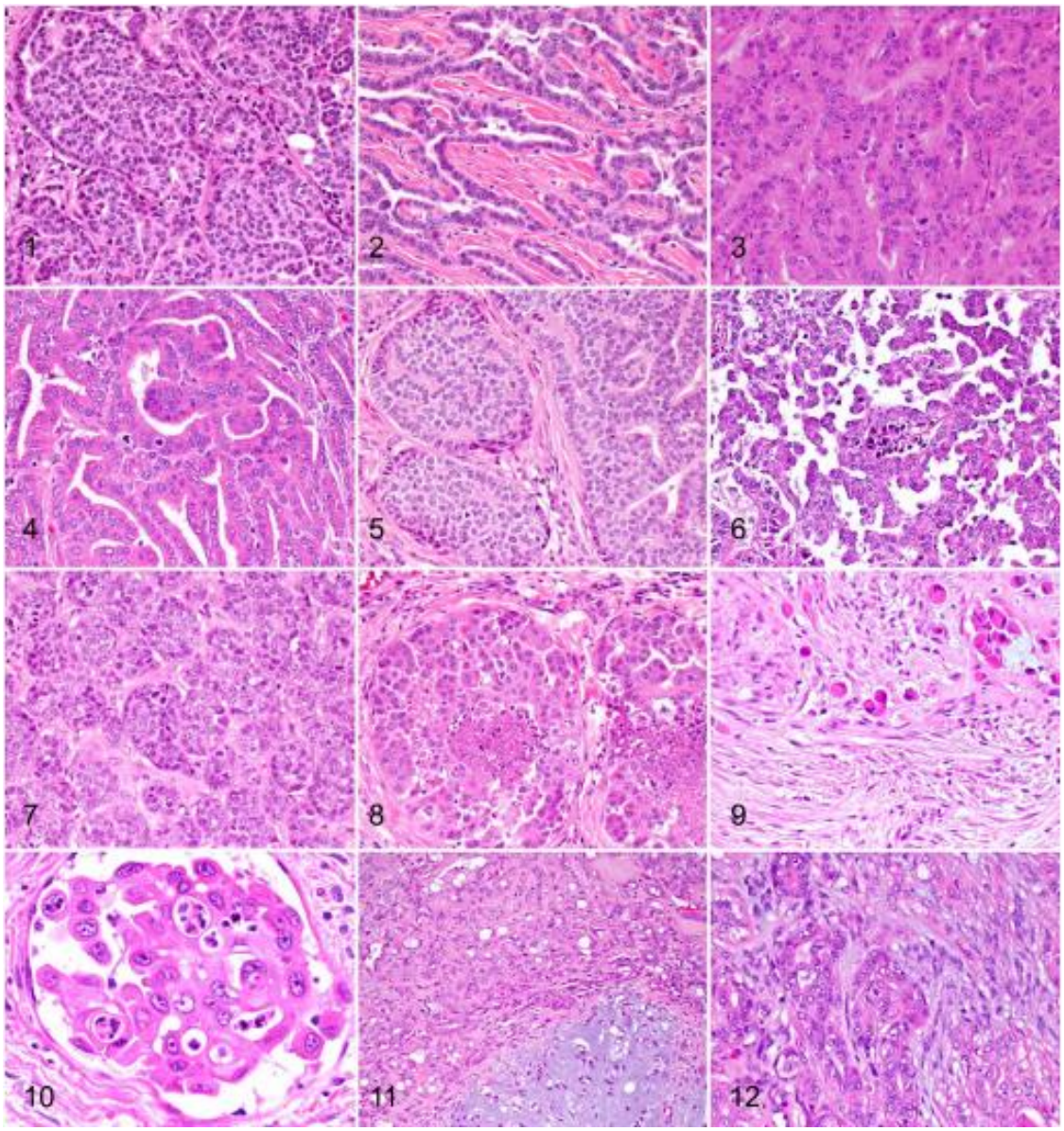



**Figura 6 - Comparativo entre imagens histológicas de tecido mamário de cães com presença de neoplasias malignas. 1) Carcinoma in situ. 2) Carcinoma tubular 3) Carcinoma tubular com considerável pleomorfismo nuclear e celular. 4) Carcinoma tubulopapilífero. 5) Carcinoma cribriforme. 6) Carcinoma micropapilar. 7) Carcinoma sólido. 8) Comedocarcinoma. 9) Carcinoma anaplásico. 10) Carcinoma anaplásico. 11) Carcinoma em tumor mamário misto benigno. 12) Carcinoma complexo.**
**Fonte: Goldschmidt *et al.* (2011).**

### 2.3.6.2 Neoplasias benignas

O segundo grupo de classificação, segundo Misdorp *et al.* (1999), são as neoplasias benignas. Estas são subdivididas em adenomas (simples, complexo e

basalóide), fibroadenomas (alta celularidade e baixa celularidade), tumor misto benigno e papiloma ductal (COSTA, 2010).

*Adenomas:*

- Adenoma simples: são compostas por células do epitélio luminal e células mioepiteliais. Bem diferenciados e constituídos por túbulos.
- Adenoma complexo: são parecidos com os carcinomas complexos em sua estrutura celular, porém apresentam características específicas que os tornam benignos, não podendo ser carcinoma. Estas características são a presença de encapsulação celular e baixa atividade mitótica.
- Adenoma basalóide: presença de grupos de células epiteliais basalóides com forma única. Segundo Costa (2010), são necessários mais estudos para diferenciar melhor este tipo de tumor.

*Fibroadenoma:* apresenta uma mistura de células epiteliais luminais e estroma mamário. O fibroadenoma de alta celularidade contém uma alta quantidade de células em processo mitótico, enquanto o de baixa celularidade não apresenta esta característica.

*Tumor misto benigno:* sua constituição celular é idêntica à célula normal, apresentando componentes epitelial e mesenquimal. O componente mesenquimal pode produzir cartilagem, conjuntivo fibroso, gordura e osso.

*Papiloma ductal:* localizado dentro de um ducto que se encontra distendido e pode apresentar lobulações e ramificações.

#### 2.3.6.3 Tumores sem classificação e hiperplasias mamárias e displasias

O terceiro grupo, que representa os tumores sem classificação são tecidos de mama de cadela que apresentam atividade tumoral, porém não se enquadram em nenhuma classificação anteriormente descrita. O quarto grupo, das hiperplasias mamárias e displasias classificam-se da seguinte maneira (MISDORP, 1999):

*Hiperplasia mamária:* O termo hiperplasia significa um aumento no número de células em um tecido, sendo uma alteração comum em cães. Ocorre um aumento no tecido, quando visualizado macroscopicamente e pode ser confundido como uma hipertrofia. As células hiperplásicas são idênticas as normais e a arquitetura do tecido

ou do órgão ficam bem alterados (FERGUSSON, 1985). Segundo o mesmo autor, as hiperplasias mamárias são comuns em cadelas e alguns autores a consideram como uma variação celular pré neoplásica, que pode estar associada a uma alteração hormonal, e sendo assim a mesma não pode ser classificada como neoplasia.

- Hiperplasia ductal: Tipo de hiperplasia mamária que é caracterizada pela proliferação dentro dos ductos (intraductal) de células epiteliais podendo ocasionar obstrução parcial ou total dos ductos. Pode ocorrer em um único local da mama ou em diversos pontos focais. Quando há a presença de diversas alterações atípicas, é chamada de hiperplasia ductal atípica.
- Hiperplasia lobular: Subdividida em hiperplasia epitelial e adenose. A hiperplasia epitelial é uma proliferação das células epiteliais ocorrendo dentro dos ductos intralobulares da mama. A adenose é uma proliferação das células do tecido epitelial mamário, podendo apresentar padrão de crescimento intraductal e/ou periductal.

*Cistos e Ectasia Ductal:* difíceis de serem diferenciados, porém pode-se perceber que as ectasias são menores que os cistos e apresentam origem ductal.

*Ginecomastia:* é uma hiperplasia do estroma e dos ductos mamários. Sua ocorrência é verificada em cães machos.

A Figura 7 a seguir representa a imagem histológica de células neoplásicas benignas e hiperplasias presente em tecido mamário de cães. Também consta do arquivo de Goldschmidt (2011).

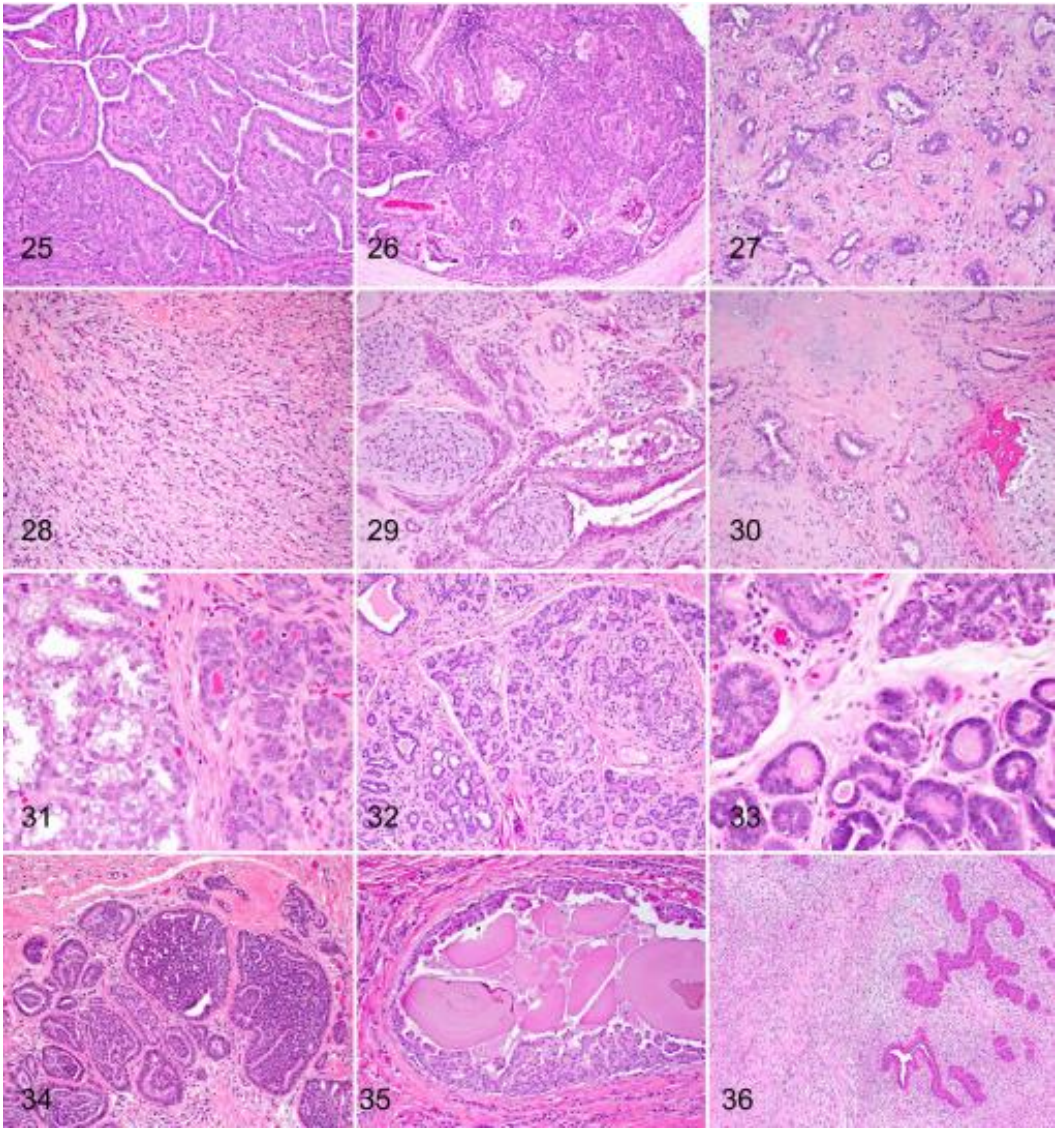



**Figura 7 - Comparativo entre imagens histológicas de tecido mamário de cães com presença de neoplasias benignas e hiperplasias. 25) Adenoma intraductal papilar. 26) Adenoma ductal. 27) Fibroadenoma. 28) Mioepitelioma. 29) Adenoma complexo. 30) Tumor misto benigno. 31) Hiperplasia lobular. 32) Hiperplasia lobular com fibrose. 33) Hiperplasia lobular com atipia. 34) Hiperplasia epitelial. 35) Papiloma ductal. 36) Fibroadenoma.**
**Fonte: Goldschmidt *et al.* (2011).**

### 2.3.6.4 Outras alterações

Vale ressaltar aqui um grupo que não é classificado como neoplasia mamária e nem como hiperplasia. Este grupo será pontuado neste trabalho devido ao fato de três amostras que apresentam estas características foram disponibilizadas no laboratório para análise: paniculite, hamartoma e linfoma difuso. Paniculite é classificada como

uma dermatopatia inflamatória, hamartoma como uma dermatopatia proliferativa não neoplásica e linfoma difuso como uma dermatopatia inflamatória com padrão difuso (YAGER e WILCOCK, 1994; WERNER, 2002).

*Paniculite:* Panículo é a gordura subcutânea que fica entre a derme e a fáscia muscular. Os lóbulos de gordura contêm nervos, vasos linfáticos e sanguíneo. Portanto a paniculite é uma inflamação que ocorre nos panículos presentes na mama da cadela. É subdividida em paniculite nodular, paniculite septal e paniculite difusa. Esta subdivisão é diferente em cães das encontradas em mama humana, sendo que em cães é comum a presença de paniculite de dois ou três tipos anatômicos (ACKERMAN, 1997). A paniculite normalmente vem acompanhada de lesões na derme. As dermatopatias inflamatórias que envolvem o panículo adiposo podem ser classificadas como neutrófilica (processo inflamatório do abscesso subcutâneo), granulomatosas e piogranulomatosas (quando ocorre alterações atípicas, lesões por trauma, reação inflamatória por corpo estranho) e linfócitas (causadas por reação inflamatória decorrente de vacina) (WERNER, 2002).

*Hamartoma:* Hamartoma é uma anomalia congênita (malformação ao nascimento) que apresenta um crescimento celular sem muita ordem. Tem sua origem nos próprios componentes celulares do tecido mamário, por uma resposta errada da célula às citoquinas locais (proteínas ativas ou glicoproteicas que regulam o crescimento celular). Sua progressão é limitada, havendo retenção das dimensões que foram atingidas ao longo do tempo (NUNES e FILGUEIRA, 2014).

*Linfoma difuso:* O linfoma difuso é uma doença inflamatória da pele que apresenta um padrão celular difuso, no qual a derme é destruída pela infiltração da inflamação dos leucócitos que formam nódulos ou faixas difusas (WERNER, 2002).

## 2.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS TUMORES DE MAMA E ELEMENTOS TRAÇO

Em todo o processo biológico celular do indivíduo, os elementos químicos estão presentes em proteínas, em processos enzimáticos, em ativação celular, entre outros processos. O excesso ou a falta de um elemento ou de um conjunto de elementos em um determinado processo biológico está sendo estudado atualmente pela

possibilidade desta característica estar ligada com algumas enfermidades, incluindo a carcinogênese. Portanto, estudar e analisar a presença de elementos químicos em tumores é de vital importância, principalmente se uma correlação na quantidade destes elementos e sua carcinogênese puder ser pontuada como favorável (KUBALA-KUKUS, 2007).

Pesquisas que envolvem a identificação destes elementos químicos no tecido biológico estão em crescente avanço, por auxiliar no diagnóstico de diversas neoplasias (MAJEWSKA, 1999; GERAKI, FARQUHARSON e BRADLEY, 2002; PEREIRA, 2008; THEODORAKOU e FARQUHARSON, 2008; SILVA, TOMAL *et al*., 2009; MERSOV, MERSOV *et al*., 2014).

A Agência Internacional de Pesquisa ao Câncer (*International Agency for Research on Cancer*) (IARC, 2015), desde 1993 listou possíveis elementos químicos pós pesquisa, e que apresentaram potencial carcinogênico: Be, Cr, Co, Ni, As, Cd, Sb, Pb, Hg e Pt.

Diversos estudos têm sido dedicados nas últimas décadas para compreender o potencial carcinogênico de elementos químicos presentes em tecidos neoplásicos. Alguns estudos mais recentes, considerando os últimos dez anos, como o estudo de Kwiatek *et al.* (2005), é possível verificar a diferença de concentração de elementos químicos presentes em tecidos sadios e tumorais de próstata, no qual os elementos Mn, Cu e Ni, apresentaram uma maior concentração destes elementos nos tecidos tumorais do que nos sadios de próstata, além de verificarem um possível aumento de Cu e Zn, caso haja a progressão tumoral. Em outro estudo de Al-Ebraheem *et al.* (2009), verifica-se que há um aumento na quantidade de elementos como Fe, Cu, Zn e K, em tumores do fígado e rim, enquanto em tumores mamários o elemento Ca estava mais elevado.

Farquharson *et al.* (2007), Pereira *et al.* (2008), Silva *et al.* (2009), em seus estudos verificaram que investigar tecidos tumorais de mama, além de ser de vital importância devido ao grande acometimento desta doença, apresenta um mapeamento químico que se padroniza nas neoplasias mamárias, sendo o Ca, Fe, Cu e Zn, elementos químicos que aparecem com um provável potencial carcinogênico para o tumor de mama, devido a sua prevalência em diversas pesquisas.

Estes elementos químicos encontrados são considerados como elementos traço, pois estão presentes em menos de 1% do material biológico analisado, e são classificados como essenciais, provavelmente essenciais e não essenciais. Como

elementos essenciais encontram-se Na, Mg, Cl, K, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, I, Se Mo, pois apresentam fundamental importância em diversas funções do metabolismo, e como provavelmente essenciais encontram-se o F, Si, Vn, Cr, As, Sn (SCHWARTZ, 1975; CESAREO, 1998).

Os elementos traço que são mais significativos na carcinogênese de tecidos mamários, como pode-se perceber são o Ca, Fe, Cu e Zn. Estes elementos desempenham diversas funções no organismo e apresentam funções específicas em neoplasias de tecidos mamários.

O elemento químico Ca está correlacionado ao carcinoma mamário no processo de calcificação das lesões e sua malignidade. Apesar de ser um elemento de grande importância diagnóstica, sua função ainda não é bem clara, pois não se sabe se esta calcificação é originada de um processo degenerativo ou de um processo ativo celular não resolvido (BÜSING, KEPPLER e MENGES, 1981).

O elemento químico Fe é o elemento traço mais abundante no organismo, sendo que seu excesso pode causar diversos danos ao organismo. O processo de oxidação celular está diretamente ligado com um aumento de concentração de Fe no organismo, sendo que este processo pode resultar na liberação de radicais livres e produzir danos ao DNA contribuindo para a manifestação do câncer (MAGALHÃES, BECKER, *et al.*, 2008).

O elemento químico Cu por mais que seja essencial a diversos processos bioquímicos, pode ser relativamente tóxico. É também considerado um cofator da angiogênese, pois se acredita que um excesso de Cu nos tumores de mama desenvolve o mesmo através da angiogênese e de possíveis danos oxidativos ao DNA (HUANG, SHEU e LIN, 1999).

O elemento químico Zn está correlacionado com o sistema de defesa do organismo. Portanto sua falta ou seu excesso é representado por uma deficiência do organismo perante o sistema imune, com isto há um descontrole nas células o que pode resultar em um câncer (CAVALLO, GERBER, *et al.*, 1991).

Segundo Sakamoto (2011) há um aumento significativo na análise estatística dos elementos traços Ca, Fe e Zn presentes em tecidos mamários de cadelas segundo a técnica de fluorescência de raios X ao comparar um grupo controle normal de um grupo neoplásico. Já um comparativo em estadiamento clínico (TNM) das mesmas amostras, não foi representativo em análise estatística, visto que os

elementos traços estão relacionados ao tipo histológico e não ao estadiamento clínico de prognóstico de vida (SAKAMOTO, 2011).

Segundo Robbins e Cotran (2010), é de vital importância o conhecimento das alterações das concentrações de elementos traços presentes em neoplasias, pois estes podem atuar como biomarcadores tumorais e com isto tornam o diagnóstico mais assertivo, melhorando assim o tratamento a ser adotado.

## 2.5 MECANISMOS DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

A fluorescência de raios X é uma técnica de análise multielementar baseada na excitação dos átomos de uma amostra através da aplicação de um feixe de raios X com energia apropriada e posterior detecção da radiação característica emitida. Dessa forma, nesta seção descrevemos de forma sucinta os mecanismos básicos associados a esta técnica.

### 2.5.1 Produção de Raios X em um Tubo de Raios X

No interior de um tubo de raios X existem duas partes principais o cátodo e o ânodo. O cátodo é um filamento que quando aquecido libera elétrons através de efeito termoiônico. Esses elétrons são acelerados em direção ao ânodo devido a uma diferença de potencial da ordem de quilovolts. Este fluxo de elétrons então acelerados colide com o material do ânodo e interações coulombianas podem acontecer e propiciar a produção de raios X. O espectro do tubo de raios X contém duas componentes principais: componente contínua (*Bremsstrahlung* ou radiação de freamento) e componente discreta (raios X característicos) (ATTIX, 1986), cujo espectro é exibido na Figura 8.

A componente contínua (*Bremsstrahlung*) ocorre pela desaceleração dos elétrons devido as interações coulombianas inelásticas. Já a componente discreta (raios X característicos) é resultado de um preenchimento de uma vacância formada

devido a ejeção de um elétron da camada mais interna do átomo. Quando esta vacância é preenchida por um elétron de uma camada mais energética, a diferença de energia entre as camadas é liberada na forma de um fóton (ATTIX, 1986).

No entanto, da energia transportada pelos elétrons apenas 1% é voltada à produção de raio X, o restante é convertido em calor (BORN, 1969).

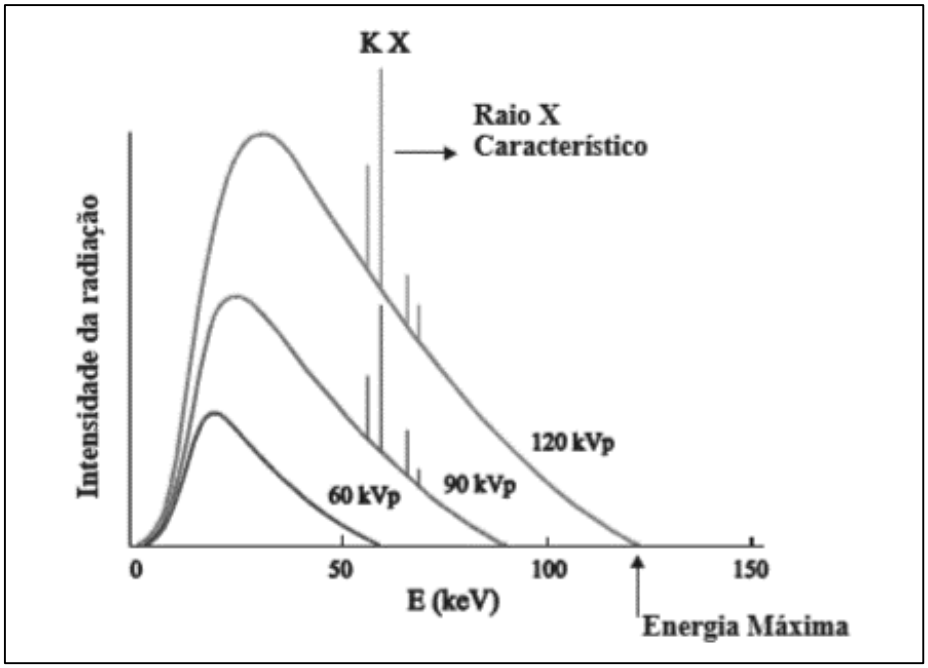



**Figura 8 - Espectro de raios X de freamento e raios X característicos para kVp de 60, 90 e 120.**
**Fonte: Tauhata *et al.* (2003).**

## 2.6 INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO COM A MATÉRIA

Na faixa de energias que inclui os raios X e gama, um fóton de energia *hv* e um momento associado *hv / c* pode interagir com a matéria, basicamente, por cinco tipos de interações que devem ser consideradas em física radiológica (YOSHIMURA, 2009):

- Efeito Compton;
- Espalhamento Coerente (Rayleigh);
- Produção de Pares;
- Interações Fotonucleares;

- Efeito Fotoelétrico;

O Efeito Compton é um processo de espalhamento inelástico que ocorre quando um fóton incidente interage com um elétron e transfere parte de sua energia e momento linear a este. Como resultado desta interação o elétron adquire uma energia cinética e é espalhado em um ângulo $\theta$ em relação a direção do fóton incidente. Já o fóton é espalhado com um ângulo $\varphi$ e uma energia igual à diferença entre a energia do fóton incidente e a do elétron espalhado. (GRIFFTHS, 1999).

O Espalhamento Elástico ou também denominado Espalhamento Rayleigh, ocorre com maior probabilidade em fótons de raios X que apresentam energias menores que 10 keV. É chamado de coerente porque o fóton é espalhado pela combinação da ação de todo o átomo. É elástico no sentido de que o fóton não perde nenhuma fração de sua energia inicial; o átomo move-se apenas o suficiente para conservar o seu momento (ATTIX, 1986).

A Produção de Pares por sua vez ocorre somente se o fóton incidente possuir energia maior que 1,022 MeV, pois fica sob a influência do campo nuclear por se aproximar do núcleo atômico. O fóton incidente desaparece e origina duas partículas carregadas, sendo um pósitron e um elétron (SPRAWLS, 1995).

As Interações Fotonucleares ocorrem quando um fóton de altíssima energia, acima de 10 MeV, excita um núcleo. Desta excitação há a emissão de um próton ou de um nêutron (ATTIX, 1986).

O Efeito Fotoelétrico é a interação da radiação com a matéria de maior importância para fótons incidentes de baixa energia. Um fóton interage com um elétron ligado e transfere toda sua energia a ele. Caso esta energia seja maior ou igual que a energia de ligação do elétron ao átomo, esse é liberado deixando uma vacância (ATTIX, 1986). Como o foco deste trabalho está na detecção dos raios X característicos emitidos, o efeito fotoelétrico será detalhado no tópico seguinte.

A Figura 9 representa esquematicamente a dominância de alguns destes efeitos conforme a energia do fóton incidente (*hv*) e o número do material absorvedor (Z) (ATTIX, 1986).

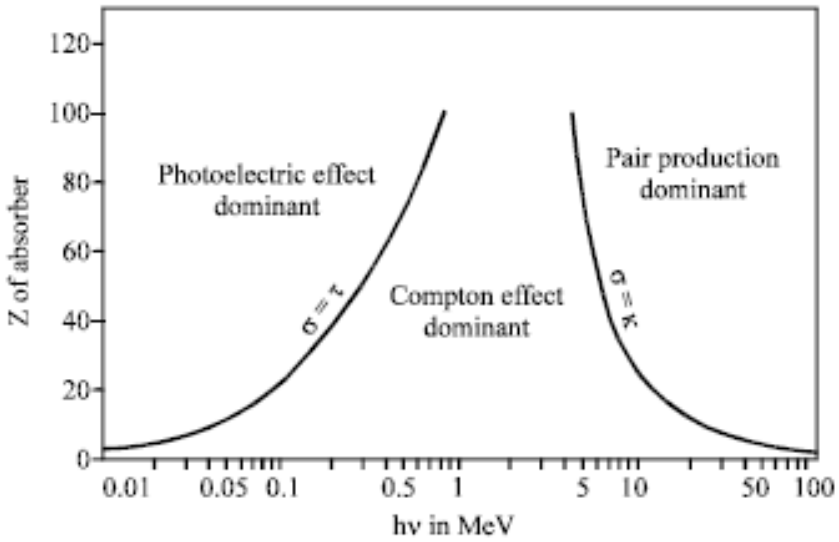



**Figura 9 - Dominância das interações da radiação com a matéria conforme o número atômico do material absorvedor e a energia do fóton incidente em MeV.**
**Fonte: Attix (1986).**

## 2.7 EFEITO FOTOELÉTRICO

A descrição do Efeito Fotoelétrico será convenientemente subdividida em dois aspectos: cinemática e seção de choque.

### 2.7.1 Cinemática

Quando um fóton com energia hv interage com um elétron fortemente ligado ao átomo com energia $E_b$, o fóton transfere toda sua energia incidente para o átomo e o elétron recebe hv-Eb. Caso a energia do fóton seja maior ou igual a $E_b$, o elétron é ejetado do átomo. Este elétron ejetado é chamado de fotoelétron. Este processo é conhecido como efeito fotoelétrico e está representado na Figura 10 a seguir:

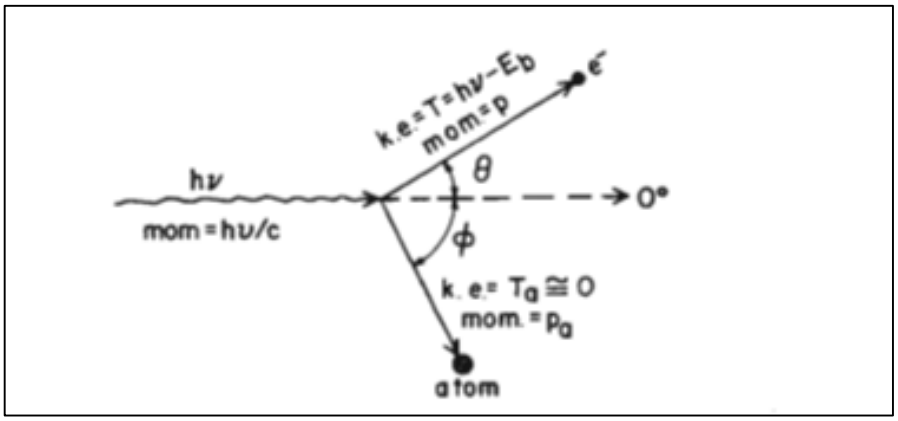



**Figura 10 - Cinemática do Efeito Fotoelétrico**
**Fonte: Attix (1986).**

Conforme pode ser observado na Figura 10 o elétron é ejetado com um ângulo θ da direção do fóton incidente no átomo, carregando um momento *p* que é dado pela Equação 1 a seguir (ATTIX, 1986):

$$T = hv - E_b - T_a \qquad 1$$

Sendo T a energia cinética do elétron ejetado, hν a energia do fóton incidente, $E_b$ a energia de ligação do elétron e $T_a$ a energia cinética referente ao recolhimento do átomo que é aproximadamente zero (ATTIX, 1986):

$$T = hv - E_b \qquad 2$$

Portanto, para que este efeito ocorra, conforme já descrito anteriormente, a energia do fóton incidente *hv* deve ser maior ou igual a energia de ligação do elétron.

Os fotoelétrons são ejetados predominantemente lateralmente pois tendem a ser emitidos na direção do vetor campo elétrico do fóton para baixas energias. Porém com o aumento da energia, esta distribuição tende a aproximar-se da direção do fóton incidente, conforme Figura 11 (ATTIX, 1986).

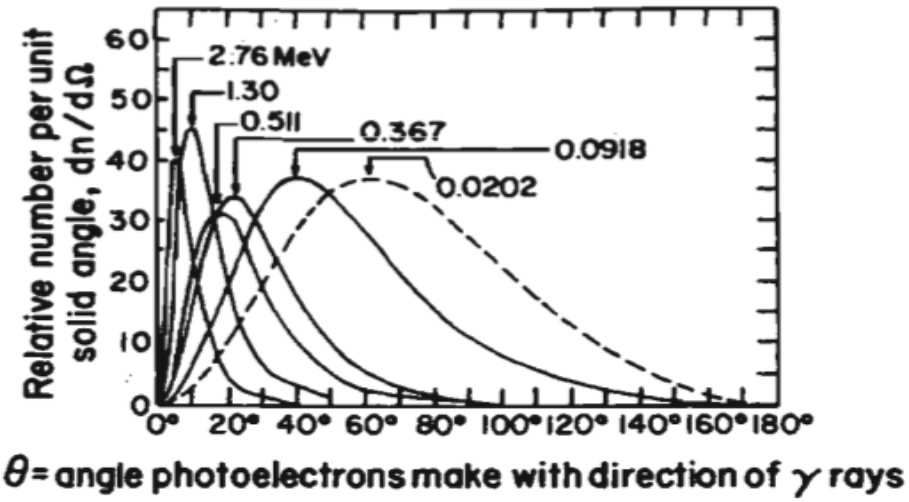



**Figura 11 - Direção de distribuição do efeito fotoelétrico por unidade do ângulo sólido, para energias classificadas nas curvas.**
**Fonte: Attix (1986).**

### 2.7.2 Seção de Choque

A seção de choque para o Efeito Fotoelétrico prediz a probabilidade de que esta interação ocorra. No caso deste efeito a seção de choque integrada sobre todos os ângulos de emissão do fotoelétron pode ser escrita como:

$$a^{\tau} \cong k.(Z^{n}/(hv)^{m}) \qquad 3$$

Sendo $a^{\tau}$ a seção de choque para o efeito fotoelétrico, com unidade de ($cm^2$/atom); *k* uma constante; *Z* o número de elétrons em um átomo (número atômico); *n* variando de 4 (para energia hv = 0,1 MeV) a 4,6 (para energia hv = 3 MeV); e *m* variando de 3 (para energia hv = 0,1 MeV) e a 1 (para energia hv = 5 MeV) (ATTIX, 1986).

Com isto, tem-se que para energia de hv ≅ 0,1 MeV e abaixo deste valor, a seção de choque para o efeito fotoelétrico é descrito da seguinte maneira (ATTIX, 1986):

$$a^{\tau} \approx Z^{4}/(hv)^{3} \qquad 4$$

## 2.8 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

A fluorescência de raios X (XRF) baseia-se na emissão de raios X característicos pelos átomos que compõem um material, que ocorre quando este é submetido à excitação apropriada, seja na forma de radiação corpuscular ou eletromagnética. Se a energia incidente possuir valor igual ou maior a energia de ligação do elétron, este será ejetado do átomo formando uma vacância, que será posteriormente preenchida através da captura e/ou decaimento de outro elétron de uma camada mais externa. Essa transição eletrônica faz com que o átomo libere energia, emitindo um fóton de raios X característico, com energia correspondente à diferença de energia entre as camadas. A vacância formada pelo elétron que preencheu a primeira pode ser por sua vez, preenchida por um elétron mais externo dando origem a outras linhas de emissão (menos energéticas, ou de maior comprimento de onda) (VAN GRIEKEN e MARKOWICZ, 2002).

## 2.9 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

Através das técnicas espectroscópicas de fluorescência de raios X é possível identificar e quantificar elementos traço de uma amostra sem destruí-la. A técnica consiste basicamente em medir a intensidade dos raios X característicos emitidos pelos elementos químicos presentes nas amostras analisadas, quando excitadas com uma certa energia e intensidade adequadas (NASCIMENTO FILHO, 1999).

Existem diversos tipos de análise com o uso da técnica de fluorescência de raios X, como a Fluorescência de Raios X por Dispersão de Comprimento de Onda (WD-XRF – *Wavelength Dispersive X-Ray Fluorescence*); Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia (ED-XRF – *Energy Dispersive X-Ray Fluorescence*); Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TR-XRF – *Total Reflection X-Ray Fluorescence*); e Microfluorescência (μ-XRF - *μ X-Ray Fluorescence)* (TERTIAN e CLAISSE, 1982).

A fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda foi utilizada até 1966 como técnica única da XRF. Esta técnica se baseia na lei de Bragg, sendo que os espectrômetros necessitam de um movimento preciso e sincronizado entre o cristal difrator e o detector. Os cristais defletores separam os raios X fluorescentes em diferentes comprimentos de onda.

A técnica TR-XRF vem sendo bem desenvolvida nos últimos anos. A radiação incidente na amostra é rasante à superfície da mesma para que ocorra a reflexão total do feixe. A quantidade de amostra é muito pequena (< μl ou μg) o que traz uma vantagem à técnica, pois não há necessidade de correção do efeito matriz, visto que a amostra forma um filme fino (NASCIMENTO FILHO, 1999).

A técnica de μ-XRF consiste em analisar dados sobre a distribuição espacial dos elementos na amostra com a utilização de feixe de raios X de dimensões micrométricas. É possível construir um mapa espacial dos elementos analisados (BERTIN, 1978).

Já a técnica de ED-XRF só foi possível a partir do final da década de sessenta, com a chegada de detectores semicondutores de silício lítio (Si (Li)), que apresentavam uma alta resolução e assim puderam distinguir, na espectroscopia de raios X, energias de fluorescência que eram muito próximas umas das outras. (TERTIAN e CLAISSE, 1982). Como a técnica de fluorescência de raios X por dispersão de energia foi utilizada neste trabalho, esta será detalhada a seguir.

### 2.9.1 Técnica de Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia

A técnica de Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia é uma das técnicas de espectroscopia mais utilizadas, além de ser uma técnica analítica não destrutiva, que realiza análises qualitativas e quantitativas da amostra, podendo atingir limites de detecção da ordem de ppm e até mesmo ppb em alguns casos (NASCIMENTO FILHO, 1999). Tem a vantagem de necessitar de uma instrumentação simples e de baixo custo se comparada com as demais técnicas já exemplificadas anteriormente e também determinar simultaneamente a concentração de vários

elementos presentes no material analisado. Estes fatores corroboram para utilização desta técnica em larga escala (RIELLA, 2012).

Os raios X característicos emitidos pela amostra são convertidos em pulsos eletrônicos em um detector apropriado e estes são diretamente proporcionais às energias dos raios X. Os detectores mais utilizados são os cintiladores sólidos de NaI(Tl) (Iodeto de Sódio dopado com Tálio) e os semicondutores de Si(Li) (Silício dopado com Lítio), Ge(Li) (Germânio dopado com Lítio) e Ge (Germânio) hiperpuro (NASCIMENTO FILHO, 1999).

#### 2.9.1.1 Espectrômetro para ED-XRF

Existem diferentes tipos de configuração da técnica de ED-XRF em relação a excitação da amostra: excitação direta por fonte polienergética, sendo fonte de radionuclídeos ou tubo de raios X (feixe polienergético); excitação com um tubo de raios X e uso de alvos secundários composto por elementos puros (feixe monoenergético); excitação com uso de monocromadores dispostos entre a fonte e a amostra (feixe monoenergético). Neste trabalho foi utilizada uma excitação direta por fonte polienergética através de um tubo de raios X. Além da fonte de excitação, é necessário um material de medida (amostra), um detector, um amplificador e um sistema de leitura (*software*). Um sistema típico para a técnica de ED-XRF está representado esquematicamente na Figura 12.

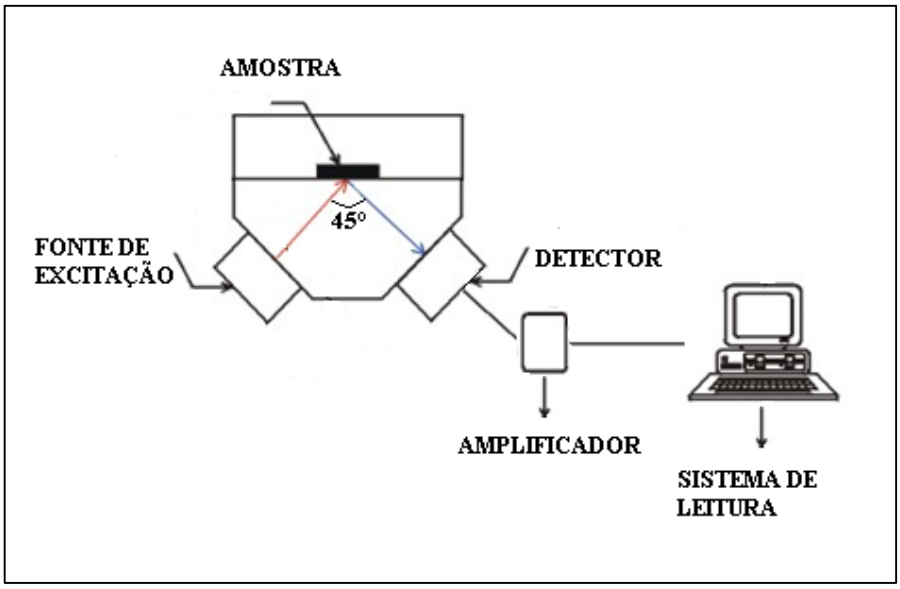



**Figura 12 - Configuração esquemática de um equipamento de Fluorescência de Raios X.**
**Fonte: Adaptado de Shackley (2012).**

Após a conversão dos fótons fluorescentes em pulso eletrônico, estes são processados eletronicamente através de pré-amplificadores e amplificadores que aumentam os níveis de tensão devido a uma primeira queda que ocorre no primeiro estágio do processo (CESAREO, 1988).

Os analisadores multicanais, compostos por um conversor analógico digital e uma memória, tem a função de medir cada variação de amplitude da sequência de pulsos e converter em número digital, o qual é armazenado em um histograma, para posterior análise e interpretação dos dados (CESAREO, 1988).

#### 2.9.1.2 Métodos de análise quantitativa para ED-XRF

Após a irradiação da amostra, sua composição química é representada pela intensidade da fluorescência destes elementos. Para obter uma resposta quantitativa, ou seja, saber a concentração destes elementos que estão presentes na amostra através de sua intensidade, dois procedimentos principais são usados: os métodos matemáticos e os métodos comparativos (TERTIAN e CLAISSE, 1982).

O primeiro grupo é utilizado para análise em amostras com concentrações definidas, onde o efeito matriz da mesma é calculado através de algoritmos e correções.

O segundo grupo são mais aplicados em análise parciais, e são divididos em três subgrupos: métodos de compensação (padrão externo, padrão interno, adição, diluição dupla), métodos de atenuação minimizada (diluição, filme fino) e métodos de correção por atenuação (intensidade espalhada, transmissão-emissão). Para verificar a quantidade de elementos presentes nas amostras é necessária uma curva de calibração que represente um padrão de concentração conhecida para posterior análise. Assim as intensidades fluorescentes e a radiação espalhada primária são proporcionais a absorção das amostras, o que faz com que sua taxa seja praticamente independente do efeito matriz (TERTIAN e CLAISSE, 1982).

# 3 MATERIAIS E MÉTODOS

## 3.1 AMOSTRAS

Foram utilizadas amostras de tecido mamário canino da espécie *Canis lúpus familiaris*, coletadas de um laboratório de patologia veterinária da região metropolitana de Curitiba após análises histopatológicas.

O Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UTFPR) encontra-se aprovado e em Anexo A deste trabalho. O projeto foi protocolado com n° 2015-17. Todos os procedimentos da pesquisa estão de acordo com a Lei n° 11.794 de outubro de 2008.

Ao total obtivemos 56 amostras, sendo de tecido mamário neoplásico benigno e maligno de cadela, além de conter um grupo de hiperplasias mamárias, um hamartoma, uma paniculite e um linfoma difuso, cujo exemplo de laudo encontra-se em Anexo B.

Após coletadas, as amostras foram armazenadas em formol tamponado a 10% (formalina) e mantidas a temperatura ambiente. No momento das medidas foram colocadas em um porta amostra específico e o excesso de formol removido com o auxílio de um papel absorvente.

As cinquenta e seis amostras tiveram suas principais características tabuladas na Tabela 1. Ainda a Figura 13 representa a aparência macroscópica típica dos tipos de alterações mais comuns. Todo o acervo de imagens macroscópica das amostras encontra-se em APÊNDICE A – IMAGEM MACROSCÓPICA DE GRUPO DE AMOSTRAS NEOPLÁSICAS E GRUPO DE AMOSTRAS DIVERSOS.

**Tabela 1 - Amostras de tecido mamário canino recebidas para análise. Consta na tabela tipo de tecido, o grau da neoplasia quando houver, a raça e a idade dos animais (SDR – Raça não definida).**

| Amostra | Tipo | Grau | Raça | Idade |
|---|---|---|---|---|
| 15- 1888 | Carcinoma mamário simples cístico | 1 | SDR | 12 anos |
| 15- 1905 | Carcinoma em tumor mamário misto | 1 | Yorkshire | 8 anos |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 15- 2102 | Carcinoma em tumor mamário misto | 2 | SDR | 4 anos |
| 15- 2290 | Tumor benigno misto | | SDR | 10 anos |
| 15- 2261 | Tumor benigno misto | | Poodle | 13 anos |
| 15 -2331 | Tumor maligno tubular | 1 | Basset | 5 anos |
| 15- 2341 | Carcinoma em tumor misto | 1 | SDR | 6 anos |
| 15- 2344 | Tumor benigno misto | | SDR | 10 anos |
| 15- 2386 | Tumor maligno tubular papiliforme | 1 | SDR | 9 anos |
| 15-2540 | Tumor maligno tubular cístico | 1 | Poodle | 5 anos |
| 15- 2775 | Carcinoma em tumor misto | 2 | Yorkshire | 12 anos |
| 15- 2782 | Tumor benigno misto | | Yorkshire | 7 anos |
| 15- 2788 | Tumor maligno tubular | 1 | Poodle | 7 anos |
| 15- 2789 | Tumor maligno tubular papiliforme | 1 | SRD | 8 anos |
| 15- 2855 | Carcinoma em tumor misto | 1 | Yorkshire | 5 anos |
| 15- 2863 | Tumor maligno tubular papiliforme | 2 | Poodle | 9 anos |
| 15- 2869 | Paniculite neutrófilica | | ShihTzu | 3 anos |
| 15- 2876 | Tumor maligno simples tubular sólido | 2 | SRD | 13 anos |
| 15- 2877 | Adenoma simples cístico | | SRD | 6 anos |
| 15- 3018 | Adenoma simples tubular | | Poodle | 10 anos |
| 15- 3019 | Tumor benigno misto | | Maltês | 5 anos |
| 15- 3072 | Tumor maligno cístico papiliforme | 1 | American Staffordshire | não inf |
| 15- 3091 | Tumor benigno misto | | Poodle | 8 anos |
| 15- 3105 | Sarcoma (Osteossarcoma) | | SRD | 13 anos |
| 15- 3184 | Tumor maligno tubular papiliforme | 2 | SRD | não inf |
| 15- 3208 | Tumor benigno misto | | Poodle | 6 anos |
| 15- 3280 | Tumor maligno tubular | 1 | SRD | 7 anos |
| 15- 3373 | Tumor benigno misto cístico | | Spitz Alemão | 15 anos |
| 15- 3415 | Linfoma Difuso | | Pinscher | 14 anos |
| 15- 3462 | Tumor maligno simples tubular infiltrativo | 3 | ShihTzu | 11 anos |
| 15- 3473 | Tumor maligno tubular papiliforme | 1 | SDR | 11 anos |
| 15- 3547 | Hiperplasia nodular | | Dachshund | 7 anos |
| 15- 3571 | Tumor maligno tubular cístico | 1 | Dachshund | 10 anos |
| 15- 3599 | Hiperplasia | | Pitbull | 7 anos |
| 15- 3610 | Carcinoma em tumor misto | 1 | Poodle | 8 anos |
| 15- 3637 | Hemangioma cutâneo | | Pitbull | 5 anos |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 15- 3686 | Hiperplasia nodular cística | | Yorkshire | 8 anos |
| 15- 3743 | Tumor maligno indiferenciado | | SRD | 10 anos |
| 15- 3801 | Hamartoma colagenoso | | Dachshund | 12 anos |
| 15- 3805 | Hiperplasia nodular | | Poodle | 8 anos |
| 15- 3890 | Carcinoma em tumor misto | 1 | SRD | 8 anos |
| 15- 3954 | Tumor benigno misto | | SRD | 9 anos |
| 15- 3955 | Adenoma simples cístico | | Bull Terrier | 6 anos |
| 15- 4042 | Carcinoma em tumor misto | 1 | Pinscher | 8 anos |
| 15- 4076 | Carcinoma em tumor misto | 1 | Cocker | 14 anos |
| 15- 4085 | Adenoma papiliforme | | Poodle | 13 anos |
| 15- 4090 | Tumor maligno tubular | 1 | Schnauzer | 7 anos |
| 15- 4099 | Tumor maligno simples ductal sólido | 1 | Rottweiler | 9 anos |
| 15- 4102 | Tumor benigno misto | | Poodle | não inf |
| 15- 4132 | Carcinoma em tumor misto | 1 | Poodle | 8 anos |
| 15- 4345 | Carcinoma em tumor misto | 1 | Cocker | 7 anos |
| 15- 4347 | Tumor maligno tubular papiliforme | 1 | SRD | 13 anos |
| 15- 4412 | Carcinoma em tumor misto | 1 | Poodle | 7 anos |
| 15- 4428 | Tumor benigno misto | | Boxer | 7 anos |
| 15- 4495 | Adenoma tubular cístico | | Yorkshire | 10 anos |
| 15- 4509 | Carcinoma em tumor misto | 1 | Poodle | 11 anos |

**Fonte: Autoria própria. Retirado dos dados de laudos da clínica veterinária.**

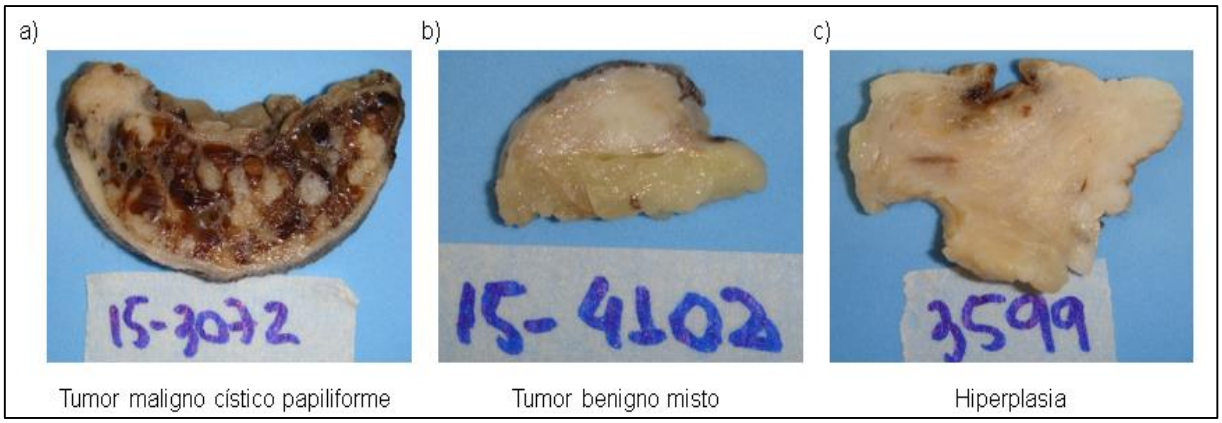



**Figura 13 – Imagens macroscópicas de três amostras analisadas das alterações mais comumente encontradas. Em a) neoplasia maligna, em b) neoplasia benigna e em c) hiperplasia. Fonte: Autoria própria.**

Após analisar os dados contidos na Tabela 1, podemos retirar informações importantes sobre os mesmos que corroboram com a literatura encontrada, como a idade média de acometimento do câncer de mama em cadelas, maior prevalência da raça e os tipos de neoplasias caninas mais verificadas nas amostras desta pesquisa.

Idade média dos animais: 8,75 anos. Este dado corrobora com o que consta em Moe, 2001, visto que a média de idade para o aparecimento de tumores em cadelas segundo o autor é de 7,8 anos a 8,8 anos.

Raça: com exceção das raças não definidas (SRD) que compõe um total de 30,36%, a raça mais acometida nesta pesquisa é o Poodle, com um total de 25% destes animais. Este dado também está de acordo com o autor White, 2007, visto que o mesmo afirma que as raças predispostas para neoplasia mamária são o Poodle e Cocker Spaniel.

Neoplasias: 57,14% das neoplasias deste grupo de estudo são malignos, 30,36% são benignos e 12,5% são classificados como grupo diversos, onde consta hiperplasias, paniculite, hamartoma e linfoma difuso. Estes valores estão de acordo com demais autores, visto que mais da metade das neoplasias mamárias caninas são classificadas como malignas (DALECK, FRANCESCHINI, *et al*., 1998; ANDRADE, AQUINO, *et al.,* 2001; D'OLIVEIRA, IBANEZ, *et al.,* 2001; OLIVEIRA, OLIVEIRA, *et al.*, 2003; FILGUEIRA, 2003). Dos tumores benignos estudados no laboratório, 64,7% foram classificados como tumores benignos mistos, o que corrobora com resultados encontrados em outros trabalhos (O'KEFFE, 1997; JOHNSTON, KUSTRITZ e OLSON, 2001).

## 3.2 ARRANJO EXPERIMENTAL

### 3.2.1 Equipamento para ED-XRF

O Laboratório de Espectroscopia de Raios X da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR – Campus Curitiba) possui um kit para experimentos de ED-XRF da Amptek. Este kit é composto basicamente de um tubo de raios X modelo

Mini-X com alvo de prata (Ag), um detector semicondutor *silicondrift,* modelo *X-123SDD* (4096 canais) com janela de berílio (Be), conforme Figura 14, e um microcomputador para controle e análise dos espectros obtidos. A análise da emissão dos espectros foi realizada pelo software *DPP-MCA* que faz parte do sistema *Amptek®*.

O tubo de raios X possui um ponto focal de 2mm e opera com uma tensão que varia de 10 kV a 40 kV e uma corrente de 5 µA a 200 µA, sendo o tempo determinado manualmente pelo operador.

O detector é um detector semicondutor *silicondrift,* modelo *X-123SDD*, com uma área ativa de 7 mm², cujas características principais estão descritas na Tabela 2.

O tubo e o detector estão em um ângulo de 45° entre si. O ângulo entre o tubo e amostra e entre a amostra e o detector é de 67,5°, segundo dados do fabricante.

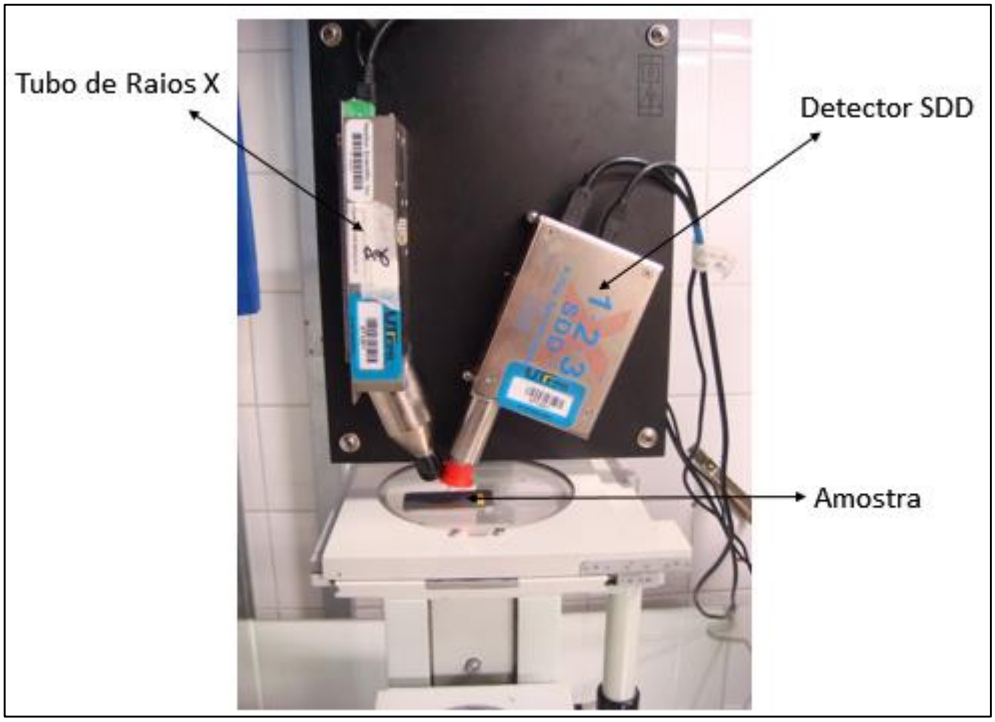



**Figura 14 - Imagem do equipamento de Fluorescência de Raios X do Laboratório de Espectroscopia de Raios X da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Fonte: Autoria Própria.**

**Tabela 2 - Desempenho da espectroscopia do equipamento de fluorescência de raios X marca Amptek®, segundo dados do fabricante.**

| | |
|---|---|
| Alcance energético | Eficiência >25% para raios X de 1 a 25 keV |
| Picos de *background* | 7000 a 1 (entre 5,9 keV a 2 keV) |
| Resolução energética | 135 a 155 eV FWHM/5.9 keV |
| Ruído do sinal | 73 eV FWHM |
| Taxa de contagem máxima | Varia entre $1{,}0 \times 10^5$ a $4{,}9 \times 10^4$ ($seg^{-1}$) |

**Fonte: Adaptado do manual da Amptek®.**

### 3.2.2 Calibração do Detector

O espectro de Raios X é calibrado a cada vez que o software *DppMCA* é ligado para uma aquisição. Uma amostra padrão de aço, fornecida juntamente com o kit de ED-XRF, cuja função é calibrar o espectro de raios X. Este padrão apresenta elementos e suas concentrações conhecidas. Conforme recomendação técnica, o espectro foi calibrado com a técnica de 30 kV e 30 μA à uma distância de 1 cm da amostra ao equipamento e por sessenta segundos.

Para as medidas experimentais com tecidos mamários caninos foi utilizado 30 kV e 100 μA com tempo de exposição de 1000 segundos. Ainda, foi comprovado em trabalho anterior deste grupo de pesquisa (Castilho, 2014), que a inserção de um colimador de 1mm e um filtro de 0,25 mm de Al na saída do tubo realça a fluorescência para tecidos biológicos.

## 3.3 METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE ELEMENTOS

### 3.3.1 Padrões de Calibração: Método do Padrão Externo

Para se quantificar a concentração de elementos traço é necessário que o sistema esteja previamente calibrado para aquele(s) determinado(s) elemento(s) a ser(em) investigado(s). O processo de calibração consiste em utilizar um padrão com concentrações conhecidas cuja matriz seja semelhante à das amostras a serem analisadas. Para isso, existem os métodos de compensação, atenuação minimizada e correção por atenuação, conforme demostrado no tópico 2.9.1.2. Porém neste trabalho foi utilizado o método do padrão externo. Este é um método bastante empregado em análises em que as variações do efeito matriz são pequenas. Este método consiste em comparar a concentração de elementos traços presente em padrões para calibração (concentrações previamente conhecidas) com o uso de curvas de calibração (intensidade fluorescente vs concentração) (TERTIAN e CLAISSE, 1982).

Segundo Poletti *et al.* (2002), um bom material equivalente para simular a matriz destes tecidos seria a água. Portanto as soluções dos padrões de calibração foram feitas com água destilada e sais. A fim de identificar e quantificar a concentração dos elementos traço Ca, Fe, Cu e Zn, foram utilizados os sais $CaSO_4.2H_2O$, $FeCl_3.6H_2O$, $Cu(NO_3)_2.3H_2O$ e $ZnSO_4.7H_2O$, respectivamente, para a confecção dos padrões.

O Manual de Soluções, Reagentes e Solventes de Morita e Assumpção, 2007 foi utilizado como base para a confecção dos padrões de calibração e padronizar este método (MORITA e ASSUMPÇÃO, 2007).

As massas dos sais foram medidas em balança analítica da marca *Shimadzu*®, modelo *AUY-220*, com sensibilidade de 0.1 mg.

A concentração inicial dos sais eram de: 400 mg/kg a 35 mg/kg para o $CaSO_4.2H_2O$ com 98% de pureza, 20 mg/kg a 2 mg/kg de $FeCl_3.6H_2O$ com 97% de pureza, 10 mg/kg a 1 mg/kg de $Cu(NO_3)_2.3H_2O$ com 98% de pureza, e 100 mg/kg a 9 mg/kg de $ZnSO_4.7H_2O$ com 99% de pureza. Após a pesagem dos sais os mesmos foram reservados em porta-amostras específicos. Este valor de concentração foi escolhido de acordo com a faixa esperada de concentração dos elementos em tecido mamário humano normal e neoplásico segundo a literatura, porém os padrões de Cu e Zn foram aumentados em 10 vezes, devido a concentração ser muito pequena (RIZK e SKY-PECK, 1984; GERAKI, FARQUHARSON e BRADLEY,2002; POLETTI *et al.*, 2004, SILVA, 2007).

A primeira solução foi realizada com água destilada, em temperatura ambiente, com a ajuda de um balão volumétrico de 500 ml e um Becker para a determinação do volume. A água destilada foi colocada no balão volumétrico e o sal foi acrescentado. As soluções foram feitas separadamente, sendo que cada solução ficou com apenas um elemento traço de interesse. Diluições posteriores foram feitas de cada solução para termos concentrações variadas de cada elemento. Foram feitas quatro diluições posteriores (sendo a solução mãe (1) + quatro diluições posteriores (4)), e assim construir a curva de calibração.

Para a pesagem dos sais, foi calculado quantas gramas de cada sal era necessário pesar na balança para que o peso tivesse o valor de mg/kg desejado. Para este processo é preciso considerar o peso molecular do sal como um todo, incluindo a hidratação do mesmo e sua porcentagem de pureza. Como o interesse é apenas o elemento traço presente em cada um dos sais, apenas o peso atômico deste elemento foi considerado.

Este cálculo é realizado conforme exemplo na Tabela 3 para o $CaSO_4.2H_2O$:

**Tabela 3 - Exemplo do cálculo para encontrar o peso molecular do sal inorgânico $CaSO_4.2H_2O$.**

| Peso atômico | Ca = 40.08 | S = 32.064 | O = 15.999 | H = 1.007 | |
|---|---|---|---|---|---|
| N° de elementos | 1 | 1 | 6 | 4 | TOTAL |
| Peso molecular | 40,08 | 32,064 | 95,994 | 4,028 | 172,17 |

**Fonte: Autoria própria.**

Sabendo o peso molecular do sal é possível descobrir o quanto deve ser pesado na balança para termos “X” mg/kg de solução. Como o peso atômico do Ca é 40,08, e deseja-se para a solução mãe uma concentração de 400 mg/kg de Ca, a seguinte relação é necessária:

$$X = \frac{172{,}17 \times 0{,}2}{40{,}08} \quad (5)$$

Sendo X o valor em gramas que desejasse encontrar, 172,17 o peso molecular do sal, 0,2 o valor de 400 mg/kg de Ca (balão volumétrico de 500 ml e calculado em

gramas: 400 mg/kg em 1000 ml – 0,2 gramas em 500 ml) e 40,08 o valor do peso atômico do Ca.

Sabendo disso tem-se que X = 0,860 gramas. Como a pureza do sal é de 98%, então o que devesse pesar na balança é 0,860x0,98 = 0,878 gramas.

Estes cálculos foram repetidos para todos os outros três sais, tendo um valor de pesagem para obter a quantidade de mg/kg desejado na solução mãe (solução que contém a máxima concentração), conforme pode ser visualizado em Tabela 4.

**Tabela 4 - Valor em gramas dos sais inorgânicos para pesagem na balança analítica para obter a quantidade de mg/kg desejada.**

| Tipo do sal inorgânico | Valor mg/kg desejado | Peso em gramas |
|---|---|---|
| $CaSO_4.2H_2O$ | 400 | 0,878 |
| $FeCl_3.6H_2O$ | 20 | 0,049 |
| $Cu(NO_3)_2.3H_2O$ | 10 | 0,019 |
| $ZnSO_4.7H_2O$ | 100 | 0,222 |

**Fonte: Autoria própria.**

Como temos o valor máximo e o valor mínimo da concentração desejada para cada sal (400 mg/kg a 35 mg/kg para o $CaSO_4.2H_2O$, 20 mg/kg a 2 mg/kg de $FeCl_3.6H_2O$, 10 mg/kg a 1 mg/kg de $Cu(NO_3)_2.3H_2O$ , e 100 mg/kg a 9 mg/kg de $ZnSO_4.7H_2O$), três pontos intermediários foram calculados para que cada elemento químico tivesse cinco pontos de concentração:

$$y = \left(\frac{C_{máx} - C_{mín}}{4}\right)$$
$$C_2 = C_{máx} - y$$
$$C_3 = C_2 - y \qquad 6$$
$$C_4 = C_3 - y$$
$$C_5 = C_4 - y = C_{mín}$$

Portanto, com os cinco pontos de concentração de cada elemento químico, pode-se calcular o volume a ser diluído através da solução mãe (solução que contém a máxima concentração) e obter o valor de concentração desejado. Como exemplo em Tabela 5, pode-se verificar o procedimento adotado para o Ca:

**Tabela 5 - Valores de concentração do elemento químico Ca.**

| Descrição | Concentração (mg/kg) |
|---|---|
| $C_{máx}$ | 400 |
| $C_2$ | 308 |
| $C_3$ | 217 |
| $C_4$ | 126 |
| $C_{mín}$ | 35 |

**Fonte: Autoria própria.**

Sabe-se que para o processo de diluição a seguinte relação deve ser cumprida:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \quad (7)$$

Para o Ca tem-se que: $C_1$ ($C_{máx}$) = 400 mg/kg, $V_1$ é o que desejasse encontrar, $C_2$ = 308 mg/kg e $V_2$ = 500 ml (volume do balão volumétrico).

$$400 \times V_1 = 308 \times 500$$
$$V_1 = 385\ ml$$

Neste valor $V_1$ = 385 ml acrescenta-se água destilada até completar o volume total de 500 ml (500 ml – 385 ml) para obtermos o valor de diluição para uma concentração $C_2$ = 308 mg/kg. Os 115 ml que foram retirados da solução mãe são reservados em um porta amostra específico e torna-se o primeiro padrão de calibração líquido com 400 mg/kg.

Todo este processo é repetido até obtermos todas as cinco concentrações necessárias dos quatro elementos químicos de interesse. Ao todo tem-se vinte padrões de calibração. Cada padrão líquido foi colocado em um porta amostra específico de volume conhecido (1,056 $cm^3$) e irradiado com uma técnica de 30 kV, 100 μA durante 1000 segundos de exposição a uma distância de 1 cm da fonte à amostra, e repetido por três vezes.

A incerteza associada à área do fotopico dos elementos traço nestes padrões é representa pela soma da contribuição da incerteza na medição da massa dos sais, do volume de água, eficiência do detector, a incerteza no ajuste da curva Gaussiana e no desvio padrão da média das três exposições. Para verificar que existe uma relação linear entre as variáveis estudadas, considera-se o coeficiente de correlação de Pearson "r", o mais próximo o valor de 1, o que indica que há uma relação linear entre os pontos.

### 3.3.2 Curvas de Calibração

Após todos os padrões de calibração irradiados e os espectros obtidos, o software *pyMCA* foi utilizado para selecionar a área do fotopico do elemento de interesse, visto que a curva de calibração consiste na quantidade de fótons fluorescente x concentração do elemento traço. A área do fotopico neste software é obtida através do ajuste à área gaussiana. A intensidade fluorescente é a área do fotopico que obtemos com a irradiação do padrão e a concentração do elemento é conhecida.

Para confeccionar a curva de calibração e linearizar os valores obtidos, o *software Origin Pro 8.0* foi utilizado neste procedimento. A partir disto pode-se obter a sensibilidade da técnica para aquele determinado elemento.

### 3.3.3 Validação do Método: Código X-Ray Monte Carlo (XRMC)

As simulações de pesquisas com raios X normalmente são realizadas através de códigos determinísticos, pois são fáceis e rápidos de serem empregados, porém perdem em eficiência para experimentos mais complexos como é o caso da Fluorescência de Raios X. Códigos probabilísticos, como códigos de Monte Carlo simples são aplicados neste caso. Contudo, a aplicação deste método implica em um elevado tempo computacional, e não é adequado para simulações de emissão fluorescente de elementos com baixa concentração, como são os elementos traço.

Assim o Código X-Ray Monte Carlo foi desenvolvido especialmente para simulação em espectroscopia de raios X e em imagem (GOLOSIO, 2014).

Este código combina o método de Monte Carlo com técnicas de redução de variância, o que reduz consideravelmente o tempo computacional e permite simular experimentos de XRF (GOLOSIO, 2014).

Neste trabalho foi utilizado o código XRMC para validar a metodologia usada nos experimentos de ED-XRF, através da simulação das respostas esperadas para os ensaios experimentais com os padrões líquidos de calibração com as diferentes concentrações dos elementos traço aqui estudados. Foram simulados os experimentos para levantamento das curvas simuladas de calibração para serem comparadas com as experimentais (Simulado vs Experimental).

A simulação do tubo de raios X utilizado, bem como a geometria do arranjo e da composição da amostra foi considerado para simular o resultado o mais próximo do que foi feito experimentalmente, cujos códigos são apresentados no APENDICE B

### 3.3.4 Irradiação das Amostras

As amostras de tecido biológico foram retiradas do formol e seu excesso removido com o auxílio de um papel absorvente. A área tumoral de interesse foi extraída do tecido com o auxílio de um bisturi cirúrgico. Esta região foi irradiada com técnica de 30 kV, 100 μA e 1000 segundos de exposição e 1 cm de distância da fonte à amostra. Três pontos da amostra foram escolhidos e irradiados com o objetivo de melhorar a área total a ser estudada (sendo área do ponto focal 1 $mm^2$).

Ao total foram irradiadas: quarenta e nove amostras de tecido neoplásico (tecido neoplásico benigno e maligno) e sete amostras de tecido diverso (hiperplasias, paniculite, hamartoma e linfoma difuso). Ainda, das amostras neoplásicas, em sete delas foi extraída a parte saudável que se encontrava na periferia da amostra e, estas foram denominadas de tecido normal periférico. Cada amostra foi irradiada três vezes, em pontos diferentes. A área do fotopico também foi selecionada pelo software *pyMCA*, e a concentração de cada elemento traço de interesse foi determinada através da sensibilidade obtida das curvas de calibração dos padrões líquidos confeccionados.

## 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para realizarmos a análise estatística, primeiramente foi verificado se os testes a serem aplicados seriam paramétricos ou não paramétricos. O software utilizado para as análises estatísticas foi o *XLSTAT* (*Statistical Software and Data Analysis in Excel*). Para isso, foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk em todos os dados, para verificar se os mesmos tinham distribuição normal. Neste caso, foi adotado um nível de significância de 0,05 e rejeitou-se a hipótese de distribuição normal (ESTATCAMP, DIGUP, 2015).

Assim, foram aplicados testes não paramétricos em duas configurações: amostras pareadas e não pareadas. Amostras pareadas são aquelas que provem do mesmo espécime de estudo, e amostras não pareadas são de espécimes diferentes.

Neste estudo foi utilizado o teste não paramétrico para amostras pareadas de Wilcoxon, com tratamento dos empates de Hollander & Wolfe, para saber se há variação significativa na concentração de elementos traços presentes no tecido normal periférico e no tecido neoplásico, visto que aquela provém da mesma amostra que esta. Neste teste analisa-se se a distribuição das duas amostras é a mesma ou se são diferentes. Se o p-valor calculado for menor que o nível de significância $\alpha$ = 0,05, considera-se que a distribuição das amostras é diferente (ESTATCAMP, DIGUP, 2015).

Para as amostras não pareadas, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, para verificar se há diferença estatisticamente significativa entre os grupos de amostras estudados. Se o p-valor calculado for menor que o nível de significância $\alpha$ = 0,05, considera-se que a distribuição das amostras é diferente (ESTATCAMP, DIGUP, 2015).

Durante a quantificação das amostras, verificou-se a necessidade de realizar uma comparação entre a variação na concentração dos elementos traço entre as amostras neoplásicas benignas e malignas, sendo estas do mesmo grupo. Para verificar se há diferença significativa entre a concentração dos elementos traços Ca, Fe, Cu e Zn presentes nas neoplasias o teste não paramétrico de Kolmogorov-

Smirnov foi utilizado para este fim, onde o se o p-valor calculado for menor que o nível de significância $\alpha$ = 0,05, considera-se que há diferença significativa entre os elementos (ESTATCAMP, DIGUP, 2015).

Outro teste utilizado foi o teste não paramétrico de correlação de Spearman entre pares de elementos. Foi realizado em tecidos normais periféricos, tecidos diversos e tecidos neoplásicos. Aqui verifica-se se os dados se aproximam de uma reta, e sua variação de 1 a -1. Com isso há uma associação direta quando o valor é 1 e uma associação inversa quando o valor é -1, sendo o valor 0 considerado como ausência de correlação (ESTATCAMP, DIGUP, 2015).

## 3.5 CONTRIBUIÇÕES ESPÚRIAS E LIMITE DE DETECÇÃO

### 3.5.1 Porta Amostras e Porta Amostras + Água

Neste trabalho um porta amostra cilíndrico de silicone com 1,16 cm de diâmetro e 1 cm de altura foi utilizado para analisar todos os padrões líquidos. A água destilada foi utilizada aqui para simular a matriz de tecido biológico, visto a grande similaridade entre eles. A Figura 15 a seguir representa o espectro do porta amostra sem água e a Figura 16 do porta amostra com a água destilada, sem a adição de nenhum elemento traço ainda.

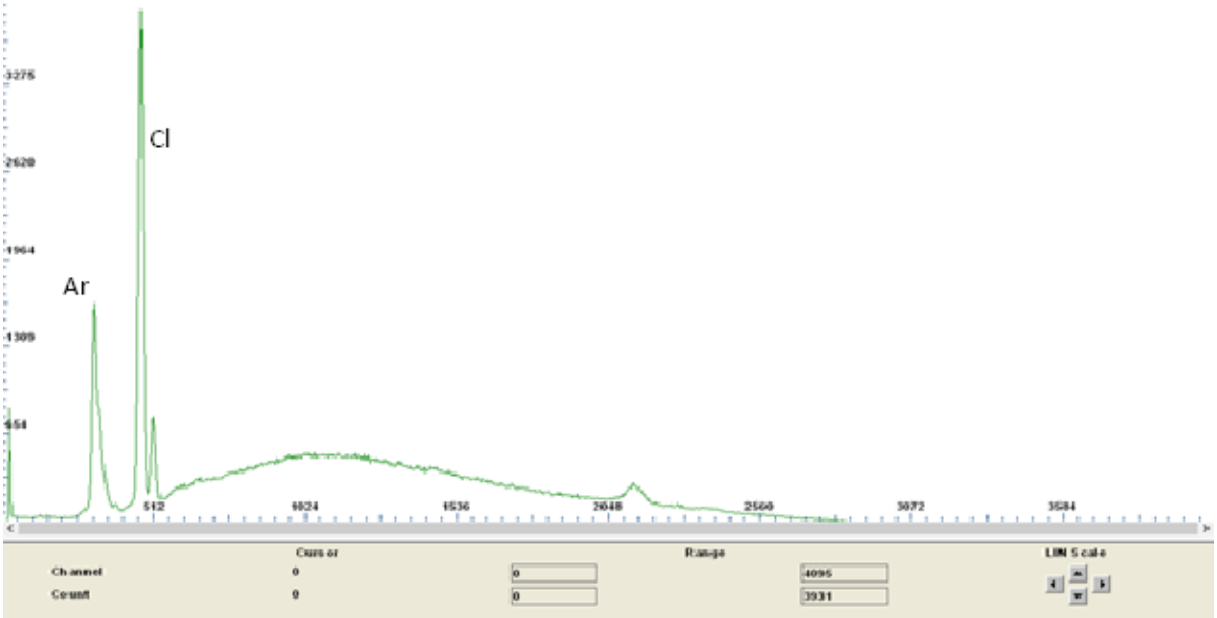



**Figura 15 – Espectro do porta amostra sem água destilada. Utilizado como uma das primeiras partes do processo para verificar o branco da análise.**
**Fonte: Espectro do equipamento de fluorescência de raios X da marca Amptek®.**

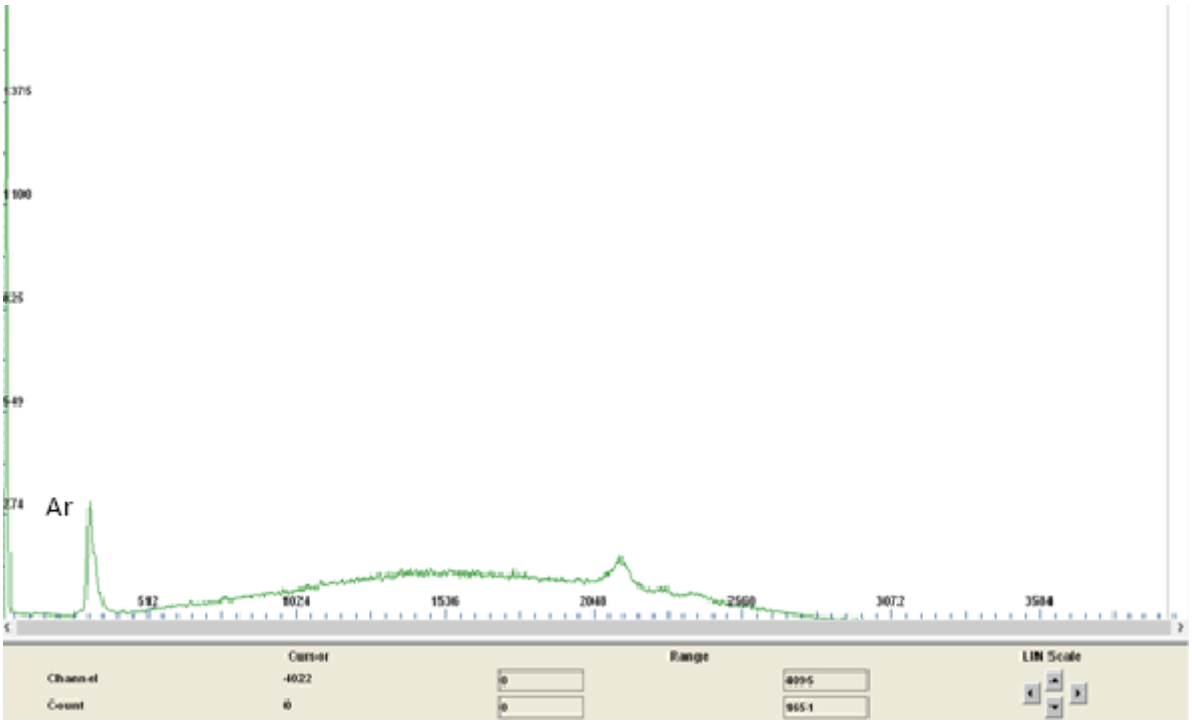



**Figura 16 – Espectro do porta amostra com água destilada. Utilizado como uma das primeiras partes do processo para verificar o branco da análise.**
**Fonte: Espectro do equipamento de fluorescência de raios X da marca Amptek®.**

Pode-se perceber que na Figura 15 um pico de Argônio (Ar) Cl aparece, sendo que este representa o material do porta amostra e aquele a presença de um sistema aberto. Já na Figura 16, apenas o espalhamento da água pode ser visualizado, bem como um pico de Ar no início do espectro. Nenhum elemento traço a ser estudado

aparece neste espectro, o que faz com que não seja necessário fazer nenhum tratamento prévio para desconsiderar concentrações dos elementos. Vale considerar aqui que o mesmo espectro também foi submetido à análise da área do fotopico pelo *software pyMCA* para verificar se realmente nenhuma área de algum elemento traço de interesse apareceria.

### 3.5.2 Limites de Detecção

Os limites de detecção foram calculados com o objetivo de verificar o valor mínimo de concentração que o equipamento de fluorescência de raios X consegue detectar. Esta análise foi feita com base na relação entre os picos fluorescentes e o background para cada elemento de interesse: Ca, Fe, Cu e Zn. A seguinte equação é necessária para este cálculo: $LD_i=3\times C_i\sqrt{N_{BG}}/N_i$, sendo que $C_i$ representa a concentração do elemento i, $N_{BG}$ o número de contagens por segundo do background em relação ao elemento i e $N_i$ o número de contagens por segundo do pico fluorescente do elemento i (SILVA, 2007).

Os limites de detecção encontrados para o Ca, Fe, Cu e Zn quando submetidos à irradiação com o equipamento de fluorescência de raios X foram de aproximadamente: 4mg/kg para o Ca, 1,8 mg/kg para o Fe, 0,2 mg/kg para o Cu e 0,1 mg/kg para o Zn.

## 3.6 CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Para cada elemento químico de interesse, uma curva de calibração foi confeccionada a partir dos valores de área do fotopico obtidos através da irradiação dos padrões líquidos, e da concentração elementar desejada cujo espectro e a respectiva área do fotopico estão apresentados na Figura 17. A área do fotopico foi selecionada pelo software *pyMCA.*

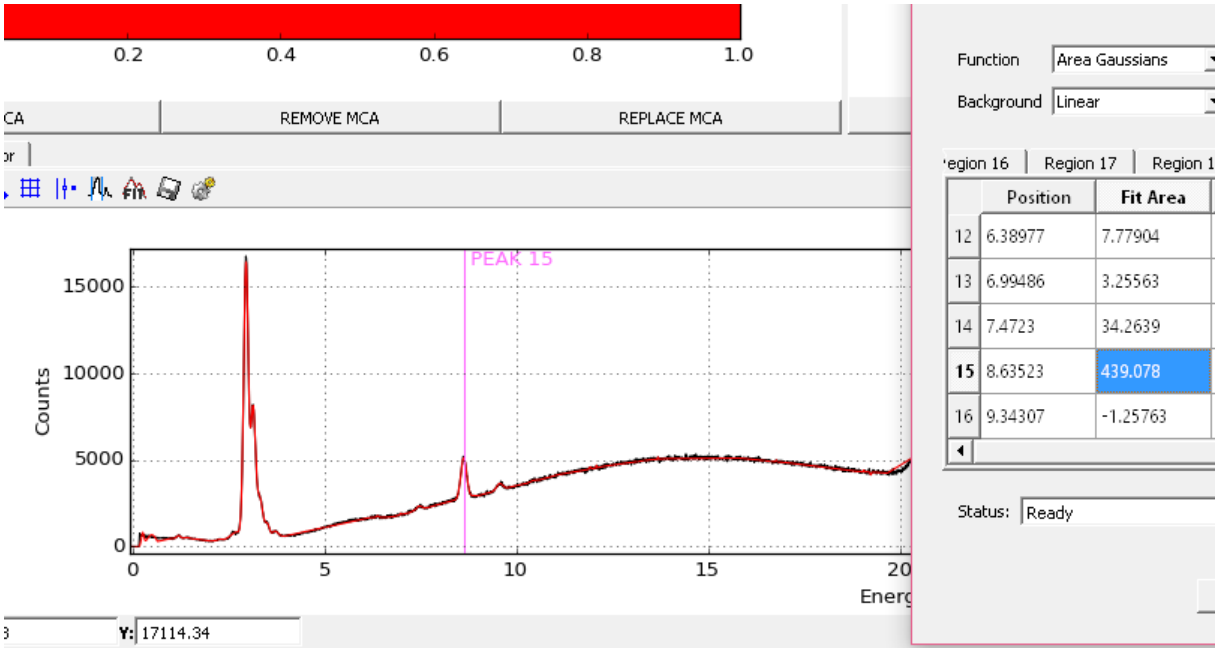



**Figura 17 - Espectro do elemento químico Zn obtida com o padrão líquido deste elemento. Pode-se perceber na figura a presença do pico Zn, bem como o seu valor de energia = 8,63 e a área do fotopico = 439,078.**

Foram construídas curvas de calibração relacionando a área do fotopico e os valores de concentração pré-estabelecidos, para cinco valores de concentração no *software Origin Pro 8.0*. Às curvas de calibração, foram ajustadas retas, onde o valor do coeficiente angular da mesma representa a sensibilidade para aquele determinado elemento (SILVA, 2007).

O valor da sensibilidade será utilizado para determinar a concentração dos elementos traço nas amostras a partir da relação:

$$C = Ar \times S \qquad 8$$

Sendo *C* a concentração do sal, *Ar* a área do fotopico e *S* a sensibilidade.

# 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta seção serão apresentados os resultados espectroscópicos bem como sua análise e discussões em relação às neoplasias caninas.

## 4.1 CURVAS DE CALIBRAÇÃO

A curva de calibração do Ca é representada no Gráfico 1. Pode-se observar uma relação linear entre a área do fotopico e a concentração elementar no intervalo de concentração pré-estabelecido (400 mg/kg a 35 mg/kg), visto um coeficiente r= 0,988.

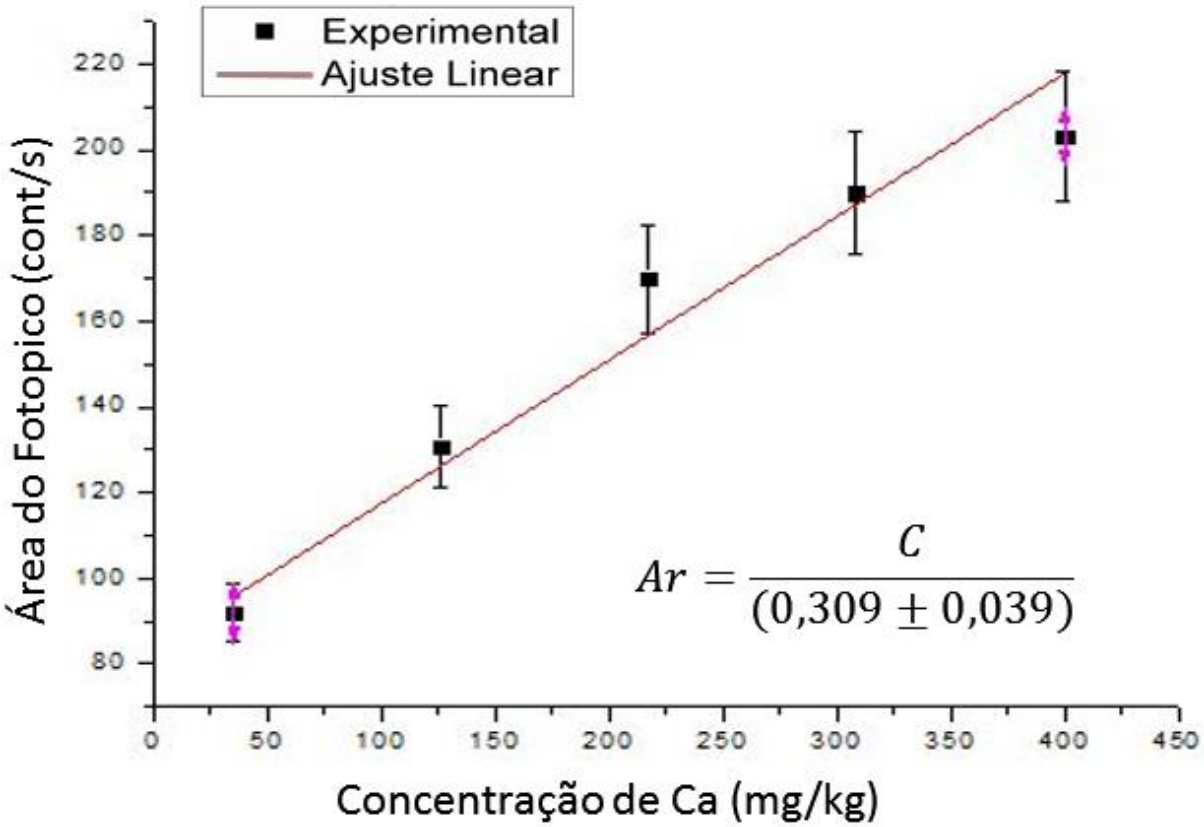



**Gráfico 1 - Curva de calibração para o elemento Ca.**
**Fonte: Gráfico gerado no *software Origin Pro 8.0*.**

Com estes dados, tem-se que a sensibilidade do arranjo experimental para o Ca é S = 0,309 ± 0,039

A curva de calibração do Fe é representada no Gráfico 2. Pode-se observar uma relação linear entre a área do fotopico e a concentração elementar no intervalo de concentração pré-estabelecido (20 mg/kg a 2 mg/kg), visto um coeficiente r= 0,992 e a sensibilidade encontrada foi de S = 3,633 ± 0,516. Como o a concentração de 2 mg/kg era muito próxima do limite de detecção do equipamento para o Fe, este valor foi desconsiderado.

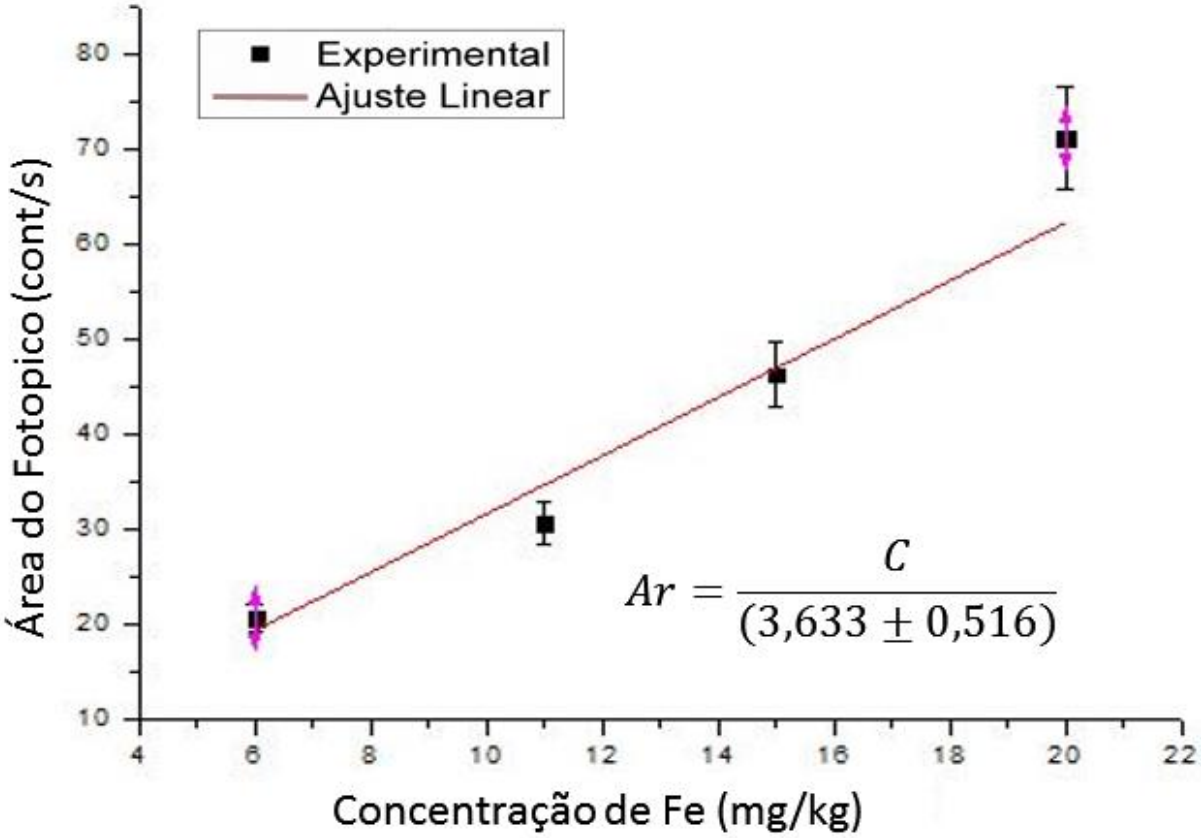



**Gráfico 2 - Curva de calibração para o elemento Fe.**
**Fonte: Gráfico gerado no *software Origin Pro 8.0*.**

A curva de calibração do Cu é representada no Gráfico 3. Pode-se observar uma relação linear entre a área do fotopico e a concentração elementar no intervalo de concentração pré-estabelecido (10 mg/kg a 1 mg/kg), visto um coeficiente r= 0,989.

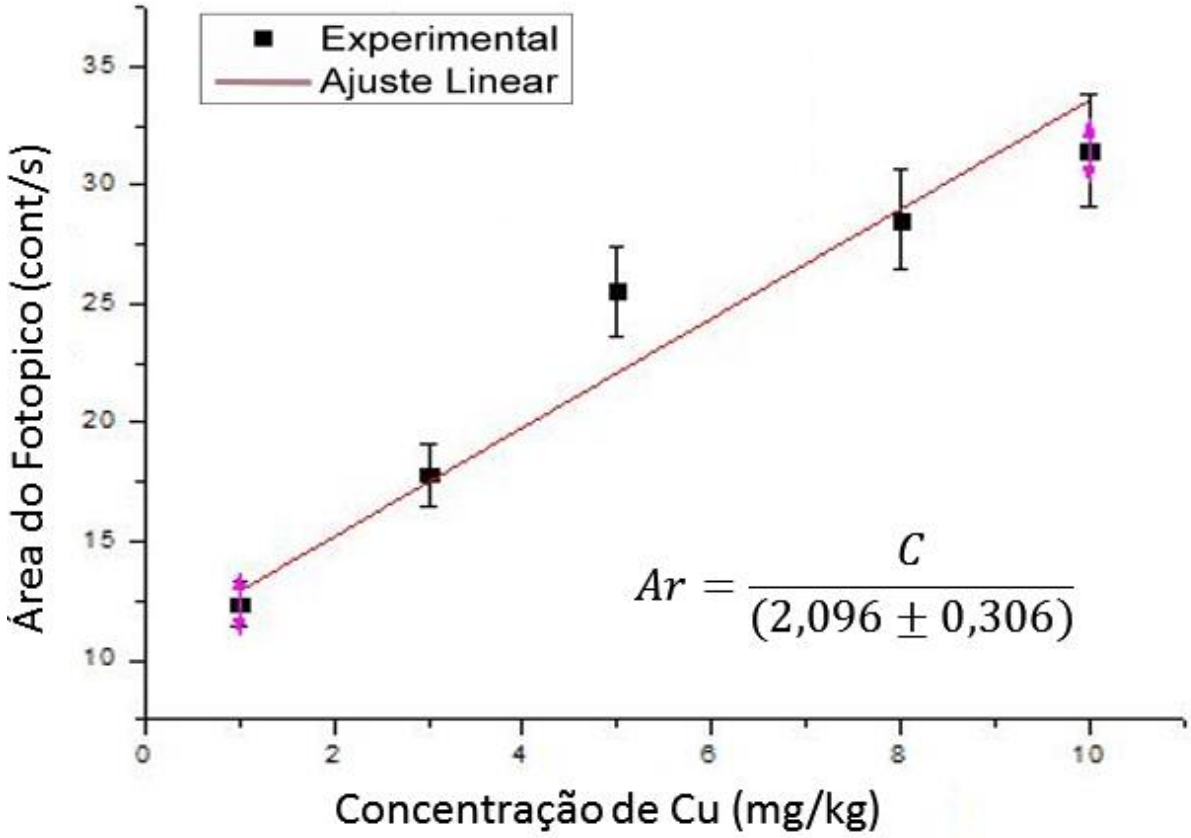



**Gráfico 3 - Curva de calibração para o elemento Cu.**
**Fonte: Gráfico gerado no *software Origin Pro 8.0*.**

Com estes dados, tem-se que a sensibilidade do Cu é S = 2,096 ± 0,306.

A curva de calibração do Zn é representada no Gráfico 4. Pode-se observar uma relação linear entre a área do fotopico e a concentração elementar no intervalo de concentração pré-estabelecido (100 mg/kg a 9 mg/kg).

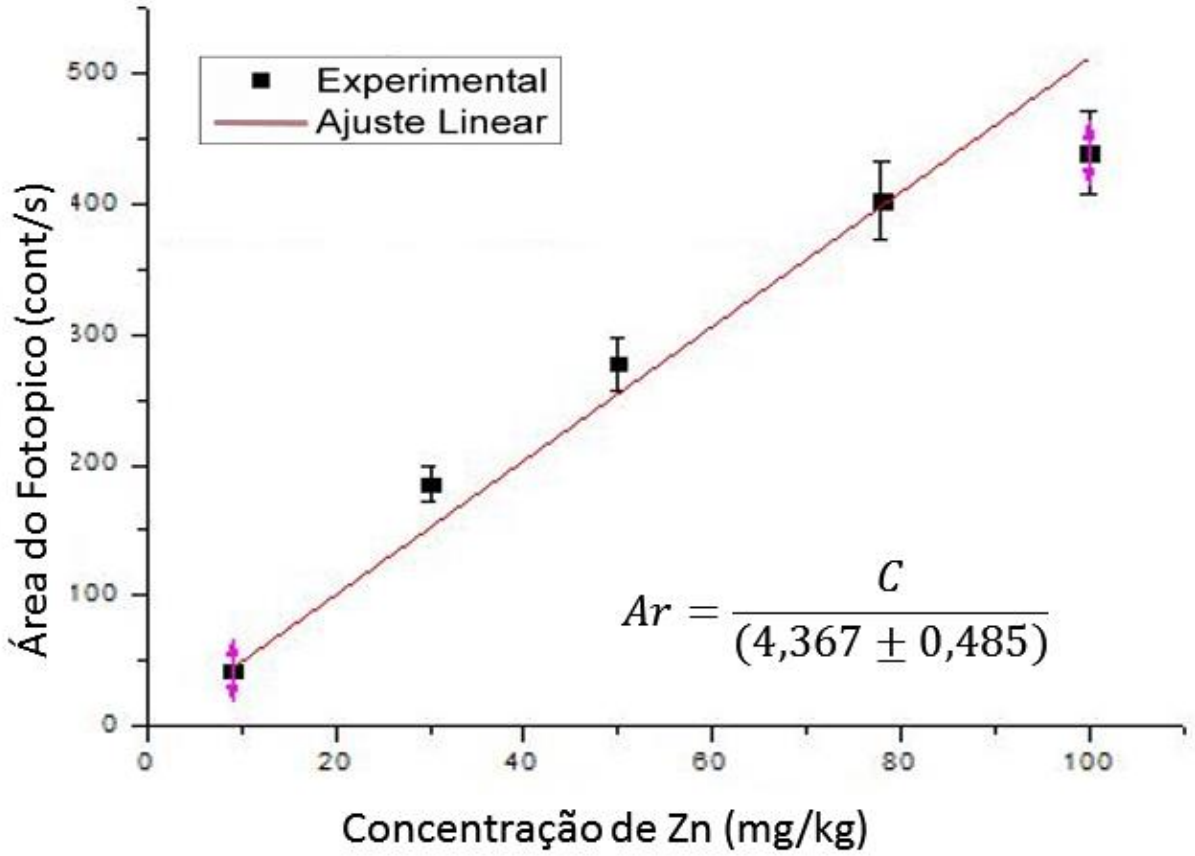



**Gráfico 4 - Curva de calibração para o elemento Zn.**
**Fonte: Gráfico gerado no *software Origin Pro 8.0*.**

Neste caso, tem-se que a sensibilidade para o Zn é S = 4,367 ± 0,485 e um coeficiente r = 0,988.

Portanto, com os valores de sensibilidades encontrados, foram analisados quantitativamente os elementos traços presentes nos tecidos mamários de cadelas, como os tecidos neoplásicos, os tecidos normais periféricos e os tecidos diversos, visto que todos apresentam uma matriz similar com a matriz de água.

## 4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Através do Código XRMC (GOLOSIO, 2014) foram simuladas as respostas experimentais esperadas para os padrões de calibração dos elementos traço Ca, Fe, Cu e Zn. As comparações entre as curvas experimentais e simuladas para estes elementos estão dispostas nos Gráfico 5, Gráfico 6, Gráfico 7 e Gráfico 8.

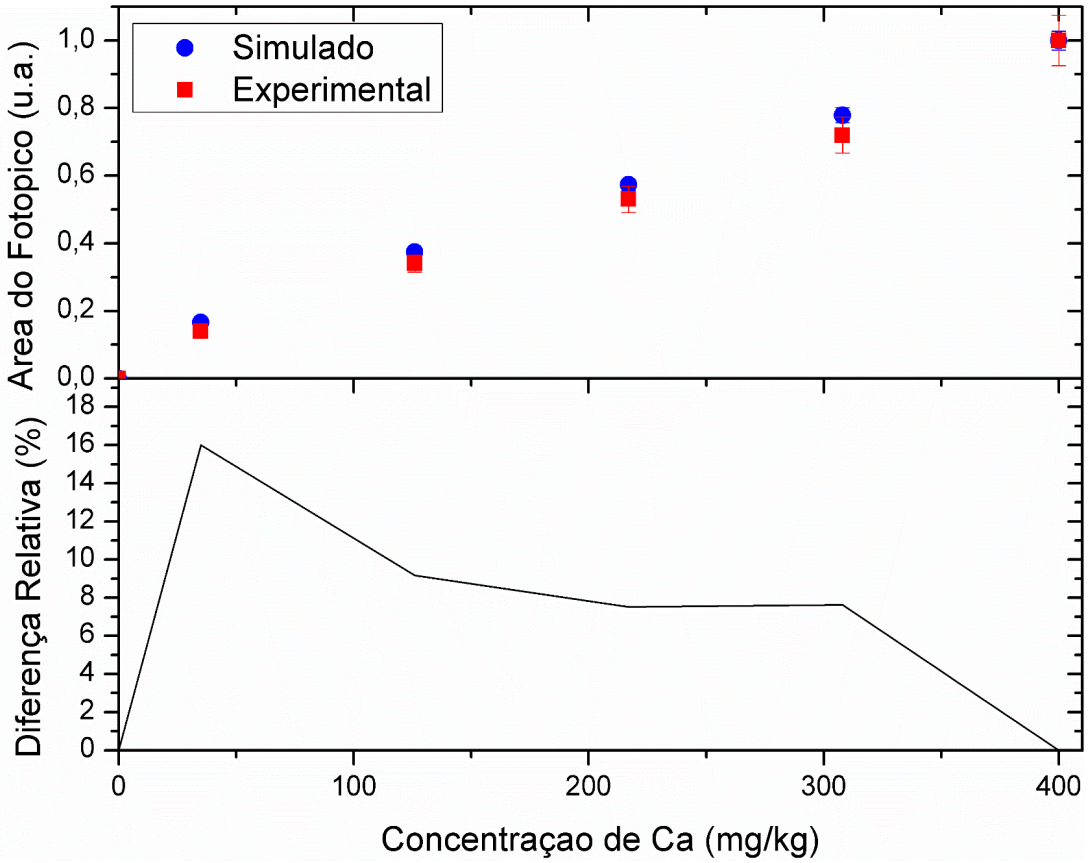



**Gráfico 5 - Comparação Simulado vs Experimental para o elemento Ca.**
**Fonte: Gráfico gerado no *software Origin Pro 8.0*.**

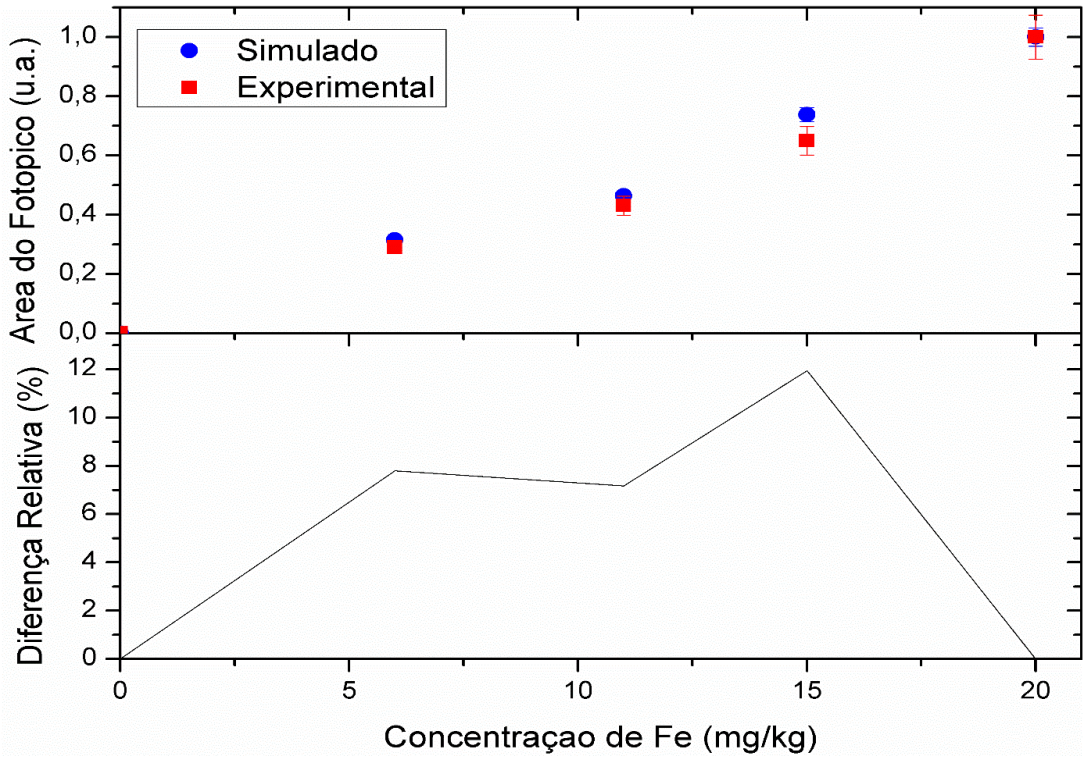



**Gráfico 6 - Comparação Simulado vs Experimental para o elemento Fe.**
**Fonte: Gráfico gerado no *software Origin Pro 8.0*.**

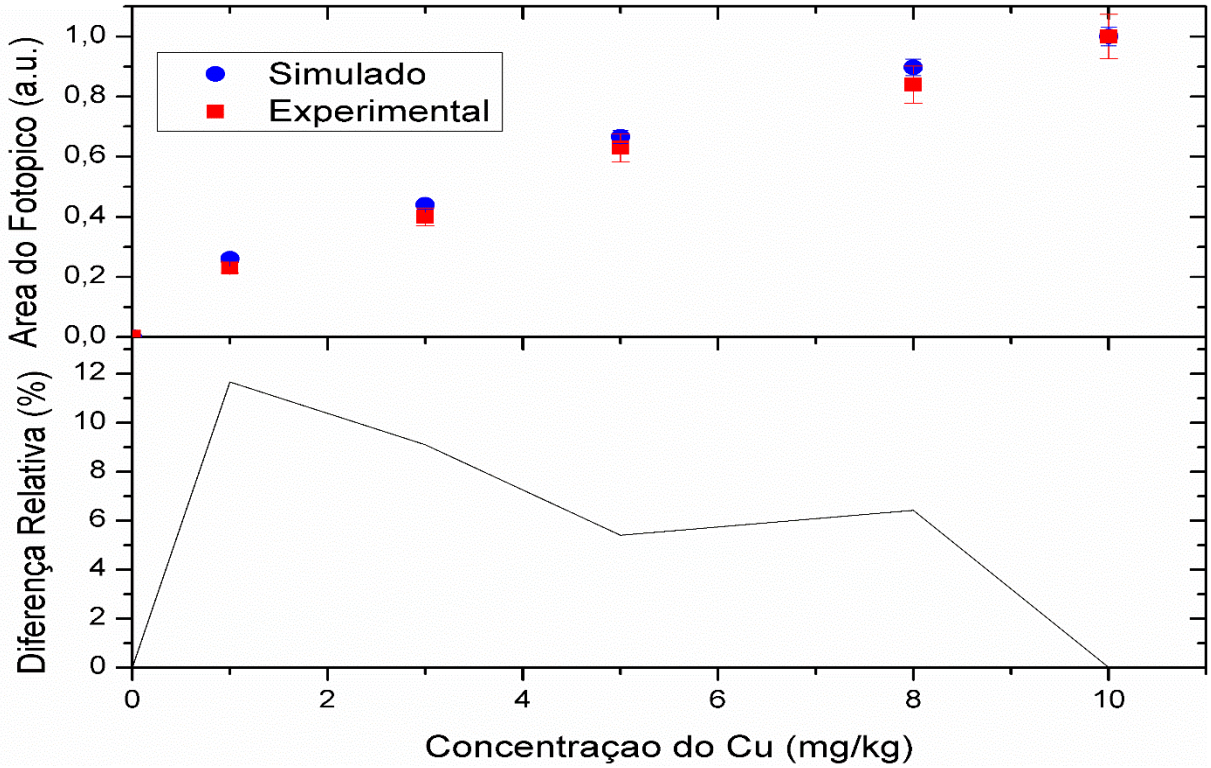



**Gráfico 7 - Comparação Simulado vs Experimental para o elemento Cu.**
**Fonte: Gráfico gerado no *software Origin Pro 8.0*.**

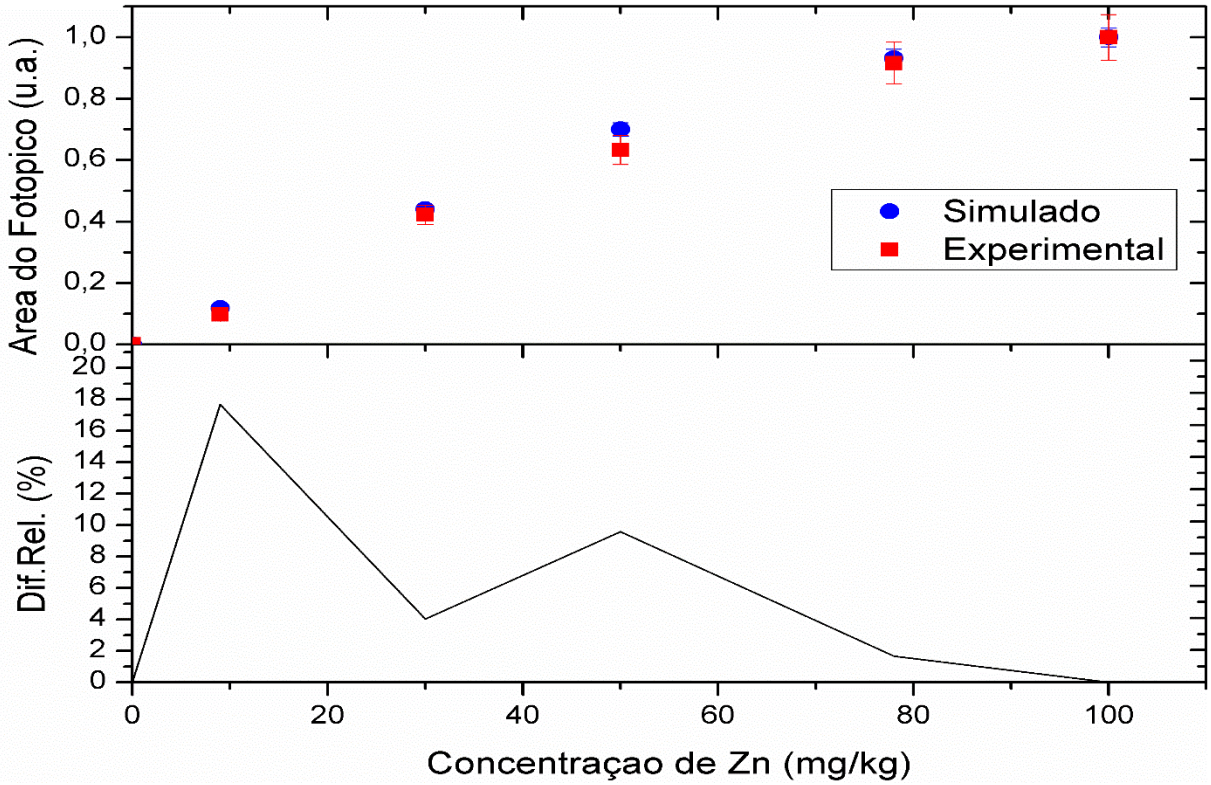



**Gráfico 8 - Comparação Simulado vs Experimental para o elemento Zn.**
**Fonte: Gráfico gerado no *software Origin Pro 8.0*.**

A incerteza experimental foi calculada através da medição da massa dos sais, o volume da água, o ajuste da curva Gaussiana, o desvio padrão das medidas e a incerteza na contagem. O resultado da incerteza ficou com um intervalo de 6-9%, com média de 7,4%. A partir dos gráficos acima pode-se observar que a diferença relativa entre as curvas experimental e teórica está dentro do intervalo da incerteza experimental.

## 4.3 VALORES DE CONCENTRAÇÃO

As concentrações dos elementos traços presentes em tecido mamário canino foram quantificadas a partir dos valores de sensibilidade extraídos das curvas de calibração dos elementos Ca, Fe, Cu e Zn, demonstradas anteriormente no tópico 3.5, e o processo de seleção da área do fotopico foi realizada da mesma maneira, através do software *pyMCA.*

A comparação estatística dos valores de concentração dos elementos traço Ca, Fe, Cu e Zn, em tecidos mamários com amostras pareadas (tecido normal periférico e tecido neoplásico) e em tecidos mamários com amostras não pareadas (tecido diverso e tecido neoplásico) podem ser visualizados nas Figura 18, Figura 19, Figura 20 e Figura 21, respectivamente. Vale lembrar que aqui foi considerado para compor o grupo do tecido neoplásico apenas as amostras que também contém tecido normal periférico, e a relação entre o tecido diverso (grupo de amostras hiperplásicas, paniculite, hamartoma e linfoma difuso) e o tecido neoplásico (neoplásico benigno e maligno), sendo aqui todo o grupo de neoplásico.

As tabelas que representam um resumo dos resultados para cada elemento traço estudado encontram-se no APÊNDICE C – TABELAS QUE REPRESENTAM UM RESUMO DOS RESULTADOS PARA CADA ELEMENTO TRAÇO ESTUDADO.

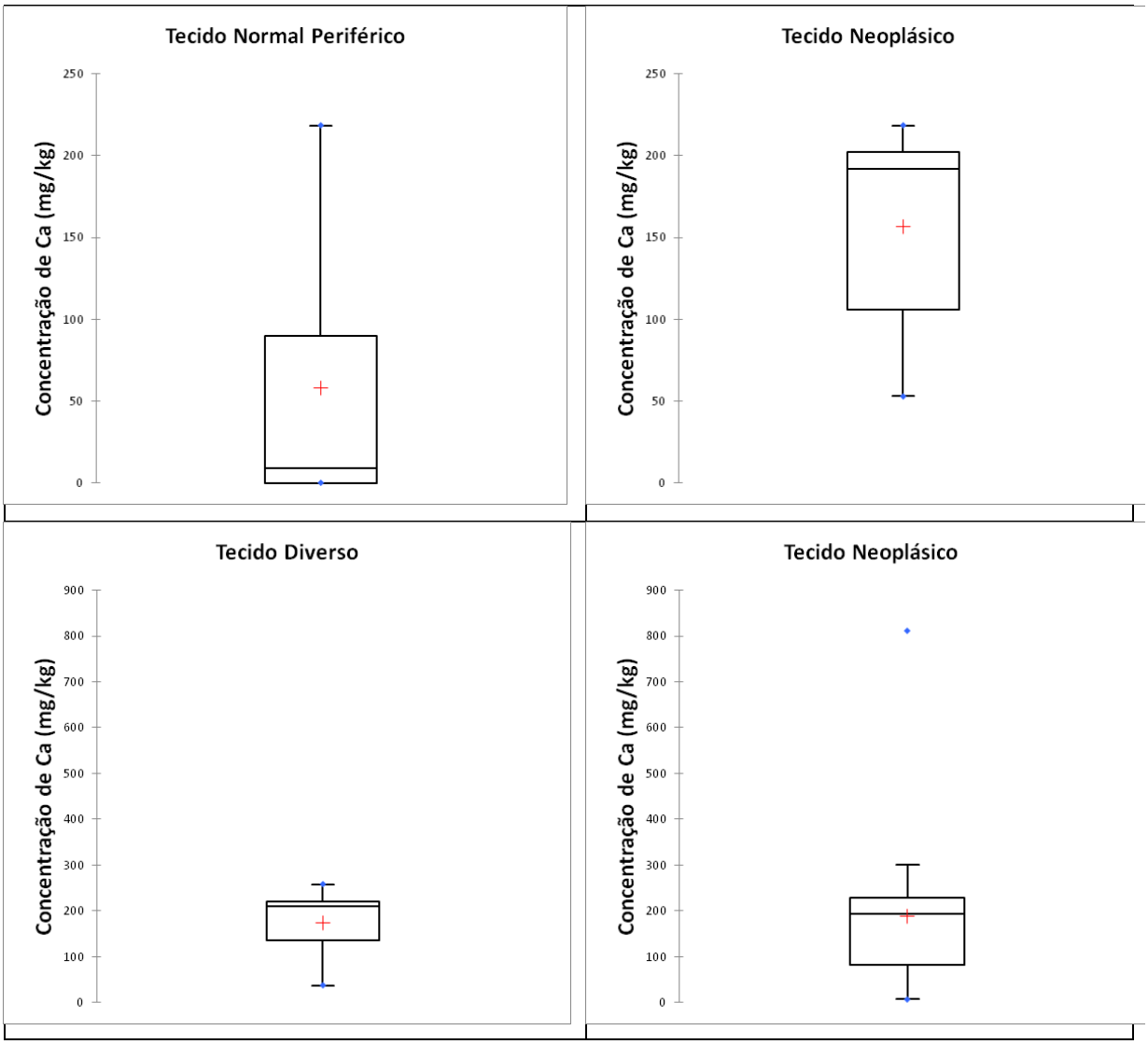



**Figura 18 - Concentração do elemento Ca em tecido normal periférico e neoplásico (imagem superior) e em tecido diverso e neoplásico (imagem inferior) presente em tecido mamário de cadelas. O ponto azul que aparece no gráfico (outliers) representa valores de concentração que ficaram fora dos limites inferiores e superiores.**
**Fonte: Gráficos tipo box plot, autoria própria.**

Apesar que não seja possível confirmar com segurança se estas diferenças são significativas, pode-se perceber no elemento Ca que os pontos que ficaram fora dos limites inferiores e superiores estão representados de maneira mais discrepante nos tecidos neoplásicos do que nos demais. Isto pode se dever ao fato de que haja uma maior concentração de Ca nestes tecidos do que em tecidos considerados histologicamente como não neoplásicos.

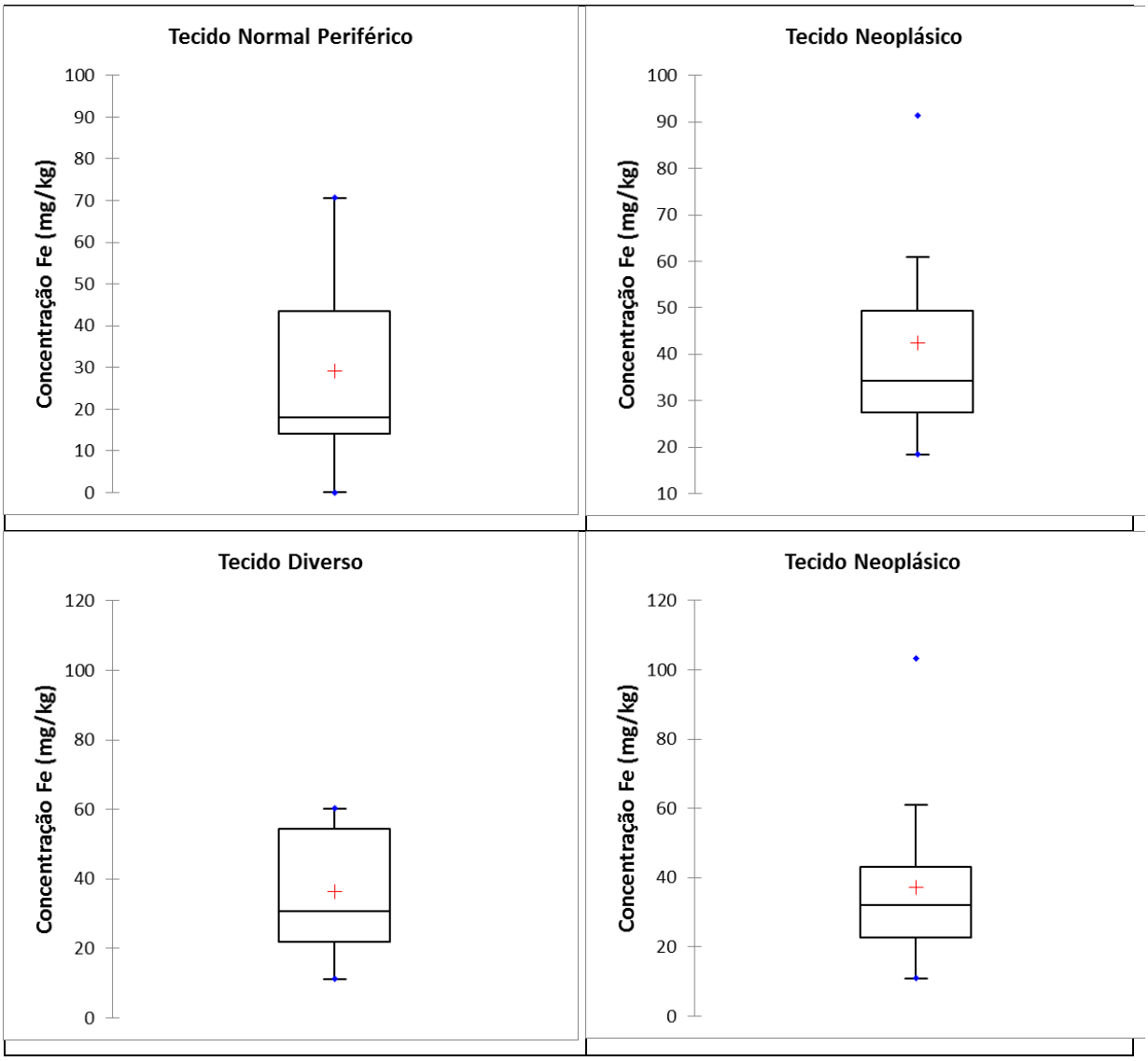



**Figura 19 - Concentração do elemento Fe em tecido normal periférico e neoplásico (imagem superior) e em tecido diverso e neoplásico (imagem inferior) presente em tecido mamário de cadelas. O ponto azul que aparece no gráfico (outliers) representa valores de concentração que ficaram fora dos limites inferiores e superiores.**
**Fonte: Gráficos tipo box polt, autoria própria.**

Da mesma maneira que no Ca, não é possível confirmar com segurança se as diferenças são significativas entre os grupos aqui estudados. Pode-se perceber que para o Fe há uma distribuição aparentemente mais homogênea entre os grupos. Da comparação entre tecido neoplásico e TNP é claramente visto uma maior concentração de Fe no tecido tumoral. Isto deve-se ao fato de que o Fe está associado ao processo de oxidação celular que está diretamente ligado com um aumento de concentração de Fe no organismo, sendo que este processo pode resultar na liberação de radicais livres e produzir danos ao DNA contribuindo para a manifestação do câncer (MAGALHÃES, BECKER, *et al.*, 2008). Já na imagem inferior há

visivelmente uma maior concentração de Fe no tecido diverso do que no neoplásico, porém há um ponto discrepante de maior valor de concentração neste do que naquele grupo.

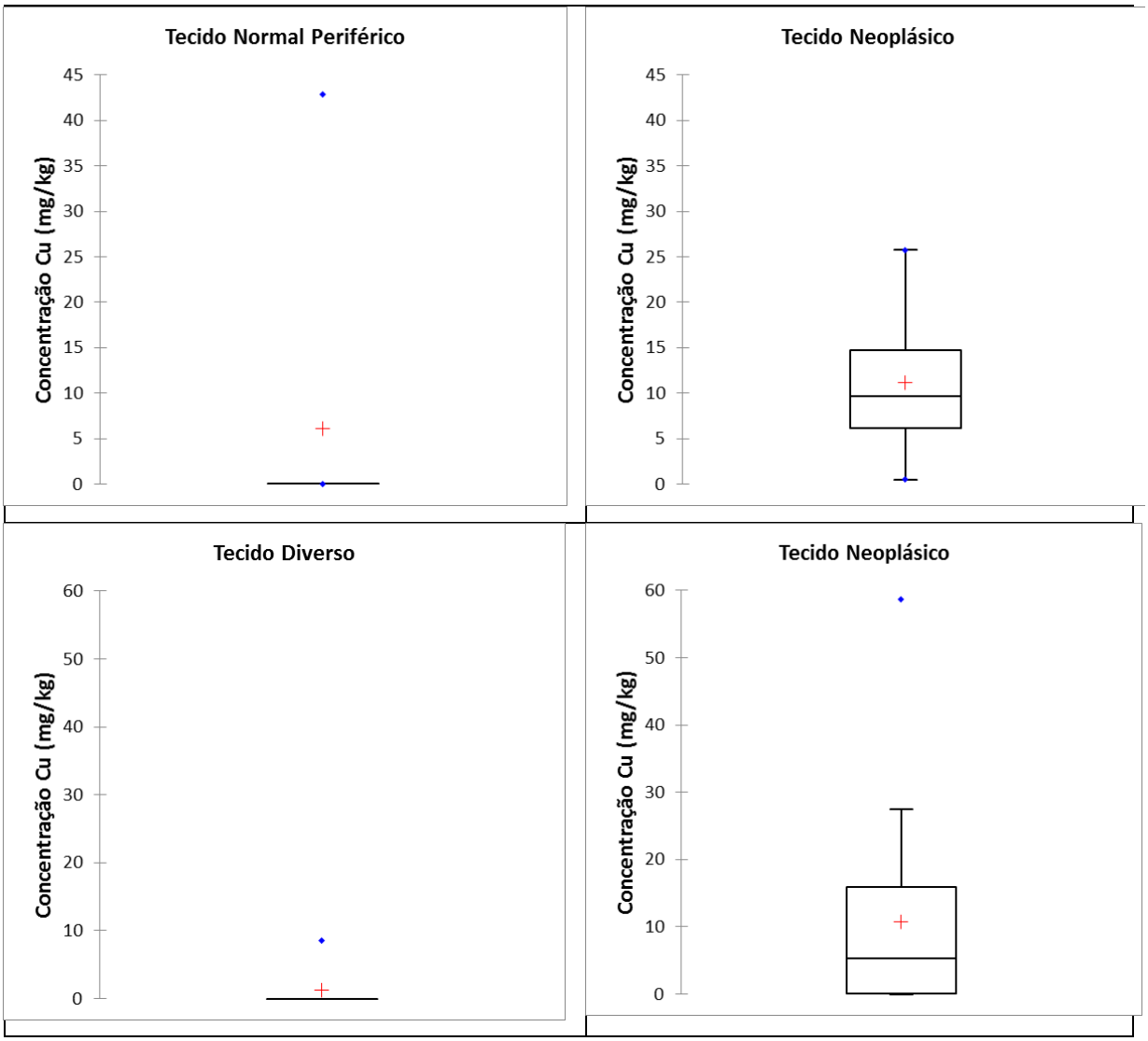



**Figura 20 - Concentração do elemento Cu em tecido normal periférico e neoplásico (imagem superior) e em tecido diverso e neoplásico (imagem inferior) presente em tecido mamário de cadelas. O ponto azul que aparece no gráfico (outliers) representa valores de concentração que ficaram fora dos limites inferiores e superiores.**
**Fonte: Gráficos tipo box plot, autoria própria.**

Para o Cu percebe-se visualmente que há uma maior concentração presente nos tecidos neoplásicos do que no tecido normal periférico e no tecido diverso, visto a presença de uma baixa concentração de Cu naquele grupo. Este comportamento pode ser explicado pelo fato de que o Cu atua como cofator da angiogênese, pois se acredita que um excesso de Cu nos tumores de mama desenvolve o mesmo através

da angiogênese e de possíveis danos oxidativos ao DNA (HUANG, SHEU e LIN, 1999).

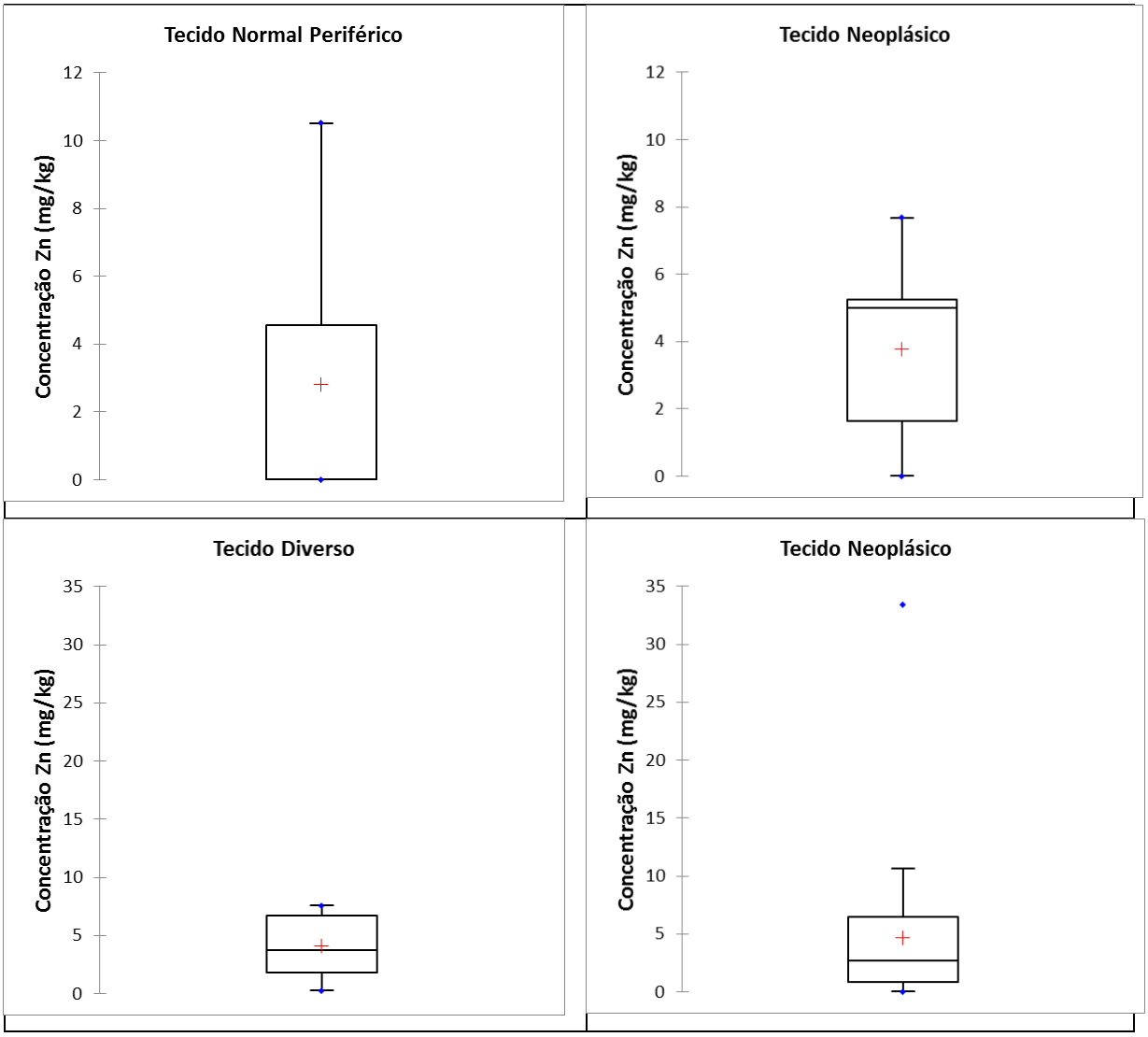



**Figura 21 - Concentração do elemento Zn em tecido normal periférico e neoplásico (imagem superior) e em tecido diverso e neoplásico (imagem inferior) presente em tecido mamário de cadelas. O ponto azul que aparece no gráfico (outliers) representa valores de concentração que ficaram fora dos limites inferiores e superiores.**
**Fonte: Gráficos tipo box plot, autoria própria.**

Para o Zn, bem como para o Fe, percebe-se visualmente uma distribuição mais homogênea entre os grupos estudados. Porém a presença novamente de um ponto fora dos limites inferiores e superiores está presente no grupo de tecido neoplásico também neste caso.

## 4.4 TESTES ESTATÍSTICOS

### 4.4.1 Teste de Normalidade

O primeiro teste aplicado foi o teste de normalidade de Shapiro-Wilk em todo o banco de dados. O objetivo deste é primeiramente verificar se os valores apresentam aderência a curva normal. Aqui se o p-valor calculado for menor que o valor de significância α = 0,05, rejeita-se a hipótese de que há uma distribuição normal dos dados e considera-se que os dados extraídos não seguem uma distribuição normal. Este teste tem grande validade, visto o fato de que se a distribuição dos dados não for normal, deve-se então no passo seguinte fazer análise estatística com testes não paramétricos.

A Tabela 6 a seguir representa os valores de significância do teste de normalidade Shapiro-Wilk, do grupo de tecido neoplásico (TNeo), grupo de tecido normal periférico (TNP) e grupo de tecido diverso (TD).

**Tabela 6 - Teste de Normalidade Shapiro-Wilk para a distribuição dos valores de concentração de Ca, Fe, Cu e Zn, em tecidos neoplásicos (TNeo), tecidos normais periféricos (TNP) e tecidos diversos (TD). Os valores destacados representam valores que não seguem uma distribuição normal.**

| Teste de Normalidade Shapiro-Wilk | | | |
|---|---|---|---|
| | TNeo | TNP | TD |
| Ca | **< 0,0001** | **0,003** | **0,025** |
| Fe | **< 0,0001** | 0,6 | 0,291 |
| Cu | **< 0,0001** | **< 0,0001** | **< 0,0001** |
| Zn | **< 0,0001** | **0,021** | 0,42 |

**Fonte: Dados teste de Shapiro-Wilk, autoria própria.**

Os valores menores que o valor de significância α = 0,05 foram representados em negrito na tabela anterior. Portanto testes não paramétricos devem ser utilizados para a análise estatística neste trabalho.

### 4.4.2 Comparação Entre Grupos de Amostras

#### 4.4.2.1 Análise estatística para amostras pareadas: tecido normal periférico e tecido neoplásico

Após aplicação do teste não paramétrico de amostras pareadas de Wilcoxon, com tratamento dos empates de Hollander & Wolfe, os dados estatísticos em Tabela 7 representam a relação entre o grupo de tecido normal periférico com o grupo de tecido neoplásico.

**Tabela 7 - Teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras pareadas, para representação da variância entre as concentrações de Ca, Fe, Cu e Zn nos tecidos analisados (tecido normal periférico e tecido neoplásico).**

| **Teste não paramétrico de Wilcoxon** | | | |
|---|---|---|---|
| | | Variável TNP | Variável TNeo |
| Ca (mg/kg) | Mín – Máx | 0,003 – 218,263 | 53,132 – 3560,737 |
| | Média (x) | 49,948 | 642,675 |
| | Desvio Padrão (S) | 85,058 | 1288,381 |
| | (x±S) | 49,948±85,058 | 642,675±1288,381 |
| | Variância | 35 | |
| | p-valor | **0,035** | |
| Fe (mg/kg) | Mín – Máx | 0,003 – 70,672 | 18,370 – 91,370 |
| | Média (x) | 29,071 | 42,502 |
| | Desvio Padrão (S) | 24,478 | 25,493 |
| | (x±S) | 29,071±24,478 | 42,502±25,493 |
| | Variância | 35 | |
| | p-valor | **0,673** | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Cu (mg/kg) | Mín – Máx | 0,00 – 42,878 | 0,483 – 25,742 |
| | Média (x) | 6,125 | 11,102 |
| | Desvio Padrão (S) | 16,206 | 8,287 |
| | (x±S) | 6,125±16,206 | 11,102±8,287 |
| | Variância | 35 | |
| | p-valor | **0,272** | |
| Zn (mg/kg) | Mín – Máx | 0,00 – 10,517 | 0,00 – 7,676 |
| | Média (x) | 2,808 | 3,776 |
| | Desvio Padrão (S) | 4,07 | 2,739 |
| | (x±S) | 2,808±4,07 | 3,776±2,739 |
| | Variância | 35 | |
| | p-valor | **0,353** | |

**Fonte: Dados teste de Wilcoxon, autoria própria.**

O p-valor do elemento Ca é menor do que o valor de significância α (p-valor = 0,035 e α = 0,05), portanto há diferença significativa entre a concentração do Ca se compararmos em uma amostra de tecido mamário de cadela, uma região neoplásica (tecido neoplásico) e uma região normal periférica (tecido normal periférico), visto que o elemento em questão se encontra mais concentrado na parte tumoral do que na periferia.

O p-valor do elemento Fe é maior do que o valor de significância α (p-valor = 0,673 e α = 0,05), portanto não há diferença significativa entre o grupo de amostras estudado.

O p-valor do elemento Cu é maior do que o valor de significância α (p-valor = 0,272 e α = 0,05), portanto também não há diferença significativa entre o grupo de amostras estudado. Este resultado repete-se ao elemento Zn, visto que o p-valor do elemento Zn é maior do que o valor de significância α (p-valor = 0,353 e α = 0,05), portanto não há diferença significativa entre o grupo de amostras estudado.

Este resultado pode se dar ao fato de que em uma mesma amostra de tecido mamário canino, a concentração dos elementos traços que apresentam correlação com a carcinogênese, como o Ca, Fe, Cu e Zn aqui estudados, não se localizam apenas na região central do tumor, mas se alastram por toda a região periférica da amostra, com exceção do Ca. Esta diferença pode-se dever ao fato de que o Ca está

relacionado com a calcificação tumoral, portanto é esperado que sua concentração seja maior no tumor do que na periferia. Porém Sakamoto, 2011, utilizando a técnica de fluorescência de raios X para irradiar tecido mamário canino, verificou diferença significativa de elementos traço como o Ca, Fe e Zn quando comparados com um grupo de amostras de tecido normal.

Este resultado comprova o fato também de que para realizar mastectomias de tecido mamário, um limite maior de tecido é removido, para controle de reincidência tumoral. Com isto comprovasse que na periferia do tecido há concentração destes elementos, e deve-se manter um limite de extirpação tecidual de segurança.

#### 4.4.2.2 Análise estatística para amostras não pareadas: tecido diverso e tecido neoplásico

Após aplicação do teste não paramétrico de comparação de k amostras de Kruskal Wallis, o objetivo principal é saber se as amostras provêm de uma mesma população de amostras ou não. Se o p-valor calculado for menor que o nível de significância α = 0,05, as amostras provêm de populações diferentes. Os resultados estatísticos dessa análise podem ser verificados na Tabela 8.

**Tabela 8 - Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparar dois universos de amostras.**

| **Teste não paramétrico de Kruskal Wallis** | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Ca | Fe | Cu | Zn |
| Mín – Máx | 174,16 – 550,38 | 36,35 – 38,145 | 1,21 – 10,96 | 4,09 – 4,28 |
| Média | 362,27 | 37,248 | 6,085 | 4,185 |
| Desvio Padrão | 266,02 | 1,269 | 6,894 | 0,134 |
| (x±S) | 362 ± 266 | 37 ± 1 | 6 ± 7 | 4 ± 0,1 |
| p-valor | **0,112** | | | |

**Fonte: Dados teste de Kruskal-Wallis, autoria própria.**

Os dados da tabela anterior demostram que as amostras provêm de uma mesma população, devido ao fato de o p-valor = 0,112 ser maior que o valor α de significância

α = 0,05. Porém o grupo analisado é diferente, visto que se trata de um grupo diverso, sem alterações neoplásicas e um grupo de neoplasias.

Alguns autores consideram hiperplasias mamárias como uma variação celular pré neoplásica, visto que as hiperplasias apresentam um aumento no número de células em um tecido mamário (FERGUSSON, 1985). Este resultado encontrado aqui pode corroborar o fato de que uma alteração pré-neoplásica, mesmo não sendo uma neoplasia, apresenta elementos traços com concentração similar, podendo potencializar desde o início da alteração uma correlação com neoplasia posterior.

### 4.4.3 Comparação Entre Neoplasia Benigna e Maligna

Para a comparação entre neoplasias benigna e maligna o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis também foi utilizado. Nesta comparação não houve diferença significativa entre os tecidos neoplásico benigno e neoplásico maligno. O p-valor encontrado nesta análise estatística foi de 0,773, sendo maior que o valor de significância α = 0,05 e, portanto, para este teste considerado que as amostras provêm de uma mesma população. Este resultado deve ser considerado, visto que tanto neoplasias malignas quanto neoplasias benignas são conceituadas como uma proliferação desordenada de células, as quais tendem para um crescimento único e progressivo, e com perda de diferenciação da célula original (CORRÊA, 2000).

Um outro teste foi aplicado para verificar se há diferença significativa entre a concentração dos elementos traços Ca, Fe, Cu e Zn presentes nas neoplasias. O teste não paramétrico de Kolmogorov-Smirnov, demonstrou que há uma diferença significativa com p-valor menor que o nível de significância α = 0,05 para o elemento Zn (p-valor = 0,048). Para os demais elementos o teste não apontou nenhuma diferença significativa. O fato do Zn ser pontuado como um cofator para a malignidade do tumor, pode estar relacionada à presença deste elemento nas matrizes de metaloproteinases, e em neoplasias malignas estão mais concentradas porque há característica de invasão tumoral neste tipo de neoplasia. As matrizes de metaloproteinases formam um grupo de enzimas que degrada vários componentes da matriz extracelular e podem estar presentes, além dos processos fisiológicos normais

do organismo, também em situações patológicas, tais como a tumorigênese (JUSTULIN, DELLA-COLETA, *et al.*, 2010).

Sabe-se, conforme já explicitado na fundamentação teórica, que cada neoplasia apresenta particularidades específicas, e acredita-se que uma possível diferença dar-se-ia em um maior número de amostras analisadas.

Apesar de não haver uma diferença significativa entre o Ca, Fe e Cu, pode-se perceber que a maior concentração destes, juntamente com o Zn, esteve presente em alterações neoplásicas malignas: Amostra 2855 – Carcinoma em tumor misto grau 1: Ca = 811,72 mg/kg, Fe = 103,35 mg/kg, Zn = 33,41 mg/kg; Amostra 2331 – Tumor maligno tubular grau 1: Cu = 58,62 mg/kg.

O contrário também é verdade, se verificarmos que as menores concentrações de Fe, Cu e Zn estiveram presentes em alterações neoplásicas benignas, com exceção apenas do Ca: Amostra 4428 – Tumor benigno misto: Fe = 11 mg/kg; Amostra 2261 – Tumor benigno misto: Cu = não identificado, Zn = não identificado.

### 4.4.4 Correlação Entre Elementos Traços

Para verificar correlação entre os elementos traços presentes nas amostras biológicas aqui estudadas, o teste de correlação de Spearman foi utilizado. Este teste tem a função de associar relações que possam estar presentes entre os elementos Ca, Fe, Cu e Zn, e avaliar aspectos biológicos existentes. A análise foi feita entre os tecidos neoplásicos estudados. A Tabela 9 a seguir representa os coeficientes de correlação do teste de Spearman.

**Tabela 9 - Teste de Correlação de Spearman. As relações entre os elementos Ca/Fe, Ca/Cu, Ca/Zn, Fe/Cu, Fe/Zn e Cu/Zn foram analisadas no grupo de tecido normal periférico, tecido diverso e tecido neoplásico. Valor de significância α = 0,05.**

| **Teste de correlação de Spearman** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Ca/Fe | Ca/Cu | Ca/Zn | Fe/Cu | Fe/Zn | Cu/Zn |
| TNP | 0,670 | -0,338 | 0,380 | -0,612 | -0,020 | 0,676 |
| TD | 0,321 | 0,204 | -0,250 | 0,408 | -0,429 | -0,612 |
| TNeo | 0,137 | -0,057 | -0,011 | 0,039 | 0,162 | 0,149 |

**Fonte: Dados teste de Spearman, autoria própria.**

Para este teste de correlação, valores menores que o valor de significância α = 0,05 indicam uma correlação entre os elementos químicos analisados. Durante as análises de correlação, nenhum dos elementos traços apresentaram correlação com nível de significância considerável. Portanto, para este estudo não há correlação entre os elementos Ca/Fe, Ca/Cu, Ca/Zn, Fe/Cu, Fe/Zn e Cu/Zn.

Segundo Silva, 2007, em estudo com amostras mamárias humanas, também utilizando a técnica de ED-XRF, a correlação presente entre os elementos foi observada apenas com o Ca/Fe e em tecidos normais.

# 5 CONCLUSÕES

## 5.1 CONCLUSÕES GERAIS

### 5.1.1 Sobre Padrões de Calibração

Foram confeccionados padrões líquidos utilizando o método do padrão externo teve resultado satisfatório, visto que a matriz das amostras estudadas se assemelha com a matriz da água. O padrão líquido foi um grande desafio, pois o mesmo ainda não havia sido feito no nosso laboratório. A curva de calibração resultante dos padrões líquidos apresentou comportamento linear, o que permite concluir que o mesmo está de acordo com o objetivo proposto e pode ser usado para quantificar amostras biológicas tanto neste trabalho como em trabalhos futuros. A partir da equação da reta, foi determinada a sensibilidade da técnica de ED-XRF para a quantificação de cada elemento traço estudado neste trabalho.

### 5.1.2 Sobre a Validação Experimental

Foi utilizado o código híbrido XRMC (X-Ray Monte Carlo) para validação da metodologia usada nos experimentos de ED-XRF neste trabalho. Os resultados experimentais encontrados foram confrontados com as respostas simuladas para os padrões líquidos de calibração que continham diferentes concentrações dos elementos traço estudados. Da comparação entre ambos foi verificado que a diferença relativa máxima foi de 17% para o elemento Zn, estando dentro da incerteza experimental. Portanto a simulação computacional mostrou que a metodologia empregada na quantificação de elementos traço está correta.

### 5.1.3 Sobre as Amostras de Tecido Mamário Canino

As amostras de tecido neoplásico e tecido normal periférico não apresentaram diferença significativa em relação a concentração dos elementos traços, apenas o elemento Ca teve p-valor = 0,035, sendo menor que o valor de significância α = 0,05 e, portanto, obteve diferença significativa entre o tecido neoplásico e o tecido periférico. Acredita-se que o fato desta comparação entre os dois grupos não ter obtido diferença significativa é positiva, pois é recomendado em mastectomias de mama que parte da região periférica seja extraída, para manter um limite de controle. Portanto, comprovasse com este resultado que os elementos químicos estão concentrados tanto nos tumores de mama quanto na periferia.

As amostras de tecido diverso e de tecido neoplásico não apresentaram diferença significativa, e com este resultado pode se supor que as hiperplasias, alterações consideradas pré-neoplásicas, bem como alterações de processo inflamatório e crescimento desordenado de células, mesmo que não sejam um tecido neoplásico, apresentam concentrações de elementos traços o que indicam que este tecido apresenta quimicamente uma anormalidade, não podendo ser considerado como um tecido normal.

A comparação entre as amostras de tecido neoplásico, pode-se perceber que há uma diferença significativa em relação ao elemento Zn em tumores malignos perante os tumores benignos de cães. Este elemento está relacionado ao processo de invasão tumoral, característica específica de uma malignidade.

Pode-se concluir também que a técnica empregada de ED-XRF além de ser extremamente viável, por não destruir a amostra e ser de fácil operação, apresentou resultados significativos que puderam ser comparados e discutidos entre os grupos amostrais aqui estudados.

## 5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se para trabalhos futuros uma análise com difração de raios X para verificar se há alterações estruturais nas amostras.

Realizar esta pesquisa com radiação sincrotron, visto uma maior eficiência deste, podendo alterar com alguma significância os resultados encontrados.

Utilizar um grupo maior de amostras de tecido neoplásico e verificar se há uma variação significativa nos elementos Ca, Fe e Cu.

Comparar tecidos neoplásicos com outros grupos de amostras e com diferentes técnicas espectroscópicas, e verificar diferenças e comportamento dos elementos traço.

# REFERÊNCIAS


ACKERMAN, A. B. **Histologic diagnosis of inflammatory skin diseases.** 2ª. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997.

AL-EBRAHEEM, A.; FARQUHARSON, M. J.; RYAN, E. The evaluation of biologically important trace metals in liver, kidney and breast tissue. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 67, n. 3, p. 470-474, 2009.

ANDRADE, L. A. F. *et al*. Tumores em caninos e felinos: retrospectiva de um ano de trabalho em animais submetidos a cirurgias no Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Waitsman. **In: XXII Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais.**, Fortaleza, v. 11, 239 páginas, 2001.

ANTUOFERMO, E. *et al.* Spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs - A model of cancer. **Cancer Epidemology, Biomarkers & Prevention**, n. 16 (11), p. 2247-2256, 2007.

ATTIX, F. E. **Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry.** New York: John Wiley and Sons, 1986.

BECKER, P. F. L. **Patologia Geral**. 1ª. ed. São Paulo: Sarvier, 1997.

BERTIN, E. P. **Introduction to X-ray spectrometric analysis**. New York: Plenum Press, 1978.

BOGLIOLO, L. **Patologia**. 1ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan , 1972.

BOGLIOLO, L.; FILHO, G. B. **Patologia**. 8ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan , 2011.

BORN, M. **Atomic physics**. 8ª. ed. New York, U.S.A.: Dover Publications, 1969.

BÜSING, C. M.; KEPPLER, U.; MENGES, V. Differences in microcalcification in breast tumours. **Virchows Archiv [Patho Anat]**, v. 393, n. 3, p. 307-313, 1981.

CARVALHO, M. L., MAGALHÃES, T., *et al.* Trace elements in human cancerous and healthy tissues: A comparative study by EDXRF, TXRF, synchrotron radiation and PIXE. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 62, n. 9, p. 1004-1011, 2007.

CASSALI, G. D. **Estudo morfológico, imunohistoquímico e citométrico de tumores mamários da cadela - aspectos comparativos com neoplasias de mama humana.** Tese de Doutorado em Ciência Animal. Escola de Veterinária: Universidade Federal de Minas Gerais. 2000.

CASTILHO, P. R. **Estudo da aplicação da técnica de ED-XRF para caracterização elementar de tecidos mamários.** Dissertação de Mestrado. Curitiba: Programa de Pós Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2014. 85 páginas.

CAVALCANTI, M. F.; CASSALI, G. D. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas. **Clínica Veterinária**, v. 61, p. 56-64, 2006.

CAVALLO, F. *et al.* Zinc and copper in breast cancer. **A joint studie in northen Italy and southern France**, v. 67, n. 3, p. 738-745, 1991.

CESAREO, R. **Nuclear Analytical Techniques in Medicine**. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers. 1988. 404 páginas.

COOPER, G. M. Elements of human cancer. In: COOPER, G. M. **Elements of human cancer.** Boston: Jones and Bartlett Publishers, 1992. Cap. 2, p. 16-20.

CORRÊA, L. Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. **PatoArte Geral Neoplasias.**, 2000. Acesso em: 2 Setembro 2015.

COSTA, M. M. **Estudo epidemiológico e anatomopatológico de tumores mamários na cadela e na gata.** Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária. 2010.

COTRAN, R. S. *et al.* Neoplasias. In: ROBBINS: **Patologia estrutural e funcional.** 5ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 213-268.

DALECK, C. R., FRANCESCHINI, P.H., *et al.* Aspectos clínicos e cirúrgicos do tumor mamário canino. **Ciência Rural**, v. 28, n. 1, p. 95-100, 1998.

DAMASCENO, K. A. **Carcinoma em tumores mistos mamários caninos:** Expressão de Versican e sua relação com invasão do estroma e com grau de

diferenciação mioepitelial. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina: Minas Gerais. 2012.

DELOUIS, C.; RICHARD, P. La lactation. **In: Thibault, C.; Levasseur, M.C. La reproduction chez les mammifères et l' homme**, Paris: Marketing, p. 487-514, 1991.

D'OLIVEIRA, K. S. *et al.* Levantamento casuístico de cadelas e gatas com neoplasia mamária atendidos no serviço de cirurgia de pequenos animais do Hospital Veterinário – UNISA, no período de agosto de 1999 a abril de 2001. **In: XXII Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais.**, Fortaleza, v. 11, 240 páginas, 2001.

DONNAY, I. *et al.* Épidémiologie et hormonodépendance des tumeurs mamaires de la chienne. **Ann Méd Vét.**, n. 133, p. 491-503, 1989.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária.** 2ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

ESTATCAMP, DIGUP. **Consultoria estatística e qualidade e Desenvolvimento de sistemas e consultoria estatística.** Portal Action. Disponível em: http://www.portalaction.com.br/. Acessado em 12/2015.

FARQUHARSON, M. J. *et al.* The localisation and micro-mapping of copper and other trace elements in breast tumours using a synchrotron micro-XRF system. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 65, n. 2, p. 183-188, 2007.

FERGUSSON, H. R. Canine mammary gland tumors. **Vet Clin North Am**, v. 15, p. 501-511, 1985.

FERRI, S. T. S. Tumores mamários em fêmeas caninas e felinas: revisão de literatura.. **A Hora Veterinária** , v. 22, n. 131, p. 64-67, 2003.

FILGUEIRA, K. D. **Características anatomopatológicas de neoplasias mamárias em cadela criadas no município de Fortaleza-CE.** Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Ceará. Faculdade de Veterinária. Fortaleza. 2003.

FONSECA, C. S.; DALECK, C. R. Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovário-histerectomia como terapia adjuvante. **Ciência Rural**, v. 30, n. 4, p. 731-735, 2000.

GERAKI, K.; FARQUHARSON, M. J.; BRADLEY, D. A. Concentrations of Fe, Cu and Zn in breast tissue: a synchrotron XRF study. **Physics in Medicine and Biology**, UK:Institute of Physics Publishing, v. 47, p. 2327-2339, 2002.

GERALDES, M.; GÃRTNER, F.; SCHMITT, F. N. A immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. **The Veterinary Record.**, p. 1140-1148, 2000.

GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos.** 5ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 2, 1986.

GOLDSCHMIDT, M. *et al.* Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. **Veterinary Pathology**, Philadelphia, v. 48, n. 1, p. 117-131, January 2011.

GOLOSIO, B. *et al.* **Computer Physics Communications**. 2014. 185: 1044-1052.

GREGO, A.; ROSA, S. S. Tumor de mama em cadelas requer atenção de proprietários. **Informativo Unesp.**, 2012. Disponivel em: <http://www.unesp.br/proex/informativo/edicao13jul2002/materias/tumorcanino.htm>. Acesso em: Julho 2015.

GRIFFTHS, D. J. **Introduction to Electrodynamics**. 3ª. ed. New Jersey: Prentice Hall, v. Cap. 12, 1999.

GUIDUGLI-NETO, J. **Elementos de Patologia Geral**. São Paulo: Santos, v. I, 1997.

GUPTA, K.; SOOD, N. K. *et al.* **Journal of Pharmacy**, 2: 322-333, 2012.

HATAKA, A. *et al.* Dados epidemiológicos de cadelas portadoras de neoplasias mamárias – resultados parciais. **In: 6ª Mostra Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia UNESP**, Botucatu, 2002.

HUANG, Y. L.; SHEU, J. Y.; LIN, T. H. Association between oxidative stressand changes of trace elements in patients with breast cancer. **Clinical Biochemistry**, v. 32, n. 2, p. 131-136, 1999.

IARC. **Site da International Agency for Research on Cancer**, 2015. Disponivel em: <http://www.iarc.fr/>. Acesso em: 26 Novembro 2015.

INCA. INCA. **Instituto Nacional do Câncer - Surgimento do Câncer**, 2015. Disponivel em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/>. Acesso em: Outubro 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Nacional de Saúde 2013 - IBGE**, 2015.

JOHNSTON, S. D. Oncologia – sistemas reprodutivos. **In: SLATTER, D. Manual de cirurgia de pequenos animais.**, São Paulo: Manole, p. 2566-2583, 1998.

JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. Disordens of the mammary glands of the bitch. **In: Canine and feline theriogenology**, Philadelphia: W.B. Saunders, p. 243-256, 2001.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. Distúrbios do crescimento: aplasia até neoplasia. 6ª. ed. São Paulo: Manole, 2000. p. 87-118.

JUSTULIN, J. . L. A. *et al.* Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activity and localization during ventral prostate atrophy and regrowth. **INTERNATIONAL JOURNAL OF ANDROLOGY**, v. 33, n. 5, p. 696-708, October 2010.

KUBALA-KUKUS, A. E. A. Analysis of elemental concentration censored distributions in breast malignant and breast benign neoplasm tissues. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 62, n. 6-7, p. 695-701, 2007.

KWIATEK, W. M. E. A. Cancerous tissues analyzed by SRIXE. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 401, n. 1-2, p. 173-177, 2005.

LESPAGNARD, L.; KISS, R.; DANGUY, A. E. A. In vitro studies of canine mammary tumors: influence of 17 beta estradiol and progesterone on cell kinencs parameters. **Oncology**, v. 44, p. 292-301, 1987.

LOEB, L. Mutations and cancer. **In: MODIANO, J.F. Genes, dogs and cancer: emergency concepts im molecular diagnosis and therapy**, New York: International Veterinary Information Service, 2001.

MAGALHÃES, T. *et al.* Study of Br, Zn, Cu and Fe concentration in health and cancer breast tissue by TXRF. **Spectrochimica Acta Part B**, Elsevier, 2008.

MAJEWSKA, U. *et al.* Some aspects of statistical distribution of trace element concentrations in biomedical samples. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B:**, Beam Interactions with Materials and Atoms, v. 150, n. 1-4, p. 254-259, 1999.

MARTINS, A. M. C. R. P. F.; TAMASO, E.; GUERRA, J. L. Histochemical study of fibrilar proteins of the extracellular matrix in benign and malignant mammary neoplasms in dogs.. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 1, p. 43-49, 2002.

MARTINS, D. C.; FERREIRA, A. M. R. Marcadores prognósticos como um auxílio à conduta clínico-cirúrgica em uma cadela apresentando múltiplos nódulos mamários. **Acta Scientiae Veterinariae**, 31(3):, p. 189-191, 2003.

MERSOV, A. *et al.* The differentiation of malignant and benign human breast tissue at surgical margins and biopsy using x-ray interation data and Bayesian classification. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 95, p. 210-213, February 2014.

MISDORP, W. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. **Armed Forces Institute of Pathology**, v. 7, n. 1, p. 1-59, 1999.

MISDORP, W. Tumours of the mammary gland. In: Tumours of domestic animals.. **Meuten DJ, Blackwell Publishing**, Iowa, p. 575-606, 2002.

MITCHELL, L. *et al.* Mammary tumors in dogs: survey of clinical and pathological characteristics. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 15, n. 5, p. 131-138, 1974.

MOE, L. Population-based incidence of mammary tumors in some dog breeds. **Journal of Reproduction and Fertility**, supl. 57, p. 439-443, 2001.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. **Manual de Soluções, Reagentes e Solventes.** 2ª. ed. Brasil: Blucher, 2007.

MORRIS, J. S. *et al*. Effect of ovariohysterectomy in bitches with mammary neoplasms. **Veterinary Record**, 142:, p. 656-658, 1998.

MOULTON, J. E. Tumours in domestic animals. 3ª. ed. Berkeley: University of California, 1990. p. 518-512.

NASCIMENTO FILHO, V. F. **Técnicas analíticas nucleares de fluorescência de raios X por dispersão de energia (ED-XRF) e por reflexão total (T-XRF)**. Departamento de Ciências Exatas - Laboratório de Instrumentação Nuclear. São Paulo, 63 páginas, 1999.

NG, K.H., BRADLEY, D.A., LOOI, L.M. Evaluated trace element concentrations in malignant breast tissues. **The British Journal of Radiology**. v. 70, p. 375, 1997.

NUNES, G. D. L.; FILGUEIRA, K. D. Hamartoma Folicular: relato de um caso na espécie canina. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 12, n. 2, 273 páginas, 2014.

O'KEFFE, D. A. Tumores do sistema genital e das glândulas mamárias. 4ª. ed. São Paulo: Manole, v. 2, 1997. p. 2344-2351.

OLIVEIRA, L. O., OLIVEIRA, R.T., *et al*. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. **Acta Scientiae Veterinariae**, 31(2):, p. 105-110, 2003.

OSTERTAG, O.; OSTERTAGOVÁ, E.; HUNADY, R. Morphological matriz applied within the design project of the manipulator frame. **Procedia Engineering**, 2012. 495-499.

PAOLONI, M. E.; KHANNA, C. Nature Reviews, p. 8: 147-155, 2008.

PEREIRA, C. T. **Avaliação cintilográfica da vascularização e drenagem linfática das glândulas mamárias de cadelas.** Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo: São Paulo. 2005.

PEREIRA, G. R. *et al*. **Elemental distribution mapping on breast tissue sample**. European Journal of Radiology: Elsevier. 2008.

PET Brasil. **Mercado Brasileiro de Pets**, 2015. Disponivel em: <http://www.petbrasil.org.br/mercado-brasileiro>. Acesso em: Agosto 2015.

POLETTI, M. E. *et al*. A preliminary study of variations of trace amounts within healthy and neoplastic breast tissues with synchotron radiation x-ray fluorescence. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 71, p. 975-976, 2004.

POLETTI, M. E.; GONÇALVES, O. D.; MAZZARO, I. X-ray scattering from human breast tissues and breast-equivalent materials.. **Institute of Physics Publishing**, 47(1):, p. 47-63, Janeiro 2002.

QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos – novas perspectivas. **In: Congresso de Ciências Veterinárias**, Oeiras, 2002. Anais., p. 183-190, 2002a.

QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos: pesquisa de novos fatores de prognóstico. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 47, n. 543, p. 119-127, 2002b.

RIBEIRO, L. G. R. Expressão da Cox-2 nos carcinomas mamários de cadela. **Veterinária em Foco**, v. 6, p. 134-139, 2009.

RIELLA, H. G. **Técnicas de Caracterização de Materiais**. Espectrometria de Fluorescência de Raios X. São Paulo: IPEN. 2012. p. 1-77.

RIZH, S.L., SKY-PECH, H.H. Comparison between concentrations of trace elements in normal and neoplastic human breast tissue. **Cancer Research.** v. 44, p. 5390-5394, 1984.

ROBBINS, S. L.; CONTRAN, R. S. **Patologia:** bases patológicas da doença. 8ª. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

RUTTEMAN, G. R.; MISDORP, W. Hormonal background of canine and feline mammary tumours. **Journal of Reproduction and Fertility**, supl. 47, p. 483-487, 1993.

SAKAMOTO, S. S. **Identificação de elementos traços em tumores de mama de cadelas e sua correlação com histopatologia e prognóstico de vida.** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária: São Paulo. 2011.

SCHWARTZ, M. K. Role of trace elements in cancer. **Cancer Research AACR**, v. 35, p. 3481-3487, 1975.

SFACTERIA, A. *et al*. Cyclin D1 expression in pre-cancerous and cancerous lesions of the canine mammary gland. **Journal of Comparative Pathology**, 128:, p. 245-251, 2003.

SHACKLEY, S. What is XRF (X-Ray Fluorescence Spectrometry)?, 2012. Disponivel em: <http://www.swxrflab.net/xrfinstrument.htm>. Acesso em: 01 Dezembro 2015.

SIDDIQUI, M.J.K, JYOT, SINGH, S., MEHROTRA, P.K., SINGH, K. SARANGI, R. Comparison of some trace elements concentration in blood, tumor free breast and tumor tissues of women with benign and malignant breast lesions: An Indian study. **Environment International.** v. 32, p. 630-637, 2006.

SILVA, A. E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 625-633, 2004.

SILVA, M. P. **Estudo da Fluorescência de elementos traços para identificar a presença de neoplasias mamárias**. Dissertação de Mestrado. Ribeirão Preto, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras: Programa de Pós Graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia. 2007, 68 páginas.

SILVA, M. P. **Papel dos elementos traços em neoplasias mamárias:** estudo através de técnicas espectroscópicas de fluorescência de raios X e análise imunohistoquímica. Tese de Doutorado. Ribeirão Preto, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras: Programa de Pós Graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia. 2011, 108 páginas.

SILVA, M. P. *et al.* Determination of Ca, Fe, Cu and Zn and their correlations in breast cancer and normal adjacent tissue. **X-Ray Spectrometry**, v. 38, n. 2, p. 103-111, April 2009.

SILVA, M. P. *et al.* Role of Ca, Fe, Cu and Zn in breast cancer: study by X-ray fluorescence techniques and immunohistochemical analysis. **X-Ray Spectrometry**, v. 42, p. 303-311, 2013.

SIMABUCO, S. M. Emprego da fluorescência de raios X por dispersão de energia no estudo da dinâmica da vinhaça do solo. **IPEN**, 1993.

SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais.** 2ª. ed. São Paulo: Manole, 1998.

SOARES, M. P. Fisiologia da glândula mamária: aspectos comparativos. **A Hora Veterinária**, ano 22, n. 131, p. 11-14, 2003.

SPRAWLS, P. **The Physical Principles of Medicine Imaging**. 2ª. ed. Atlanta: Medical Physics Publishing Corporation, 1995.

TAUHATA, L. *et al.* **Radioproteção e Dosimetria:** Princípios. 5ª. ed. Rio de Janeiro: IRD/CNEN, 2003.

TERTIAN, R.; CLAISSE, F. **Principles of quantitative x-ray fluorescence analysis.** London: Heyden, 1982.

TERZIAN, A. C. B.; ZUCCARI, D. A. P. C.; PEREIRA, R. S. E. A. A avaliação imuno-histoquímica de apoptose nas neoplasias mamárias em cadelas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 57(1):94, 2005.

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

VONDERHAAR, B. K. Prolactin involvement in breast cancer. **Endocrine Related Cancer**, v. 6, p. 389-404, 1999.

WERNER, J. **Avaliação Histopatológica das dermatopatias de pequenos animais diagnosticadas entre Janeiro de 1998 e Abril de 2001 em Curitiba - Paraná.** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná. Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias: Curitiba. 2002.

WHITE, R. A. S. Tratamento cirúrgico de distúrbios cutâneos específicos. 3ª. ed. Barueri: Manoele, v. 1, 2007. Cap. 25, p. 339-355.

WILLETT, W. Diet and Cancer. **The Oncologist**, v. 5, p. 393-404, 2000.

WILLIS, R. A. **The Spread of Tumors in the Human Body.** London: Butterworth, 1952.

YAGER, J. A.; WILCOCK, B. P. **Color atlas and Text of Surgical Pathology of the Dog and Cat. Dermatopathology and Skin Tumors.** 1ª. ed. London: Mosb-Year Book Europe Limited, 1994.

YOSHIMURA, E. M. Radiation Physics: interation of radiation with matter. **Revista Brasileira de Física Médica**, v. 3 (1), p. 57-67, 2009.

ZANGANI, D., DARCY, K.M., *et al.* Adipocyte-epithelial interactions regulate the in vitro development of normal mammary epithelial cells. **Experimental Cell Research**, v. 247, p. 399-409, 1999.

ZUCCARI, D. A. P. C.; SANTANA, A. E.; ROCHA, N. S. Fisiopatologia da neoplasia mamária em cadelas. **Clínica Veterinária**, n. 2, p. 50-54, 2001.

# ANEXO A – Parecer Consubstanciado Da CEUA

Ministério da Educação
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
Câmpus Dois Vizinhos
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

PROJETO DE PESQUISA / AULA PRÁTICA

| | |
|---|---|
| **Título:** | Análise Quali-Quantitativa De Elementos Traços Presentes Em Tecido Mamário Neoplásico Canino Através Da Técnica De Fluorescência De Raios X |
| **Área Temática:** | **3.13.00.00-6 – Engenharia Biomédica** |
| **Pesquisador / Professor:** | **André Luiz Coelho Conceição** |
| **Instituição:** | **UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ – CAMPUS CURITIBA** |
| **Financiamento:** | **CAPES** |
| **Versão:** | 02 |

| **PARECER CONSUBSTANCIADO DA CEUA** | **Protocolo nº 2015-17** |
|---|---|
| **Apresentação do Projeto:** Trata-se de projeto no qual os pesquisadores buscam avaliar qualitativamente e quantitativamente os elementos traço cálcio, ferro, cobre e zinco em tecido mamário canino normal e tumoral com o objetivo de relacionar a presença e a concentração destes elementos com o surgimento e desenvolvimento destes tumores. Serão utilizadas amostras previamente coletadas em serviço cirúrgico veterinário. As amostras serão analisadas pela técnica de fluorescência de raios X. Escolheu-se utilizar amostras caninas devido à escassez deste tipo de estudo em animais e por ser um modelo experimental de neoplasia mamária com possibilidade de extrapolação de achados para humanos. | |
| **Objetivo:** Em suma o objetivo do trabalho é comparar as concentrações dos elementos traço cálcio, ferro, cobre e zinco em amostras normais e tumorais de tecido mamário canino utilizando a técnica de fluorescência de raios X. | |
| **Avaliação dos Riscos e Benefícios:** O projeto apresenta como potenciais benefícios a determinação da relação da presença de determinadas concentrações dos elementos traço analisados com alterações neoplásicas mamárias caninas, com contribuição para compreensão destas patologias em cães e possível extrapolação dos dados para seres humanos. O projeto não oferecerá riscos aos animais uma vez que serão utilizadas amostras previamente coletadas em serviço cirúrgico veterinário e que seriam descartadas. O grupo de pesquisa envolvido tem experiência no uso de raios X e o projeto, provavelmente, não oferecerá risco aos participantes. | |
| **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**<br>O objetivo da pesquisa apresenta mérito científico e os pesquisadores envolvidos têm experiência na área.<br>Foi apresentada carta de ciência da clínica veterinária que está cedendo as amostras para o estudo. | |
| **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**<br>Os termos foram corretamente apresentados: 1) Requerimento preenchido completamente e assinado pelo pesquisador responsável pelo projeto; 2) formulário unificado de encaminhamento do CEUA/UTFPR; 3) projeto de pesquisa completo no modelo da PROPPG-CEUA; 4) declaração de não início do projeto (com assinatura e data); 7) registro de projeto junto a Diretoria responsável (anuência da DIRPPG); 5) Anuência do laboratório que cederá as amostras. | |
| **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:** | |



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
Câmpus Dois Vizinhos
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

| |
|---|
| Não há. |
| **Situação do Parecer:**<br>APROVADO |
| **Considerações Finais a Critério da CEUA:**<br>Todos os procedimentos devem seguir a lei n° 11.794 de 8 de outubro de 2008 |

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Análise Quali-Quantitativa De Elementos Traços Presentes Em Tecido Mamário Neoplásico Canino Através Da Técnica De Fluorescência De Raios X", protocolo nº 2015/17, sob a responsabilidade de André Luiz Coelho Conceição - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UTFPR) da UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ, em reunião de 12/11/2015.

| | |
|---|---|
| **Vigência do projeto:** | 16/11/2015 a 02/03/2016 |
| **Espécie/linhagem:** | Cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) |
| **Número de animais:** | 60 |
| **Peso/Idade:** | Porte pequeno/ não determinada |
| **Sexo:** | fêmeas |
| **Origem:** | Serão amostras previamente coletadas em serviço cirúrgico veterinário. |

Dois Vizinhos, 13 de novembro de 2015.

Nédia C. Ghisi

Assinado por:

Nédia de Castilhos Ghisi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná

## ANEXO B – Exemplo De Laudo Histopatológico

[redacted]

**N.º 15-4509**
Data de entrada: 30/06
Número de origem: XXX
Número de lâminas: 01

***RESULTADO DE EXAME***
***HISTOPATOLÓGICO /CITOPATOLÓGICO***

***Responsável***: [redacted]
***Identificação do Animal – Nome***: [redacted] ***Espécie***: canina. ***Raça***: Poodle. ***Sexo***: F. ***Idade***: 11 anos.
***Médico Veterinário***: [redacted]
***Histórico***: nódulo não aderido, não ulcerado, firme, crescimento lento, evolução de mais de um ano, nódulo em mama. ***Suspeita clínica***: neoplasia.
***Amostra***: nódulo.

---

***MACROSCOPIA***

Massa tecidual parcialmente revestida por pele esbranquiçada com um mamilo, medindo 42 x 34 x 13 mm. Ao corte exibe consistência levemente firme, área de aspecto regular compacto e coloração esbranquiçada, e área com aspecto irregular e coloração esbranquiçada a acastanhada (1B/1F/PI).

***MICROSCOPIA***

Tecido mamário envolto por pele e exibindo transformação neoplásica multinodular, expansiva, discretamente infiltrativa, moderadamente bem delimitada e parcialmente revestida por cápsula fibrosa. Existe componente mesenquimal que apresenta metaplasia mixóide, pré-cartilaginosa e colagenosa. As células tumorais epiteliais propagam-se formando estruturas glandulares irregulares que infiltram o componente mesenquimal e a cápsula fibrosa. Existe anisocariose, anisocitose e atipia nuclear discreta. O índice mitótico é de 1 f.m./ 10 campos de 40x. O tecido mamário peritumoral apresenta hiperplasia.

***DIAGNÓSTICO OU CONCLUSÕES***

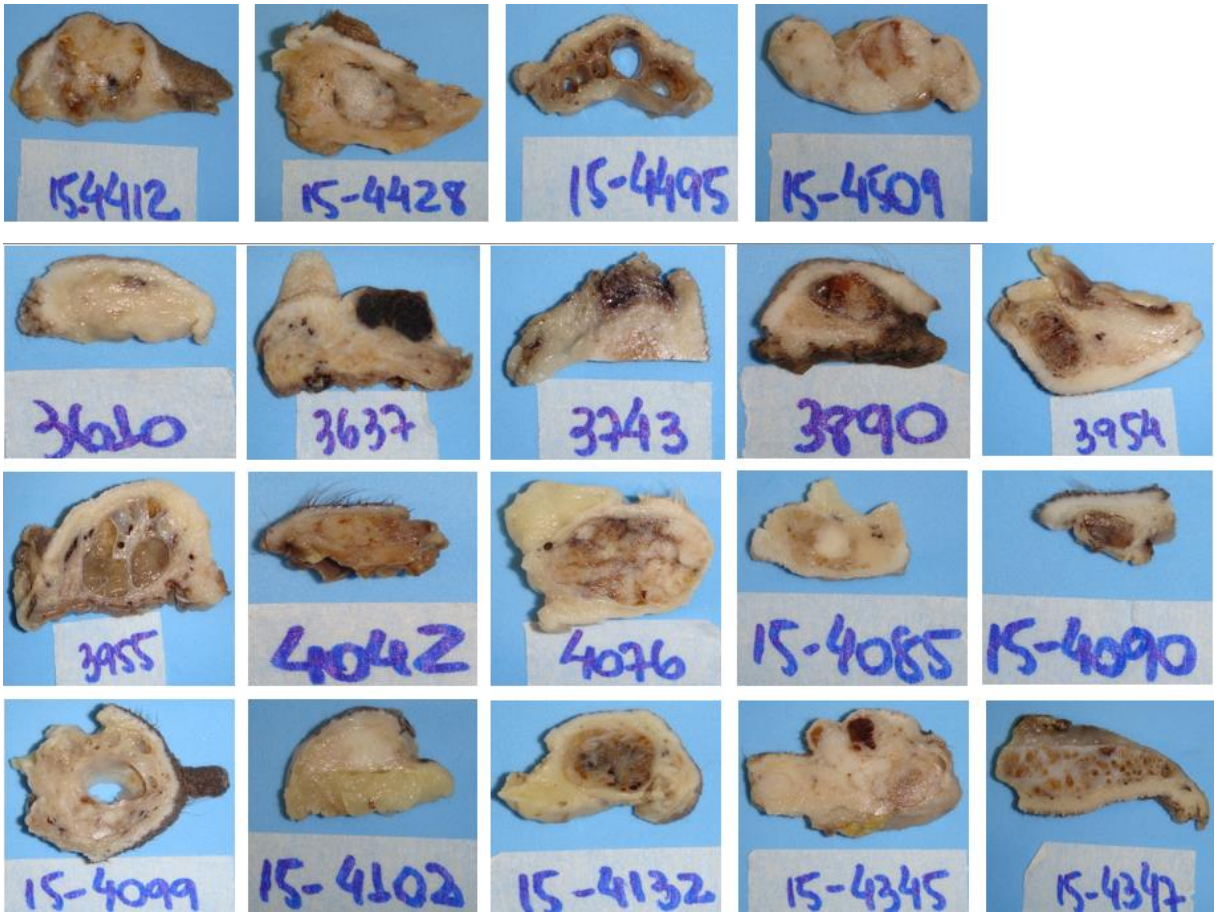
CARCINOMA EM TUMOR MAMÁRIO MISTO – GRAU 1 (CASSALI, G. D. 2014).

**Curitiba,** [redacted]

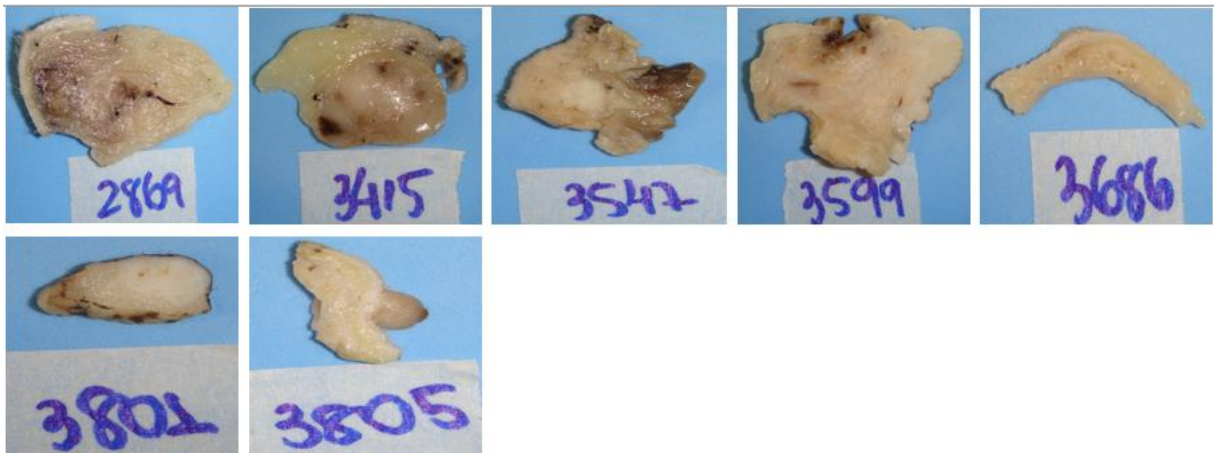
**Assinado Eletronicamente por**
[redacted]

## APÊNDICE A – Imagem Macroscópica De Grupo De Amostras Neoplásicas E Grupo De Amostras Diversos

Amostras grupo neoplásico: maligna e benigna.




Amostras grupo diverso: hiperplasias, paniculite, hamartoma, linfoma difuso.



# APÊNDICE B – Códigos X-Ray Monte Carlo Utilizados Neste Trabalho

```
; Composition file
;
Newdevice composition          ; Device type
Composition                    ; Device name

Phase Air                      ; Air
NElem 3                        ; Number of atomic species for this phase
7  76.000000                   ; Atomic number, weight percent of 1st element
8  23.000000                   ;          ....
18  1.000000
Rho 0.000010                   ; mass density of the phase (g/cm3)


Phase Ca_400        Phase Fe_20         Phase Cu_10         Phase  Zn_100
NElem 4             NElem 4             NElem 4             NElem 4
1  11.19456         1  11.2091           1  11.2094          1  11.2070
8  88.73356         8  88.7851           8  88.7891          8  88.7781
16  0.031951        17  0.0038           7  0.0004           16  0.0049
20  0.039931        26  0.0020           29  0.001           30  0.01
Rho 1.0             Rho 1.0             Rho 1.0             Rho 1.0

Phase Ca_308        Phase Fe_15         Phase Cu_8          Phase Zn_78
NElem 4             NElem 4             NElem 4             NElem 4
1  11.1981          1  11.2093           1  11.2095          1  11.2076
8  88.7466          8  88.7864           8  88.7893          8  88.7808
16  0.0296          17  0.0029           7  0.0004           16  0.0038
20  0.0369          26  0.0015           29  0.0008          30  0.0078
Rho 1.0             Rho 1.0             Rho 1.0             Rho 1.0

Phase Ca_217        Phase Fe_11         Phase Cu_5          Phase Zn_50
NElem 4             NElem 4             NElem 4             NElem 4
1  11.1957          1  11.2094           1  11.2096          1  11.2084
8  88.7378          8  88.7874           8  88.7897          8  88.7842
16  0.0246          17  0.0021           7  0.0002           16  0.0025
20  0.0308          26  0.0011           29  0.0005          30  0.005
Rho 1.0             Rho 1.0             Rho 1.0             Rho 1.0

Phase Ca_126        Phase Fe_6          Phase Cu_3          Phase Zn_30
NElem 4             NElem 4             NElem 4             NElem 4
1  11.2050          1  11.2096           1  11.2097          1  11.2089
8  88.7724          8  88.7887           8  88.7899          8  88.7866
16  0.0101          17  0.0011           7  0.0001           16  0.0015
20  0.0126          26  0.0006           29  0.0003          30  0.003
Rho 1.0             Rho 1.0             Rho 1.0             Rho 1.0

Phase Ca_35         Phase Fe_2          Phase Cu_1          Phase Zn_9
NElem 4             NElem 4             NElem 4             NElem 4
1  11.2084          1  11.2097           1  11.2097          1  11.2095
8  88.7853          8  88.7897           8  88.7901          8  88.7891
16  0.0028          17  0.0004           17  0.00004         16  0.0004
20  0.0035          26  0.0002           26  0.0001          30  0.0009
Rho 1.0             Rho 1.0             Rho 1.0             Rho 1.0


End
```

**;/; Detector array parameter file**

```
;
Newdevice detectorarray          ; Device type
DetectorArray                    ; Device name
SourceName Sample                ; Source input device name
NPixels 1 1                      ; Pixel number (NX x NY)
PixelSize 1.0 1.0                ; Pixel Size (cm)
Shape 1                          ; Pixel shape (0 rectangular, 1 elliptical)
dOmegaLim 1e-2                   ; Cut on dOmega (default = 2*PI)
X  1  0.414  0                   ; detector center coordinates x, y, z
                                 ; Detector orientation :
uk  -0.924  -0.383  0            ; z direction (normal to the screen)
ui   0 -1  0                     ; x direction
ExpTime 1                        ; Exposure time (sec)
PhotonNum 10000                  ; Multiplicity of simulated events per pixel
RandomPixelFlag 1                ; Enable random point on pixels (0/1)
PoissonFlag 0                    ; Enable poisson statistic on pix. counts (0/1)
RoundFlag 0                      ; Round pixel counts to integer (0/1)
HeaderFlag 0                     ; Use header in output file (0/1)
AsciiFlag 1                      ; binary(0) or ascii(1) file format
PixelType 2                      ; Pixel content type:
                                 ; 0: fluence, 1: energy fluence,
                                 ; 2: fluence(E), 3: energy fluence(E)
Emin 0                           ; Emin
Emax 40                          ; Emax
NBins 1000                       ; Nbins
SaturateEmin 0                   ; Saturate energies lower than Emin (0/1)
SaturateEmax 0                   ; Saturate energies greater than Emax (0/1)
;Rotate 0 0 0 1 0 0 -20          ; rotation around axis x, u, angle theta
;Rotate 0 0 0 0 0 1 -30          ; rotation around axis x, u, angle theta
End
```

**; 3D object geometric description file**

```
;
Newdevice geom3d                 ; Device type
Geom3D                           ; Device name
QArrName QuadricArray            ; Quadric array input device name
CompName Composition             ; Composition input device name

;
Object Porta
Ca_400 Vacuum                    ; Phase in, phase out
3                                ; Number of quadrics
CX1 P1 P2                        ; Quadric names
End
```

**; X-ray Monte Carlo (xrmc) input file**

```
; Files used by the simulation
;

Load source_20deg.dat            ; Source position, orientation
Load detector_0deg.dat           ; Detector position, orientation, size
Load spectrumAg40kV.dat          ; Energy Spectrum file
Load sample.dat                  ; Sample file
Load quadric.dat                 ; quadric file
Load geom3d.dat                  ; qvolume file
Load composition.dat             ; composition file
Run DetectorArray                ; Run device
```

```
Save DetectorArray Image output.dat      ; Output file : scattering image
End
```

**; Quadric array file**

```
;
Newdevice quadricarray          ; Device type
QuadricArray                    ; Device name

;external cylinder
CylinderX CX1                   ; cylinder:
0 0 1.6 1.6                     ; axis x0, y0, ellipt. section semiaxes Rx, Ry

Plane P1
0   0   0       1  0  0

Plane P2
-1  0  0     -1   0  0
End
```

**; Sample parameters file**

```
;
;
;
Newdevice sample                ; Device type
Sample                          ; Device name
SourceName Source               ; Source input device name
Geom3DName Geom3D               ; Geom3d input device name
CompName Composition            ; Composition input device name
WeightedStepLength 0            ; Weighted step length (0/1)
FluorFlag 1                     ; Activate Fluorescence (0/1)
ScattOrderNum 3                 ; Maximum scattering order
500                             ; Multiplicity of simulated events for order 0
10000                           ; Multiplicity of simulated events for order 1
10000                           ; Multiplicity of simulated events for order 2
10000                           ; Multiplicity of simulated events for order 3
End
```

**; Source position/orientation file**

```
;
Newdevice source                ; Device type
Source                          ; Device name
SpectrumName Spectrum           ; Spectrum input device name
X 1 -0.414 0                    ; source x, y, z
; Source orientation :
uk -0.924   0.383 0             ; z direction (main source direction)
ui 0 0 1                        ; x direction
Divergence 4e-1  4e-1           ; beam divergence (thetax, thetay)
Size 0.05 0.05 0.05             ; source size (sigmax sigmay, sigmaz, cm) in
                                ; local coordinate system
;Rotate 0 0 0 1 0 0 -20         ; rotation around axis x, u, angle theta
;Rotate 0 0 0 0 0 1 -30         ; rotation around axis x, u, angle theta
End
```

**; Spectrum file**

```
;
Newdevice spectrum              ; Device type
Spectrum                        ; Device name
```

```
PolarizedFlag 0                 ; unpolarized/polarized beam (0/1)
LoopFlag 0                      ; 0: extract random energies on the whole spectrum
                                ; 1: loop on all lines and sampling points
ContinuousPhotonNum 1           ; Multiplicity of events for each interval in spectrum
LinePhotonNum 1                 ; Multiplicity of events for each line in the spectrum
RandomEneFlag 1                 ; enable random energy on each interval (0/1)
ContinuousSpectrumFile          ; continuous part of the spectrum
1023                            ; Number of sampling points in the continuous spectrum
continuous_spectrum.dat         ; Continuous spectrum file name
End
```

# APÊNDICE C – Tabelas Que Representam Um Resumo Dos Resultados Para Cada Elemento Traço Estudado

**Valores de Concentração do elemento Ca em tecidos mamários Caninos.**

| Ca | Amostras Pareadas | | Amostras Não Pareadas | |
|---|---|---|---|---|
| | TNP[1] | Neoplasia | TD[2] | Neoplasia |
| Min–Máx (mg/kg) | NI[3] – 218,26 | 53,13 – 218,38 | 37,47 – 257,9 | NI[3] – 811,72 |
| Média (mg/kg) | 60,7 | 156,33 | 174,16 | 187,43 |
| Mediana (mg/kg) | 11,45 | 191,84 | 210,71 | 197,18 |
| 25% - 75% (mg/kg) | 4,75 – 139,82 | 72,78 – 207,18 | 61,92 – 225,22 | 76,79 – 240,06 |

**Fonte: Autoria própria.**

**Valores de Concentração do elemento Fe em tecidos mamários Caninos.**

| Fe | Amostras Pareadas | | Amostras Não Pareadas | |
|---|---|---|---|---|
| | TNP | Neoplasia | TD | Neoplasia |
| Min – Máx (mg/kg) | NI[3] – 70,67 | 18,37 – 91,37 | 11,18 – 60,25 | 11 – 103,35 |
| Média (mg/kg) | 29,43 | 42,5 | 36,35 | 37,19 |
| Mediana (mg/kg) | 17,91 | 34,24 | 30,75 | 32,12 |
| 25% - 75% (mg/kg) | 11,39 – 46,49 | 22,83 – 60,99 | 13,56 – 59,29 | 22,67 – 43,9 |

**Fonte: Autoria própria.**

**Valores de Concentração do elemento Cu em tecidos mamários Caninos.**

| Cu | Amostras Pareadas | | Amostras Não Pareadas | |
|---|---|---|---|---|
| | TNP | Neoplasia | TD | Neoplasia |
| Min – Máx (mg/kg) | NI[3] – 42,9 | 0,48 – 25,74 | NI[3] – 8,51 | NI[3] – 58,62 |
| Média (mg/kg) | 6,48 | 11,10 | 1,55 | 11,12 |
| Mediana (mg/kg) | 0,3 | 9,66 | 0,4 | 5,5 |
| 25% - 75% (mg/kg) | 0,3 – 0,9 | 4,46 – 15,86 | 0,2 – 0,8 | 0,3 – 16,2 |

**Fonte: Autoria própria.**

**Valores de Concentração do elemento Zn em tecidos mamários Caninos.**

| Zn | Amostras Pareadas | | Amostras Não Pareadas | |
|---|---|---|---|---|
| | TNP | Neoplasia | TD | Neoplasia |
| Min – Máx (mg/kg) | NI[3] – 10,52 | NI[3] – 7,68 | 0,24 – 7,58 | NI[3] – 33,41 |
| Média (mg/kg) | 2,94 | 3,81 | 4,09 | 4,73 |
| Mediana (mg/kg) | 0,3 | 4,99 | 3,72 | 2,72 |
| 25% - 75% (mg/kg) | 0,2 – 5,63 | 1,05 – 5,27 | 1,16 – 7,45 | 0,77 – 6,79 |

**Fonte: Autoria própria.**

[1] TNP: tecido normal periférico.
[2] TD: tecido diverso.
[3] NI: não identificado.