

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA E ASTRONOMIA**

**FELIPE BURILLE**

**CARACTERIZAÇÃO DE TECIDOS MAMÁRIOS CANINOS NORMAIS E  
NEOPLÁSICOS COMBINANDO TÉCNICAS DE MICRO-FLUORESCÊNCIA E  
ESPALHAMENTO DE RAIOS X**

**DISSERTAÇÃO**

**CURITIBA**

**2020**

**FELIPE BURILLE**

**CARACTERIZAÇÃO DE TECIDOS MAMÁRIOS CANINOS NORMAIS E  
NEOPLÁSICOS COMBINANDO TÉCNICAS DE MICRO-FLUORESCÊNCIA E  
ESPALHAMENTO DE RAIOS X**

**Characterization of normal and neoplastic canine breast tissues  
combining micro-fluorescence and X-ray scattering techniques**

Dissertação apresentada como requisito para  
obtenção do título de Mestre em Física da  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
(UTFPR).

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Antoniassi

Coorientador: Prof. Dr. André Luiz Coelho Conceição

**CURITIBA**

**2020**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite que outros distribuam, remixem, adaptem e criem a partir do seu trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que lhe atribuam o devido crédito pela criação original. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

## TERMO DE APROVAÇÃO DE DISSERTAÇÃO

A Dissertação de Mestrado intitulada “**Caracterização de Tecidos Mamários Caninos Normais e Neoplásicos Combinando Técnicas de Micro-fluorescência e Espalhamento de Raios X**”, defendida em sessão pública pelo(a) candidato(a) **Felipe Burille**, no dia 19 de agosto de 2020, foi julgada para a obtenção do título de Mestre em Física e Astronomia, Área de concentração Física, Linha de pesquisa Física Atômica e Molecular, e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Física e Astronomia.

### BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Marcelo Antoniassi - Presidente - UTFPR

Prof. Dr. Pedro Zambianchi Junior - UTFPR

Prof. Dr. Martin Eduardo Poletti – FFCLRP/USP

A via original deste documento encontra-se arquivada na Secretaria do Programa, contendo a assinatura da Coordenação após a entrega da versão corrigida do trabalho.

Curitiba, 19 de agosto de 2020.

---

Carimbo e Assinatura do(a) Coordenador(a) do Programa

Ao meu querido pai (in memoriam)

## **AGRADECIMENTOS**

A elaboração deste trabalho só foi possível graças ao auxílio de diversas pessoas e instituições. Portanto, gostaria de expressar a minha gratidão e apreço a todos aqueles que contribuíram para sua realização.

Primeiramente, a minha família, pelo carinho, incentivo e total apoio em todos os momentos da minha vida.

Ao meu orientador, professor Dr. Marcelo Antoniassi, pela orientação, convívio, amizade e apoio para realização deste trabalho.

Aos professores André L. C. Conceição, Pedro Zambianchi Jr., Jaqueline Kappke e colegas do Grupo de Imagem e Espectroscopia de Raios X (GIERX) da UTFPR, que ajudaram de forma direta e indireta na conclusão deste trabalho, em especial a Camila de Almeida Salvego pelos momentos de discussões.

Ao Departamento de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Paraná e professor Renato Silva de Souza, por ter fornecido as amostras de tecidos e laudos histológicos, além de ajudar na identificação das estruturas dos tecidos analisados.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron - LNLS, pela oportunidade de realizar meus experimentos, e ao Dr. Carlos Pérez responsável pela Linha de Luz Síncrotron XRF por todo auxílio fornecido.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

BURILLE, Felipe. **Caracterização de tecidos mamários caninos normais e neoplásicos combinando técnicas de micro-fluorescência e espalhamento de raios X**. 2020. 84 f. Dissertação (Mestrado em Física e Astronomia) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2020.

O câncer é uma das principais causas de morte na espécie canina, e 25% dessas neoplasias ocorrem nas glândulas mamárias desses animais. Estudos sobre câncer de mama canino não são apenas relevantes para essa espécie, mas também para a oncologia humana. Os tumores mamários caninos apresentam semelhanças histológicas e etiológicas com os tecidos mamários humanos, tais como, desenvolvimento do tumor, dependência hormonal e padrão metastático. Logo, o estudo de tecidos mamários caninos pode servir de modelo para entender o processo carcinogênico de ambas as espécies. A utilização de técnicas espectroscópicas, como fluorescência e espalhamento de raios X, permite a obtenção de informações a respeito de diversos tecidos biológicos, e a aplicação destas no estudo de tumores mamários pode ser útil para entender a relação entre a composição tecidual e o processo carcinogênico. A fluorescência de raios X é uma das técnicas mais utilizadas para determinar a concentração de elementos-traço em tecidos mamários. O espalhamento de raios X, por sua vez, permite obter informações do número atômico efetivo ( $Z_{ef}$ ), através da razão de intensidades entre os espalhamentos Rayleigh e Compton ( $R/C$ ). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi a caracterização dos tecidos mamários caninos normais e neoplásicos, combinando técnicas de micro-fluorescência de raios X ( $\mu$ -XRF) e espalhamento de raios X, obtendo informações da distribuição espacial dos elementos químicos e do número atômico efetivo da matriz tecidual, respectivamente. Este estudo analisou nove amostras de tecidos mamários caninos (normais, benignos e malignos) na linha de luz de fluorescência de raios X, do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS. Inicialmente, foi aplicada a técnica de  $\mu$ -XRF usando um feixe polienergético para mapear a distribuição espacial dos elementos químicos nos tecidos mamários. Em seguida, foi empregada a técnica de espalhamento de raios X, com modificação do arranjo para utilização de um feixe monocromatizado (12 keV). Foram medidos pontos selecionados nas amostras, com intuito de se obter valores de razão  $R/C$  e  $Z_{ef}$  nessas regiões. Os resultados de  $\mu$ -XRF mostraram-se sensíveis às variações de distribuição espacial dos diferentes elementos traço: S, Ca, Fe, Zn, Cu e Br, sendo possível a criação de mapas com essas distribuições, os quais foram correlacionados com as diferentes regiões histológicas sadias e neoplásicas dos tecidos

mamários. Os mapas de  $\mu$ -XRF apresentaram maiores quantidades de S e Ca em regiões de ácinos e ductos mamários. O Fe destacou-se em regiões próximas as neoplasias e vasos sanguíneos nas amostras. Zn e Cu estavam distribuídos de maneira semelhante ao longo dos tecidos, exceto por regiões de vasos sanguíneos, que apresentaram maior intensidade de Zn. Quanto ao comportamento das razões  $R/C$  e  $Z_{ef}$ , verificou-se concordância com os trabalhos presentes na literatura, com valores baixos em regiões de tecido de menor glandularidade e aumentando em regiões fibroglandulares e tumorais. Por fim, observa-se que a combinação das técnicas de  $\mu$ -XRF e espalhamento de raios X permite obter informações complementares no estudo de tecidos mamários caninos normais e neoplásicos.

**Palavras-chave:** Neoplasia mamária canina. Elemento-traço. Número atômico efetivo.

## ABSTRACT

BURILLE, Felipe. **Characterization of normal and neoplastic canine breast tissues combining micro-fluorescence and X-ray scattering techniques.**

2020. 84 p. Dissertation (Master's Degree in Physics) – Federal University of Technology – Paraná. Curitiba, 2020.

Cancer is one of the main causes of deaths in the canine species, and 25% of these neoplasms occur in the mammary glands of these animals. Studies on canine breast cancer are not only relevant for this species, but also for human oncology. Canine breast tumors have histological and etiological similarities with human breast tissues, such as tumor development, hormonal dependence and metastatic pattern. Therefore, the study of canine breast tissues can serve as a model to understand the carcinogenic process of both species. The use of spectroscopic techniques, such as X-ray fluorescence and scattering, allows to obtain information about different biological tissues, and their application in the study of breast tumors can be useful to understand the relationship between tissue composition and the carcinogenic process. X-ray fluorescence is one of the most used techniques to determine the concentration of trace elements in breast tissues. The scattering of X-rays allows obtaining information on the effective atomic number ( $Z_{ef}$ ). Thus, the objective of this work was to characterize normal and neoplastic canine breast tissues, combining X-ray micro-fluorescence ( $\mu$ -XRF) and scattering techniques, to obtain information about the spatial distribution of chemical elements of the effective atomic number of the tissue matrix, respectively. This study analyzed nine samples of canine breast tissues (normal, benign and malignant) in the X-ray fluorescence beamline, at the National Synchrotron Light Laboratory - LNLS. Initially, the  $\mu$ -XRF technique was applied using a polyenergetic beam to map the spatial distribution of chemical elements in breast tissues. Then, the X-ray scattering technique was used, with modification of the arrangement to use a monochromatic beam (12 keV). Selected points in the samples were measured in order to obtain ratio  $R/C$  and  $Z_{ef}$  values in these regions. The  $\mu$ -XRF results were shown to be sensitive to variations in the spatial distribution of the different trace elements: S, Ca, Fe, Zn, Cu and Br, making it possible to create maps with these distributions, which were correlated with the different healthy and neoplastic regions of the breast tissues. The  $\mu$ -XRF maps showed higher amounts of S and Ca in regions of acini and mammary ducts. Fe stood out in regions close to neoplasms and blood vessels in the samples. Zn and Cu were distributed in a similar way throughout the tissues, except for regions of blood vessels, which presented greater intensity of Zn. As for the behavior for the ratio



$R/C$  and  $Z_{ef}$ , there was agreement with the studies found in the literature, with low values in regions of the less glandular and increasing in fibroglandular and tumoral regions. Finally, it is observed that the combination of  $\mu$ -XRF and X-ray scattering techniques allowsf obtaining complementary information in the study of normal and neoplastic canine breast tissues.

**Keywords:** Canine mammary neoplasms . Trace elements. Effective atomic number.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura anatômica de uma glândula mamaria canina. . . . .	20
Figura 2 – Cadeia de mamas canina e sistema linfático simplificado. As mamas caninas são subdivididas como: torácicas craniais (M1), torácicas caudais (M2), abdominais craniais (M3), abdominais caudais (M4) e inguinais (M5) . . . . .	21
Figura 3 – Estrutura histológica do alvéolo e ducto associado de uma mama canina. . . . .	22
Figura 4 – Glândula mamária inativa e ativa. . . . .	23
Figura 5 – Lâminas histológicas de tecido mamário normal e neoplásico correspondente a espécie canina e humana. . . . .	24
Figura 6 – Representação esquemática do efeito fotoelétrico com um elétron orbital do átomo transferindo toda sua energia. . . . .	26
Figura 7 – Representação esquemática do efeito Rayleigh, onde o raio X com energia incidente $h\nu_1$ interage com o átomo sofrendo um espalhamento em um ângulo $\theta$ . . . . .	28
Figura 8 – Fator de forma atômico das tabelas de Hubbell et al. (1975) (esquerda) e secção de choque diferencial Rayleigh (direita) em função do momento transferido para os átomos de Hidrogênio (H), Carbono (C) e Oxigênio (O). . . . .	29
Figura 9 – Representação esquemática do efeito Compton, onde o raio X com energia $h\nu_1$ e momento $\hbar\vec{k}_1$ incidentes interagem com o elétron orbital provocando o seu espalhamento em um ângulo $\theta$ e do elétron em um ângulo $\varphi$ . . . . .	30
Figura 10 – Função de espalhamento incoerente das tabelas de Hubbell et al. (1975) (esquerda) e secção de choque diferencial Compton (direita) em função do momento transferido para os átomos de hidrogênio (H), carbono (C) e oxigênio (O). . . . .	33
Figura 11 – Perfil de espalhamento Compton das tabelas de Biggs, Mendelsohn e Mann (1975) em função do momento $p_z$ para os átomos de hidrogênio (H), carbono (C) e oxigênio (O). . . . .	35
Figura 12 – Transição eletrônica e emissão de raios X característico do átomo. As letras K, L, M e N representam as camadas eletrônicas e $n$ os níveis de energia do átomo. . . . .	37
Figura 13 – Esquema experimental básico empregado durante as investigações de Micro Fluorescência de Raios X ( $\mu$ -XRF). . . . .	38
Figura 14 – Esquema de uma instalação de radiação síncrotron. . . . .	40

Figura 15 – Estrutura de bandas de energia para materiais isolantes e semicondutores. . . . .	42
Figura 16 – Exemplo de uma amostra fotografada pelo estereomicroscópio e região de interesse selecionada para o estudo. . . . .	47
Figura 17 – Esquema experimental na linha XRF no UVX-LNLS (esquerda) e disposição da amostra no equipamento (direita). . . . .	48
Figura 18 – Razão entre o espalhamento Rayleigh e Compton ( $R/C$ ) em função do número atômico efetivo $Z_{ef}$ . Os valores obtidos da função $f_{0,66}(Z)$ (pontos) são para os elementos químicos puros e $f_{0,66}(Z_{ef})$ (linha contínua) são resultados do ajuste polinomial para o número atômico efetivo $Z_{ef}$ . . . . .	52
Figura 19 – Espectro de fluorescência de raios X normalizado em um dos pontos medidos da amostra VII (esquerda) e ajuste de curva total realizado para esse espectro experimental (direita). . . . .	53
Figura 20 – Amostra I (tecido normal) - Distribuição espacial dos elementos químicos com sua respectiva lâmina histológica (LH) e regiões indicadas (1. tecido fibroso, 2. lóbulos mamários, 3. ductos e 4. vasos sanguíneos). . . . .	55
Figura 21 – Amostra II (tecido normal) - Distribuição espacial dos elementos químicos com sua respectiva lâmina histológica (LH) e regiões indicadas (1. tecido fibroso, 2. lóbulos mamários, 3. ductos e 4. vasos sanguíneos). . . . .	55
Figura 22 – Amostra III (tecido normal) - Distribuição espacial dos elementos químicos com sua respectiva lâmina histológica (LH) e regiões indicadas (1. tecido fibrocolagenoso, 2. lóbulos mamários, 3. ductos e 4. vasos sanguíneos). . . . .	56
Figura 23 – Amostra IV (adenoma simples a papilífero) - Distribuição espacial dos elementos químicos com sua respectiva lâmina histológica (LH) e regiões indicadas (1. tecido fibroso, 2. linfonodo, 3. neoplasias e 4. vasos sanguíneos). . . . .	56
Figura 24 – Amostra V (adenoma cístico) - Distribuição espacial dos elementos químicos com sua respectiva lâmina histológica (LH) e regiões indicadas (1. tecido fibroso, 2. lóbulos mamários circundados por neoplasias, 3. ductos e 4. vasos sanguíneos). . . . .	57
Figura 25 – Amostra VI (adenoma simples a papilífero) - Distribuição espacial dos elementos químicos com sua respectiva lâmina histológica (LH) e regiões indicadas (1. tecido fibroso, 2. lóbulos mamários circundados por neoplasias, 3. ductos e 4. vasos sanguíneos). . . . .	57

Figura 26 – Amostra VII (adenocarcinoma papilífero a complexo de grau I) - Distribuição espacial dos elementos químicos com sua respectiva lâmina histológica (LH) e regiões indicadas (1. tecido fibroso, 2. neoplasias e 3. vasos sanguíneos). . . . .	58
Figura 27 – Amostra VIII (adenocarcinoma simples de grau I) - Distribuição espacial dos elementos químicos com sua respectiva lâmina histológica (LH) e regiões indicadas (1. tecido fibroso, 2. neoplasias e 3. vasos sanguíneos). . . . .	59
Figura 28 – Amostra IX (adenocarcinoma cístico de grau II) - Distribuição espacial dos elementos químicos com sua respectiva lâmina histológica (LH) e regiões indicadas (1. tecido fibroso, 2. vasos sanguíneos e 3. neoplasias). . . . .	60
Figura 29 – Correlações das distribuições espaciais dos elementos químicos Cu-Zn das amostras I, IV e IX. . . . .	64
Figura 30 – Correlações das distribuições espaciais dos elementos químicos S-Ca das amostras II, VIII e IX. . . . .	65
Figura 31 – Gráfico de correlação das distribuições espaciais dos elementos químicos Cu-Zn (esquerda) e Ca-S (direita) da amostra IX (tecido mamário maligno). . . . .	66
Figura 32 – Exemplo do ajuste de curva médio Rayleigh e Compton em um espectro de espalhamento médio experimental obtido em um único ponto na amostra. . . . .	67
Figura 33 – Razão Rayleigh e Compton ( $R/C$ ) dos tecidos mamários caninos normais, benignos e malignos usando a técnica de espalhamento. . . . .	68
Figura 34 – Combinação dos mapas de distribuições espaciais dos elementos-traço e razão $R/C$ obtidos das amostras normais I e III, com suas respectivas lâminas histológicas e regiões indicadas (1. tecido fibroso, 2. lóbulos mamários, 3. ductos e 4. vasos sanguíneos). . . . .	72
Figura 35 – Combinação do mapa de distribuição espacial dos elementos-traço e razão $R/C$ obtidos da amostra neoplásica maligna IX, com sua respectiva lâmina histológica e regiões indicadas (1. tecido fibroso, 2. vasos sanguíneos e 3. neoplasias). . . . .	72

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Semelhanças entre tumores mamários humanos e caninos. . .	25
Tabela 2 – Número atômico efetivo ( $Z_{ef}$ ) com suas respectivas incertezas dos pontos medidos nos tecidos mamários normais, benignos e malignos. . . . .	69

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
1.1	<b>OBJETIVOS</b>	18
1.1.1	Objetivo Geral	18
1.1.2	Objetivos específicos	18
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>20</b>
2.1	<b>ASPECTOS ANATÔMICOS E HISTOLÓGICOS DE TECIDOS MAMÁRIOS CANINOS</b>	20
2.1.1	Anatomia da mama	20
2.1.2	Histologia da mama	22
2.2	<b>SEMELHANÇA ENTRE TECIDOS MAMÁRIOS CANINOS E HUMANOS</b>	23
2.3	<b>INTERAÇÕES DOS RAIOS X COM A MATÉRIA</b>	26
2.3.1	Efeito Fotoelétrico	26
2.3.2	Espalhamento Rayleigh	27
2.3.2.1	Distribuição angular da radiação espalhada Rayleigh	27
2.3.3	Espalhamento Compton	30
2.3.3.1	Distribuição angular da radiação espalhada Compton	31
2.3.3.2	Distribuição em energia da radiação espalhada Compton	33
2.4	<b>FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X</b>	35
2.4.1	Micro-Fluorescência de Raios X ( $\mu$ -XRF)	37
2.5	<b>FONTES DE RAIOS X</b>	39
2.5.1	Fonte de radiação síncrotron	39
2.6	<b>DETECTORES DE RAIOS X</b>	41
2.6.1	Semicondutores	42
2.6.2	Resolução em energia	43
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>45</b>
3.1	<b>AMOSTRAS DE TECIDOS MAMÁRIOS</b>	45
3.1.1	Coleta e classificação histológica dos tecidos mamários	45
3.1.2	Preparação das amostras de tecidos mamários	45
3.2	<b>TÉCNICA DE MICRO-FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X</b>	47
3.2.1	Arranjo experimental	47
3.2.2	Método de análise para determinação dos mapas de $\mu$ -XRF	49
3.3	<b>TÉCNICA DE ESPALHAMENTO DE RAIOS X</b>	49
3.3.1	Arranjo experimental	49
3.3.2	Método de análise para determinação do número atômico efetivo usando a razão Rayleigh e Compton (R/C)	50
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>53</b>

4.1	<b>TÉCNICA DE MICRO FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X . . .</b>	<b>53</b>
4.1.1	Espectro de fluorescência de raios X . . . . .	53
4.1.2	Aspectos descritivos da distribuição espacial dos elementos químicos nos tecidos mamários . . . . .	54
4.1.2.1	Tecidos mamários normais . . . . .	54
4.1.2.2	Tecidos mamários benignos . . . . .	56
4.1.2.3	Tecidos mamários malignos . . . . .	58
4.1.3	Comparação dos resultados das distribuições espaciais dos elementos químicos obtidos com os presentes na literatura . . .	60
4.1.3.1	Enxofre (S) . . . . .	61
4.1.3.2	Cálcio (Ca) . . . . .	61
4.1.3.3	Ferro (Fe) . . . . .	62
4.1.3.4	Cobre (Cu) . . . . .	62
4.1.3.5	Zinco (Zn) . . . . .	63
4.1.3.6	Bromo (Br) . . . . .	63
4.1.4	Correlação entre os elementos químicos nos tecidos mamários	63
4.2	<b>TÉCNICA DE ESPALHAMENTO DE RAIOS X . . . . .</b>	<b>66</b>
4.2.1	Espectros de Espalhamento . . . . .	66
4.2.2	Razão Rayleigh e Compton (R/C) e número atômico efetivo ( $Z_{ef}$ ) para os diferentes grupos de tecidos mamários . . . . .	67
4.3	<b>COMBINAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE MICRO-FLUORESCÊNCIA E ESPALHAMENTO DE RAIOS X . . .</b>	<b>70</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS . . . . .</b>	<b>74</b>
5.1	PERSPECTIVAS . . . . .	76
	<b>REFERÊNCIAS . . . . .</b>	<b>77</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morte na espécie canina, chegando aproximadamente 25% dessas neoplasias ocorrerem nas glândulas mamárias desses animais (MORRIS; DOBSON, 2008), sendo 50% desses tumores malignos (GRAHAM; MYERS, 1999). O desenvolvimento do câncer de mama ocorre principalmente com o aumento da idade, na espécie canina em torno de oito à nove anos (STRANDBERG; GOODMAN, 1974). Existem poucos estudos investigando as alterações químicas que acometem os tecidos mamários caninos, mesmo com evidências de sua alta malignidade (PAOLONI; KHANNA, 2008).

A importância de estudos sobre câncer de mama canino não são apenas relevantes para essa espécie, mas também para a oncologia humana, pois, os tecidos mamários caninos apresentam semelhanças histológicas e etiológicas com os tecidos mamários humanos, tais como, desenvolvimento do tumor, dependência hormonal e padrão metastático (PINHO et al., 2012; VISAN et al., 2016). Como o câncer de mama em humanos é o segundo mais frequente no mundo e uma das principais causas de morte relacionada ao câncer (TORRE et al., 2016), entender o processo de carcinogênese em mamas tanto na espécie canina como humana é essencial para investigar as causas das alterações químicas e bioquímicas nesses tecidos. Além disso, os tecidos mamários caninos parecem representar um modelo adequado para estudos do câncer de mama humano, podem ser empregados, por exemplo, para investigação e desenvolvimento de novos sistemas de caracterização e classificação de amostras de tecidos mamários, que irão beneficiar ambas as espécies (PINHO et al., 2012; VISAN et al., 2016).

O estudo de técnicas espectroscópicas, como a fluorescência e espa-



lhamento de raios X, permitem obter informações sobre tecidos mamários normais e neoplásicos. A fluorescência baseia-se na detecção de linhas de emissão de raios X, permitindo obter informações simultaneamente de vários elementos-traço presentes em amostras (CESAREO et al., 1992). O uso dessa técnica ganhou grande interesse na análise de elementos-traço em tecidos mamários (GERAKI; FARQUHARSON; BRADLEY, 2002; SILVA et al., 2009), pois as alterações morfológicas e químicas causadas no processo carcinogênico podem apresentar concentrações diferentes desses elementos nas regiões normais e neoplásicas desses tecidos. Dentre as inúmeras técnicas de fluorescência, a micro-fluorescência de raios X ( $\mu$ -XRF) destaca-se por focalizar seu feixe primário de raios X em áreas micrométricas em amostras (GRIEKEN; MARKOWICZ, 2001). Alguns trabalhos tem utilizado  $\mu$ -XRF para mapear às distribuições espaciais de elementos químicos, diferenciando as regiões saudáveis e neoplásicas de tecidos mamários, investigando a possibilidade de seu uso na caracterização de tecidos mamários humanos (FARQUHARSON et al., 2007; FARQUHARSON et al., 2008; SILVA et al., 2013; MALEZAN, 2018) e caninos (SALVEGO, 2019).

Em geral, os experimentos de fluorescência de raios X não são sensíveis a emissão fluorescente de elementos de baixo número atômico, como carbono ( $K_{\alpha 1} = 0,277 \text{ keV}$ ) e oxigênio ( $K_{\alpha 1} = 0,525 \text{ keV}$ ), constituintes principais dos tecidos mamários, não sendo, portanto, adequados para estudar a morfologia ou composição da matriz de tecidos mamários (ANTONIASSI et al., 2019). Uma vez que a presença de uma neoplasia pode estar associada a alterações nesta matriz (CONKLIN; KEELY, 2012; LUPARELLO, 2013; ANTONIASSI et al., 2019), a obtenção de parâmetros associados a ela pode ser útil para caracterização dos tecidos mamários normais e neoplásicos. Neste contexto, a limitação das técnicas de fluorescência de raios X pode ser complementada por técnicas de espalhamento de raios X. Especificamente, uma das técnicas utiliza a razão entre o número de fótons espalhados Rayleigh e Compton ( $R/C$ ), a qual é dependente

do número atômico efetivo ( $Z_{ef}$ ) das amostras (DUVAUCHELLE; PEIX; BABOT, 1999a). Estudos que utilizaram amostras de tecidos mamários mostraram que essa técnica permite caracterizá-las (RYAN; FARQUHARSON, 2010; ANTONIASSI; CONCEIÇÃO; POLETTI, 2011), sendo possível associar os valores de  $Z_{ef}$  com a porcentagem de Carbono e Oxigênio desses tecidos.

Nesse sentido, as técnicas fluorescência e espalhamento de raios X podem ser combinadas para fornecer resultados complementares a respeito da diferenciações químicas e morfológicas de amostras. A combinação dessas técnicas para caracterização de tecidos mamários já vem sendo estudadas (ANTONIASSI et al., 2019; SALVEGO, 2019). Simulações computacionais de Monte Carlo mostraram-se eficazes em produzir imagens que permitiam distinguir as várias regiões dos tecidos mamários (ANTONIASSI et al., 2019). Recentemente, foram realizados estudos experimentais combinando técnicas de micro-fluorescência e espalhamento de raios X em tecidos mamários caninos (SALVEGO, 2019). A fluorescência mostrou-se sensível às concentrações típicas dos elementos-traço, enquanto a técnica de espalhamento utilizada permitiu obter informações relacionadas às densidades eletrônicas ( $\rho_e$ ) dos tecidos mamários caninos (SALVEGO, 2019).

Este trabalho foi dividido em 5 capítulos, conforme a seguinte estrutura:

No capítulo 2, serão apresentadas as fundamentações teóricas em que este trabalho baseou-se. Inicialmente serão apresentados os aspectos anatômicos e histológicos dos tecidos mamários caninos e as semelhanças entre os tecidos mamários neoplásicos caninos e humanos. Posteriormente, serão abordadas as contribuições das secções de choque do efeito fotoelétrico, espalhamento Rayleigh e espalhamento Compton de raios X. Por fim, será tratado como ocorre a produção e detecção deste tipo de radiação.

No capítulo 3, serão descritos os materiais e métodos utilizados para realização desse trabalho. Primeiramente, serão descritas as classificações his-

tológicas e preparo dos tecidos mamários caninos estudados. Posteriormente, o arranjo experimental das técnicas de micro-fluorescência e espalhamento de raios X utilizadas, e os métodos de análise envolvidos para determinação das distribuições espaciais dos elementos-traço e número atômico efetivo ( $Z_{ef}$ ) desses tecidos.

No capítulo 4, serão apresentados os resultados da distribuição espacial dos elementos-traço dos diferentes grupos de tecidos mamários caninos e sua correlação por meio das lâminas histológicas nas regiões sadias e neoplásicas desses tecidos. Em seguida, serão apresentados os resultados de razões  $R/C$  e  $Z_{ef}$  nos pontos selecionados das amostras caninas. Por fim, serão abordados os aspectos complementares das técnicas para obtenção de informações dos tecidos mamários caninos normais e neoplásicos estudados.

No capítulo 5 será dedicado às conclusões e perspectivas desse trabalho.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Estudar a distribuição espacial de elementos-traço e do número atômico efetivo de tecidos mamários caninos normais e neoplásicos, por meio das técnicas de micro-fluorescência e espalhamento Rayleigh e Compton de raios X, respectivamente.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Mapear a distribuição espacial dos elementos-traço nas amostras de tecidos mamários caninos, utilizando a técnica de micro-fluorescência de raios X.

- Relacionar os aspectos descritivos qualitativos da distribuição espacial dos elementos químicos com as regiões de tecidos normais e neoplásicos a partir das suas lâminas histológicas.
- Estudar a correlação entre as distribuições espaciais dos elementos-traço nos tecidos mamários caninos.
- Obter informações do número atômico efetivo através da razão entre as intensidades dos espectros Rayleigh e Compton em pontos selecionados dessas amostras, utilizando a técnica de espalhamento de raios X.
- Avaliar a combinação das informações obtidas pelas técnicas de microfluorescência e espalhamento de raios X, e seus aspectos complementares na caracterização dos tecidos mamários.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

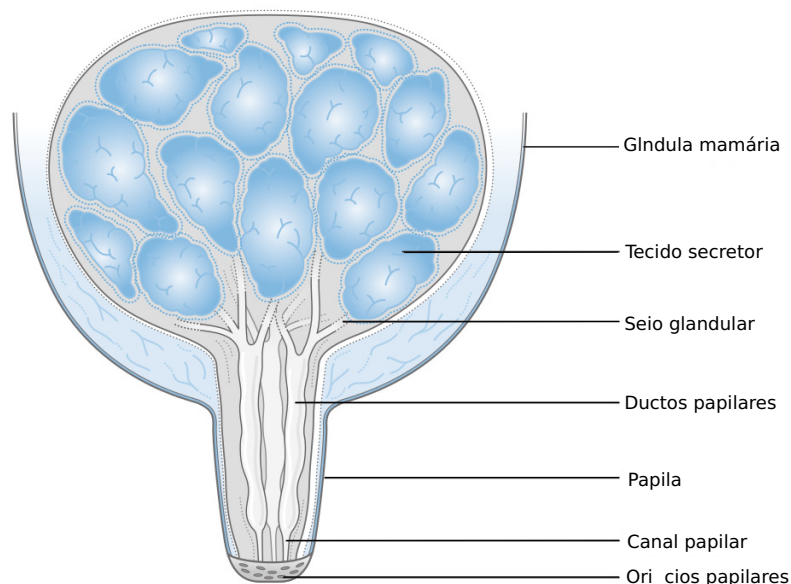
### 2.1 ASPECTOS ANATÔMICOS E HISTOLÓGICOS DE TECIDOS MAMÁRIOS CANINOS

Para compreender os processos patológicos dos tecidos mamários caninos, é necessário conhecer suas estruturas e funções. Nesse sentido, nessa secção serão abordadas brevemente as estruturas anatômicas e histológicas de um mama normal canina.

#### 2.1.1 Anatomia da mama

A figura 1 apresenta as estruturas anatômicas que compõem uma glândula mamaria canina.

**Figura 1: Estrutura anatômica de uma glândula mamaria canina.**

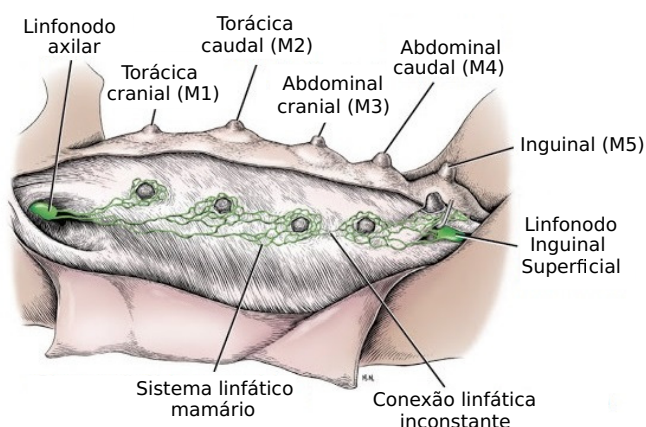


**Fonte: Adaptado de Aspinal e Cappello (2015).**

A glândula mamária canina é conhecida como sudorípara modificada,

pois consistem de uma rede de ductos papilares cercados por estroma fibroglandular e adipócitos (EVANS; LAHUNTA, 2015). Essas glândulas estão circundadas por tecido secretor, no qual ocorre proliferação de leite durante a gestação na fase reprodutiva do animal (SORENMO, 2011; ASPINAL; CAPPELLO, 2015). O leite produzido é drenado através de uma rede de seios que formam os ductos papilares do conjunto de glândulas mamárias. Por fim, o leite percorre esses ductos papilares até encontrar os orifícios papilares da mama canina. Esses ductos papilares possuem de 7 à 16 aberturas, e cada um desses ductos eventualmente formará um lóbulo da glândula mamária adulta e atuará como uma unidade funcional independente (SORENMO, 2011).

**Figura 2: Cadeia de mamas canina e sistema linfático simplificado. As mamas caninas são subdivididas como: torácicas craniais (M1), torácicas caudais (M2), abdominais craniais (M3), abdominais caudais (M4) e inguinais (M5)**



**Fonte: Adaptado de Aspinal e Cappello (2015).**

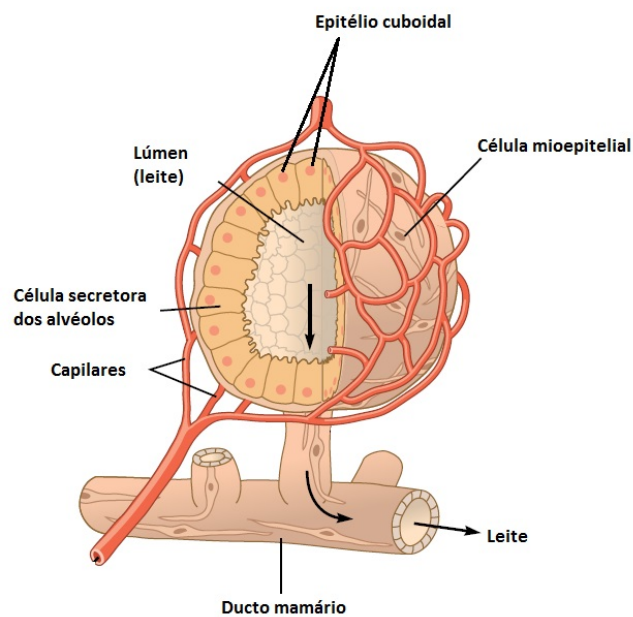
A maioria dos cães apresentam cinco pares de glândulas mamárias, as quais situam-se na parede ventral do abdômen e do tórax, em ambos os lados da linha média, conforme a figura 2. As glândulas mamárias são subdivididas como, duas torácicas (classificadas como M1 e M2), duas abdominais (M3 e M4) e uma inguinal (M5) (EVANS; LAHUNTA, 2015). As glândulas M1 e M2 recebem suprimento sanguíneo das artérias torácicas internas, enquanto as glândulas M3,

M4 e M5 das artérias epigástricas superficiais (EVANS; LAHUNTA, 2015).

### 2.1.2 Histologia da mama

As estruturas histológicas da mama canina podem ser divididas em dois componentes: estrutural e funcional. A parte estrutural consiste nos tecidos responsáveis pela sustentação da mama, que incluem: tecido adiposo e conjuntivo fibroso, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos. A parte funcional da mama consiste nos tecidos responsáveis pela função de lactação da mama, e são compostas basicamente por tecido epitelial e conjuntivo fibroso (SORENMO, 2011; EVANS; LAHUNTA, 2015).

**Figura 3: Estrutura histológica do alvéolo e ducto associado de uma mama canina.**

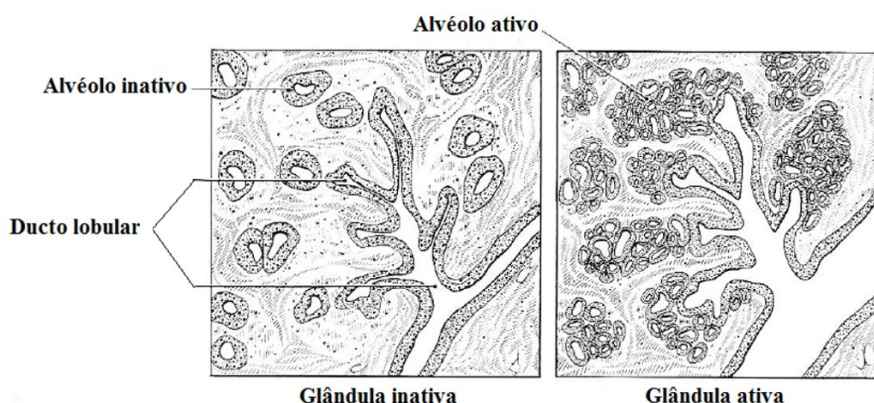


**Fonte: Adaptado de Jones e Lopez (2013).**

As glândulas mamárias são estruturas tubuloalveolares e seu componente secretor é composto por células colunares que formam o epitélio alveolar e os ductos intralobulares. A figura 3, apresenta as estruturas histológicas que

compõem um alvéolo de uma glândula mamária canina. O alvéolo tem forma esférica a ovoide com uma quantidade grande de lúmen. Suas células secretórias tem o papel de drenar esse material para cada ducto intralobular e por conseguinte para os ductos lobulares. Por fim, esses ductos lobulares drenam o leite para o canal da papila da glândula mamária (JENNINGS; PREMANANDAN, 2018).

**Figura 4: Glândula mamária inativa e ativa.**



Fonte: Adaptado de Banks (1993).

Os alvéolos podem apresentar inatividade e atividade na glândula mamária canina, conforme a figura 4. Quando inativo, o alvéolo é similar aos pequenos ductos (possuem uma única camada de epitélio cuboidal e células mioepiteliais fusiformes). Quando em atividade secretória, em seu entorno existem células mioepiteliais em forma de estrela, compondo uma espécie de cesta (SORENMO, 2011).

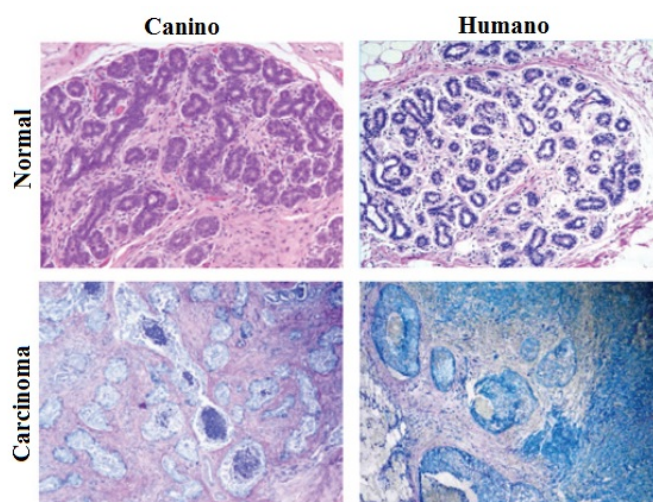
## 2.2 SEMELHANÇA ENTRE TECIDOS MAMÁRIOS CANINOS E HUMANOS

Os tecidos mamários caninos são sugeridos pela literatura como um possível modelo apropriado para estudos de câncer de mama em humanos, pois apresentam semelhanças etiológicas e histológicas (PAOLONI; KHANNA, 2008;



PINHO et al., 2012; VISAN et al., 2016). O desenvolvimento de neoplasias em cães ocorre aproximadamente entre oito e nove anos, equivalente 50 e 58 anos em humanos (STRANDBERG; GOODMAN, 1974). Em ambas as espécies a progressão do desenvolvimento das neoplasias são idênticas, como fatores ambientais, sexo, idade e reprodução (VISAN et al., 2016). Além disso, outras fontes que são semelhantes e afetam o resultado clínico são, o tamanho do tumor, estadia-mento clínico e invasão linfonodal (ABDELMEGEED; MOHAMMED, 2018).

**Figura 5: Lâminas histológicas de tecido mamário normal e neoplásico correspondente a espécie canina e humana.**



**Fonte: Adaptado de Abdelmegeed e Mohammed (2018).**

Histologicamente, os tecidos mamários caninos apresentam semelhanças aos dos humanos. As lesões benignas, em humanos é mais provável surgirem quantidades maiores de fibroadenomas, enquanto, na espécie canina são mais frequentes surgirem adenomas complexos e tumores benignos mistos (MISDORP, 2002). As lesões malignas mais presentes em cães são tumores malignos epiteliais infiltrativos, e apresentam características histológicas similares aos carcinomas ductais infiltrantes em humanos. Em ambas as espécies, a incidência de adenocarcinomas, carcinomas lobulares e carcinomas lobulares *in situ* são similares (SLATTER, 2003). A figura 5 apresenta a semelhança entre as

lâminas histológicas de tecidos mamários normais e neoplásicos (carcinoma), correspondente as espécies canina e humana.

A tabela 1, mostra as principais semelhanças entre um tecido neoplásico mamário canino e humano (ABDELMEGEED; MOHAMMED, 2018).

**Tabela 1: Semelhanças entre tumores mamários humanos e caninos.**

Características semelhantes	Humanos	Cachorros
Ocorrência	Espontânea	Espontânea
Curso da doença	Idêntico em ambos	Idêntico em ambos
Tamanho do tumor	Semelhante em ambos	Semelhante em ambos
Estadiamento clínico	Idêntico em ambos	Idêntico em ambos
Invasão para os linfonodos	Idêntico em ambos	Idêntico em ambos
Neoplasia espontânea mais comum	Neoplasia mamária	Neoplasia mamária
Dependência de estrogênio	Longa exposição ao estrogênio aumenta o risco de ocorrência de tumor	Cães não esterilizados têm um risco quatro vezes maior de ocorrência de tumor do que cães esterilizados <2 anos de idade
Lesões pré-malignas	Prevalentes	Prevalentes
Marcadores moleculares	Genes identificados desempenham um papel crítico na carcinogênese dos tumores mamários	Foi determinado que os genes têm papel idêntico na carcinogênese dos tumores mamários caninos
Anomalias mamográficas	Neoplasias mamárias de cães e humanos têm microcalcificações e macrocalcificações semelhantes	Neoplasias mamárias de cães e humanos têm microcalcificações e macrocalcificações semelhantes

**Fonte: Adaptado de Abdelmegeed e Mohammed (2018).**

Fica evidente, que o uso de tecidos mamários caninos para estudos de neoplasias é adequado, pois replica várias das características dos tecidos mamários humanos. Sendo que, quando comparados com outras técnicas utilizadas, como cultura de células *in vitro* e indução de tumores em camundongos, o modelo canino destaca-se pelas semelhanças com os tecidos mamários humanos (GORDON; KHANNA, 2010).

## 2.3 INTERAÇÕES DOS RAIOS X COM A MATÉRIA

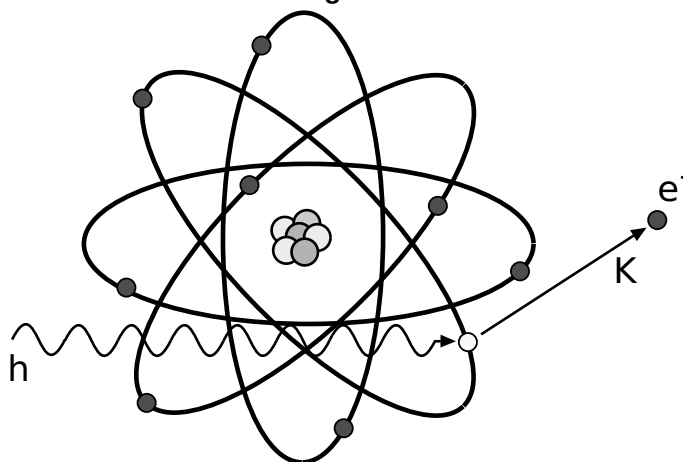
Entender os processos de interação dos raios X com a matéria é de grande importância para os estudos de espectroscopia.

Nesta seção, serão abordados os processos de interação de absorção fotoelétrica, de espalhamento Rayleigh e Compton darão o embasamento teórico para o desenvolvimento do estudo realizado.

### 2.3.1 Efeito Fotoelétrico

Nesse processo, o raio X quando interage com um elétron orbital de um material precisa possuir energia incidente  $h\nu$  suficientemente superior a energia de ligação  $U$  desse elétron, ocorrendo a transferência de toda sua energia para ele. Logo, o elétron é ejetado do átomo com energia cinética bem definida, figura 6 (ATTIX, 1986).

**Figura 6: Representação esquemática do efeito fotoelétrico com um elétron orbital do átomo transferindo toda sua energia.**



Fonte: Autoria própria.

Para que possa haver essa transferência de energia total existe uma probabilidade de ocorrência do efeito fotoelétrico, que está relacionada com a

secção de choque de interação fotoelétrica  $\tau$ . A secção de choque terá dependência tanto da energia do raio X incidente  $h\nu$  e como do número atômico ( $Z$ ) do material espalhador (ATTIX, 1986). Em regimes de baixas energias ( $h\nu < 100$  keV), interesse de nosso estudo, a interação fotoelétrica é predominante onde a secção de choque é:

$$\tau \propto \frac{Z^4}{(h\nu)^3}. \quad (1)$$

A partir da equação (1), é possível observar que a secção de choque fotoelétrica aumenta para materiais de elevado número atômico e para raios X incidentes de baixas energias.

### 2.3.2 Espalhamento Rayleigh

#### 2.3.2.1 Distribuição angular da radiação espalhada Rayleigh

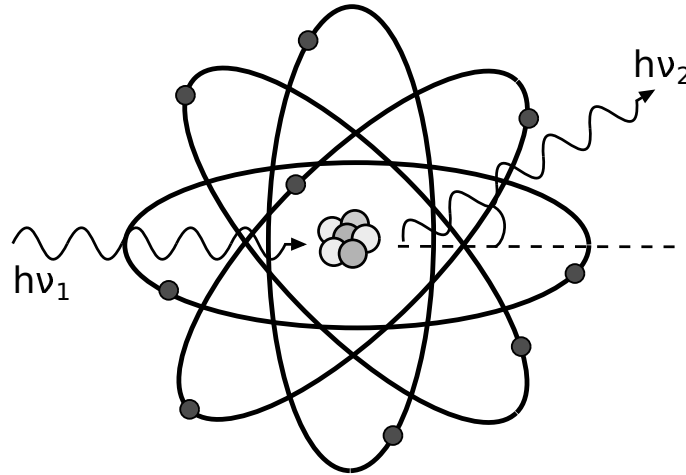
No espalhamento Rayleigh, figura 7, quando o raio X com energia incidente  $h\nu_1$  entra em contato com um átomo livre é espalhado elasticamente pelos elétrons ligados aos átomos. O espalhamento é elástico devido a radiação incidente não sofrer variação de sua energia ( $h\nu_1 = h\nu_2$ ), ocorrendo apenas alteração de sua direção por um ângulo de espalhamento  $\theta$  (ATTIX, 1986).

A distribuição angular da radiação espalhada pode ser obtida através da secção de choque diferencial Rayleigh  $(d\sigma/d\Omega)_R$  para o átomo livre como (CESAREO et al., 1992; ANTONIASSI, 2012):

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_R = [F(x,Z)]^2 \left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{Th}, \quad (2)$$

onde  $(d\sigma/d\Omega)_{Th}$  é a secção de choque diferencial de Thomson,  $F(x,Z)$  o fator de forma atômico e  $x$  o vetor de momento transferido com magnitude  $x = \lambda^{-1} \text{sen}(\theta/2)$ .

**Figura 7: Representação esquemática do efeito Rayleigh, onde o raio X com energia incidente  $h\nu_1$  interage com o átomo sofrendo um espalhamento em um ângulo  $\theta$ .**



**Fonte: Autoria própria.**

J. J Thomson, descreveu a  $(d\sigma/d\Omega)_{Th}$  em termos da polarização e da não polarização do raio X espalhado em um certo ângulo  $\theta$  (CESAREO et al., 1992). Quando o raio X não é polarizado, a secção de choque diferencial de Thomson é dada por:

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{Th} = \frac{r_0^2}{2}(1 + \cos^2\theta). \quad (3)$$

Caso contrário, quando o raio X é polarizado, a secção de choque diferencial torna-se (HANSON, 1986):

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{Th} = r_0^2(1 - \sin^2\theta \cos^2\alpha), \quad (4)$$

onde  $r_0 = e^2/m_0c^2 = 2,82 \times 10^{-15}m$  é chamado de raio clássico do elétron,  $\theta$  é o ângulo de espalhamento que o raio X sofreu e  $\alpha$  é o ângulo azimutal de espalhamento de raios X, medido na direção de polarização.

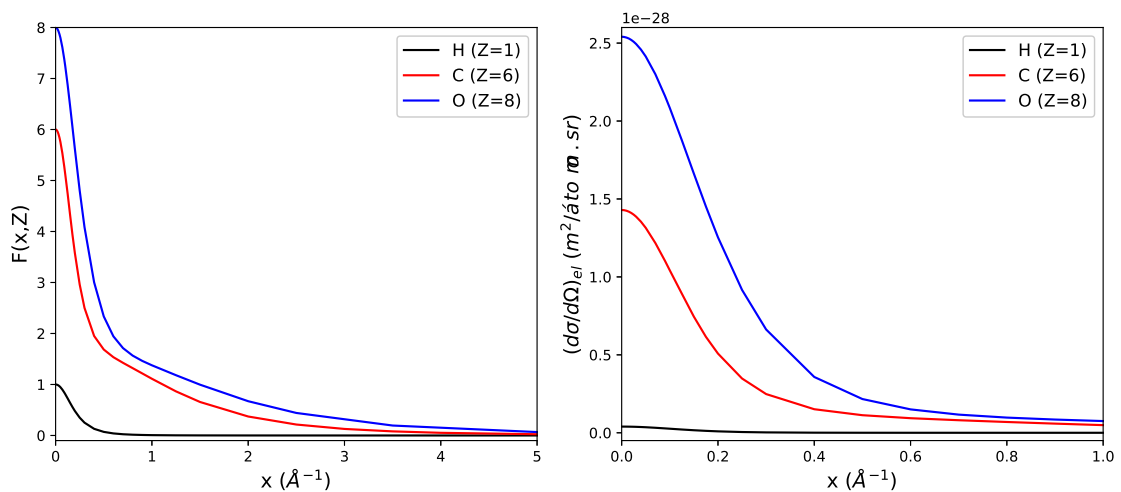
O fator de forma atômico para um átomo de número atômico  $Z$ , segundo a teoria de Nelms and Oppenheim, é definido como o elemento de matriz (HUBBELL et al., 1975):

$$F(x,Z) = \sum_{n=1}^Z \langle \psi_0 | \exp(i\mathbf{x} \cdot \mathbf{r}_n) | \psi_0 \rangle, \quad (5)$$

onde  $\psi_0$  é a função de onda para o estado fundamental do átomo e  $r_n$  é o vetor de raio do núcleo ao enésimo elétron. Esse fator de forma atômico tem dependência exclusivamente do momento transferido  $x$  e do número atômico do material espalhador  $Z$ , implicando no aumento ou diminuição da seção de choque diferencial elástica.

A figura 8 estão representados os valores de  $F(x, Z)$  das tabelas de Hubbell et al. (1975), e a  $(d\sigma/d\Omega)_R$  calculadas para os átomos de Hidrogênio (H), Carbono (C) e Oxigênio (O), principais elementos químicos em materiais biológicos.

**Figura 8: Fator de forma atômico das tabelas de Hubbell et al. (1975) (esquerda) e seção de choque diferencial Rayleigh (direita) em função do momento transferido para os átomos de Hidrogênio (H), Carbono (C) e Oxigênio (O).**



**Fonte: Autoria própria.**

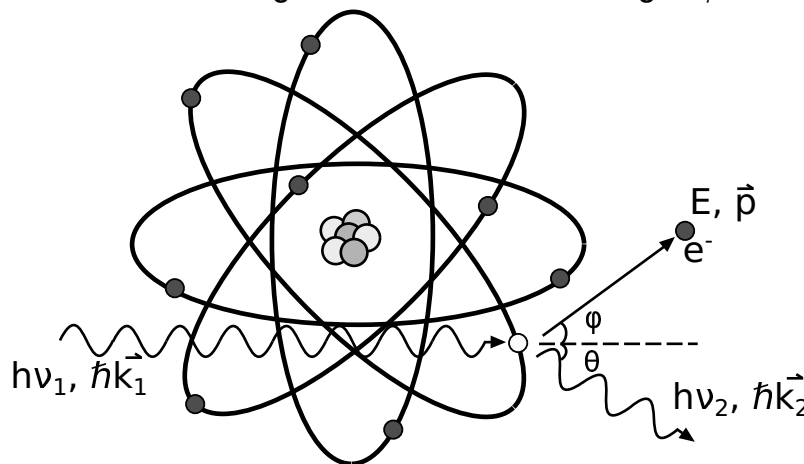
Na figura 8, nota-se que, a medida que os valores de momentos transferidos são baixos (energias de radiações incidentes baixas e/ou pequeno ângulo de espalhamento),  $F(x, Z) \rightarrow Z$  e a probabilidade de ocorrer o espalhamento Rayleigh,  $(d\sigma/d\Omega)_R$ , aumenta, enquanto que, para altos valores de momento transferido  $F(x, Z) \rightarrow 0$  e  $(d\sigma/d\Omega)_R$  diminui. Dessa forma, em regimes de baixas energias pode-se aproximar a equação (2) para  $(\frac{d\sigma}{d\Omega})_R = Z (\frac{d\sigma}{d\Omega})_{Th}$  (ANTONIASI,

2012).

### 2.3.3 Espalhamento Compton

No espalhamento Compton, figura 9, quando um raio X com energia  $h\nu_1$  e momento  $\hbar\vec{k}_1$  interage com um elétron orbital do átomo, de energia e momento inicial, é espalhado inelasticamente por esse elétron. O espalhamento é inelástico devido a radiação incidente sofrer diminuição da sua energia para  $h\nu_2$  e momento  $\hbar\vec{k}_2$ , ocorrendo alteração da sua direção em um ângulo de espalhamento  $\theta$ , enquanto, o elétron é espalhado em um ângulo  $\phi$  com energia  $E$  e momento  $\vec{p}$  final. O resultado dessa colisão é a conservação de energia e momento do raio X e elétron (ATTIX, 1986).

**Figura 9: Representação esquemática do efeito Compton, onde o raio X com energia  $h\nu_1$  e momento  $\hbar\vec{k}_1$  incidentes interagem com o elétron orbital provocando o seu espalhamento em um ângulo  $\theta$  e do elétron em um ângulo  $\phi$ .**



Fonte: Autoria própria.

Como consequência dessas conservações, é possível obter três equações que fornecem uma solução completa da cinemática do espalhamento Compton para a interação do raio X, considerando a aproximação de um elétron livre e em repouso (ATTIX, 1986). A equação (6), fornece a energia cinética

do elétron após a colisão:

$$E = h\nu_1 - h\nu_2, \quad (6)$$

enquanto, a equação (7) resulta no ângulo de espalhamento desse elétron:

$$\cot\varphi = \left(1 + \frac{h\nu_1}{m_0c^2}\right) \tan\left(\frac{\theta}{2}\right). \quad (7)$$

E a equação (8), relaciona a energia incidente do raio X com a energia e ângulo de espalhamento que esse raio X sofreu na interação:

$$h\nu_2 = h\nu_1 \left[1 + \left(\frac{h\nu_1}{m_0c^2}\right) (1 - \cos\theta)\right]^{-1}. \quad (8)$$

### 2.3.3.1 Distribuição angular da radiação espalhada Compton

As soluções descritas anteriormente foram para o elétron livre e em repouso, porém, devemos levar em conta o fato de que os elétrons estão em movimento no átomo em uma situação real. Nesse contexto, podemos descrever a probabilidade da radiação incidente ser espalhada inelasticamente em um certo ângulo de espalhamento  $\theta$ , em termos da secção de choque diferencial Compton  $(d\sigma/d\Omega)_C$  como (CESAREO et al., 1992; ANTONIASSI, 2012):

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_C = S(x,Z) \left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{KN}, \quad (9)$$

onde  $S(x,Z)$ , é a função de espalhamento incoerente, e  $(d\sigma/d\Omega)_{KN}$  é a secção de choque diferencial de Klein-Nishina, que representa a probabilidade do raio X incidente ser espalhado em um ângulo  $\theta$  por um elétron orbital do átomo.

Klein-Nishina, descreveu a  $(d\sigma/d\Omega)_{KN}$  em termos da polarização e não polarização desse raio X espalhado (CESAREO et al., 1992). Definimos a secção de choque diferencial para o raio X não polarizado como:

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{KN} = \frac{r_0^2}{2} \left(\frac{h\nu_2}{h\nu_1}\right)^2 \left(\frac{h\nu_2}{h\nu_1} + \frac{h\nu_1}{h\nu_2} - \sin^2\theta\right), \quad (10)$$



para o raio X polarizado a secção de choque diferencial torna-se (HANSON, 1986):

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{KN} = \frac{r_0^2}{2} \left(\frac{h\nu_2}{h\nu_1}\right)^2 \left(\frac{h\nu_2}{h\nu_1} + \frac{h\nu_1}{h\nu_2} - 2\text{sen}^2\theta\text{cos}^2\alpha\right), \quad (11)$$

onde  $\alpha$  é o ângulo azimutal de espalhamento de raios X medido na direção de polarização.

A função de espalhamento incoerente  $S(x,Z)$  para um átomo de número atômico  $Z$ , segundo a teoria de Hartree-Fock, pode ser expressa em termos de fator de forma generalizada como (HUBBELL et al., 1975):

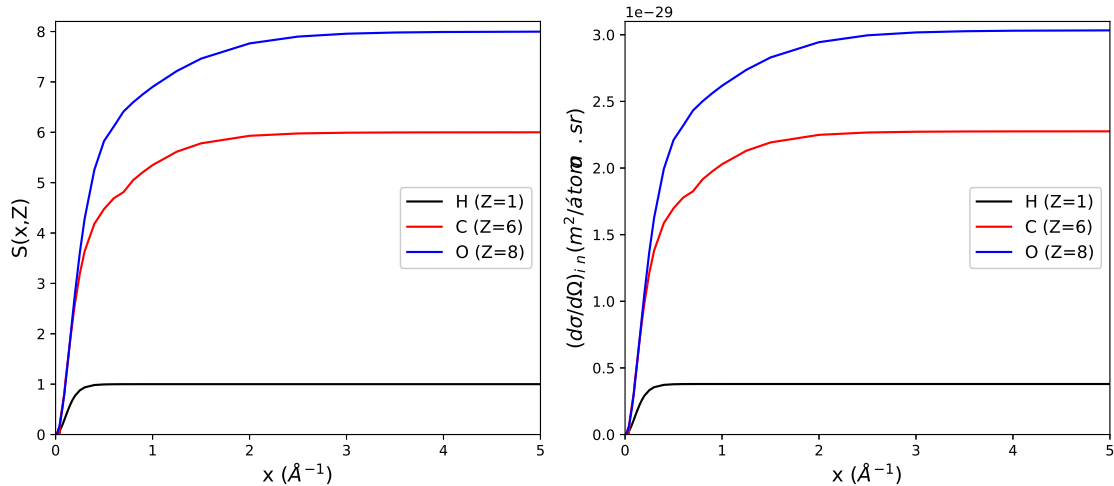
$$S(x,Z) = \sum_{m=1}^Z \sum_{n=1}^Z \langle \psi_0 | \exp[i\mathbf{x}(\mathbf{r}_m - \mathbf{r}_n)] | \psi_0 \rangle - |F(\mathbf{x},Z)|^2, \quad (12)$$

onde  $\psi_0$  é a função de onda para o estado fundamental do átomo,  $\mathbf{r}_n$  e  $\mathbf{r}_m$  são as posições respectivas do  $n$ ésimo, e  $m$ ésimo elétron no átomo e a função  $F(\mathbf{x},Z)$  é o fator de forma descrito na equação (5). Como podemos perceber a função de espalhamento incoerente também tem dependência exclusivamente do momento transferido e do número atômico do material espalhador, implicando no aumento ou diminuição da secção de choque diferencial Compton.

A figura 10, estão representados os valores de  $S(x,Z)$  das tabelas de Hubbell et al. (1975) e  $(d\sigma/d\Omega)_C$  calculadas para os átomos de hidrogênio (H), carbono (C) e oxigênio (O).

Na figura 10, nota-se que a probabilidade de ocorrência do efeito Compton é reduzida para raios X de baixos momentos transferidos,  $S(x,Z) \rightarrow 0$  quando  $x \rightarrow 0$ , portando, a interação Compton é menos provável de ocorrer em baixas energias. Para altos valores de momento transferido, a probabilidade de ocorrência da interação Compton é proporcional ao número de elétrons no átomo,  $S(x,Z) \rightarrow Z$  quando  $x \rightarrow \infty$ , ocorrendo o aumento da  $(d\sigma/d\Omega)_C$ . Nestas condições, pode-se aproximar a equação (9) em altos momentos transferidos para  $\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_C = Z \left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{KN}$  (ANTONIASSI, 2012).

**Figura 10:** Função de espalhamento incoerente das tabelas de Hubbell et al. (1975) (esquerda) e secção de choque diferencial Compton (direita) em função do momento transferido para os átomos de hidrogênio (H), carbono (C) e oxigênio (O).



**Fonte:** Autoria própria.

### 2.3.3.2 Distribuição em energia da radiação espalhada Compton

Para um entendimento completo do espectro de raios X espalhado Compton, ele deve ser descrito em termos da distribuição de energia dos fótons espalhados. Essa distribuição de energia, que pode ser descrita através da secção de choque dupla diferencial, apresenta duas características que ocorrem simultaneamente no espectro de espalhamento Compton: a primeira é o alargamento do espectro Compton devido à distribuição de momento dos elétrons no material, conhecido como perfil de espalhamento Compton  $J$ , e a segunda resulta na separação do espectro Compton e Rayleigh quando utilizadas energias de raios X incidentes baixas e/ou ângulos de espalhamento grandes (CESAREO et al., 1992).

Em situação real os elétrons no átomo estão em movimento e ligados. Assim, a distribuição em energia dos raios X espalhados depende do movimento dos elétrons e da ligação deles ao átomo. Para obtermos uma aproximação para

a secção de choque dupla diferencial pode-se fazer uma aproximação que os elétrons estejam em movimento mas livres, que se denomina aproximação de impulso. Para considerarmos que, os elétrons estejam livres a energia incidente e/ou o ângulo de espalhamento devem ser grandes de forma a tornar a energia de ligação desprezível (COOPER, 1985; ANTONIASSI, 2012). Nesse sentido, quando os raios X são espalhados no mesmo ângulo  $\theta$  por esses elétrons orbitais de diferentes momentos iniciais irão adquirir diferentes energias de espalhamento ao longo do espectro Compton. Logo, a secção de choque diferencial dupla Compton na aproximação de impulso (AI), não relativística, pode ser escrita como (RIBBERFORS; BERGGREN, 1982):

$$\left( \frac{d^2\sigma}{d\Omega dh\nu_2} \right)_C^{AI} = \frac{m_0}{|K|} \frac{h\nu_2}{h\nu_1} \left( \frac{d\sigma}{d\Omega} \right)_{Th} J(p_z), \quad (13)$$

onde  $J(p_z)$  é conhecido como perfil de espalhamento Compton das projeções  $p_z$  dos momentos dos elétrons na direção do vetor de espalhamento (por convenção escolhido como eixo  $z$  no sistema de coordenadas cartesianas) e  $|K|$  é o módulo do vetor de espalhamento do raio X. Segundo Biggs, Mendelsohn e Mann (1975), essa equação é suficientemente precisa para átomos de baixo número atômico  $1 \leq Z \leq 36$ , interesse de nosso estudo, não sendo necessário sua descrição relativística.

O perfil de espalhamento Compton  $J(p_z)$  para uma distribuição de momento do elétron  $\rho(p_x, p_y, p_z)$  pode ser definido como (COOPER, 1985):

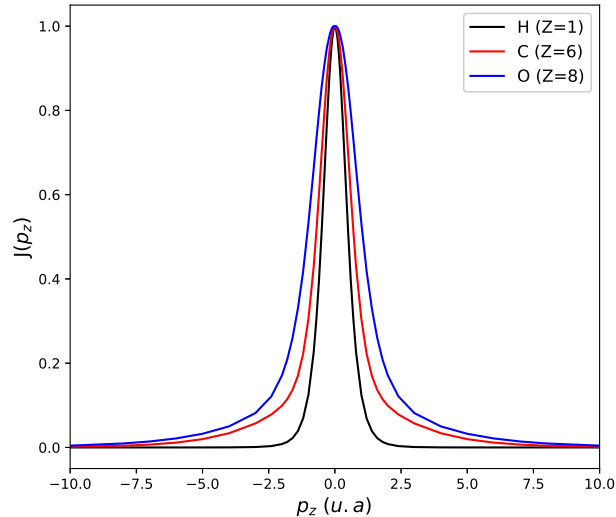
$$J(p_z) = \int_{p_x} \int_{p_y} \rho(p_x, p_y, p_z) dp_x dp_y, \quad (14)$$

onde  $p_z$  depende do momento  $p$  e vetor de espalhamento  $K$  do elétron. A equação (14), pode ser reescrita da seguinte maneira:

$$J(p_z) = \sum_i Z_i J_i(p_z), \quad (15)$$

onde  $Z_i$  é o número de elétrons na  $i$ -ésima camada, e  $J_i$  é o perfil de espalhamento Compton de um elétron para essa camada.

**Figura 11: Perfil de espalhamento Compton das tabelas de Biggs, Mendelsohn e Mann (1975) em função do momento  $p_z$  para os átomos de hidrogênio (H), carbono (C) e oxigênio (O).**



**Fonte: Autoria própria.**

A figura 11, estão representados os valores dos  $J(p_z)$  normalizados obtidos das tabelas de Biggs, Mendelsohn e Mann (1975) para os átomos de hidrogênio (H), carbono (C) e oxigênio (O).

Na figura 11, observa-se que o perfil de espalhamento Compton  $J(p_z)$  depende exclusivamente do número atômico  $Z$  do material, ou seja, quando maior o número atômico do material maior é a largura do perfil de espalhamento e, por consequência, maior será a largura da curva do espectro de espalhamento Compton (ANTONIASSI, 2012; ANTONIASSI; CONCEIÇÃO; POLETTI, 2012).

## 2.4 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

A fluorescência de raios X é uma técnica muito poderosa para determinação de elementos químicos na indústria e saúde. Sua análise consiste em utilizar radiação incidente em uma amostra, e medir os raios X característicos emitidos pelos átomos dos elementos químicos que compõem a amostra, sendo,

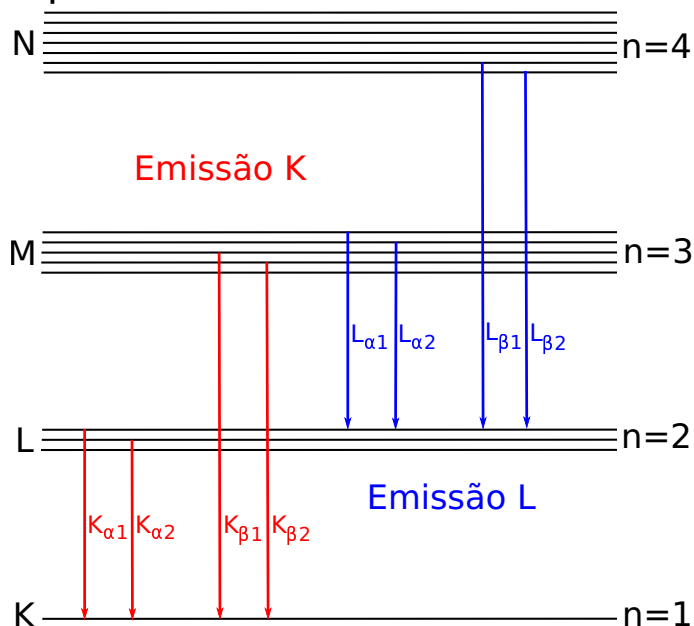
que a intensidade desses raios X característicos emitidos são aproximadamente proporcionais a concentração desses elementos (CESAREO et al., 1992).

Para medir a fluorescência é preciso ocorrer o efeito fotoelétrico. Nesse processo o átomo fica em seu estado excitado após o elétron ser ejetado pela radiação incidente, logo, outro elétron orbital de camada mais externa ocupa a vacância do elétron ejetado através de um rearranjo eletrônico. O excesso da energia neste rearranjo é equivalente à diferença entre os níveis de energia (representadas pelas camadas e subcamadas eletrônicas) que os elétrons ocupavam, sendo que, essa energia pode ser emitida em forma de energia característica de raios X e/ou elétron Auger (CESAREO et al., 1992).

Como o átomo apresenta níveis de energia rotulados pelas letras K, L, M, N, ..., e cada um desses níveis de energia apresentam subcamadas energéticas. Os raios X característicos emitidos também são representados por essas letras, conforme mostrado na figura 12. Nela, por exemplo, os raios X característicos  $K_{\alpha 1}$  e  $K_{\alpha 2}$  resultam de uma transição das subcamadas *L* para *K*;  $K_{\beta 1}$  e  $K_{\beta 2}$  de uma transição das subcamadas *M* para *K*. Essa classificação ocorre de maneira semelhante para as demais camadas e subcamadas do átomo (CESAREO et al., 1992).

Existem diferentes variantes da técnica de Fluorescência de Raios X (XRF), dentre elas destacam-se a Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia (ED-XRF), Fluorescência de Raios X por Dispersão de Comprimento de Onda (WD-XRF), Fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF) e Micro-Fluorescência de Raios X ( $\mu$ -XRF). Na próxima subseção, será descrita com maiores detalhes a  $\mu$ -XRF, técnica utilizada neste trabalho.

Figura 12: Transição eletrônica e emissão de raios X característico do átomo. As letras K, L, M e N representam as camadas eletrônicas e  $n$  os níveis de energia do átomo.



Fonte: Autoria própria.

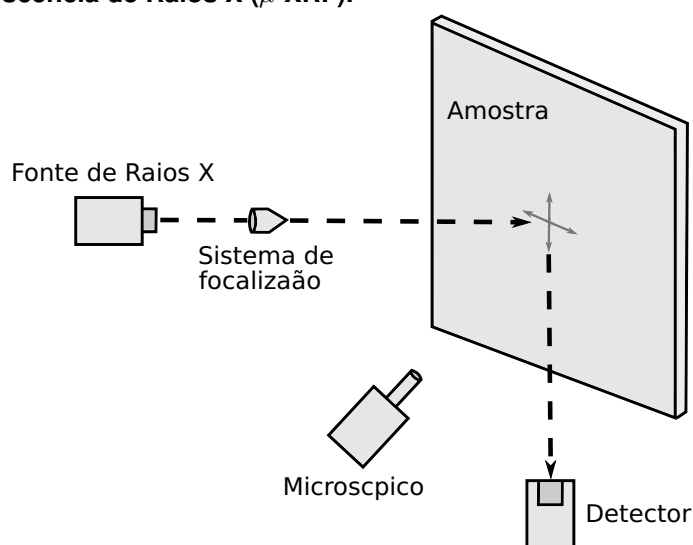
#### 2.4.1 Micro-Fluorescência de Raios X ( $\mu$ -XRF)

Uma das primeiras instalações de espectroscopia de  $\mu$ -XRF baseada em fontes de radiação síncrotron foi descrita em 1972, por Horowitz e Howell. Essa técnica se desenvolveu rapidamente na última década em fontes síncrotron por apresentarem alta brilho na radiação incidente sendo possível utilizá-la em diversos campos das ciências. Uma das vantagens de utilizar esse tipo de técnica é a possibilidade de focalizar o feixe primário em tamanhos micrométricos, permitindo a análise da fluorescência em diferentes modos: pontual, varredura de linha e/ou de área (GRIEKEN; MARKOWICZ, 2001).

A configuração da  $\mu$ -XRF em uma fonte síncrotron consiste basicamente, de uma fonte de raios X, um sistema de focalização (ou apenas uma abertura de colimação), um suporte de amostras motorizado, um microscópio convencional (ou apenas uma câmera) e um sistema de detecção, conforme a figura 13. A

fonte de raios X e o sistema de focalização, definirão as propriedades espectrais do feixe primário. O suporte de amostras motorizado, permitirá o controle remoto e preciso da posição da amostra, enquanto, o microscópio ou câmera, ajudará a identificar e monitorar as regiões que serão analisadas na amostra. Por fim, o sistema de detecção coletará os espectros de fluorescência de raios X emitidos por cada secção medida na amostra (GRIEKEN; MARKOWICZ, 2001).

**Figura 13: Esquema experimental básico empregado durante as investigações de Micro Fluorescência de Raios X ( $\mu$ -XRF).**



**Fonte: Autoria própria.**

A técnica de  $\mu$ -XRF vem sendo muito utilizada para aquisição de mapas da distribuição espacial de elementos químicos em tecidos biológicos (FARQUHARSON et al., 2008; SILVA et al., 2013; MALEZAN, 2018; SALVEGO, 2019). Para obter esses mapas é preciso varrer uma região de interesse em pequenos passos com o feixe incidente, e o detector coletará os espectros de fluorescência de cada ponto medido. As intensidades dos picos característicos de raios X estarão relacionadas com a concentração dos elementos químicos naquela região. Logo, com a ajuda dessa ferramenta é possível converter essas intensidades dos espectros em escalas de cores obtendo mapas de  $\mu$ -XRF.

Quando realizado esse procedimento é possível correlacionar a distribuição espacial desses elementos químicos nas regiões saudáveis e neoplásicas de tecidos biológicos (FARQUHARSON et al., 2008; SILVA et al., 2013; MALEZAN, 2018; SALVEGO, 2019).

## 2.5 FONTES DE RAIOS X

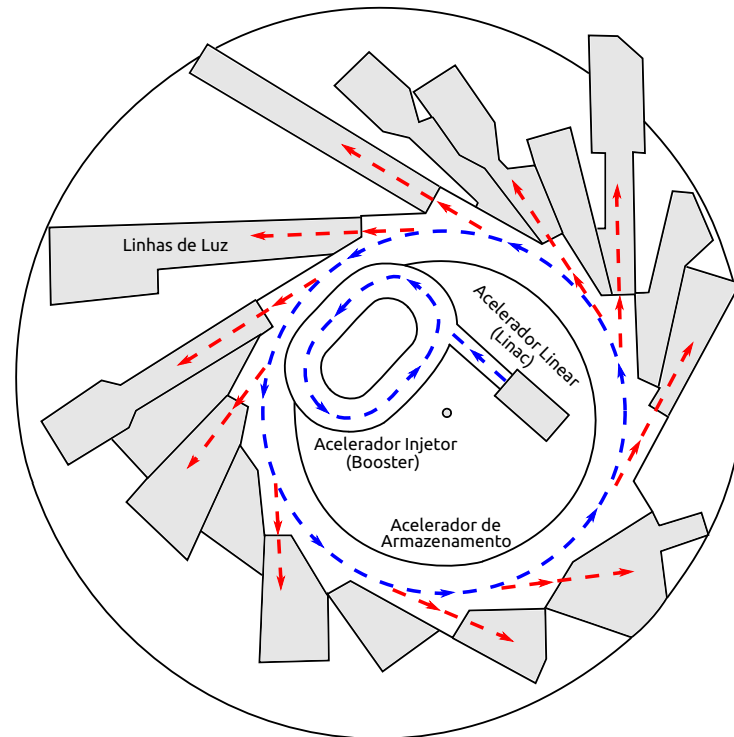
Existem diferentes tipos de fontes de raios X, dentre eles, destacam-se os tubos de raios X, irradiadores e aceleradores de partículas lineares ou circulares (radiação síncrotron). Nesta seção, serão descritos os processos envolvidos na produção de raios X por uma fonte de radiação síncrotron, fonte utilizada neste trabalho.

### 2.5.1 Fonte de radiação síncrotron

A radiação síncrotron é extremamente intensa e se estende por uma ampla faixa de comprimento de onda, do infravermelho ao ultravioleta, até as regiões de raios X moles e duros do espectro eletromagnético. Esse tipo de fonte apresenta propriedades como feixe polienergético e/ou monoenergético de alta intensidade, alto grau de polarização e colimação da radiação em uma pequena região sobre amostra e alta estabilidade de feixe. Essa radiação vem sendo usada para estudar muitos aspectos da estrutura da matéria em escalas atômicas e moleculares, desde as propriedades da superfície dos sólidos até a estrutura das moléculas de proteína (MOBILIO; BOSCHERINI; MENEGHINI, 2015).

Inicialmente os elétrons são emitidos a partir de um cátodo e acelerados por campos eletrostáticos em um canhão de elétrons. Esses elétrons são injetados no acelerador linear (*Linac*) até que alcancem velocidades próximas à da luz. Então, os elétrons com velocidades relativísticas são conduzidos para um



**Figura 14: Esquema de uma instalação de radiação síncrotron.**

**Fonte: Autoria própria.**

acelerador injetor, ou *Booster*, esse acelerador circular tem o papel de aumentar ainda mais a energia dos elétrons para ordens de Giga elétron-Volts (GeV). Nesse ponto, eles são transferidos por meio de uma linha de transporte para um acelerador circular maior, conhecido como anel de armazenamento, como mostrado na figura 14. Em ambos os aceleradores circulares os elétrons são forçados a seguir caminhos circulares por um conjunto de ímãs defletores que compõem a chamada rede magnética. No anel de armazenamento, os elétrons estão em uma situação quase estacionária e parte de sua energia é perdida em forma de radiação síncrotron a cada turno quando atravessa os dispositivos de inserção, equipamentos que provocam oscilações na trajetória do elétron através dos dipolos do campo magnético. Em seguida, a radiação síncrotron emitida continua em sua trajetória linear para as estações experimentais, chamadas de linhas de

luz (MOBILIO; BOSCHERINI; MENEGHINI, 2015).

Existem dois tipos de dispositivos de inserção, os *wigglers* e onduladores. A diferença entre eles esta principalmente na amplitude das oscilações de órbita dos elétrons e na abertura angular da radiação emitida. Nos *wigglers*, não ocorre o fenômeno de interferência, pois o desvio angular das oscilações de órbita é superior a abertura da radiação. Logo, há um aumento da intensidade da radiação por um fator de  $N$  polos. Nos onduladores, o desvio da órbita é da mesma ordem da abertura angular da radiação emitida. Com isso, ocorre interferência entre as ondas emitidas a partir de cada polo. Nesse caso, a intensidade da radiação aumenta proporcional a  $N \times N$  polos (MOBILIO; BOSCHERINI; MENEGHINI, 2015).

Especificamente, em medidas de fluorescência e espalhamento de raios X, o uso da radiação síncrotron, além das propriedades apresentadas inicialmente, possibilita redução de tempo de medida, análise com feixe micrométrico e diminuição de incertezas experimentais.

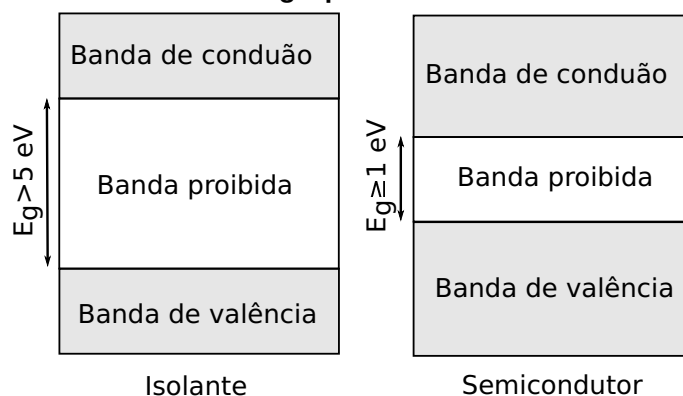
## 2.6 DETECTORES DE RAIOS X

Para que a radiação seja detectada é necessário que ocorram os processos de absorção e espalhamento com a matéria e este forneça um sinal em resposta a essa interação. Os detectores de raios X podem ser de diferentes tipos, dentre eles, destacam-se as câmara de ionização, contadores proporcionais, cintiladores e semicondutores. Nesta seção serão descritos algumas características dos detectores que utilizam semicondutores, pois corresponde ao tipo empregado neste trabalho.

### 2.6.1 Semicondutores

Em materiais cristalinos sua rede periódica estabelece bandas de energia permitidas para elétrons em seu interior. Essa energia dos elétrons devem ser confinadas dentro do material, e podem ser separadas por intervalos ou faixas de energias proibidas. A figura 15 mostra uma representação simplificada dessas bandas em isolantes e semicondutores. A banda de valência corresponde aos elétrons da camada externa que estão ligados a locais de rede específicos dentro do cristal. A banda de condução corresponde aos elétrons livres que movimentam-se através do cristal, esses elétrons contribuem para a condutividade elétrica no material. Essas duas bandas estão separadas por um intervalo chamado de banda proibida, onde nessa região não existem estados permitidos para os elétrons. Sendo que, a distância nessa banda proibida determina se o material é classificado como semicondutor ou isolante (KNOLL, 2005).

**Figura 15: Estrutura de bandas de energia para materiais isolantes e semicondutores.**



**Fonte: Autoria própria.**

Nos isolantes a diferença de energia entre as bandas de valência e condução são altas em temperatura ambiente, na ordem  $5 \text{ eV}$  ou maior, impossibilitando o elétron se mover para a banda de condução. Nos semicondutores essa diferença é menor, na ordem de  $1 \text{ eV}$ , possibilitando que ocorra essa migração dos elétrons para banda de condução, deixando um buraco na banda de valên-

cia. Quando ocorre esse processo é conhecido como par elétron-buraco, e sua probabilidade de criação é dada em termos da temperatura absoluta  $T$  como (KNOLL, 2005):

$$p(T) = CT^{3/2}e^{-E_g/2kT} \quad (16)$$

onde  $E_g$  é a energia da banda proibida,  $k$  constante de Boltzmann e  $C$  constante de proporcionalidade que corresponde a determinado material cristalino.

Quando ocorre a interação entre a radiação ionizante e um detector com material semicondutor, toda ou parte de sua energia é gerando-se pares elétrons-buracos. O número de pares elétrons-buracos produzidos será proporcional a energia transferida pela radiação ao material (KNOLL, 2005). Para que ocorra a coleta e quantificação desta carga elétrica, aplica-se um campo elétrico, de modo que, os elétrons são atraídos para o polo positivo, e os buracos para o polo negativo do detector (KNOLL, 2005; ANTONIASSI, 2012).

### 2.6.2 Resolução em energia

Os detectores em geral apresentam uma propriedade importante em fontes de radiação monoenergéticas que é medir a distribuição em energia da radiação incidente, essa propriedade é conhecida como função resposta do detector. Para um detector ideal a distribuição de energia medida é uma função delta de Dirac equivalente a energia da radiação incidente. No entanto, para o caso real existem várias fontes potenciais de flutuação na resposta de um detector que implicam no alargamento do espectro. Isso inclui a coleta incompleta de carga, ruídos aleatórios dentro do sistema do detector e/ou instrumentação e ruídos estatísticos resultante da natureza discreta do próprio sinal medido (KNOLL, 2005).

Embora ambas as distribuições apresentem características diferentes e estejam centradas no mesmo valor médio  $H_0$  suas áreas sob cada pico serão

iguais, levando em conta que o mesmo número de pulsos seja coletado pelo detector. Porém, no caso do espectro de baixa resolução de energia a largura à meia altura (LMA) será muito maior (KNOLL, 2005).

Para o caso real, uma estimativa pode ser feita assumindo que a formação de portadores de carga é um processo de Poisson. Sob essa suposição, se um número  $N$  de portadores de carga são gerados em média, as flutuações estatísticas serão caracterizadas pelo desvio padrão dessa medida  $\sqrt{N}$ . Caso esta seja a única fonte de ruído no sistema de medida, a função resposta será uma função Gaussiana (KNOLL, 2005):

$$G(H) = \frac{A}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-(H-H_0)^2/2\sigma^2} \quad (17)$$

onde  $H_0$  é o centroide,  $A$  é a área abaixo da curva descrita pela função  $G(H)$  e  $\sigma$  é o desvio padrão que está relacionado com a largura à meia altura (LMA) da curva, que é dada por:

$$LMA = 2\sqrt{2\ln(2)} = 2,355\sigma. \quad (18)$$

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 AMOSTRAS DE TECIDOS MAMÁRIOS

##### 3.1.1 Coleta e classificação histológica dos tecidos mamários

As amostras de tecidos mamários caninos e seus laudos histológicos, foram obtidos no laboratório de patologia veterinária da Universidade Federal do Paraná (UFPR), campus Agrárias de Curitiba, Paraná. O material adquirido para o estudo foi obtido por meio de procedimentos cirúrgicos realizados em cães da espécie *Canis lupus familiaris*. Cabe ressaltar que todos os tecidos mamários coletados eram de descarte residual.

A classificação histológica dos tecidos mamários caninos foi realizada através da análise microscópica das lâminas histológicas por um médico patologista responsável, do laboratório de patologia veterinária da UFPR. Um total de nove amostras de tecidos mamários foram recolhidas após as cirurgias, as quais foram subdividas em 3 grupos: tecidos normais (amostras I, II e III), tecidos neoplásicos benignos (amostras IV, V, VI) e tecidos neoplásicos malignos (amostras VII, VIII, IX).

##### 3.1.2 Preparação das amostras de tecidos mamários

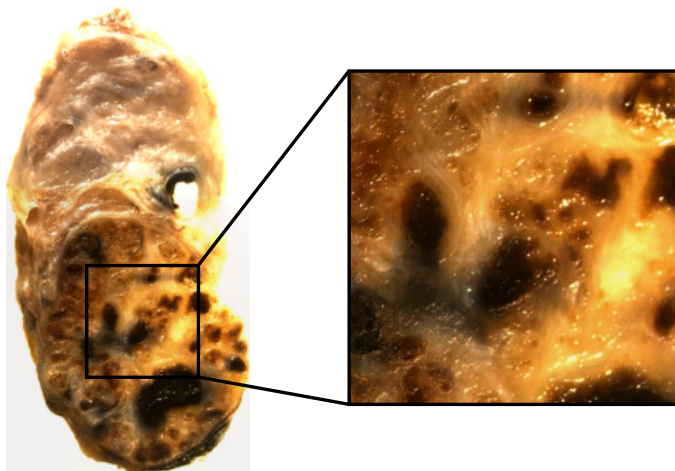
As formas de preparo de amostras de tecidos biológicos são variadas, sendo possível, fazê-lo de diferentes maneiras até o momento das medidas. Em tecidos mamários, especificamente, alguns trabalhos optaram por conservar as amostras congeladas após o procedimento cirúrgico (JOHNSTON; DAO; FARQUHARSON, 2019), outros optaram por armazenar as amostras em formol tamponado 10% em temperatura ambiente até o momento da análise (FAGUN-

DES et al., 2019). Alguns autores utilizaram as amostras de tecidos desidratadas por congelamento durante as medidas (WRÓBEL et al., 2017), outros escolheram utilizar as amostras de tecidos após o procedimento de parafinização (SILVA et al., 2009; SALVEGO, 2019; MALEZAN, 2018). Como estamos lidando com tecidos biológicos é esperado que qualquer um desses métodos de preparação possam gerar alguma alteração nos resultados, quando comparado as condições reais do tecido.

Neste trabalho, as amostras de tecidos mamários utilizadas foram armazenadas em recipientes plásticos contendo solução de formol tamponado (10%) à temperatura ambiente, sendo retiradas dos recipientes somente no momento do experimento. A escolha desse método teve o objetivo de preservar, e evitar o máximo possível alteração da sua estrutura tecidual e contaminação no contato com outros elementos químicos. Todos os tecidos foram cortados com uma espessura de aproximadamente 1,5 *mm* com bisturis cirúrgicos no Laboratório de Imagem e Espectroscopia de Raios X (LIERX) na UTFPR. O procedimento foi realizado tomando todo cuidado para evitar a contaminação das amostras. Após os cortes, as amostras de tecidos foram transportados ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) para realização das medidas.

No LNLS, antes das medidas, as amostras foram secas utilizando um papel toalha diminuindo o excesso de formol tamponado (10%) que poderia prejudicar nas informações obtidas nos tecidos. Além disso, todas amostras foram fotografadas com um estereomicroscópico externo padrão, modelo S6D Leica®. Devido ao tempo disponível de feixe síncrotron para realização das medidas, foram escolhidas nas amostras regiões de interesse de aproximadamente 20 *mm*<sup>2</sup> à 25 *mm*<sup>2</sup>, conforme a figura 16, para o estudo das técnicas de microfluorescência e espalhamento de raios X. Em seguida, as amostras foram colocadas em um porta-amostras retangular de acrílico e fixadas por uma camada de plástico Ultralene®, de forma que apresentassem uma superfície regular e homo-

**Figura 16: Exemplo de uma amostra fotografada pelo estereomicroscópico e região de interesse selecionada para o estudo.**



**Fonte: Autoria própria.**

gênea. Após a acomodação dos tecidos, os porta-amostras foram posicionados no equipamento, conforme a fotografia da figura 17.

### 3.2 TÉCNICA DE MICRO-FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

A técnica de Micro-Fluorescência de Raios X ( $\mu$ -XRF), utilizando uma fonte de radiação síncrotron, foi realizada na linha de Fluorescência de Raios X (XRF) no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas, São Paulo (PÉREZ et al., 1999).

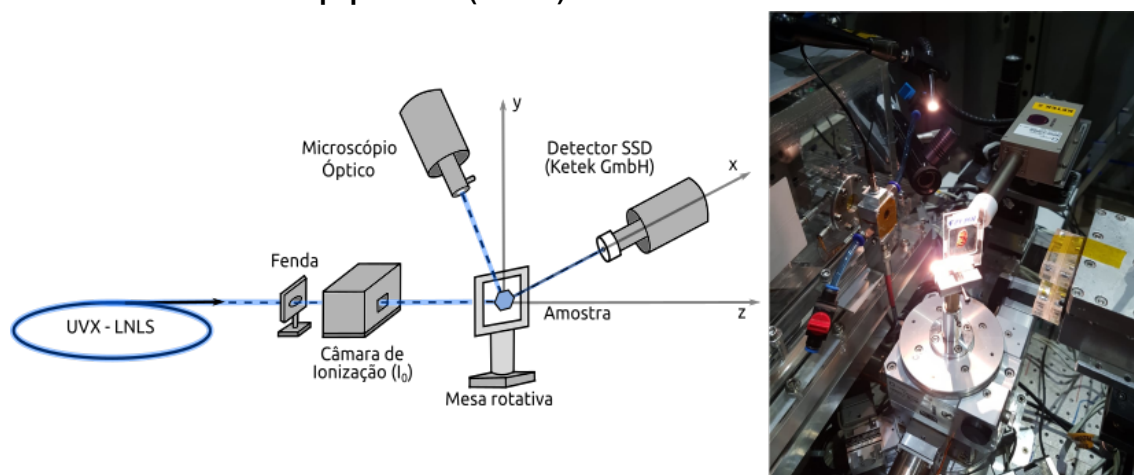
#### 3.2.1 Arranjo experimental

Para as medidas de  $\mu$ -XRF, foi utilizado um feixe polienergético (feixe branco) com uma densidade de fluxo que variava com a queda da corrente no anel síncrotron. Esse feixe incidente foi focalizado com um diâmetro interno de 30  $\mu m$  na superfície da amostra, utilizando um conjunto de espelhos de Kirkpatrick-Baez (PÉREZ et al., 1999). As amostras fixadas no porta-amostra estavam posi-



cionadas na mesa rotativa de coordenadas  $XYZ$  fazendo um ângulo de  $45^\circ$  em relação ao feixe incidente, conforme a figura 17. Essa mesa rotativa era controlada remotamente fora da estação experimental, e um microscópio óptico auxiliava a localização do centro da amostra. A detecção da radiação foi realizada usando um detector Silicon Drift AXAS-A da KETEK GmbH, o qual foi posicionado no plano horizontal (XZ) de detecção em geometria de reflexão, fazendo um ângulo de  $90^\circ$  em relação ao feixe incidente. Esse detector possuía uma resolução de energia de  $139\text{ eV}$  em  $5,9\text{ keV}$ , e coletava os dados através de um analisador multicanal acoplado de 2047 canais. Nesse experimento, foi utilizado um colimador de abertura de  $1\text{ mm}$  de diâmetro com uma janela de Be de  $8\text{ }\mu\text{m}$ . A distância entre a câmara de ionização  $I_0$  e amostra era de  $54\text{ mm}$ , e entre amostra e detector de  $23,0\text{ mm}$ .

**Figura 17: Esquema experimental na linha XRF no UVX-LNLS (esquerda) e disposição da amostra no equipamento (direita).**



**Fonte: Autoria própria.**

Durante as medidas, a câmara de ionização  $I_0$  monitorava o número de fótons incidentes, sendo que os dados eram corrigidos pelo decaimento da corrente no anel síncrotron. Os mapas de distribuição espacial dos elementos químicos das regiões selecionadas nas amostras de tecidos mamários foram realizadas com passos de  $0,04\text{ mm}$  e tempo de  $250\text{ ms}$ .

### 3.2.2 Método de análise para determinação dos mapas de $\mu$ -XRF

Para a determinação dos mapas de  $\mu$ -XRF, ou seja, distribuição espacial dos elementos-traço nas amostras, foi utilizado o software PyMca 5.4.3 (SOLÉ et al., 2007). As contagens nos picos característicos de emissão dos elementos de interesse em cada ponto da amostra, foi obtida através do algoritmo de ajuste multipicos deste programa. Usando o *Correlator RGB* do PyMca, o *software* convertia a contagem desses espectros característicos de raios X obtidos nos tecidos em intensidade de pixel na escala *RGB*, gerando mapas de  $\mu$ -XRF dos elementos-traço. Esses mapas foram comparados qualitativamente com as imagens das lâminas histológicas, sendo possível estudar e correlacionar elementos-traços encontrados com as regiões sadias e neoplásicas desses tecidos.

## 3.3 TÉCNICA DE ESPALHAMENTO DE RAIOS X

### 3.3.1 Arranjo experimental

Após as medidas de  $\mu$ -XRF, foram feitas algumas alterações no arranjo experimental, para a realização das medidas de espalhamento de raios X. Para essas medidas foi utilizado um feixe monocromatizado, adicionando-se um monocromador de duplo cristal  $Si(111)$ , o qual selecionava uma energia de 11,96 *keV* para o feixe incidente. Com o conjunto de espelhos de Kirkpatrick-Baez da técnica anterior, manteve-se o mesmo tamanho do feixe na superfície da amostra. As distâncias entre fonte-amostra e amostra-detector continuaram as mesmas que na técnica de  $\mu$ -XRF. Nesse experimento, o ângulo de espalhamento ( $\theta$ ) obtido para as medições foi de 86,45° (determinado experimentalmente a partir das posições dos picos Rayleigh e Compton nos espectros), resultando em um

momento transferido  $x = 0,66 \text{ \AA}^{-1}$ . O detector (Silicon Drift AXAS-A) manteve-se no plano horizontal (XZ) de detecção, porém, foi alterado seu colimador para uma abertura de 4 mm. Fazendo uso dos mapas de  $\mu$ -XRF previamente obtidos do experimento anterior, foram selecionados 4 pontos em cada amostra de tecido para as medidas de espalhamento. Esses pontos foram medidos 5 vezes durante um tempo de exposição de 250 s, mantendo a incerteza estatística de contagem máxima de 1,3% para o pico Rayleigh, e de 0,3% para o pico Compton. Por fim, como na técnica de  $\mu$ -XRF, a câmara de ionização  $I_0$  monitorava a intensidade incidente para correção do decaimento da corrente no anel síncrotron.

### 3.3.2 Método de análise para determinação do número atômico efetivo usando a razão Rayleigh e Compton (R/C)

Em um sistema de espalhamento de raios X com feixe monoenergético, quando ocorre o processo de interação com uma amostra espera-se detectar um pico estreito correspondente aos fótons de espalhamento Rayleigh, com a mesma energia da radiação incidente ( $E_R = E_0$ ) e um pico largo correspondente aos fótons de espalhamento Compton de menor energia que a radiação incidente ( $E_C < E_0$ ). Esses números de fótons espalhados Rayleigh  $N_R$  e Compton  $N_C$  detectados em um ângulo de espalhamento  $\theta$ , podem ser calculados da seguinte forma (ANTONIASSI; CONCEIÇÃO; POLETTI, 2011):

$$N_R = N_0 \eta_{at} \overline{\left( \frac{d\sigma}{d\Omega} \right)}_R \Delta\Omega_{det} \varepsilon V A_R \quad (19)$$

$$N_C = N_0 \eta_{at} \overline{\left( \frac{d\sigma}{d\Omega} \right)}_C \Delta\Omega_{det} \varepsilon V A_C, \quad (20)$$

onde  $N_0$  é o número de fótons incidentes por unidade de área;  $\eta_{at}$  é o número de átomos por unidade de volume do material espalhador, dependente da densidade eletrônica  $\rho_e$  e do número atômico  $Z$  desse material;  $\overline{(d\sigma/d\Omega)}_R$  e  $\overline{(d\sigma/d\Omega)}_C$

correspondem as secções de choque diferenciais Rayleigh e Compton para feixe polarizado médias no intervalo de ângulo sólido  $\Delta\Omega_{det}$  compreendido pelo detector;  $\varepsilon$  é a eficiência do detector;  $V$  é o volume da amostra com o qual a radiação interage;  $A_R$  e  $A_C$  são os fatores de atenuação Rayleigh e Compton que ocorrem dentro da amostra.

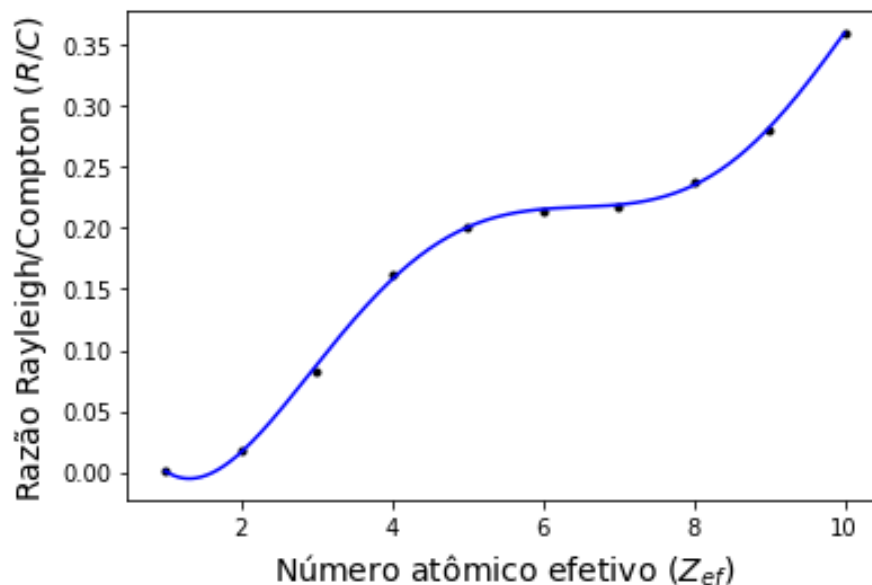
Para obtermos a razão entre os espalhamentos Rayleigh e Compton,  $R/C$ , independente da atenuação que ocorre na amostra  $A_R/A_C \approx 1$ , é preciso escolher condições experimentais de energia incidente  $E_0$  e ângulo de espalhamento  $\theta$  que permitam uma pequena diferença de energia entre os espectros Rayleigh e Compton ( $E_R \approx E_C$ ), mas que sejam suficientes para separar esses picos (DUVAUCHELLE; PEIX; BABOT, 1999b; ANTONIASSI; CONCEIÇÃO; POLETTI, 2011; DEL LAMA et al., 2015). Dessa forma, podemos definir a razão Rayleigh e Compton como:

$$R/C = \frac{N_R}{N_C} = \frac{[F(x,Z)]^2 \overline{(d\sigma/d\Omega)}_{Th}}{S(x,Z) \overline{(d\sigma/d\Omega)}_{KN}}. \quad (21)$$

Como o momento transferido  $x$  durante o experimento é fixo, as secções de choque diferenciais de Thomson  $\overline{(d\sigma/d\Omega)}_{Th}$  (4) e Klein-Nishida  $\overline{(d\sigma/d\Omega)}_{KN}$  (11) médias podem ser calculadas considerando o ângulo sólido  $\Delta\Omega_{det}$  compreendido pelo detector (HANSON, 1986; HANSON, 1988), a equação (21) torna-se uma função do número atômico para elementos químicos puros  $R/C = f_x(Z)$  ou do número atômico efetivo para materiais compostos, com mais de um elemento químico  $R/C = f_x(Z_{ef})$ . A figura 18, apresenta a razão  $R/C$  teórica em função dos elementos químicos puros de número atômico  $1 \leq Z \leq 10$ , e o ajuste polinomial de ordem 6 (linha contínua) para esses elementos. Os valores de  $F(x,Z)$  e  $S(x,Z)$  utilizados na equação (21) foram obtidos das tabelas de Hubbell et al. (1975), e o momento transferido  $x=0,66 \text{ \AA}^{-1}$  foi o mesmo usado nas medidas experimentais. As secções de choque diferenciais médias de Thomson  $\overline{(d\sigma/d\Omega)}_{Th}$

e Klein-Nishida  $\overline{(d\sigma/d\Omega)}_{KN}$  para feixe de raios X polarizado, considerando o intervalo de ângulo sólido de detecção (definidos pelas distâncias experimentais e abertura do colimador) foram calculadas numericamente por meio de programa computacional implementado para este fim.

**Figura 18: Razão entre o espalhamento Rayleigh e Compton ( $R/C$ ) em função do número atômico efetivo  $Z_{ef}$ . Os valores obtidos da função  $f_{0,66}(Z)$  (pontos) são para os elementos químicos puros e  $f_{0,66}(Z_{ef})$  (linha contínua) são resultados do ajuste polinomial para o número atômico efetivo  $Z_{ef}$ .**



**Fonte: Autoria própria.**

Na figura 18, o ajuste polinomial (linha contínua) permite obter o número atômico efetivo  $Z_{ef}$  das amostras, através da interpolação da razão da área (contagem) dos espectros de espalhamentos Rayleigh e Compton obtidos experimentalmente. O número de fótons espalhados Rayleigh ( $N_R$ ) e Compton ( $N_C$ ) foram obtidos através da determinação da área sob a curva de cada pico de espalhamento no espectro experimental. Como existe sobreposição entre as curvas de espalhamento, foi utilizado um procedimento de ajuste de curva Gaussiano para o pico Rayleigh e Compton a fim de determinar as áreas de cada pico.

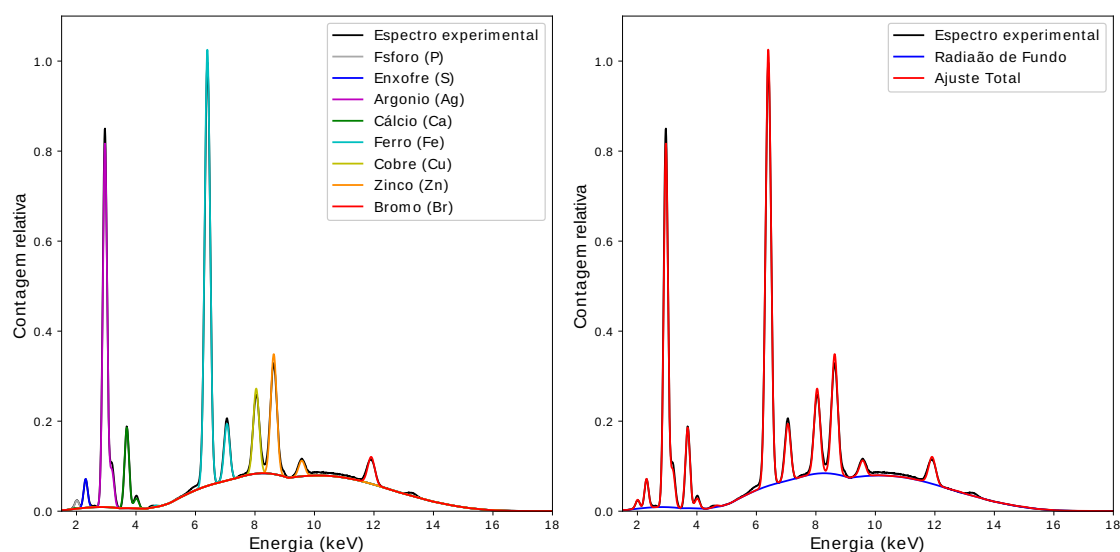
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 TÉCNICA DE MICRO FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

#### 4.1.1 Espectro de fluorescência de raios X

A figura 19, apresenta um exemplo de espectro de fluorescência de raios X normalizado corrigidos pelo decaimento da corrente no anel síncrotron, com o resultado do ajuste múltiplo do programa PyMca 5.4.3 em um dos pontos medidos de uma amostra (esquerda) e o ajuste de curva total realizado para esse espectro experimental (direita).

**Figura 19: Espectro de fluorescência de raios X normalizado em um dos pontos medidos da amostra VII (esquerda) e ajuste de curva total realizado para esse espectro experimental (direita).**



**Fonte: Autoria própria.**

Na figura 19, é possível verificar a presença de diferentes elementos químicos (P, S, Ag, Ca, Fe, Cu, Zn, Br) que foram identificados pelo PyMca 5.4.3. O ajuste total realizado pelo programa se mostra adequado para obtenção das

áreas líquidas dos elementos químicos.

#### 4.1.2 Aspectos descritivos da distribuição espacial dos elementos químicos nos tecidos mamários

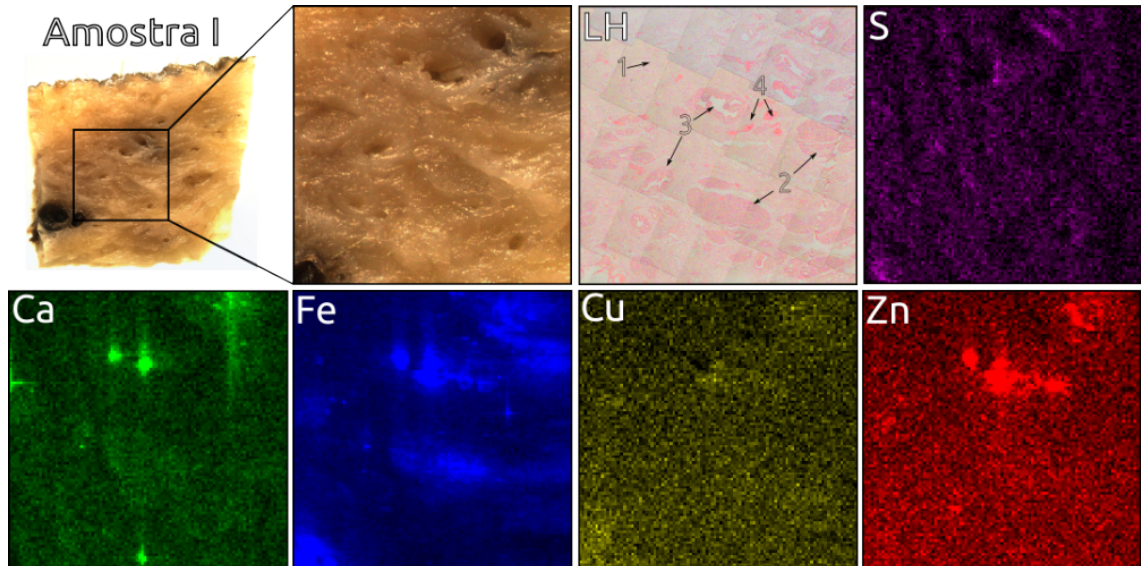
A análise da distribuição espacial dos elementos químicos nos tecidos mamários caninos foi dividida em três grupos: tecidos normais (figuras 20, 21 e 22), benignos (figuras 23, 24 e 25) e malignos (figuras 26, 27 e 28).

Nessas figuras, são apresentadas as distribuições espaciais dos elementos químicos (mapas de  $\mu$ -XRF) encontrados nas regiões selecionadas dos tecidos e que são de interesse para o estudo. A intensidade do pixel nos mapas de  $\mu$ -XRF está relacionada com a área do espectro característico de raios X, e por conseguinte, à concentração do elemento químico naquele pixel. Também são apresentadas as laminas histológicas (LH) dessas amostras, correlacionando a distribuição espacial dos elementos químicos com suas respectivas estruturas histológicas, as quais estão descritas nas legendas das figuras.

##### 4.1.2.1 Tecidos mamários normais

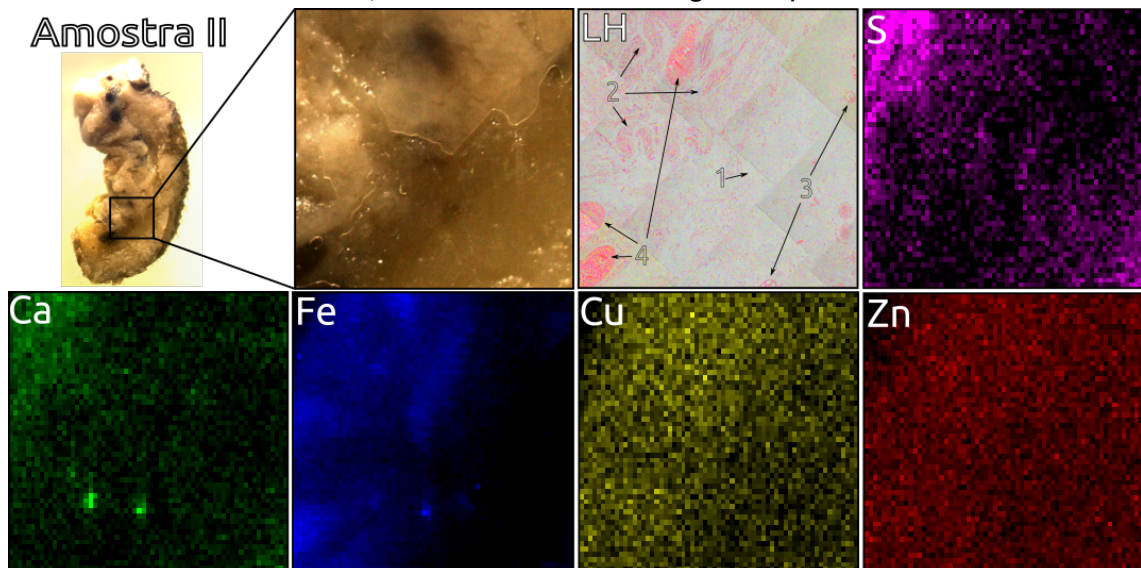
Nos tecidos mamários normais (figuras 20, 21 e 22), o S se distribuiu por toda a extensão medida, aumentando sua intensidade em regiões com maior número de lóbulos mamários, conforme a amostra II. O Ca, apresentou as mesmas características que o S, exceto na amostra I, se destacando com maior intensidade em uma região de ducto mamário. O Fe, acumulou-se principalmente nas regiões vasculares e de lóbulos mamários desses tecidos. Por fim, o Cu e Zn, obtiveram as mesmas características, certa homogeneidade ao longo das estruturas medidas e uma distribuição espacial mais ruidosa comparada aos demais elementos químicos. Particularmente, a amostra I apresentou uma elevada con-

**Figura 20: Amostra I (tecido normal) - Distribuição espacial dos elementos químicos com sua respectiva lâmina histológica (LH) e regiões indicadas (1. tecido fibroso, 2. lóbulos mamários, 3. ductos e 4. vasos sanguíneos).**



Fonte: Autoria própria.

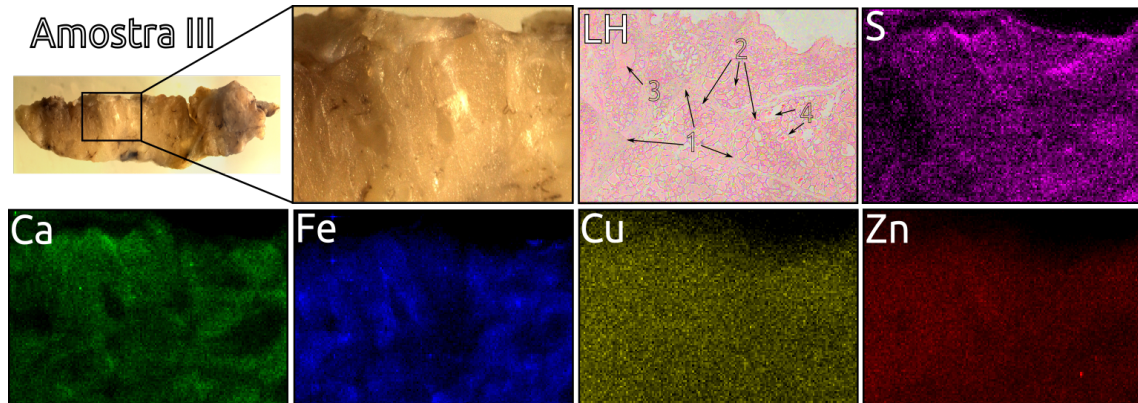
**Figura 21: Amostra II (tecido normal) - Distribuição espacial dos elementos químicos com sua respectiva lâmina histológica (LH) e regiões indicadas (1. tecido fibroso, 2. lóbulos mamários, 3. ductos e 4. vasos sanguíneos).**



Fonte: Autoria própria.



**Figura 22: Amostra III (tecido normal) - Distribuição espacial dos elementos químicos com sua respectiva lâmina histológica (LH) e regiões indicadas (1. tecido fibrocolágeno, 2. lóbulos mamários, 3. ductos e 4. vasos sanguíneos).**

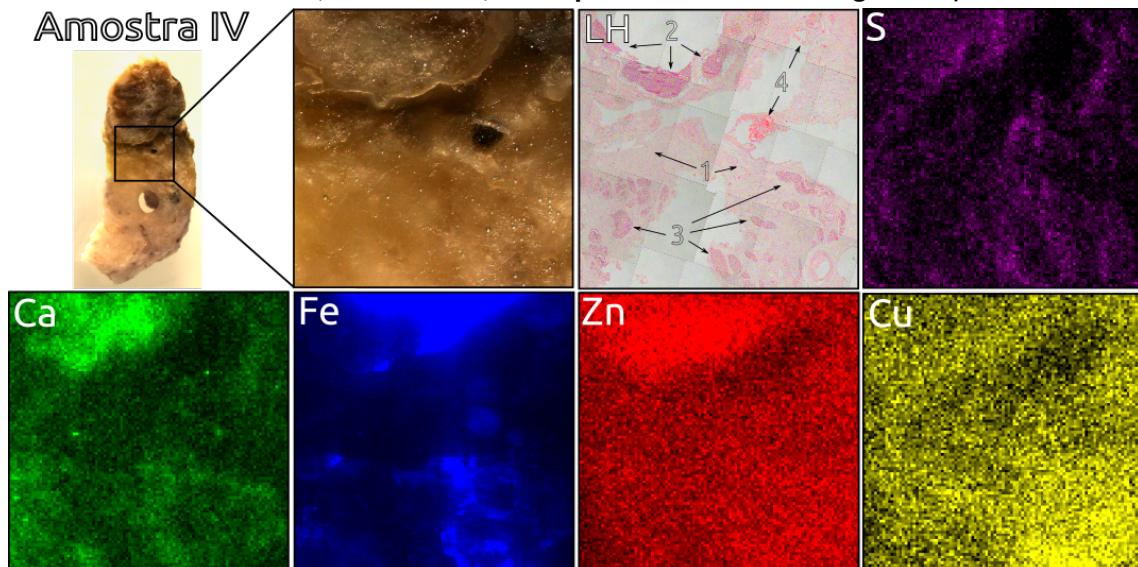


Fonte: Autoria própria.

centração de Zn nas regiões vasculares e ductais.

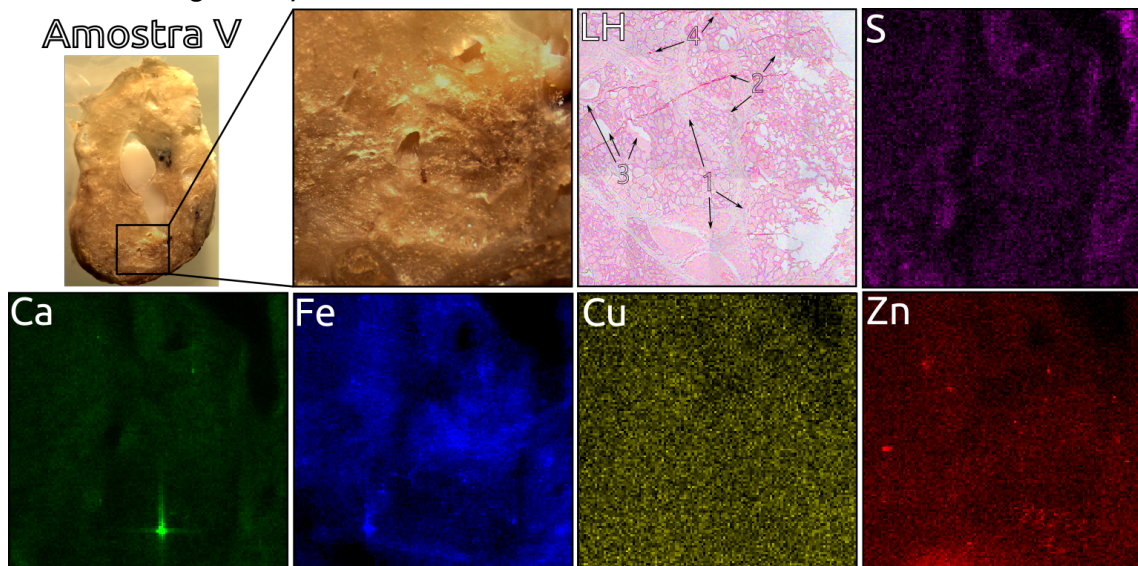
#### 4.1.2.2 Tecidos mamários benignos

**Figura 23: Amostra IV (adenoma simples a papilífero) - Distribuição espacial dos elementos químicos com sua respectiva lâmina histológica (LH) e regiões indicadas (1. tecido fibroso, 2. linfonodo, 3. neoplasias e 4. vasos sanguíneos).**



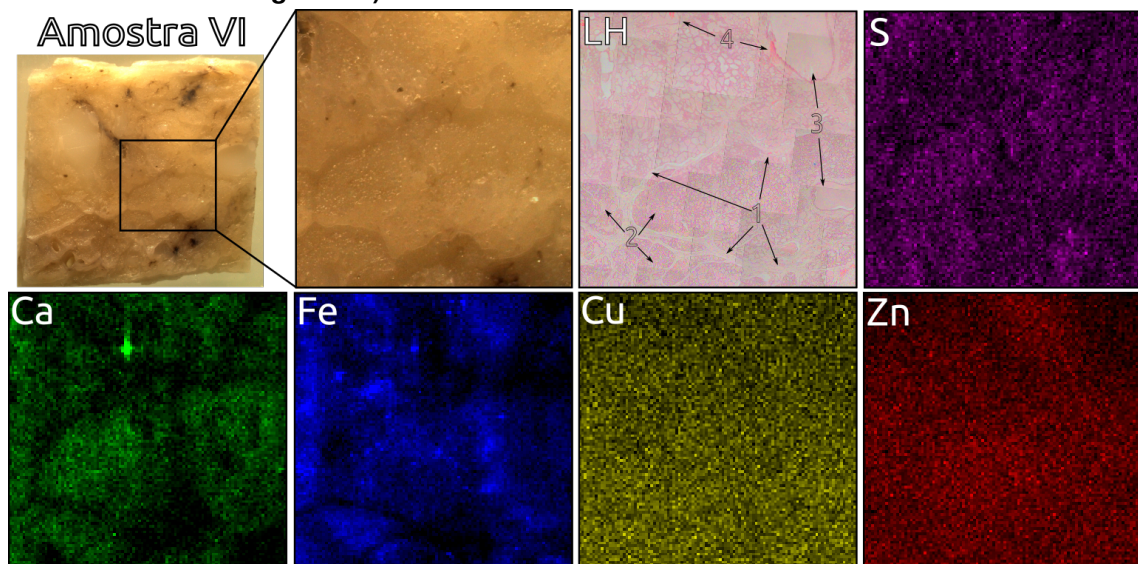
Fonte: Autoria própria.

**Figura 24: Amostra V (adenoma cístico) - Distribuição espacial dos elementos químicos com sua respectiva lâmina histológica (LH) e regiões indicadas (1. tecido fibroso, 2. lóbulos mamários circundados por neoplasias, 3. ductos e 4. vasos sanguíneos).**



Fonte: Autoria própria.

**Figura 25: Amostra VI (adenoma simples a papilífero) - Distribuição espacial dos elementos químicos com sua respectiva lâmina histológica (LH) e regiões indicadas (1. tecido fibroso, 2. lóbulos mamários circundados por neoplasias, 3. ductos e 4. vasos sanguíneos).**

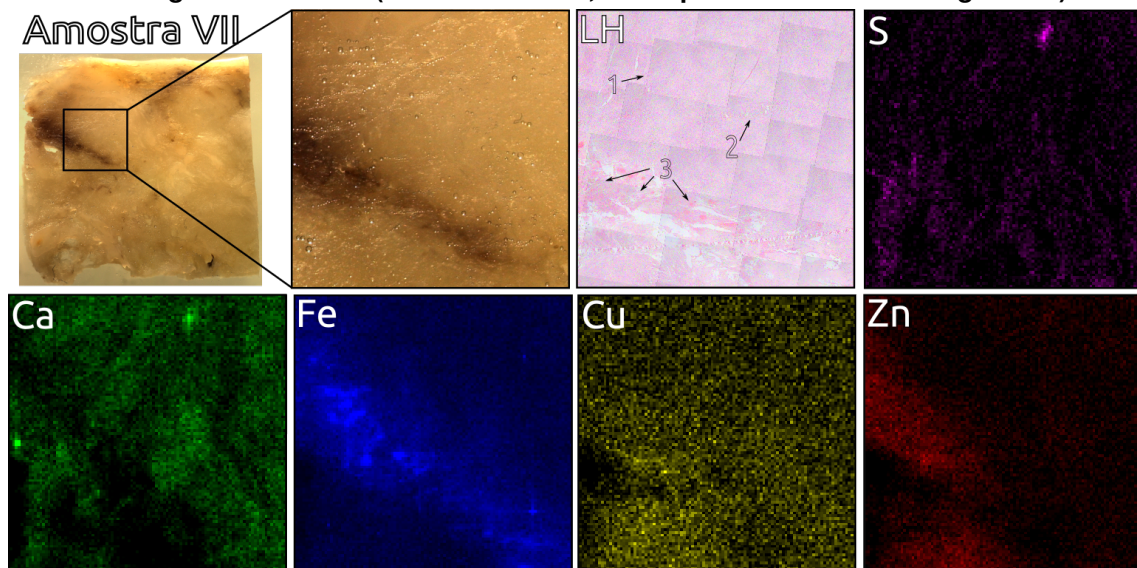


Fonte: Autoria própria.

Nos tecidos mamários benignos (figuras 23, 24 e 25), o S, Ca e Fe, se distribuíram por toda a região medida, diminuindo suas intensidades principalmente em regiões fibrosas. O Fe, semelhante ao grupo de tecidos mamários normais também apareceu em regiões vasculares nesses tecidos. O Cu e Zn, manifestaram-se de forma semelhante em todas as amostras benignas, distribuindo-se por toda a região medida e mais ruidosas quando comparadas aos demais elementos químicos. Particularmente, na amostra IV a região de linfonodo acumularam-se os elementos químicos Ca, Fe e Zn, enquanto, nas regiões neoplásicas o Ca, Fe e Cu tiveram maiores intensidades. Nas amostras V e VI (tecidos com características semelhantes), os elementos Ca e Fe apresentaram maiores intensidades que os demais elementos químicos.

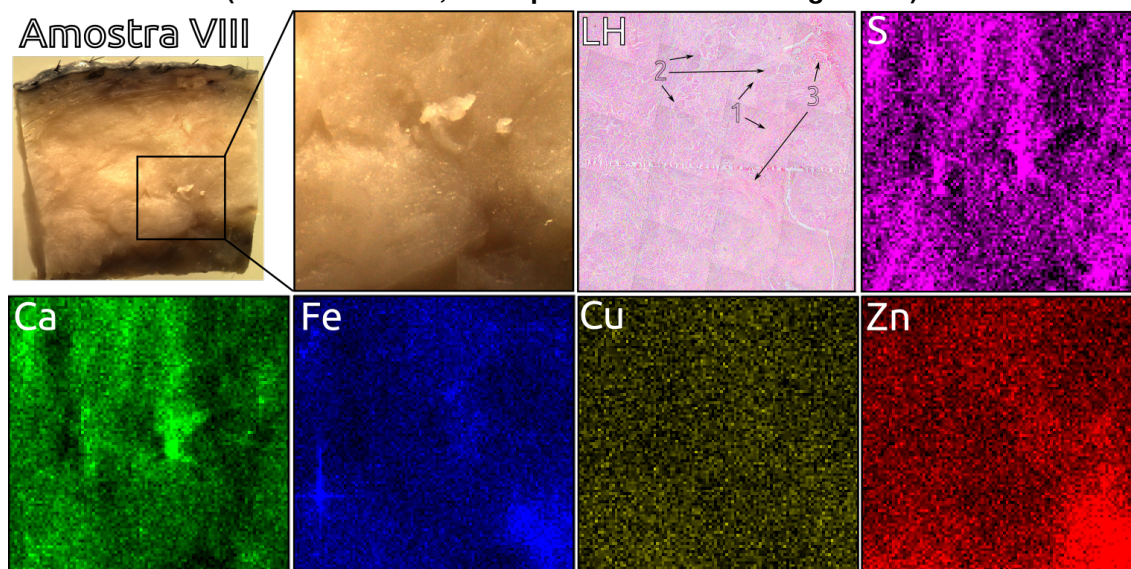
#### 4.1.2.3 Tecidos mamários malignos

**Figura 26: Amostra VII (adenocarcinoma papilífero a complexo de grau I) - Distribuição espacial dos elementos químicos com sua respectiva lâmina histológica (LH) e regiões indicadas (1. tecido fibroso, 2. neoplasias e 3. vasos sanguíneos).**



Fonte: Autoria própria.

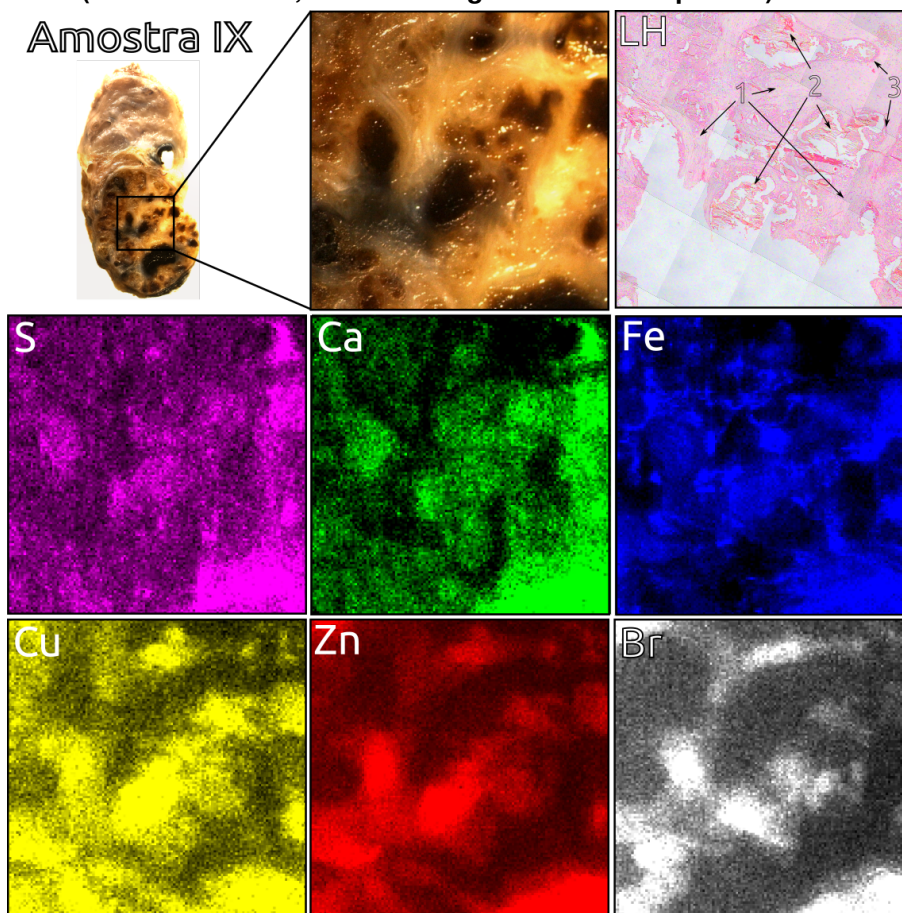
**Figura 27: Amostra VIII (adenocarcinoma simples de grau I) - Distribuição espacial dos elementos químicos com sua respectiva lâmina histológica (LH) e regiões indicadas (1. tecido fibroso, 2. neoplasias e 3. vasos sanguíneos).**



Fonte: Autoria própria.

Nas amostras malignas VII e VIII, o S se distribuiu por toda região medida, enquanto, na amostra IX esse elemento, tal como Cu, Zn e Br, acumularam-se principalmente nas regiões que continham secreções sanguíneas. O Ca, nas amostras neoplásicas malignas obtiveram as mesmas características, distribuiu-se por toda extensão medida, aumentando sua intensidade principalmente em regiões de lóbulos mamários. O Fe, por sua vez, também se distribuiu por toda a região medida nas amostras malignas, destacando-se com maior intensidade nas regiões vasculares nas amostras VII e VIII, e nas regiões neoplásicas na amostra IX. O Cu, nas amostras VII e VIII, estão distribuídos espacialmente de forma homogênea por toda a região medida, porém, mais ruidosa como visto nos demais grupos de tecidos. Na amostra IX, o Cu além de se acumular nas regiões de secreções sanguíneas, em menor intensidade apareceu nas regiões neoplásicas desse tecido. Por fim, o Zn apresentou uma tendência de acúmulo nas regiões vasculares dessas amostras.

**Figura 28: Amostra IX (adenocarcinoma cístico de grau II) - Distribuição espacial dos elementos químicos com sua respectiva lâmina histológica (LH) e regiões indicadas (1. tecido fibroso, 2. vasos sanguíneos e 3. neoplasias).**



Fonte: Autoria própria.

#### 4.1.3 Comparação dos resultados das distribuições espaciais dos elementos químicos obtidos com os presentes na literatura

A comparação dos resultados obtidos com a literatura foram feitas com trabalhos que utilizaram tecidos mamários caninos e humanos. O uso de tecidos mamários humanos como análise de referência é devido sua similaridade histológica com os tecidos mamários caninos utilizados neste trabalho e por possuírem um maior número de pesquisas com essa natureza de investigação. A análise levará em conta somente a presença do elemento químico nos tecidos

mamários e sua contribuição com o processo carcinogênico.

#### 4.1.3.1 Enxofre (S)

O S, apresentou distribuições espaciais por toda a região medida em todos os grupos de tecidos estudados diminuindo suas intensidades nas regiões fibrosas. Não foram encontrados trabalhos que correlacionam a presença do S com o processo carcinogênico em tecidos mamários em nível micro-métrico. O único trabalho que apresenta indícios de S em tecidos mamários humanos é reportado por Farquharson et al. (2007), mostrando a viabilidade do uso de hematoxilina nas amostras para uma correlação mais aparente com as estruturas teciduais. De modo geral, a presença desse elemento químico em tecidos é de grande importância, sendo o componente essencial das proteínas e, quando fornecido em nível insuficiente, levam à síntese proteica reduzida podendo contribuir com o processo carcinogênico (COLLIN et al., 2009).

#### 4.1.3.2 Cálcio (Ca)

O Ca, apareceu em todos os grupos de tecidos estudados, principalmente nas regiões de lóbulos mamários e ductos desses tecidos. Particularmente, a amostra IV apresentou intensidades maiores também nas regiões neoplásicas. Em tecidos normais é esperado que haja maiores concentrações de Ca em regiões de lóbulos mamários e ductos (HAKA et al., 2002). Quando esse elemento químico está presente em tecidos mamários neoplásicos geralmente está associado à presença de microcalcificações (MORGAN; COOKE; MCCARTHY, 2005; SILVA et al., 2013). Segundo Silva et al. (2013), Al-Ebraheem et al. (2014), Malezan (2018) a presença de Ca em tecidos mamários neoplásicos é maior que em tecidos mamários normais.

#### 4.1.3.3 Ferro (Fe)

O Fe, em geral, apresentou-se em maior quantidade nas regiões vasculares nos grupos de tecidos estudados. Particularmente, nas amostras IV e IX, esse elemento químico apareceu também nas regiões neoplásicas. O acúmulo de Fe em regiões vasculares é devido esse elemento químico estar presente na hemoglobina dos glóbulos vermelhos do sangue, proteína que é responsável pelo transporte de oxigênio desses tecidos (FARQUHARSON et al., 2008; SALVEGO, 2019). A presença do Fe em regiões neoplásicas nos tecidos mamários pode estar ligado a indução do estresse oxidativo, e alteração nos níveis de proteínas responsáveis pela homeostase desse metal promovem a transformação de células normais em neoplásicas (SHPYLEVA et al., 2011; SILVA et al., 2013; MARQUES et al., 2014).

#### 4.1.3.4 Cobre (Cu)

O Cu, apresentou em boa parte das amostras o mesmo padrão: certa homogeneidade por toda a região medida e distribuição mais ruidosas comparado as demais amostras, exceto pelas amostras IV e IX que apresentaram tendência de acúmulo nas regiões neoplásicas desses tecidos. Segundo Farquharson et al. (2007), Malezan (2018), Salvego (2019), quando há baixas concentrações de Cu em tecidos mamários, os mapas de  $\mu$ -XRF são mais ruidosos, prejudicando na comparação com a lâmina histológica. Em níveis baixos, o Cu indica uma atividade celular normal e a presença dele por toda a amostra pode estar associada a ativação de algumas enzimas, que tem o papel de proteger as células contra agentes produtores de radicais livres e substâncias que podem estar envolvidas no início do processo carcinogênico (SILVA et al., 2009). Em níveis mais altos, o Cu pode estar em seu estado oxidativo ( $Cu^{2+}$ ), contribuindo para produção de

espécies reativas de oxigênio as quais resultam no estresse oxidativo dentro da célula sofrendo mutações de células normais em neoplásicas (FARQUHARSON et al., 2007; MALEZAN, 2018).

#### 4.1.3.5 Zinco (Zn)

O Zn, em geral, distribuiu-se por toda a extensão das amostras e com um certo nível de ruído em seus mapas de  $\mu$ -XRF como já reportados por Salvego (2019). Esse elemento químico se destacou principalmente em regiões vasculares nos grupos de tecidos estudados. Segundo Wang et al. (2012), a presença do Zn é essencial em regiões vasculares e sua elevada concentração pode estar relacionada com a alimentação que esses animais tinham.

#### 4.1.3.6 Bromo (Br)

O Br, por sua vez, teve sua distribuição espacial somente na amostra IX, em regiões vasculares desse tecido. O Br é encontrado em concentrações baixas nos tecidos, esse elemento é considerado componente essencial nos processos biológicos, embora que sua função ainda não é bem conhecida. Existem indícios de Br nos tecidos mamários, tendo concentração mais elevada nos tecidos neoplásicos comparados aos tecidos normais (MAGALHÃES et al., 2008).

#### 4.1.4 Correlação entre os elementos químicos nos tecidos mamários

Nessa subseção serão apresentadas algumas correlações de distribuições espaciais entre elementos químicos nos tecidos mamários estudados.

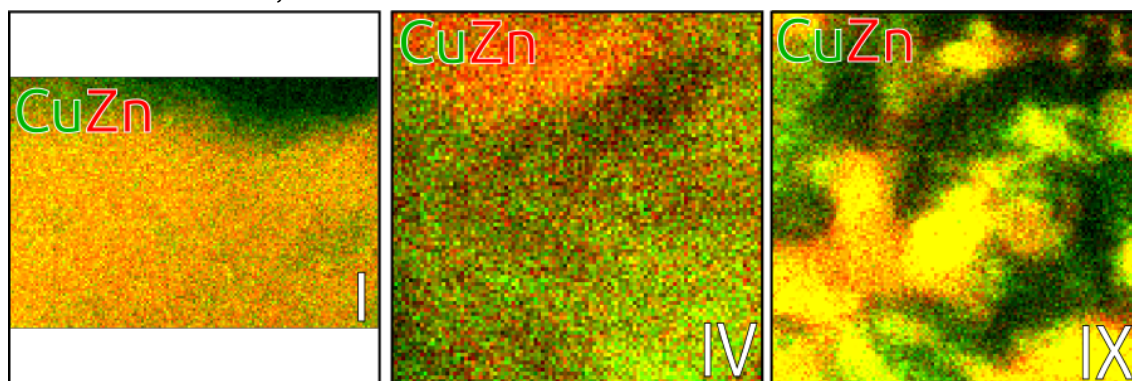
O Cu-Zn, em geral, tiveram uma correlação forte tanto em tecidos mamários normais, como neoplásicos. A presença desses elementos químicos podem contribuir para uma atividade celular normal e/ou estar relacionada aos proces-



dos carcinogênicos dos tecidos mamários. Isso deve-se, pela capacidade do Cobre de formar íons que podem ser encontrados no organismos em seu estado reduzido ( $Cu^+$ ) e oxidativo ( $Cu^{2+}$ ) (RAJU et al., 2006; MALEZAN, 2018). O Cobre, quando encontrado com o Zinco, tem o papel importante como co-fator da enzima Cu/ZnSOD, a qual atua contra a formação de espécies reativas de oxigênio, ou de radicais livres, que podem reagir com o DNA e moléculas dentro da célula (LOWNDES; HARRIS, 2005; SILVA et al., 2013).

A figura 29, apresenta, um exemplo dos mapas de correlação das distribuições espaciais dos elementos químicos Cu-Zn correspondente ao tecido mamário normal, benigno e maligno. A cor amarela, soma das cores primárias verde e vermelha, indica o quão esses dois elementos químicos estão na mesma região das amostras.

**Figura 29: Correlações das distribuições espaciais dos elementos químicos Cu-Zn das amostras I, IV e IX.**



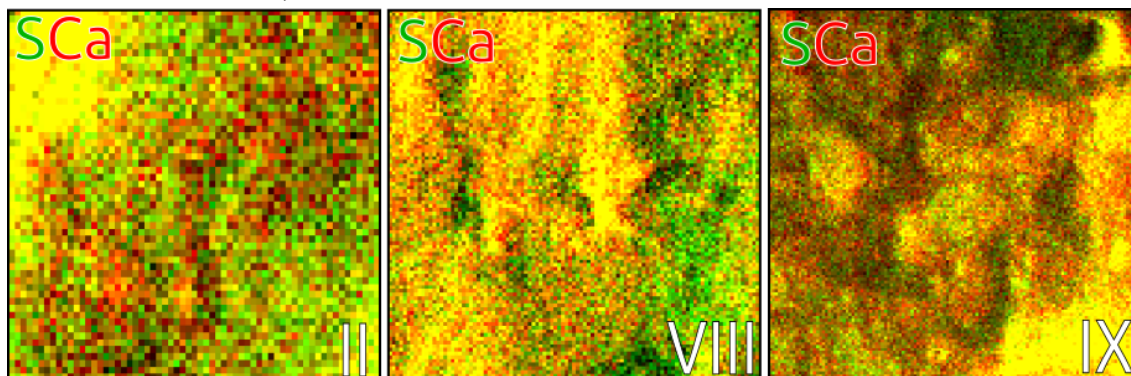
**Fonte: Autoria própria.**

Particularmente, na amostra IX (tecido mamário maligno), esses metais acumularam-se principalmente em regiões vasculares desse tecido. Quando aplicado o teste não-paramétrico de Spearman entre esses elementos químicos na amostra IX, sua correlação indicou significância estatística forte ( $r = 0,801$ ,  $p < 0,000001$ ).

O S-Ca, também apresentaram correlações nas regiões teciduais, tanto

nas amostras normais, quanto neoplásicas, destacando-se em regiões de lóbulos mamários e ductais desses tecidos. A presença do Ca em quantidades regulares metaloproteínas de matriz indicam uma atividade celular normal (SILVA et al., 2009; SILVA et al., 2013), quando encontrado em quantidades elevadas em tecidos neoplásicos, podem estar promovendo o crescimento tumoral, estando associado à presença de microcalcificações nesses tecidos (MORGAN; COOKE; MCCARTHY, 2005; SILVA et al., 2013). Como o S está nas mesmas estruturas teciduais que o Ca, podem haver indícios, a ser investigado em futuros trabalhos, de que sua presença esteja contribuindo também no processo carcinogênico desses tecidos. A figura 30, apresenta, um exemplo dos mapas de correlação das distribuições espaciais dos elementos químicos Cu-Zn das amostras II, VIII e IX

**Figura 30: Correlações das distribuições espaciais dos elementos químicos S-Ca das amostras II, VIII e IX.**



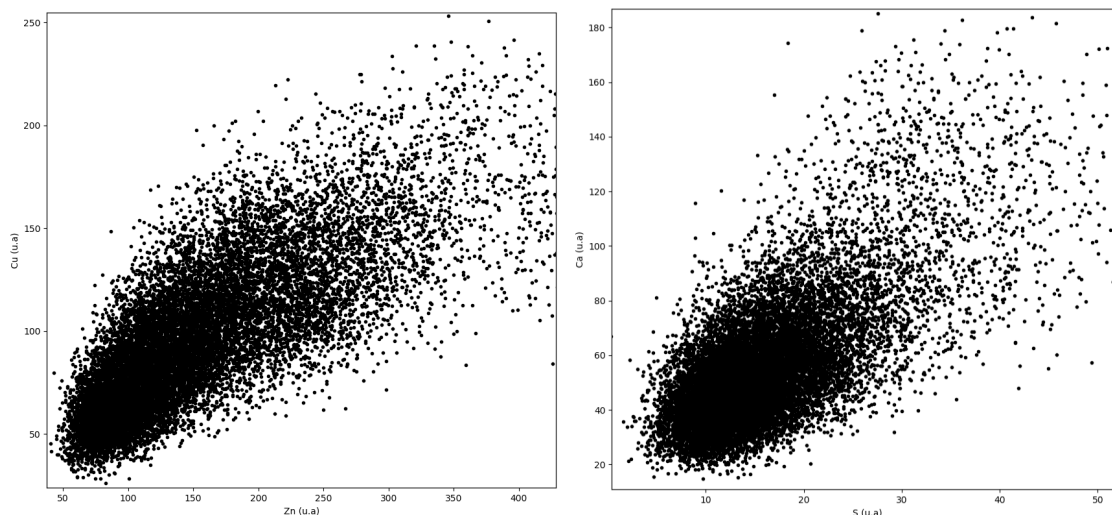
Fonte: Autoria própria.

Particularmente, nas amostras apresentadas, os elementos S-Ca estão distribuídos em regiões de lóbulos mamários e ductais. Na amostra IX, esses elementos encontram-se em regiões adjacentes as neoplasias. O teste não-paramétrico de Spearman para os elementos S-Ca na amostra IX indicou uma correlação moderada entre eles ( $r = 0,691$ ;  $p < 0,000001$ ).

A seguir, na figura 31, é apresentado, um exemplo, do gráfico de correla-

ção das distribuições espaciais do Cu-Zn (esquerda) e S-Ca (direita) da amostra IX.

**Figura 31: Gráfico de correlação das distribuições espaciais dos elementos químicos Cu-Zn (esquerda) e Ca-S (direita) da amostra IX (tecido mamário maligno).**



**Fonte: Autoria própria.**

Da figura 31, observa-se que para ambas às correlações, Cu-Zn e S-Ca, o gráfico de correlação entre as distribuições dos elementos químicos tem tendência positiva, ou seja, a medida que um elemento-traço aumenta a intensidade em determinado ponto medido na amostra, o mesmo acontecerá para o outro elemento-traço.

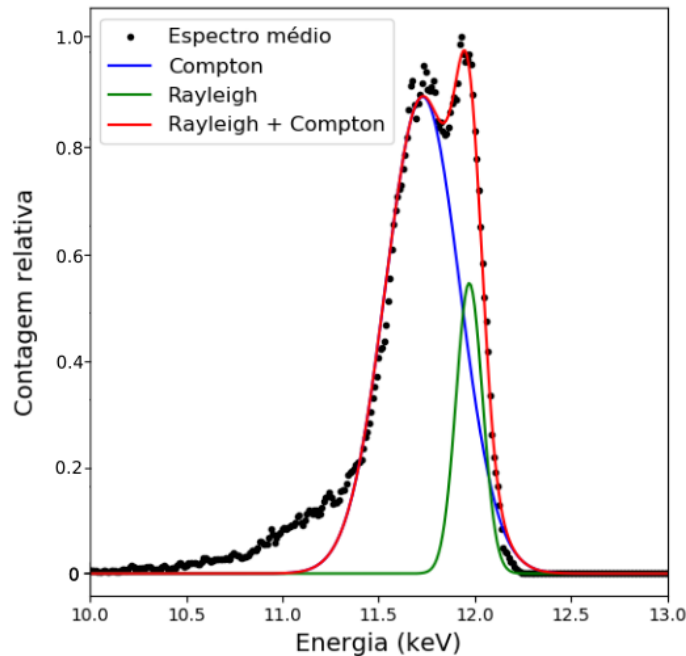
## 4.2 TÉCNICA DE ESPALHAMENTO DE RAIOS X

### 4.2.1 Espectros de Espalhamento

A figura 32, apresenta um exemplo do ajuste de curva Rayleigh e Compton do espectro de espalhamento médio experimental obtido em um ponto da amostra.

Na figura 32, observa-se que a diferença de energia entre os espectros

**Figura 32: Exemplo do ajuste de curva médio Rayleigh e Compton em um espectro de espalhamento médio experimental obtido em um único ponto na amostra.**



**Fonte: Autoria própria.**

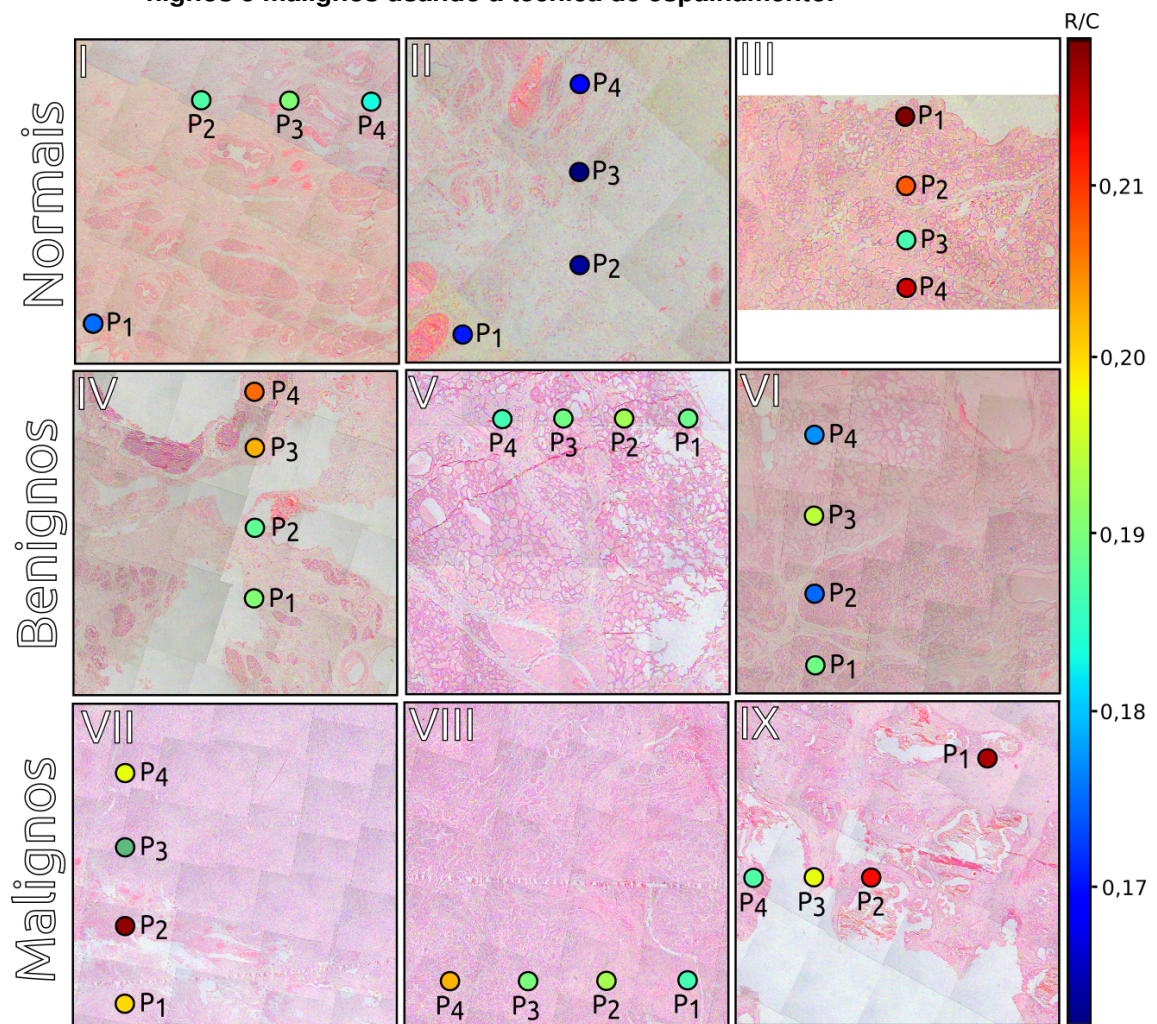
Rayleigh ( $11,96 \text{ keV}$ ) e Compton ( $11,70 \text{ keV}$ ) é pequena para um momento transferido de  $x = 0,66 \text{ \AA}^{-1}$  e ângulo de espalhamento de  $86,45^\circ$  utilizados durante o experimento, implicando na sobreposição desses picos. O ajuste de curva total, soma do modelo Gaussiano para o espectro Rayleigh e Compton, mostra-se em boa concordância com os espectros de espalhamento experimentais.

#### 4.2.2 Razão Rayleigh e Compton (R/C) e número atômico efetivo ( $Z_{ef}$ ) para os diferentes grupos de tecidos mamários

A figura 33, apresenta, os valores de razão Rayleigh e Compton ( $R/C$ ) obtidos nos pontos medidos nos tecidos mamários normais (amostras I, II e III), benignos (amostras IV, V, VI) e malignos (amostras VII, VIII, IX). Como foi utilizado um feixe micro-métrico a proporção dos pontos  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$  e  $P_4$  representa-

dos nas lâminas histológicas não correspondem ao tamanho real do feixe. Para auxiliar na análise os valores de  $R/C$  foram indicados nesses pontos através de uma escala de cores.

**Figura 33: Razão Rayleigh e Compton ( $R/C$ ) dos tecidos mamários caninos normais, benignos e malignos usando a técnica de espalhamento.**



Fonte: Autoria própria.

Esses valores de razão  $R/C$  obtidos nos tecidos mamários caninos podem ser convertidos em número atômico efetivo ( $Z_{ef}$ ) a partir da figura 18. A tabela 2, apresenta os valores dos  $Z_{ef}$  medidos nos pontos  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$  e  $P_4$  das amostras para os diferentes grupos de tecidos estudados. As incertezas experi-

mentais nas razões  $R/C$  obtidas tiveram o valor máximo de 1,4%. As incertezas experimentais associadas aos valores de  $Z_{ef}$  apresentadas na tabela 2 foram estimadas por programação de erros da função polinomial de calibração, considerando as incertezas estatísticas nas áreas dos picos Rayleigh e Compton.

**Tabela 2: Número atômico efetivo ( $Z_{ef}$ ) com suas respectivas incertezas dos pontos medidos nos tecidos mamários normais, benignos e malignos.**

Tecidos	Amostras	$P_1 (Z_{ef})$	$P_2 (Z_{ef})$	$P_3 (Z_{ef})$	$P_4 (Z_{ef})$
Normais	I	$4,3231 \pm 0,046$	$4,598 \pm 0,061$	$4,681 \pm 0,064$	$4,503 \pm 0,054$
	II	$4,231 \pm 0,037$	$4,104 \pm 0,033$	$4,073 \pm 0,033$	$4,210 \pm 0,033$
	III	$6,85 \pm 0,75$	$5,31 \pm 0,14$	$4,583 \pm 0,061$	$5,80 \pm 0,32$
Benignos	IV	$4,687 \pm 0,071$	$4,623 \pm 0,064$	$5,072 \pm 0,099$	$5,264 \pm 0,011$
	V	$4,647 \pm 0,057$	$4,752 \pm 0,063$	$4,654 \pm 0,057$	$4,577 \pm 0,051$
	VI	$4,655 \pm 0,056$	$4,317 \pm 0,042$	$4,801 \pm 0,068$	$4,363 \pm 0,046$
Malignos	VII	$4,986 \pm 0,094$	$6,5 \pm 1,3$	$4,592 \pm 0,066$	$4,891 \pm 0,090$
	VIII	$4,574 \pm 0,052$	$4,760 \pm 0,052$	$4,670 \pm 0,057$	$5,07 \pm 0,086$
	IX	$6,11 \pm 0,26$	$5,63 \pm 0,26$	$4,891 \pm 0,086$	$4,594 \pm 0,059$

Fonte: Autoria própria.

Da figura 33, é possível observar que por tratarem-se de medidas pontuais os valores de  $R/C$  ( $Z_{ef}$ ) apresentam variações entre as medidas em uma única amostra e também nos diferentes grupos de tecidos estudados. Nas amostras normais I e II, em geral, os valores de  $R/C$  ( $Z_{ef}$ ) foram mais baixos comparados aos demais tecidos estudados. Essas regiões compreendem de tecido fibroso, exceto  $P_3$  da amostra I que está em uma região de ductal. Particularmente, a amostra III obteve os valores mais elevados de  $R/C$  ( $Z_{ef}$ ) do grupo tecidos mamários normais, essa diferença deve-se ao fato que essa amostra possui elevada glandularidade nas regiões de tecido fibroglandular. Nas amostras mamárias benignas, em geral, foram encontrados valores de  $R/C$  ( $Z_{ef}$ ) semelhantes, exceto os pontos  $P_2$  e  $P_4$  da amostra VI. Particularmente, as regiões medidas das amostras V e VI compreendem de lóbulos mamários circundados por neoplasias, enquanto, na amostra IV os pontos  $P_1$  e  $P_2$  estão em regiões fibrosas,  $P_3$  e  $P_4$  próximos a um linfonodo. Nas amostras mamárias malignas, em geral, valores de

$R/C (Z_{ef})$  foram superiores aos demais tecidos estudados. Particularmente, os pontos  $P_4$  da amostra VIII,  $P_1$  e  $P_2$  da amostra IX, estão em regiões de carcinoma desses tecidos, enquanto, o ponto  $P_2$  da amostra VII compreende de uma região vascular.

Os resultados obtidos de  $Z_{ef}$  podem ser explicados porque as regiões que constituem um tecido mamário possuem diferenças em sua composição na fração entre oxigênio e carbono. Por exemplo, os tecidos adiposos são compostos por adipócitos, células especializadas em lipídios de armazenamento, os quais são ricos em carbono (WOODARD; WHITE, 1986). Os tecidos fibroglandulares e neoplásicos são de origem conjuntiva ou epitelial, ricos em fibras de colágeno e água, possuindo uma maior composição de oxigênio (POLETTI; GONÇALVES; MAZZARO, 2002a; POLETTI; GONÇALVES; MAZZARO, 2002b; ANTONIASSI; CONCEIÇÃO; POLETTI, 2011). Como a razão dos espectros Rayleigh e Compton é sensível as variações do  $Z_{ef}$ , regiões neoplásicas ou com glandularidade elevada apresentará uma maior quantidade de oxigênio que carbono (ANTONIASSI; CONCEIÇÃO; POLETTI, 2011; ANTONIASSI et al., 2019).

#### 4.3 COMBINAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE MICRO-FLUORESCÊNCIA E ESPALHAMENTO DE RAIOS X

Um importante aspecto das técnicas exploradas neste trabalho é a complementariedade das informações que podem ser obtidas através delas.

A técnica de  $\mu$ -XRF é sensível às variações de concentrações de elementos-traço tanto em tecidos normais como neoplásicos, cuja presença está associada à atividade metabólica dos tecidos. Assim, os resultados obtidos com a técnica de  $\mu$ -XRF são importantes, pois alterações dos níveis normais de elementos químicos nos tecidos mamários podem estar associados, por exemplo, aos processos carcinogênicos.

A técnica de fluorescência, no entanto, não é sensível aos elementos de baixo número atômico como o carbono ( $K_{\alpha 1} = 0,277 \text{ keV}$ ) e oxigênio ( $K_{\alpha 1} = 0,525 \text{ keV}$ ), principais constituintes dos tecidos mamários, trazendo, assim, pouca informação sobre a morfologia e composição da matriz tecidual (ANTONIASI et al., 2019).

Esta limitação da técnica de fluorescência pode ser complementada, portanto, pela técnica de espalhamento de raios X, usando à razão Rayleigh e Compton ( $R/C$ ), sensível às variações de número atômico efetivo  $Z_{ef}$  dos tecidos (que majoritariamente são compostos por carbono e oxigênio).

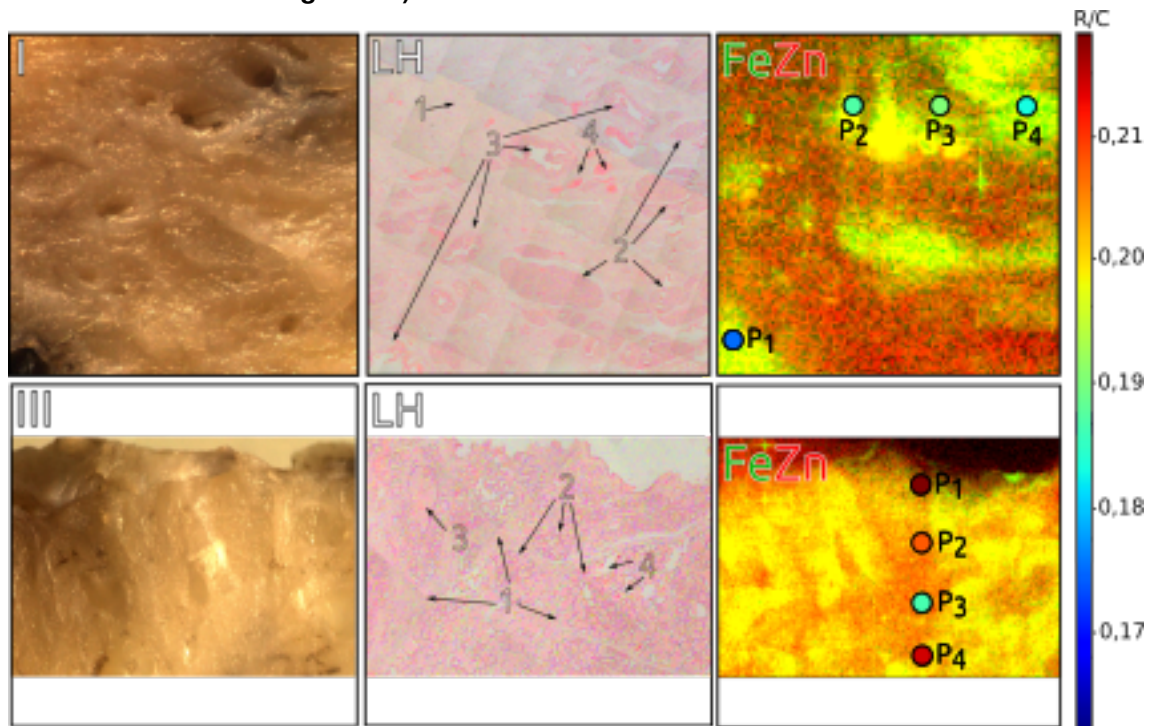
As informações obtidas por ela são úteis, por exemplo, na caracterização de tecidos normais, uma vez que permitem avaliar a glandularidade destes tecidos (ANTONIASI; CONCEIÇÃO; POLETTI, 2011; RYAN; FARQUHARSON, 2010; ANTONIASI et al., 2019). Também são úteis pois permitem identificar alterações na matriz de tecidos associadas à presença de uma neoplasia (ANTONIASI; CONCEIÇÃO; POLETTI, 2011; CONKLIN; KEELY, 2012; LUPARELLO, 2013).

A figura 34, apresenta, como exemplo, os mapas de distribuições espaciais dos elementos-traços com os pontos de razão  $R/C$  obtidos nas amostras normais I e III, com suas respectivas lâminas histológicas. Enquanto, o mapa de  $\mu$ -XRF permite identificar, mais evidentemente, nas amostras I e III, as regiões de glândulas mamárias e vasos sanguíneos, a comparação entre os pontos  $R/C$  ( $Z_{ef}$ ) entre as amostras I e III permite quantificar a maior glandularidade dessa última amostra.

A figura 35, apresenta um exemplo de mapa de distribuição espacial dos elementos traços com os pontos de razão  $R/C$  obtidos na amostra IX (tecido neoplásico maligno). Uma elevada concentração de elemento-traço, como o Fe e Cu, devido a uma maior atividade metabólica combinada com uma maior razão  $R/C$  ( $Z_{ef}$ ) decorrente de uma proliferação de tecido neoplásico, vasos sanguí-

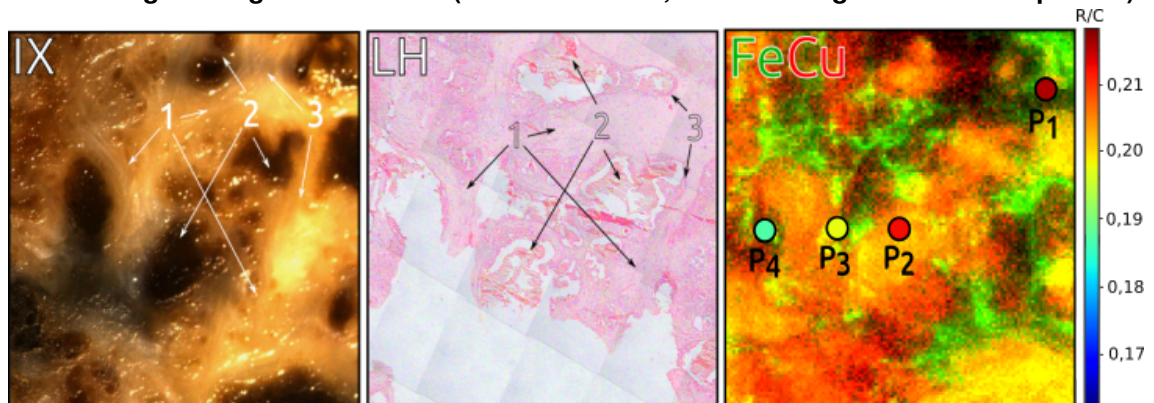


**Figura 34:** Combinação dos mapas de distribuições espaciais dos elementos-traço e razão  $R/C$  obtidos das amostras normais I e III, com suas respectivas lâminas histológicas e regiões indicadas (1. tecido fibroso, 2. lóbulos mamários, 3. ductos e 4. vasos sanguíneos).



Fonte: Autoria própria.

**Figura 35:** Combinação do mapa de distribuição espacial dos elementos-traço e razão  $R/C$  obtidos da amostra neoplásica maligna IX, com sua respectiva lâmina histológica e regiões indicadas (1. tecido fibroso, 2. vasos sanguíneos e 3. neoplasias).



Fonte: Autoria própria.

---

neos e aumento da quantidade tecido conjuntivo fibroso (reação desmoplásica) podem caracterizar a presença da neoplasia nas regiões medidas nesse tecido.

## 5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho, foi possível estudar a distribuição espacial de elementos-traço e do número atômico efetivo de tecidos mamários caninos normais e neoplásicos, por meio das técnicas de micro-fluorescência e espalhamento Rayleigh e Compton de raios X. De maneira mais específica, algumas conclusões puderam ser extraídas, conforme apresentado a seguir.

### **Sobre a técnica de $\mu$ -XRF**

Os experimentos de  $\mu$ -XRF forneceram distribuições espaciais dos elementos químicos S, Ca, Fe, Zn, Cu e Br, em amostras de tecidos mamários caninos normais, benignos e malignos. Essas amostras foram comparadas com suas respectivas lâminas histológicas. O método de análise utilizado foi qualitativo descritivo, indicando a contribuição dos elementos químicos nas diferentes estruturas dos tecidos. Foi possível observar nas amostras normais que os elementos encontrados apresentam um padrão de distribuição por toda a amostra, onde os elementos Fe e Zn destacaram-se em regiões vasculares desses tecidos. Nos tecidos benignos e malignos, observou-se um aumento da intensidade dos elementos Fe e Ca em regiões neoplásicas, enquanto os demais elementos químicos tiveram distribuições mais uniforme nessas amostras. Particularmente, na amostra IX (adenocarcinoma cístico de grau II) os elementos químicos ficaram distribuídos em regiões vasculares, exceto pelo Fe e Cu que ocuparam também as regiões neoplásicas. Em relação as correlações das distribuições espaciais dos elementos químicos, observou-se que Cu-Zn e S-Ca possuem correlações fortes e moderadas em todos os grupos de tecidos mamários estudados.

Em geral, como existem poucos trabalhos com tecidos mamários caninos, os resultados obtidos mostraram-se de acordo com os reportados

pela literatura para tecidos mamários humanos, logo, os resultados obtidos contribuem para estudos sobre câncer de mama em ambas as espécies.

### **Sobre a técnica de espalhamento de raios X**

A técnica de espalhamento de raios X permitiu obter informações sobre o número atômico efetivo ( $Z_{ef}$ ) dos tecidos mamários caninos, através da razão entre as intensidades dos espectros Rayleigh e Compton ( $R/C$ ) em pontos selecionados dessas amostras.

As razões  $R/C$  e  $Z_{ef}$  mais baixos foram observados em tecidos normais em regiões menos fibroglandulares, enquanto, os valores mais elevados apareceram em maior parte nas amostras benignas e malignas, em tecidos normais em regiões mais fibroglandulares, estando este comportamento de acordo com trabalhos reportados na literatura com tecidos humanos.

### **Sobre a combinação das informações das técnicas de micro fluorescência e espalhamento de raios X**

As informações combinadas das técnicas de micro-fluorescência e espalhamento mostraram-se adequadas para uma caracterização de forma complementar dos tecidos.

Enquanto a técnica de  $\mu$ -XRF é sensível às variações de concentrações de elementos-traço em geral associadas à atividade metabólica dos tecidos, a técnica de espalhamento se mostrou sensível à variações na matriz tecidual relacionadas a sua composição química.

Por fim, como existem poucos trabalhos sobre tecidos mamários caninos, os resultados deste estudo se apresentam como uma fonte de informação e comparação a literatura para futuros trabalhos, em especial, para aqueles na área de medicina translacional.

## 5.1 PERSPECTIVAS

Com base nos resultados deste trabalho, podem ser definidas as seguintes perspectivas:

- Estender a quantidade de amostras permitindo a quantificação e a análise estatística dos resultados.
- Realizar o mapeamento da distribuição espacial (2D) completo das amostras por meio da técnica de espalhamento de raios X.
- Buscar novos métodos de preparação de amostras que permitam a medição combinada de micro-fluorescência e espalhamento de raios X usando amostras mais finas e com maior resolução espacial.
- Estudar a combinação das técnicas de fluorescência e espalhamento de raios X para outros tecidos e diferentes materiais de interesse médico e industrial.

## REFERÊNCIAS

ABDELMEGEED, Somaia M.; MOHAMMED, Sulma. Canine mammary tumors as a model for human disease (Review). **Oncology Letters**, v. 15, n. 6, p. 8195–8205, 2018. ISSN 17921082.

AL-EBRAHEEM, A. et al. Emerging patterns in the distribution of trace elements in ovarian, invasive and in-situ breast cancer. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 499, n. 1, 2014. ISSN 17426596.

ANTONIASSI, Marcelo. O espalhamento Compton de raios X no diagnóstico de neoplasias mamárias. **Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto. SP. Brasil.**, Doutorado, p. 103, 2012.

ANTONIASSI, M.; CONCEIÇÃO, A. L.C.; POLETTI, M. E. Study of effective atomic number of breast tissues determined using the elastic to inelastic scattering ratio. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment**, v. 652, n. 1, p. 739–743, 2011. ISSN 01689002.

\_\_\_\_\_. Compton scattering spectrum as a source of information of normal and neoplastic breast tissues' composition. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 70, n. 7, p. 1451–1455, 2012. ISSN 09698043.

ANTONIASSI, M. et al. Characterization of breast tissues combining x-ray fluorescence and scattering spectroscopy: A Monte Carlo computational study. **Radiation Physics and Chemistry**, Elsevier Ltd, v. 155, n. August 2017, p. 69–74, 2019. ISSN 18790895. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2018.06.011>>.

ASPINAL, V.; CAPPELLO, M. **Introduction to Veterinary Anatomy and Physi-**

**ology Textbook**. Third. [S.I.]: Elsevier, 2015. 275 p. ISBN 9780702057359.

ATTIX, F. H. **Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry**. [S.I.]: Madison: John Wiley & Sons, 1986.

BANKS, W. J. **Applied veterinary histology**. Third. [S.I.]: Philadelphia: Mosby-Year Book, Inc, 1993.

BIGGS, F.; MENDELSON, L.B.; MANN, J. B. Hartree-Fock Compton Profiles For the Elements. **Atomic Data and Nuclear Data Tables**, v. 16, p. 201–309, 1975.

CESAREO, R. et al. Interaction of keV photons with matter and new applications. **Physics Reports**, v. 213, n. 3, p. 117–178, 1992. ISSN 03701573.

COLLIN, Anne et al. Role of sulfur amino acids in controlling nutrient metabolism and cell functions : implications for nutrition. p. 1132–1139, 2009.

CONKLIN, Matthew W.; KEELY, Patricia J. Why the stroma matters in breast cancer. **Cell Adhesion & Migration**, Taylor Francis, v. 6, n. 3, p. 249–260, 2012.

COOPER, M J. Compton scattering and electron momentum determination. **Reports on Progress in Physics**, IOP Publishing, v. 48, n. 4, p. 415–481, apr 1985.

DEL LAMA, L.S. et al. Effective atomic numbers for materials of medical interest at low photon energy using the rayleigh to compton scattering ratio. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment**, v. 784, p. 597 – 601, 2015. ISSN 0168-9002. Symposium on Radiation Measurements and Applications 2014 (SORMA XV). Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168900214014880>>.

DUVAUCHELLE, P.; PEIX, G.; BABOT, D. Effective atomic number in the rayleigh to compton scattering ratio. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 155, n. 3, p. 221 – 228, 1999. ISSN 0168-583X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168583X99004504>>.

\_\_\_\_\_. Effective atomic number in the Rayleigh to Compton scattering ratio. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 155, n. 3, p. 221–228, 1999. ISSN 0168583X.

EVANS, H. E.; LAHUNTA, A. **Miller's Anatomy of the Dog**. Fourth. [S.l.]: Elsevier, 2015. 850 p. ISBN 9781437708127.

FAGUNDES, A.C.F. et al. Structural characterization of canine mammary tissue by x-ray diffraction. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 155, p. 22 – 25, 2019. ISSN 0969-806X. IRRMA-10.

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. ISSN 0969-8043. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969804306003137>>.

FARQUHARSON, M. J. et al. The distribution of trace elements Ca, Fe, Cu and Zn and the determination of copper oxidation state in breast tumour tissue using  $\mu$ SRXRF and  $\mu$ XANES. **Physics in Medicine and Biology**, v. 53, n. 11, p. 3023–3037, 2008. ISSN 00319155.

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**, IOP Publishing, v. 47, n. 13, p. 2327–2339, jun 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1088%2F0031-9155%2F47%2F13%2F310>>.



GORDON, I. K.; KHANNA, C. Modeling Opportunities in Comparative Oncology for Drug Development. **ILAR Journal**, v. 51, n. 3, p. 214–220, 07 2010. ISSN 1084-2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/ilar.51.3.214>>.

GRAHAM, Joanne C.; MYERS, Ronald K. The prognostic significance of angiogenesis in canine mammary tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, n. 5, p. 416–418, 1999. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1939-1676.1999.tb01456.x>>.

GRIEKEN, R. E.; MARKOWICZ, A. A. **Handbook of X-Ray Spectrometry, Second Edition**,. New York: Marcel Dekker, 2001. ISBN 0824706005.

HAKA, Abigail S. et al. Identifying microcalcifications in benign and malignant breast lesions by probing differences in their chemical composition using raman spectroscopy. **Cancer Research**, v. 62, n. 18, p. 5375–5380, 2002. ISSN 00085472.

HANSON, A.L. The calculation of scattering cross sections for polarized x-rays. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment**, v. 243, n. 2, p. 583 – 598, 1986. ISSN 0168-9002.

HANSON, A. L. The calculation of coherent and incoherent scattering cross sections for polarized X-rays into an arbitrarily placed circular aperture. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research**, v. 264, p. 471–483, 1988.

HUBBELL, J. H. et al. Atomic form factors, incoherent scattering functions, and photon scattering cross sections. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v. 4, n. 3, p. 471–538, 1975. ISSN 15297845.

JENNINGS, R.; PREMANANDAN, C. **Veterinary Histology**. [S.l.]: Ohio State University, 2018.

JOHNSTON, Eric M.; DAO, Erica; FARQUHARSON, Michael J. Advances in the histopathological characterization of breast tissue using combined X-ray fluorescence and X-ray diffraction data in a multivariate analysis approach. **X-Ray Spectrometry**, n. August 2018, p. 432–437, 2019. ISSN 10974539.

JONES, R.; LOPEZ, K. H. **Human Reproductive Biology**. [S.l.]: San Diego: Academic Press, 2013. 400 p.

KNOLL, F. G. **Radiation Detection and Measurement, Third Edition**. New York: Jhon Wiley and Sons, Inc, 2005.

LOWNDES, Sarah A.; HARRIS, Adrian L. The role of copper in tumour angiogenesis. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 10, n. 4, p. 299–310, 2005. ISSN 10833021.

LUPARELLO, C. Mutagenesis Aspects of Collagen Changes in Breast Cancer. 2013.

MAGALHÃES, T et al. Spectrochimica Acta Part B Study of Br , Zn , Cu and Fe concentrations in healthy and cancer breast tissues by TXRF . **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Elsevier B.V., v. 63, n. 12, p. 1473–1479, 2008. ISSN 0584-8547. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2008.10.014>>.

MALEZAN, A. **Estudo da distribuição de elementos-traço em neoplasias marmárias através de micro-fluorescência de raios X induzida por radiação síncrotron**. 2018. 98 p. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2018.

MARQUES, Oriana et al. Iron homeostasis in breast cancer. **Cancer Letters**, Elsevier Ireland Ltd, v. 347, n. 1, p. 1–14, 2014. ISSN 0304-3835. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2014.01.029>>.

MISDORP, W. **Tumors of the mammary gland**. [S.l.]: Wiley Online Library, 2002. 575–606 p.

MOBILIO, S.; BOSCHERINI, F.; MENEGHINI, C. **Introduction to Synchrotron Radiation**. Italy: Springer, 2015. ISSN 0042-1294. ISBN 978-3-642-55314-1.

MORGAN, M. P.; COOKE, M. M.; MCCARTHY, G. M. Microcalcifications Associated with Breast Cancer : An Epiphenomenon or Biologically Significant Feature of Selected Tumors ? v. 10, n. 2, 2005.

MORRIS, J.; DOBSON, J. **Small animal oncology**. [S.l.]: Oxford: John Wiley Sons, 2008.

PAOLONI, M.; KHANNA, C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 2, p. 147, 2008.

PÉREZ, Carlos A. et al. Synchrotron radiation x-ray fluorescence at the LNLS: Beamline instrumentation and experiments. **X-Ray Spectrometry**, v. 28, n. 5, p. 320–326, 1999. ISSN 00498246.

PINHO, Salomé S. et al. Canine tumors: A spontaneous animal model of human carcinogenesis. **Translational Research**, v. 159, n. 3, p. 165–172, 2012. ISSN 18781810.

POLETTI, M. E.; GONÇALVES, O. D.; MAZZARO, I. X-ray scattering from human breast tissues and breast-equivalent materials. **Physics in Medicine and Biology**, v. 47, n. 1, p. 47–63, 2002. ISSN 00319155.

\_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. **Physics in Medicine and Biology**, v. 47, n. 1, p. 47–63, 2002. ISSN 00319155.

RAJU, G.J. Naga et al. Trace elemental correlation study in malignant and normal breast tissue by pixe technique. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 247, n. 2, p. 361 – 367, 2006. ISSN 0168-583X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168583X06001972>>.

RIBBERFORS, R.; BERGGREN, K.-F. Incoherent X-ray scattering functions and cross sections  $(d\sigma/d\Omega')_{incoh}$  by means of a pocket calculator. **Physical Review**, v. 26, n. 6, 1982.

RYAN, Elaine A.; FARQUHARSON, Michael J. The differentiation between malignant and non-malignant breast tissues using elastic and inelastic scattering of synchrotron radiation. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment**, v. 619, n. 1, p. 379 – 384, 2010. ISSN 0168-9002. Frontiers in radiation physics and applications: Proceedings of the 11th International Symposium on Radiation Physics. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168900209023377>>.

SALVEGO, C. A. **Correlação entre as variações na concentração de elementos-traços e densidade eletrônica em tumores mamários caninos**. 2019. 90 p. Dissertação (Mestrado) — Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

SHPLYEVA, Svitlana I et al. Role of ferritin alterations in human breast cancer cells. p. 63–71, 2011.

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, n. 4, p. 303–311, 2013. ISSN 00498246.

\_\_\_\_\_. Determination of Ca, Fe, Cu and Zn and their correlations in breast cancer and normal adjacent tissues. **X-Ray Spectrometry**, v. 38, n. 2, p. 103–111, 2009. ISSN 00498246.

SLATTER, D. H. **Textbook of small animal surgery**. [S.l.]: Philadelphia: Elsevier Health Sciences, 2003.

SOLÉ, V.A. et al. A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive x-ray fluorescence spectra. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 62, n. 1, p. 63 – 68, 2007. ISSN 0584-8547.

SORENMO, K. et al. **Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms**. [S.l.]: Veterinary pathology, 2011. v. 48. 85–97 p.

STRANDBERG, J.; GOODMAN, D. Animal model of human disease: canine mammary neoplasia. **The American journal of pathology**, v. 75, n. 1, p. 225, 1974.

TORRE, Lindsey A. et al. Global cancer incidence and mortality rates and trends - An update. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 25, n. 1, p. 16–27, 2016. ISSN 10559965.

VISAN, Simona et al. In vitro comparative models for canine and human breast cancers. **Clujul Medical**, v. 89, n. 1, p. 38–49, 2016. ISSN 20668872.

WANG, Ying et al. Correlations of trace element levels in the diet, blood, urine, and feces in the Chinese Male. **Biological Trace Element Research**, v. 145, n. 2, p. 127–135, 2012. ISSN 15590720.

WOODARD, H. Q.; WHITE, D. R. The composition of body tissues. **The British Journal of Radiology**, n. December, p. 1209–1219, 1986.

WRÓBEL, Paweł M. et al. Combined micro-XRF and TXRF methodology for quantitative elemental imaging of tissue samples. **Talanta**, v. 162, n. October 2016, p. 654–659, 2017.