

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

ALANA CAROLINE FRANÇA FAGUNDES

**A COMBINAÇÃO ENTRE FTIR E XRD COMO UMA FERRAMENTA
PARA ESTUDO DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS**

TESE

CURITIBA

2019

ALANA CAROLINE FRANÇA FAGUNDES

**A COMBINAÇÃO ENTRE FTIR E XRD COMO UMA FERRAMENTA
PARA ESTUDO DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de “Doutora em Ciências” – Área de concentração: Engenharia Biomédica, do Programa de Pós Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Coelho
Conceição

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Antoniassi

CURITIBA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Fagundes, Alana Caroline França

A combinação entre FTIR e XRD como uma ferramenta para estudo de neoplasias mamárias caninas [recurso eletrônico] / Alana Caroline França Fagundes.-- 2019.

1 arquivo texto (80 f.) : PDF ; 1,30 MB

Modo de acesso: World Wide Web

Título extraído da tela de título (visualizado em 27 jun. 2019)

Texto em português com resumo em inglês

Tese (Doutorado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, Curitiba, 2019

Bibliografia: f. 64-67

1. Engenharia elétrica - Teses. 2. Tumores - Exames médicos. 3. Cães - Doenças - Diagnóstico. 4. Cães - Câncer - Diagnóstico. 5. Mamas - Câncer - Diagnóstico. 6. Raios X - Uso em diagnóstico. 7. Espectroscopia de infravermelho. 8. Fourier, Análise de. I. Conceição, André Luiz Coelho. II. Antoniassi, Marcelo. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial. IV. Título.

CDD: Ed. 23 – 621.3

Biblioteca Central da UTFPR, Câmpus Curitiba

Bibliotecário: Adriano Lopes CRB-9/1429

TERMO DE APROVAÇÃO DE TESE Nº 189

A Tese de Doutorado intitulada “**Combinação Entre FTIR e XRD Como Uma Ferramenta Para Estudo de Neoplasias Mamárias Caninas**”, defendida em sessão pública pelo(a) candidato(a) **Alana Caroline França Fagundes**, no dia 28 de março de 2019, foi julgada para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração Engenharia Biomédica, e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial.

BANCA EXAMINADORA:

Prof.(a) Dr.(a) André Luiz Coelho Conceição - Presidente – (UTFPR)

Prof.(a) Dr.(a) Hugo Reuters Schelin – (UTFPR)

Prof.(a) Dr.(a) Thais Andrade Costa Casagrande – (UP)

Prof.(a) Dr.(a) Sergio de Souza Funari – (DESY)

Prof.(a) Dr.(a) 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, 28 de março de 2019.

Dedico este trabalho à minha família,
aos que estão, aos que foram e aos que virão.

AGRADECIMENTOS

Provavelmente todas as pessoas que merecem esses agradecimentos não serão citadas aqui, portanto peço desculpas por isso. Mas tenham a certeza de que serão lembradas com carinho. Minha eterna gratidão a elas.

Agradeço imensamente ao meu orientador Prof. Dr. André Luiz Coelho Conceição, pela excelente orientação, paciência, por ter me aceitado como orientanda e pela parceria nos momentos difíceis. Com certeza a caminhada foi mais florida dessa forma.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Marcelo Antoniassi, por me auxiliar sempre com muita competência.

Ao Prof. Dr. Alexander Biondo por se interessar pelo trabalho e promover a conversa entre o Hospital Veterinário da UFPR para que a pesquisa fosse possível.

Ao Prof. Me. Renato Silva de Sousa por disponibilizar as amostras biológicas utilizadas nesse trabalho, nos auxiliar na identificação das lesões, por estar presente nesses momentos. Agradeço igualmente a todos do Laboratório de Patologia Veterinária da UFPR.

Ao Prof. Dr. Irineu Mazzaro e ao LORXI da UFPR por ceder o uso dos equipamentos e instalações nos dias de semana, finais de semana, feriados e madrugadas.

À Rubia Bottini e ao LAMAQ da UTFPR por disponibilizar o equipamento de FTIR e me auxiliar com muita presteza.

Quero agradecer a todos do GIERX – Grupo de Imagens e Espectroscopia de Raios X, a todos os professores e alunos, por tudo o que vencemos juntos, pelas publicações e crescimento do grupo nos últimos anos, fonte de inspiração e orgulho poder participar desse grupo.

À Prof. Dra. Anna Silvia por me encorajar a fazer uma disciplina na UFPR abrindo os horizontes para essa pesquisa.

Aqui um agradecimento especial às futuras mestras Camila de Almeida Salvego e Natália Mariano Prado de Oliveira pela parceria acadêmica e de vida nesses últimos dois anos, pela amizade, alegria, por me ajudar com palavras de encorajamento sempre.

Meus sinceros agradecimentos a todos os professores que passaram pela minha trajetória até o momento.

Quero agradecer à minha família por estar sempre presente e pela base sólida que me sustenta até aqui. Agradecer pelo entendimento das minhas ausências nesses anos. Ao meu marido e futuro mestre Rodrigo, por todo apoio de sempre! Aos meus pais, Edmilson e Rossana e ao meu irmão Eros. Agradeço aos meus cães, Bradock e Florence pelo amor incondicional sem nada em troca.

Agradeço aos amigos que direta ou indiretamente contribuíram para esse trabalho, aos meus alunos e professores da Universidade Tuiuti do Paraná pelo apoio. Também ao grupo de Bolsistas do Facebook pelo incentivo, ajudas e compartilhamento da ciência.

À Monica Nogari Damaceno por me auxiliar na administração dos conflitos internos nesses últimos anos.

À Nadia Regina Della Barba por me mostrar o lado bom de sair do sedentarismo, me trazendo mais vida e aliviando o estresse nos momentos finais da escrita da tese, principalmente.

Agradeço às políticas públicas que me possibilitaram estudo gratuito e de qualidade, fomentando a pesquisa no nosso país.

À UTFPR e ao CPGEI pelas instalações e equipamentos cedidos em todos esses anos e pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

À CAPES pelo apoio financeiro por meio da concessão de bolsa.

RESUMO

FAGUNDES, A.C.F. **A combinação entre FTIR e XRD como uma ferramenta para estudo de neoplasias mamárias caninas**. 2019. 80 f. Tese (Doutorado em Ciências - Área de concentração: Engenharia Biomédica) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2019.

Os cães são os animais de companhia mais abundantes em todo o mundo. O câncer de mama é a doença mais recorrente que acomete esses animais, e tem origem multifatorial, em especial hormonal. Estudos indicam que neoplasias em tecidos são acompanhadas por alterações estruturais e moleculares nestes as quais que podem ser identificadas por técnicas analíticas. A difração de raios X (XRD) identifica os componentes estruturais moleculares de uma amostra. Além disso, espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) identifica a vibração de moléculas em uma amostra através da absorção de infravermelho. Estas duas técnicas se complementam, permitindo a identificação de componentes moleculares e supramoleculares em uma dada amostra. XRD e FTIR foram utilizadas para investigar as alterações na estrutura tecidual associadas ao câncer de mama em tecidos mamários caninos. Foram avaliadas 83 amostras, sendo 58 neoplásicas (malignas e benignas) e 25 normais ou não neoplásicas, de acordo com a classificação histológica por um patologista veterinário. Os perfis de espalhamento de raios-X foram determinados usando o difratômetro comercial Shimadzu XRD-7000 com um ânodo de cobre e momento transferido de $4,27 < q \text{ (nm}^{-1}) < 50,18$. Com a técnica de FTIR foram adquiridos os espectros usando um espectrômetro Varian 640-IR com um acessório ATR Pike Miracle e um cristal ZnSe. Foram identificadas com a FTIR bandas de absorção correspondentes a lipídeos e ácidos graxos (tecido adiposo) entre 1750 e 3050 cm^{-1} , fibras colágenas (1180 - 1300 cm^{-1}) e amidas I e II (1500 - 1650 cm^{-1}), que compõem o tecido fibroglandular. Esses resultados corroboram os achados da XRD, na qual os picos encontrados ($13,9 \text{ nm}^{-1}$ e $20,1 \text{ nm}^{-1}$) correspondem aos ácidos graxos e à água presentes nos tecidos adiposo e fibroglandular, respectivamente. Portanto, a complementaridade entre XRD e FTIR é fundamental para identificar e caracterizar as alterações morfológicas nas estruturas dos tecidos mamários caninos relacionados ao crescimento tumoral em diferentes escalas de comprimento.

Palavras-chave: Neoplasia mamária canina. Difração de raios X. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

ABSTRACT

FAGUNDES, A.C.F. **The combination of FTIR and XRD as a tool for the study of canine mammary neoplasms**. 2019. 80 f. Thesis (Doctoral in Science – Biomedical engineering) - Federal Technology University - Paraná. Curitiba, 2019.

Dogs are the most abundant companion animals worldwide. Breast cancer is the most recurrent disease that affects these animals, and has a multifactorial origin, especially hormonal. Studies indicate that neoplastic tissues undergo structural and molecular changes that can be identified by analytical techniques. X-ray diffraction (XRD) identifies the molecular structural components of a sample. In addition, Fourier-transform Infrared Spectrophotometry (FTIR) identifies the vibration of molecules in a sample through infrared absorption. These two techniques complement each other, allowing the identification of molecular and supramolecular components in a given sample. XRD and FTIR were used to investigate the changes in tissue structure in different length scale associated with breast cancer in canine mammary tissues. A total of 83 samples were evaluated, being 58 neoplastic (malignant and non-malignant) and 25 normal or non-neoplastic, according to the histological classification by a veterinarian pathologist. X-ray scattering profiles were determined using the commercial diffractometer Shimadzu XRD-7000 with a copper anode at the momentum transfer range of $4.27 < q \text{ (nm}^{-1}\text{)} < 50.18$. FTIR spectral profiles were acquired using a Varian spectrometer 640-IR with a Pike Miracle ATR (attenuated total reflection) and a ZnSe crystal. Absorption bands corresponding to lipids and fatty acids (adipose tissue) between 1750 and 3050 cm^{-1} , collagen fibers (1180 - 1300 cm^{-1}) and amides I and II (1500 - 1650 cm^{-1}), which compose the fibroglandular tissue, were determined from the FTIR data. These results corroborate the findings in XRD, in which the peaks found (13.9 nm^{-1} and 20.1 nm^{-1}) correspond to the fatty acids and water present in adipose and fibroglandular tissues, respectively. Therefore, the complementarity between XRD and FTIR is crucial to identify and characterize the morphological changes in canine mammary tissues structures related to the tumor growth in different length scale.

Keywords: Canine breast câncer. X-Ray diffraction. Fourier-transform infrared spectroscopy

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema das glândulas mamárias caninas. 1, par de mamas craniais torácicas; 2, par de mamas caudais torácicas; 3, par de mamas craniais abdominais; 4, par de mamas caudais abdominais; 5, par de mamas inguinais.	21
Figura 2 - Sistema de ductos da glândula mamária da cadela. Em 1 o broto mamário.	22
Figura 3 - Glândula inativa em a) e glândula ativa em b). As estruturas em 1, 2, 3 e 4 se referem ao alvéolo inativo, ducto lobular, ducto lobar e alvéolo ativo respectivamente.	23
Figura 4 - Divisão de uma glândula mamária em suas estruturas funcionais.....	26
Figura 5 - Exemplo de uma sequencia de aminoácidos e de ligação peptídica, formando uma proteína de conformação primária e linear.	28
Figura 6 - Estrutura secundária de uma proteína, conformação hélice alfa. As ligações que possibilitam os giros e hélices. As voltas acontecem, em sua maioria, a cada 3,6 resíduos de aminoácidos.	29
Figura 7 - Estrutura secundária de uma proteína, conformação folha beta. Em a) a visão superior da conformação folha beta, setas indicando o sentido paralelo e antiparalelo das fitas. Em b) a visão lateral da conformação mostrando os altos e baixos do plano.	30
Figura 8 - Modelo do porta amostras e o porta amostras impresso em Ácido Polilático pela impressora 3D. As dimensões do porta amostra estão de acordo com o difratômetro e levam em consideração a localização do feixe de raios X.	39
Figura 9 - Esquema exemplificando o funcionamento do difratômetro.....	40

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fotografia 1 - Difratorômetro com o porta amostras encaixado.....	38
Fotografia 2 - Equipamento de FTIR da UTFPR. O compartimento onde é acondicionado o acessório ATR está aberto na figura, e para a realização da medida esse deve ser fechado com o objetivo de reduzir influencias externas do meio e evaporação da amostra.....	44
Fotografia 3 - Acessório ATR do equipamento de FTIR com uma amostra de neoplasia mamária canina.....	45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Fator de área de irradiação constante $K(q)$	42
Gráfico 2 - Fator de polarização.	43
Gráfico 3 - Fator de atenuação teórico.	44
Gráfico 4 - Perfil de espalhamento de raios X típico de um tumor benigno.	49
Gráfico 5 - Perfil de espalhamento típico de um tumor maligno.	50
Gráfico 6 - Perfil de espalhamento típico de tecido adiposo.	51
Gráfico 7 - Perfil de espalhamento típico de tecido com hiperplasia.	51
Gráfico 8 – Bandas de absorção típicas para os tecidos neoplásicos malignos	53
Gráfico 9 – Bandas de absorção típicas para os tecidos neoplásicos benignos	54
Gráfico 10 – Bandas de absorção	54
Gráfico 11 – Comparação entre XRD e FTIR para tecido neoplásico maligno	55
Gráfico 12 – Comparação entre XRD e FTIR para tecido neoplásico benigno	56
Gráfico 13 – Comparação entre XRD e FTIR para tecido neoplásico benigno (osteoma)	57
Gráfico 14 - Comparação entre XRD e FTIR para tecido adiposo	58
Gráfico 15 - Comparação entre XRD e FTIR para tecido hiperplásico	58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVOS.....	14
1.1.1 Objetivo geral.....	14
1.1.2 Objetivos específicos	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1 ETIOLOGIA DAS DOENÇAS CANINAS.....	16
2.2 PATOLOGIA ONCOLÓGICA DA GLÂNDULA MAMÁRIA CANINA.....	16
2.2.1 Classificação e nomenclatura das neoplasias	18
2.2.2 Identificação da origem embriológica e histológica da neoplasia	18
2.2.3 Tumores benignos e malignos	19
2.3 ANATOMIA DAS GLÂNDULAS MAMÁRIAS CANINAS	20
2.4 HISTOLOGIA DA GLÂNDULA MAMÁRIA CANINA.....	23
2.4.1 Tecido Epitelial.....	23
2.4.1.1 Tipos de tecidos epiteliais	24
2.4.2 Tecido adiposo.....	26
2.5 PROTEÍNAS E OUTRAS MOLÉCULAS	27
2.5.1 Proteínas primárias	28
2.5.2 Proteínas secundárias	28
2.6 DIFRAÇÃO DE RAIOS X.....	31
2.6.1 Produção de raios X	31
2.6.2 Interação da radiação com a matéria.....	31
2.6.3 Vetor de espalhamento	32
2.6.4 Lei de Bragg.....	33
2.6.5 Fator de forma	33
2.7 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO	34
2.7.1 Modo de vibração das moléculas.....	35
2.7.2 Espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier.....	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 AMOSTRAS DE GLÂNDULAS MAMÁRIAS CANINAS	37
3.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS X	37
3.2.1 Desenvolvimento do porta amostras.....	38
3.2.2 Arranjo experimental.....	39
3.3 CORREÇÕES DOS PERFIS DE ESPALHAMENTO	40
3.3.1 Correção por contribuições espúrias	41
3.3.2 Correção por intensidade (área de irradiação constante) $K(q)$	41
3.3.3 Correção por polarização $P(q)$	42
3.3.4 Correção por atenuação e efeitos geométricos $A(q)$	43
3.4 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	44

3.4.1 Arranjo Experimental	45
3.4.1.1 Modo de ATR (<i>Attenuated total reflection</i>)	45
3.4.2 Aquisição das medidas	46
3.4.3 Procedimento de correção dos dados	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 RESULTADOS OBTIDOS COM A TÉCNICA DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X (XRD) 48	
4.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	52
4.3 COMBINAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE XRD E FTIR.....	55
5 CONCLUSÃO.....	60
5.1 SOBRE A DIFRAÇÃO DE RAIOS X: PERFIS DE ESPALHAMENTO.....	60
5.2 SOBRE A ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER: BANDAS DE ABSORÇÃO	60
5.3 SOBRE A COMPLEMENTARIEDADE ENTRE FTIR E XRD NO ESTUDO DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS.....	61
6 PERSPECTIVAS FUTURAS	63
REFERÊNCIAS.....	64
ANEXO A - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) 68	
APÊNDICE A - Artigo publicado na Revista <i>Radiation Physics and Chemistry</i> 71	
APÊNDICE B - Artigo em revisão na Revista <i>Radiation Physics and Chemistry</i> 76	

1 INTRODUÇÃO

Os animais de estimação estão cada vez mais presentes na vida das pessoas, em especial os animais domésticos como os cães. Segundo o IBGE, em 2013, estimou-se que 28,9 milhões de casas brasileiras tinham pelo menos um cachorro, o que corresponde a aproximadamente 44,3% domicílios (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2015).

A população canina brasileira estimada é de 52,2 milhões sendo que no mundo corresponde a 360,8 milhões de cães. A consideração por esses animais domésticos propiciou maior cuidado em todos os sentidos, principalmente na área da saúde.

Calcula-se que em 2015, o gasto mundial com os animais de estimação (“pets”) foi de 102,2 bilhões de dólares, sendo 42% correspondentes dos Estados Unidos e 5,3% ao Brasil (cerca de 18,0 milhões de reais). Logo, com alimentação mais adequada e cuidados de saúde e higiene, a expectativa de vida desses animais aumentou significativamente nos últimos 10 anos.

Segundo Oliveira et al. (2003), com o aumento da idade dos cães há o aparecimento de doenças, em particular as neoplasias. Das neoplasias caninas, cerca de 50% são neoplasias mamárias em fêmeas. Esse tipo de doença atinge cerca de 1% dos machos, sendo predominante em fêmeas (OLIVEIRA et al., 2003).

Os tumores mamários têm origem multifatorial, porém a hormônio-dependência é a mais impactante. A importância da detecção precoce e principalmente a prevenção dessa patologia auxilia num bom prognóstico da doença e conseqüentemente a qualidade de vida desse animal (RIBAS et al., 2015).

O crescente interesse pelas neoplasias mamárias caninas objetiva melhorar o prognóstico, tratamento e análises patogenéticas são importantes para auxiliar na oncologia comparada.

Nesse sentido, técnicas que caracterizam os tecidos podem auxiliar no diagnóstico de diferentes doenças, em especial a neoplasia mamária canina.

Sabe-se que os tumores quando em crescimento podem ter um caráter invasivo de estruturas vizinhas ou não, sendo essa uma das principais diferenças entre tumores malignos e benignos. As alterações moleculares e bioquímicas desses tecidos também podem trazer informações importantes para futuras pesquisas relacionadas ao diagnóstico e tratamento dessa doença (DALECK et al., 1998).

Nesse sentido, a obtenção de informações sobre a configuração estrutural, bem como as moléculas presentes nos tecidos mamários normais e patológicos são de grande importância.

Uma das técnicas disponíveis para identificação de diferenças estruturais é a Difração de Raios X (XRD), na qual através do perfil de espalhamento é possível diferenciar estruturas, como as dos tecidos mamários caninos.

A Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica que possibilita análise de moléculas presentes em uma amostra.

Logo, a combinação das duas técnicas possibilita uma análise geral em escala de comprimento complementar das moléculas presentes nos tecidos investigados, possibilitando identificar possíveis alterações nestes, decorrentes do processo carcinogênico.

Portanto, essa tese está estruturada da seguinte forma:

- (1) Fundamentação teórica referente às glândulas mamárias caninas, neoplasias, as técnicas de XRD e FTIR.
- (2) Metodologia, descrevendo brevemente os procedimentos adotados para obtenção, análise e correção dos dados obtidos com a XRD e com os de FTIR.
- (3) Na seção de resultados e discussão, são apresentados os resultados obtidos com ambas as técnicas, bem como a correlação entre eles.
- (4) Por fim, na seção de conclusões são descritas as principais conclusões deste estudo e perspectivas futuras.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo geral desse trabalho é identificar as alterações moleculares em tumores mamários caninos usando a complementariedade em escala de comprimento das técnicas de difração de raios X e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier.

1.1.2 Objetivos específicos

- Aquisição dos perfis de espalhamento dos tecidos mamários caninos através da técnica de difração de raios X;
- Correção dos perfis de espalhamento medidos;
- Aquisição das bandas de absorção dos tecidos mamários caninos através da técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier;
- Identificação das estruturas moleculares de tecidos mamários caninos saudáveis e patológicos;
- Correlação dos achados com as duas técnicas analíticas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Para o entendimento das patologias mamárias caninas, se faz necessário o entendimento da etiologia e das estruturas que envolvem o processo de carcinogênese.

2.1 ETIOLOGIA DAS DOENÇAS CANINAS

A etiologia das doenças que acometem os cães deve ser investigada, uma vez que permite que essas sejam evitadas, sempre que possível. Existem fatores predisponentes de doenças, que podem ser divididos em fatores intrínsecos e extrínsecos.

Fatores intrínsecos fazem parte do fenótipo individual do animal, podendo ou não ser hereditário. Por exemplo, espécie, raça e família (algumas raças caninas estão mais pré-dispostas a desenvolver neoplasia de mama). A idade também é um fator intrínseco, as neoplasias caninas de um modo geral têm maior prevalência em animais jovens ou idosos. Outro fator é o gênero, fêmeas são mais acometidas a neoplasias de mama do que machos. A pigmentação da pele do cão e a imunodeficiência também são fatores que o torna predisposto a alguns tipos de doenças (WERNER, 2011).

Fatores extrínsecos pertencem ao meio ambiente, por exemplo a nutrição do animal (alimentação com pouca proteína, muita gordura, deficiência de cálcio e vitamina D, entre outros casos), caquexia (desnutrição extrema), umidade e temperatura, estresse, drogas e substâncias imunossupressoras e doenças imunossupressoras. Todos esses fatores podem diminuir a imunidade do animal, deixando-o mais vulnerável à patologias diversas (WERNER, 2011).

2.2 PATOLOGIA ONCOLÓGICA DA GLÂNDULA MAMÁRIA CANINA

A maioria dos animais, em especial os cães, tem expectativa de vida curta em relação às pessoas. Dessa forma, as doenças que acometem os animais devem ser

tratadas com atenção, uma vez que os mesmos precisam apresentar sinais clínicos para que o tutor perceba que algo está diferente. Como os cães não conseguem verbalizar os sintomas, os sinais clínicos são importantes para avaliação de patologias (WERNER, 2011).

O termo neoplasia significa “novo crescimento”. Também chamado de tumor, o diagnóstico dessa doença causa desconforto e preocupação. Os neoplasmas (tumores) originam-se de uma célula que sofreu mutação, e mesmo sem o estímulo primário, conseguem sobreviver através do suprimento sanguíneo do tecido no qual estão inseridos. São estruturas que se multiplicam de maneira desordenada e vivem de maneira independente, apesar de necessitarem de um estroma vascularizado (KUMAR et al., 2010).

O diagnóstico de um tumor difere em pessoas e em animais. Especificamente o câncer de mama, na mulher (na maioria das vezes) é possível detectar massas bem pequenas através de exames como a mamografia. Já nos animais, em especial nas cadelas, geralmente o diagnóstico é feito a partir da visualização do inchaço ou apalpação das glândulas mamárias, sendo que nesse estado a neoplasia já está em estágio mais avançado (WERNER, 2011).

Apesar de serem clonais, as células neoplásicas podem sofrer mutações adicionais, o que pode explicar a mudança de crescimento ou comportamento durante um período de tempo ou mesmo a evolução de um neoplasma benigno para maligno (WERNER, 2011).

Assim, como em seres humanos, as neoplasias em cães devem ser diagnosticadas e tratadas o mais cedo possível de modo a ampliar as chances de sobrevivência desses animais. Por esse motivo, alterações em nível tecidual provenientes de adaptações celulares devem ser consideradas, como a atrofia, a hipertrofia, a hiperplasia, a metaplasia e a displasia.

Segundo Kumar et al (2010) a hiperplasia é a formação excessiva das células. Pode ser desencadeada por fatores hormonais, químicos, inflamações crônicas, entre outros, podendo ser considerada fisiológica ou patológica dependendo do estímulo. É determinada pelo aumento do número de células em um tecido, produzindo um desequilíbrio na população celular. A hiperplasia pode ser difusa (atinge o órgão inteiro) ou focal (atinge somente uma região delimitada, como as glândulas mamárias) (BRASILEIRO FILHO, 2013).

De acordo com Werner (2011) a hiperplasia não deve ser confundida com neoplasia. Nos dois casos há o aumento de células em número, mas a principal diferença é de que a hiperplasia depende fundamentalmente de um estímulo para ocorrer. Retirando o estímulo, essa adaptação regride. Já a neoplasia independe de um estímulo para sobreviver, apenas o estímulo inicial é necessário e mesmo retirando-o, a lesão permanece, por esse motivo diz-se que é irreversível. Porém, a hiperplasia pode evoluir para displasia ductal ou globular (alterações na diferenciação celular ou crescimento) e para uma neoplasia.

A metaplasia é a substituição adaptativa de células, normalmente no tecido epitelial. Devido a um estímulo nocivo, as células do tecido de origem são substituídas por células que conseguem suportar a agressão. Se o estímulo persistir, a alteração metaplásica pode evoluir para um neoplasma (KUMAR et al., 2010; BRASILEIRO FILHO, 2013).

2.2.1 Classificação e nomenclatura das neoplasias

A classificação das neoplasias é importante pois informa a origem embrionária, o tecido a que pertence e se é maligna ou benigna.

O patologista determina se a neoplasia tem origem epitelial ou mesenquimal, além de proferir outras informações que são essenciais para o tratamento e prognóstico do paciente.

2.2.2 Identificação da origem embriológica e histológica da neoplasia

As neoplasias podem ter origem epitelial ou mesenquimal. Os tumores mesenquimais tem origem embrionário mesodérmica, podendo ser benigno ou maligno. Os tumores epiteliais podem derivar das camadas de células embrionárias (endoderma, mesoderma e ectoderma).

Os neoplasmas indiferenciados são tumores que não apresentam características de origem. Já os tumores mistos, contém diversos tipos celulares derivados de uma ou mais camadas germinativas, sendo os tumores mamários caninos um exemplo. Nesse caso é comum encontrar elementos epiteliais e

mesenquimais no mesmo tumor, como tecido conjuntivo fibroso, ósseo, gordura e cartilagem (MCGAVIN; ZACHARY, 2013).

Existem algumas lesões que são semelhantes a tumores, onde há um crescimento de células epiteliais ou mesenquimais, como o caso dos hamartomas (proliferações anormais de vasos sanguíneos) e dos coristomas (compostos de tecidos maduros ectópicos) (MCGAVIN; ZACHARY, 2013).

As neoplasias mamárias caninas são compostas por tumores epiteliais e mistos, epiteliais e mioepiteliais devido a íntima relação epitélio e mesênquima. Logo, é possível encontrar neoplasias como os adenomas complexos, carcinomas e tumores mamários mistos, que apresentam combinações de estroma e epitélio (SORENMO, 2003).

2.2.3 Tumores benignos e malignos

A determinação do tipo de tumor, se maligno ou benigno, é importante pois define o tipo de conduta médica a ser seguida. E isso é realizado através da análise patológica do tecido em microscópio ótico. Vários fatores determinam a malignidade ou não de um tecido, como a diferenciação e anaplasia, taxa de crescimento, invasão local e metástases (KUMAR et al., 2010).

De acordo com Werner (2011) existem quatro categorias básicas das neoplasias: epitelial (benigna e maligna) e mesenquimal benigna e maligna. Elas se baseiam no parênquima que é composto por células em proliferação e no estroma (fornece suprimento sanguíneo e sustentação).

O estroma não faz parte do conjunto de células neoplásicas. É formado a partir de células do próprio tecido que se multiplicam para prover alimento para o tumor e sustentação por meio da irrigação sanguínea. A quantidade de estroma caracteriza o tumor como mole (pouco abundante) ou demoplásico e firme (muito abundante), esse último está presente em alguns tipos de tumores mamários (WERNER, 2011).

O estroma é formado na maioria das vezes de tecido conjuntivo extracelular constituído por proteínas e glicoproteínas como o colágeno. As células tumorais mantêm um relacionamento estreito com o estroma, trocando diversas substâncias como por exemplo hormônios.

Os tumores benignos recebem o sufixo *oma* somado ao nome da célula de origem. Para tumores benignos de origem mesenquimal, segue-se essa regra. Por exemplo: osteoma (osteócitos), condroma (condrócitos) (KUMAR et al., 2010; WERNER, 2011).

Para Werner (2011), com relação a tumores benignos de origem epitelial, a nomenclatura se dá de maneira diferente. Além da origem histológica, pode-se levar em conta o padrão histológico e macroscópico. Por exemplo: adenoma (originado no parênquima de uma glândula ou com padrão glandular), papiloma (apresenta projeções digitiformes macro ou microscópicas), cistoadenoma (cavidade cística no tumor de uma glândula).

Os tumores malignos mesenquimais são chamados de sarcoma. Para segregar o tipo, é adicionado o nome da célula ou tecido de origem ao sufixo *sarcoma*. Por exemplo: osteossarcoma, fibrossarcoma, condrossarcoma (KUMAR et al., 2010; WERNER, 2011).

Os tumores malignos epiteliais são chamados de carcinomas. Da mesma forma que os tumores benignos, os tipos de carcinomas recebem informações de suas características. Por exemplo: adenocarcinoma (pode ter se originado de uma glândula ou epitélio mas exibe padrão glandular) (KUMAR et al., 2010; WERNER, 2011).

Um tumor benigno, por exemplo um adenoma, pode evoluir para um maligno como o carcinoma não invasivo ou outras formas invasivas.

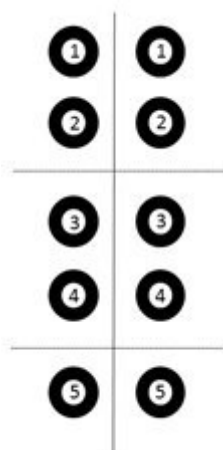
2.3 ANATOMIA DAS GLÂNDULAS MAMÁRIAS CANINAS

As glândulas mamárias em carnívoros são glândulas sudoríparas écrinas pois secretam substâncias e estão menos ligadas à regulação de temperatura do que as apócrinas. Estão presentes na pele e desenvolvem-se como brotos que invadem o mesoderma. Esse tipo de glândula tem a função de nutrição do filhote (DYCE et al., 2004).

O surgimento das glândulas mamárias se dá através de uma região chamada de crista mamária que compreende em uma linha que se estende das porções axilares até à virilha. Essa crista (também chamada de linha) é um espessamento ectodérmico na qual estão localizados pequenos brotos epiteliais que crescem dentro do mesênquima subjacente (GUYTON; HALL, 2006).

Nos seres humanos, há uma absorção dessa crista nas porções axilares, abdominais e na região da virilha, sobrando somente a porção torácica. Nas cadelas, a crista mamária se estende desde a axila até a virilha, formando em geral cinco pares de glândulas mamárias, sendo duas torácicas (cranial torácica e caudal torácica), duas abdominais (cranial abdominal e caudal abdominal) e uma inguinal distintamente separadas, como esquematizado na Figura 1. A alternância dos pares é importante pois facilita a amamentação quando a cadela se deita. Podem ser encontrados seis ou quatro pares de glândulas (DYCE et al., 2004).

Figura 1 - Esquema das glândulas mamárias caninas. 1, par de mamas craniais torácicas; 2, par de mamas caudais torácicas; 3, par de mamas craniais abdominais; 4, par de mamas caudais abdominais; 5, par de mamas inguinais.



Fonte: Adaptado de DYCE et al, 2004.

No desenvolvimento embrionário dos mamíferos, em especial dos carnívoros, há uma elevação no broto mamário que consiste na papila, que é recoberta por pelos, o que causa um aumento da superfície corpórea e é a comunicação do alimento (leite) da mãe para os filhotes (BANKS, 1992).

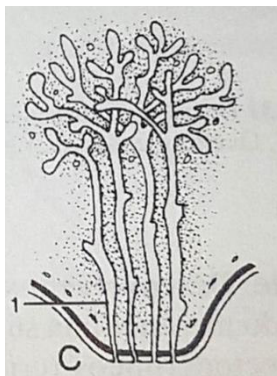
Nas cadelas, o broto mamário é composto por vários bicos que vão originar um sistema de ductos separados, por onde sairão o leite. O broto primário dará origem ao seio lactífero e o secundário aos ductos lactíferos (Figura 2) (DYCE et al., 2004).

Cada sistema de ducto irá formar diferentes orifícios na ponta da papila, facilitando assim a alimentação dos filhotes, já que o leite é drenado por esse sistema (DYCE et al., 2004).

Cada ducto está associado à uma massa glandular diferente, que se desenvolve através de estímulos hormonais, sendo que na puberdade há um momento parcial de desenvolvimento. Também na primeira gestação, há o término do

desenvolvimento completo das glândulas, na qual agem diversos hormônios da hipófise, ovários e outras glândulas endócrinas e então ocorre uma tumefação da papila na superfície da pele (SORENMO et al., 2011).

Figura 2 - Sistema de ductos da glândula mamária da cadela. Em 1 o broto mamário.



Fonte: Adaptado de DYCE et al, 2004.

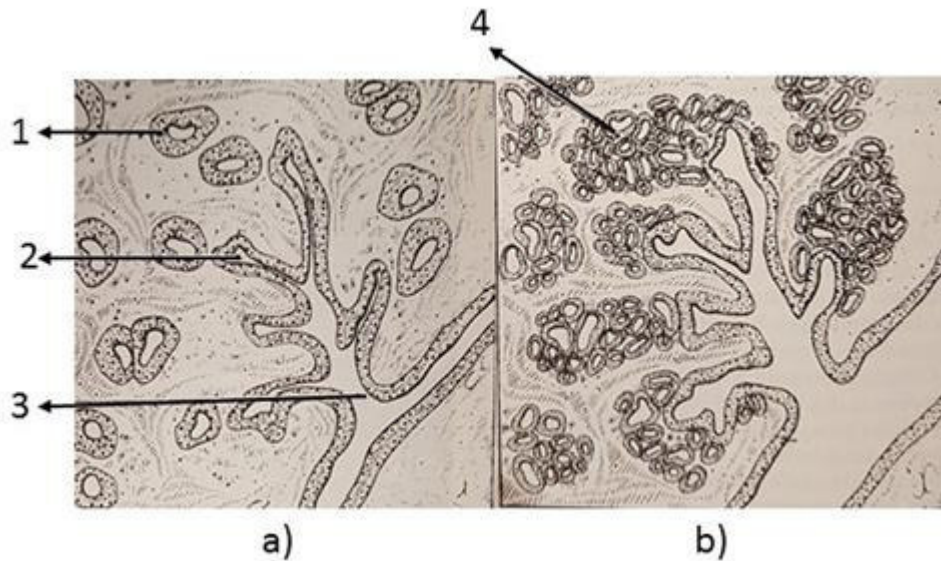
A gestação deixa o abdome das cadelas maior tanto em profundidade quanto em largura, sendo que as glândulas mamárias auxiliam nesse contorno. Próximo ao parto, tornam-se salientes e inchadas.

A glândula mamária está arranjada de forma que o tecido glandular da mama está recoberto e sustentado por tecido fibroso, que é recoberto por tecido adiposo e posteriormente pela pele do animal (BANKS, 1992).

No tecido glandular, mais precisamente na glândula, encontram-se os lóbulos e esses estão arranjados em alvéolos. A drenagem do leite é realizada por um ducto intralobular que se une com outros e formam um ducto interlobular maior. Esses ductos, por sua vez, levam o leite para ductos lactíferos que transportam o leite para uma cavidade denominada seio lactífero, onde posteriormente desembocam na papila mamária. No tecido fibroso, encontra-se a irrigação da mama, bem como nervos mamários (BANKS, 1992).

A funcionalidade da glândula mamária somente está presente no momento da lactação, onde aumentam de tamanho devido ao desenvolvimento do tecido glandular (Figura 3), que se apresenta mais amarelado se comparado à palidez do tecido fibroso. A glândula, nos mamíferos, nunca mais regride ao seu tamanho original (de antes da gestação) e tende a aumentar a cada gestação (SORENMO et al., 2011).

Figura 3 - Glândula inativa em a) e glândula ativa em b). As estruturas em 1, 2, 3 e 4 se referem ao alvéolo inativo, ducto lobular, ducto lobar e alvéolo ativo respectivamente.



Fonte: Adaptado de BANKS, 1992.

Os machos também apresentam glândulas mamárias, porém essas são consideradas rudimentares, pois não há a sensibilização dos hormônios como acontece na fêmea.

Para entender a composição dos tecidos que pertencem às glândulas mamárias, se faz necessário o estudo da histologia dessas estruturas.

2.4 HISTOLOGIA DA GLÂNDULA MAMÁRIA CANINA

As neoplasias podem ter como origem de diferentes tecidos, e essa condição, além de outras, faz com que o tumor possa ser identificado e por consequência, melhor tratado.

2.4.1 Tecido Epitelial

Os tecidos epiteliais revestem superfícies dos órgãos ou do corpo. Apresentam alta densidade celular por estarem bem unidos, com pouca substância intercelular entre as células que são semelhantes ou estreitamente relacionadas de maneira funcional ou estrutural (BANKS, 1992).

A distribuição das organelas confere às células epiteliais polaridade celular, na qual em neoplasias malignas, uma das causas de metástase se dá pela perda da polaridade das células e permitem que essas encontrem outros sítios (EURELL; FRAPPIER, 2012).

Os tecidos epiteliais são avasculares e necessitam do tecido conjuntivo para garantir sua nutrição e liberação de produtos residuais. Esse tecido tem várias funções através da modificação de suas células, por exemplo a proteção contra agentes biológicos e físicos é importante para garantir segurança para o organismo. Outra função é a de secreção, e nesse sentido, estão dispostas em diversas regiões do organismo secretando substâncias essenciais, como lubrificação de pelos, saliva, materiais enzimáticos, além de desempenhar a função de termorregulação do corpo (EURELL; FRAPPIER, 2012).

Os tecidos epiteliais estão separados do tecido conjuntivo por uma camada chamada de membrana basal, que é um material denso (lâmina basal) separado da membrana celular por uma zona clara (lâmina lúcida). A lâmina basal contém glicoproteínas e fibras colágenas, formando um emaranhado. A lâmina fibrorreticular, que é uma camada mais espessa de fibras colágenas, se projeta no tecido conjuntivo. Por ser um material muito pequeno e de difícil visualização com microscópio óptico, esses materiais podem ser visualizados por microscopia eletrônica de varredura (BANKS, 1992).

Algumas células do tecido epitelial se modificam para secretar materiais e os liberam em epitélios de revestimento, na qual recebem o nome de glândulas exócrinas, como as glândulas mamárias.

O tecido epitelial tem origem nos três folhetos embrionários – ectoderma, mesoderma e endoderma – em especial no primeiro e no último, com maior recorrência. As glândulas mamárias são oriundas da invaginação da epiderme para o mesoderma.

2.4.1.1 Tipos de tecidos epiteliais

A classificação dos tecidos epiteliais leva em consideração o número de camadas celulares (simples – uma camada; estratificado – mais de uma camada; pseudoestratificado – uma camada com aspecto de mais de uma; e o de transição –

camada sujeita à variações) e o tipo celular que é predominante na última camada (pavimentoso, cúbico ou prismático) (EURELL; FRAPPIER, 2012).

O epitélio cúbico simples tem suas células em formato de cubo com o núcleo mais centralizado, e está associado à secreção e absorção de substâncias. Está presente nas porções secretoras e ductos de algumas glândulas (BANKS, 1992).

O epitélio prismático simples tem células mais altas do que largas com núcleos alongados mais próximos à base. Esse formato está relacionado à atividades secretoras, sendo então presentes como revestimentos das porções secretoras e condutoras de muitas glândulas (EURELL; FRAPPIER, 2012).

O epitélio cúbico estratificado tem duas camadas celulares. Está presente em ductos das glândulas, como um tecido de transição entre o epitélio simples e o estratificado ou o pseudoestratificado (EURELL; FRAPPIER, 2012).

O tecido glandular desempenha função de secreção importante para o organismo. As glândulas multicelulares são grupos de unidades secretoras e adquirem uma posição extra-epitelial, não estão no mesmo plano do epitélio de revestimento, e permanecem separados do tecido conjuntivo por uma lâmina basal (BANKS, 1992).

Nessas glândulas há a formação de um tubo, que se projeta através do tecido conjuntivo, na qual serão formados os ductos, que caracterizam a glândula como exócrina, pois as secreções serão lançadas para fora do corpo.

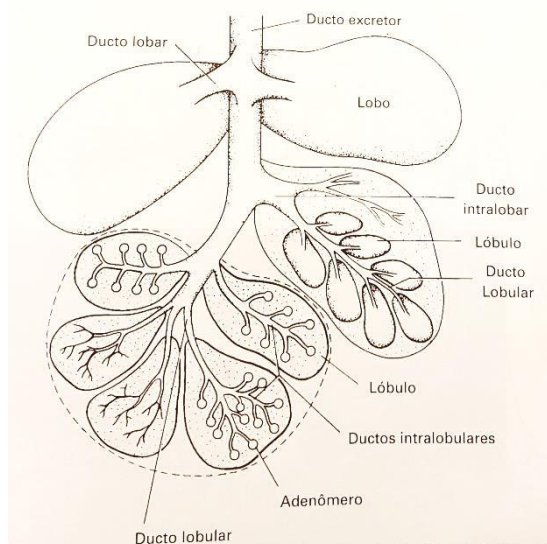
Esses ductos se abrirão na superfície do epitélio e a união deles com as células secretoras (adenômeros) podem se tornar estruturas bem elaboradas.

As glândulas mamárias são glândulas exócrinas multicelulares compostas com porções secretoras terminais tubuloalveolares, na qual há muitas subdivisões do sistema de ductos e vários tipos de adenômeros.

Nessas glândulas há a presença do ducto excretor que é a ligação da glândula com o local onde o produto de secreção será expelido, nesse caso, externamente ao corpo. O ducto excretor está ligado à glândula através dos ductos lobares (que unem os lobos) e esses por sua vez estão ligados aos ductos intralobares (pertencem aos lobos). Na glândula, os lobos são formados por unidades menores, os lóbulos, que tem a drenagem de produtos através dos ductos lobulares e a continuação desses ductos dentro do lóbulo é denominada de ductos intralobulares, como demonstrado na Figura 4 (BANKS, 1992).

Para auxiliar no processo de ejeção do leite, um tipo de epitélio especial reveste as glândulas externamente, as células mioepiteliais ou células em cesta. São células fusiformes, associadas aos adenômeros com função contrátil (EURELL; FRAPPIER, 2012).

Figura 4 - Divisão de uma glândula mamária em suas estruturas funcionais.



Fonte: BANKS, 1992.

2.4.2 Tecido adiposo

O tecido adiposo é composto de células adiposas ou adipócitos, que formam uma população celular bem homogênea. Além dessas células, o tecido adiposo é permeado por vasos sanguíneos, alguns elementos do tecido conjuntivo mas esses menos predominantes. Sugere-se que o tecido adiposo tenha origem mesenquimatosa (BANKS, 1992).

O tecido adiposo é uma fonte de energia, ajuda na conservação do calor e confere proteção mecânica a diversos órgãos, sendo dividido em tecido adiposo branco e marrom.

O tecido adiposo branco também é chamado de tecido adiposo unilocular ou comum. É composto por células grandes (cerca de 130,0µm) esféricas. Os lipídios dessas células são os triglicerídeos e alguns ácidos graxos, podendo ser divididos em unidades menores como lóbulos (EURELL; FRAPPIER, 2012).

O tecido adiposo marrom tem esse nome devido à coloração desse tecido e tem a função de manutenção corporal durante a hibernação e período pós-natal para

alguns animais. Com células multiloculares, esse tipo de tecido adiposo é mais vascularizado e inervado do que o adiposo branco (BANKS, 1992).

Os tumores das células adiposas podem se assemelhar a um ou outro tipo de tecido adiposo, por exemplo, o lipoma se assemelha ao tecido adiposo branco e o lipossarcoma ao marrom, ambos são comuns ao cão (BANKS, 1992).

2.5 PROTEÍNAS E OUTRAS MOLÉCULAS

As proteínas são estruturas presentes em todas as células, por ter função específica, tem tipos variados.

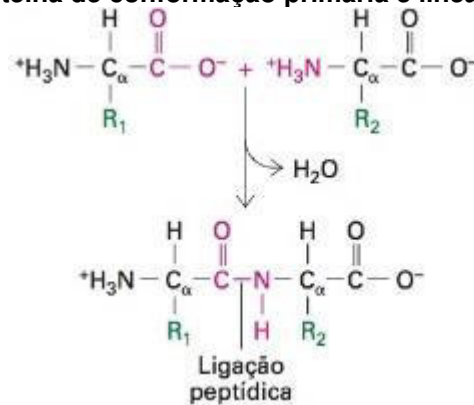
As proteínas são compostas por aminoácidos, formando uma cadeia de polipeptídeos. Os α -aminoácidos são moléculas compostas, em sua maioria, por carbono alfa (C_α), hidrogênio (H), nitrogênio (N) e oxigênio (O), sempre ligadas à um grupamento (R) diferente. Dessa forma, os α -aminoácidos são compostos de um grupamento carboxílico livre (COOH), um aminogruppo livre não substituído (NH_2), uma ligação com hidrogênio no carbono principal e o grupamento R que pode ser uma glicina, fenilalanina, alanina, entre outros. Existem 20 tipos de α -aminoácidos que unidos de forma diversa formam diferentes proteínas (LEHNINGER, 2000).

Para a formação da proteína, os aminoácidos precisam se unir por meio das ligações peptídicas. Essas ligações covalentes são realizadas com a interação do grupo carboxílico de um α -aminoácido com a amida de outro α -aminoácido. Eles se unem e nesse processo há a liberação de uma molécula de água, como mostrado na Figura 5 (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014).

A forma com que as cadeias polipeptídicas vão se formando não é aleatória, tendo como principal objetivo desempenhar funções nas células, por exemplo, as enzimas e elementos estruturais como o colágeno (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014).

As proteínas têm uma conformação tridimensional única e dependente de sua função, por exemplo, as fibras de colágeno são formadas por proteínas que estão dispostas de forma paralela a fim de garantir resistência física. Há também a conformação globular que é mais comum e está presente em diversos tipos de estruturas, como anticorpos (LEHNINGER, 2000).

Figura 5 - Exemplo de uma sequência de aminoácidos e de ligação peptídica, formando uma proteína de conformação primária e linear.



Fonte: Adaptado de Lodish et al. (2014).

As proteínas apresentam diferentes estruturas tridimensionais, como as estruturas primárias, secundárias (principal conformação para essa pesquisa), terciárias e quaternárias. Essas conformações são importantes para a função que irão desempenhar e foram descobertos com o uso de difração de raios X (LEHNINGER, 2000).

2.5.1 Proteínas primárias

A conformação primária das proteínas é uma estrutura linear de ligações covalentes e pode ser chamada de oligopeptídeo ou somente peptídeo se curta ou polipeptídeo se longa (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014).

2.5.2 Proteínas secundárias

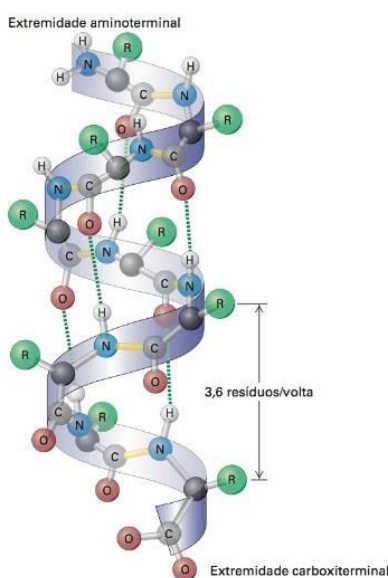
As proteínas secundárias apresentam uma estrutura de conformação regular, espiralada da cadeia peptídica ao longo do seu eixo principal e geralmente estão mais estáveis com essa conformação virada para direita. A estabilidade das proteínas está relacionada com temperatura, pH do meio e dos aminoácidos que a formam (LEHNINGER, 2000).

Um tipo de conformação secundária é chamado de hélice alfa (α) e pode ser encontrada com a orientação tanto para a direita quanto para esquerda. Os giros das cadeias polipeptídicas não podem ocorrer de forma livre pois dependem das ligações,

por exemplo, cadeias com ligações C – N tem algum caráter de dupla ligação e isso impede o giro. Já as que tem caráter de ligação simples podem girar mais livremente, desde que o grupamento R não seja grande o suficiente para impedir o giro (LEHNINGER, 2000; LODISH et al., 2014).

A conformação hélice alfa ocorre com a ligação do carbono da carbonila com o hidrogênio do grupo amida e esse enovelamento pode ser mais forte ou fracamente torcido, como demonstrado na Figura 6 (LODISH et al., 2014).

Figura 6 - Estrutura secundária de uma proteína, conformação hélice alfa. As ligações que possibilitam os giros e hélices. As voltas acontecem, em sua maioria, a cada 3,6 resíduos de aminoácidos.



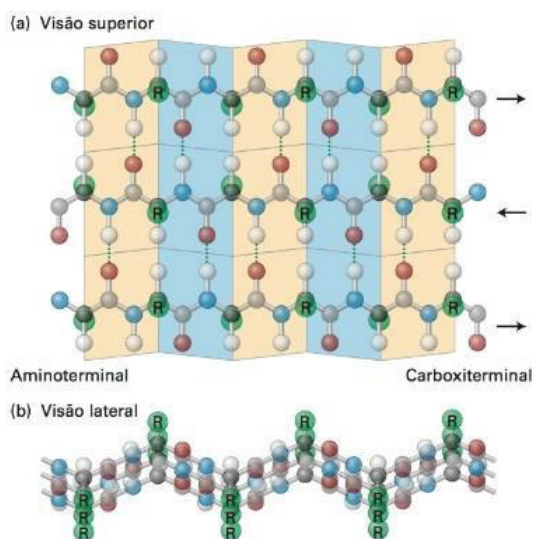
Fonte: Adaptado de Lodish et al. (2014).

Já a conformação folha beta (β) é outro tipo de conformação secundária das proteínas e são ordenadas em folhas pregueadas (Figura 7). A suspeita é que a estrutura folha beta provêm da estrutura hélice alfa quando essa perde a estabilidade garantida pelas ligações de hidrogênio intracadeia, geralmente causada por alta temperatura (LEHNINGER, 2000).

A conformação folha beta é mais distendida do que a hélice alfa, sendo comparada a um ziguezague causado pela ligação de hidrogênio intercadeias. Essa forma de ziguezague ocorre, pois, as cadeias estão dispostas lateralmente e estão unidas pelas ligações das moléculas tanto para cima quanto para baixo do plano (LODISH et al., 2014).

As fitas de cadeias podem estar de forma paralelas e antiparalelas nas conformações folha beta. Uma cadeia polipeptídica tem 60% de estruturas hélices alfa e folhas beta (suporte interno da proteína), sendo que o restante está conformado de maneira irregular, com hélices ou voltas (LEHNINGER, 2000; LODISH et al., 2014).

Figura 7 - Estrutura secundária de uma proteína, conformação folha beta. Em a) a visão superior da conformação folha beta, setas indicando o sentido paralelo e antiparalelo das fitas. Em b) a visão lateral da conformação mostrando os altos e baixos do plano.



Fonte: Adaptado de Lodish et al. (2014).

Os tecidos biológicos são diferentes em sua composição e estrutura. Para conseguir identificar essas diferenças, a técnica de difração de raios X e de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier podem ser utilizadas pois conseguem identificar diferentes estruturas através de informações moleculares contidas na amostra.

Assim, de modo a identificar as alterações moleculares decorrentes do processo patológico, em complementar escala de tamanho, as amostras de tecido mamário canino normais e neoplásicas foram estudadas através das técnicas de difração de raios X e FTIR.

2.6 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

A técnica de difração de raios X permite analisar a distribuição espacial das estruturas moleculares que compõem uma amostra, nesse caso os tecidos mamários caninos.

O arranjo experimental típico para a técnica de difração de raios X é composto por um tubo de raios X, arranjo de fendas, monocromador e um detector. No modo reflexão, utilizado neste trabalho, tanto fonte quanto detector variam angularmente em relação à posição da amostra. Assim, é possível detectar os fótons elasticamente espalhados por uma amostra em função do ângulo de espalhamento, denominado perfil de espalhamento.

2.6.1 Produção de raios X

Os raios X são ondas eletromagnéticas com pequeno comprimento de onda com intenso uso em diversas áreas, sobretudo área da medicina.

Para produzi-los se faz necessário um recipiente chamado de ampola ou tubo de raios X, selado. Dentro desse local encontram-se duas estruturas principais (catodo e anodo), na qual fazem parte do processo de produção dessa radiação ionizante (ATTIX, 2004).

O catodo libera elétrons por emissão termiônica, que são acelerados através de uma diferença de potencial e então interagem com o anodo, produzindo assim os raios X. Essa produção se dá por duas formas, raios X de frenagem (espectro contínuo) e raios X característicos (espectro discreto) (ATTIX, 2004).

2.6.2 Interação da radiação com a matéria

Os fótons de raios X ao interagirem com a matéria podem produzir assim diversos efeitos que dependem da energia incidente e do material atingido. Para energias abaixo de 100keV são predominantes três tipos de interações: efeito fotoelétrico, espalhamento elástico e inelástico (TURNER, 2007).

O efeito fotoelétrico ocorre quando um fóton com energia igual ou superior à energia de ligação (do elétron no átomo) interage com um elétron do átomo, e

transfere a sua energia para esse ejetando-o do átomo. O espalhamento inelástico ou incoerente ocorre quando o fóton transfere parte de sua energia ao interagir com elétrons de um átomo (ATTIX, 2004).

No espalhamento elástico ou coerente, o fóton ao interagir com a matéria sofre desvio da trajetória sem modificação da energia. Os fótons elasticamente espalhados carregam informações sobre a estrutura dos tecidos através do perfil de espalhamento, que é a distribuição do número de fótons de acordo com um ângulo de espalhamento. O perfil de espalhamento é único para cada material, pois depende da estrutura, que deve ser devidamente conhecida. Se não for, o perfil deve ser obtido de maneira experimental (TURNER, 2007).

Para entender e determinar como é possível caracterizar tecidos por difração de raios X se faz necessário algumas relações, entre elas o vetor de espalhamento.

2.6.3 Vetor de espalhamento

O vetor de espalhamento é definido por:

$$\vec{q} = \vec{k}' - \vec{k} \quad (2.1)$$

em que \vec{k}' representa o vetor propagação do fóton espalhado e \vec{k} representa o vetor propagação do fóton incidente. Sabendo que $|\vec{k}| = 2\pi/\lambda$ e que λ corresponde ao comprimento de onda de um fóton que sofreu espalhamento elástico, pode-se afirmar que o vetor de espalhamento é dado em função de q .

O módulo do vetor de espalhamento q pode ser calculado de maneira geométrica, sendo que:

$$q = \frac{4\pi \sin(\frac{\theta}{2})}{\lambda} \quad (2.2)$$

Logo, a unidade de q é representada por nm^{-1} e se relaciona com o ângulo θ de espalhamento.

2.6.4 Lei de Bragg

A Lei de Bragg é definida por:

$$2d \sin 2\theta = n\lambda \quad (2.3)$$

na qual d representa a distância entre os centros espalhadores, θ o ângulo de espalhamento, λ o comprimento de onda da radiação utilizada e n um número natural.

Dessa forma, a Lei de Bragg relaciona a distância entre dois centros espalhadores através de um feixe de radiação com comprimento de onda λ e ângulo θ .

Desse modo, tem-se que a distância entre os centros espalhadores está relacionada com o vetor de espalhamento q :

$$d = \frac{4\pi}{q} \quad (2.4)$$

Assim, através do valor do momento transferido para cada pico de espalhamento elástico, pode-se determinar a distância de correlação eletrônica, sendo possível assim caracterizar tecidos biológicos, por exemplo (WASEDA; MATSUBARA; SHINODA, 2011).

Cada tipo de tecido pode ser diferenciado graficamente e isso se dá pela intensidade corrigida do perfil de espalhamento. A intensidade está interligada com o fator de forma.

2.6.5 Fator de forma

A probabilidade de ocorrência de interação por espalhamento é dada pela seção de choque de espalhamento elástico. A seção de choque diferencial para o espalhamento coerente por um átomo depende do fator de forma atômico e da seção de choque Thomson. A seção de choque Thomson retrata a probabilidade de ocorrência de espalhamento elástico por um elétron livre. A seção de choque diferencial de espalhamento elástico por átomo é dada por:

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{Ray} = [F(q, Z)]^2 \left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{Th} \quad (2.5)$$

Na qual q é o vetor de espalhamento, Z o número atômico e $F(q, Z)$ o fator de forma atômico e $\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{Th}$ é a seção de choque Thomson.

Logo, a partir do perfil de espalhamento das amostras é possível determinar o fator de forma e então determinar as estruturas moleculares evidenciadas neste. Quando não se conhece a composição elementar de uma amostra, pode obter o fator de forma relativo, dado por:

$$\left(\frac{F^2(q)}{M}\right) = I_{corrigida} \quad (2.6)$$

2.7 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO

A espectroscopia no infravermelho se baseia na interação da radiação eletromagnética com moléculas das amostras que produzem movimentos de vibração. A vibração advém da absorção da radiação infravermelha no material (OLIVEIRA, 2009).

A faixa de frequência da espectroscopia geralmente está compreendida entre 400 e 4000 cm^{-1} , porém a molécula só irá vibrar em frequências específicas que devem ser iguais àquelas iguais às frequências naturais da molécula (OLIVEIRA, 2009).

As vibrações são representadas por meio de um gráfico que apresenta bandas de absorção com a posição correspondente no eixo das abscissas, sendo denominada de números de onda. Os números de onda são o inverso do comprimento de onda e são proporcionais à energia de vibração das moléculas (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2010).

No eixo das ordenadas, as intensidades das bandas de absorção são dadas em transmitância (T) ou absorbância (A). A transmitância é definida pela razão da

energia transmitida pela incidente, já a absorvância é definida pelo inverso do logaritmo decimal da transmitância (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2010).

2.7.1 Modo de vibração das moléculas

Quando os átomos de uma molécula vibram de forma axial os átomos se aproximam ou se afastam, pode ser chamada também de estiramento. Outro tipo de vibração é a angular (ou dobramento) em que o ângulo de ligação é modificado (ATKINS; JONES, 2012).

A frequência de absorção depende da frequência de vibração da molécula e a intensidade de vibração depende da variação do momento dipolar. O momento dipolo é definido pela magnitude de duas cargas multiplicada pela distância entre elas. Nesse caso, o campo elétrico do fóton causa variação do momento dipolo da molécula fazendo com que ela vibre na mesma frequência. Nem todas as moléculas são ativas para a espectroscopia de infravermelho, sendo importante identificar o momento dipolo dessas na literatura (OLIVEIRA, 2009).

Cada molécula não vibra de forma aleatória, existem os graus de liberdade que são importantes para entender os processos de vibração e rotação molecular. O número dos graus de liberdade da molécula é igual ao número total de graus de liberdade de cada átomo.

Cada átomo tem 3 graus de liberdade correspondentes aos eixos x, y e z do plano cartesiano. Se a molécula for linear ou não-linear os graus de liberdade mudam pois há uma configuração espacial diferente. Os graus de liberdade de vibração ou vibração fundamental são aqueles que excluem os graus correspondentes à rotação e translação da molécula.

Para calcular o número teórico de vibrações fundamentais ou frequências de absorção pode-se ter uma aproximação por meio da Lei de Hooke, e nesse caso a molécula é considerada como um oscilador harmônico, com duas massas ligadas por molas, como exemplificado na Equação 2.7 (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2010).

$$\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{f}{(MxMy)+(Mx+My)}} \quad (2.7)$$

Nesse caso $\bar{\nu}$ corresponde ao número de onda ou frequência vibracional (cm^{-1}), c a velocidade da luz (cm/s), f a constante de força de ligação ($5 \times 10^5 \text{ dyn/cm}$ para ligações simples e aproximadamente $15 \times 10^5 \text{ dyn/cm}$ para ligações duplas e triplas) e M_x e M_y as respectivas massas dos átomos x e y em gramas. Pela Equação 2.10, quanto maior a frequência, menor a energia de ligação das moléculas, já que f está relacionada com a rigidez da ligação dos átomos da molécula (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2010).

Dessa forma pode-se estimar o valor correspondente da frequência vibracional de cada ligação e dessa forma é realizada a identificação do tipo de ligação existente em uma amostra (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2010).

2.7.2 Espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier

O Espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier é a união dos conceitos de transformada de Fourier com o Interferômetro de Michelson. O interferômetro de Michelson é composto por dois espelhos, sendo um fixo e um móvel (SMITH, 2011).

O feixe de infravermelho é dividido por um divisor denominado *beam splitter*, que separa 50% do feixe para um espelho fixo e 50% restante do feixe para o espelho móvel (LIMA, 2015).

Os feixes são refletidos pelos espelhos e interagem. Se os espelhos estiverem na mesma distância, há uma interferência construtiva. Com distâncias diferentes a interferência é destrutiva (SMITH, 2011).

O padrão de interferências (construtivas e destrutivas) é convertido para o domínio da frequência por meio da transformada de Fourier, e o espectro final é dado em porcentagem de absorvância ou transmitância por números de onda (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2010).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo será descrita os procedimentos adotados para coleta e preparação das amostras bem como a metodologia adotada para os experimentos de difração de raios X e FITR.

3.1 AMOSTRAS DE GLÂNDULAS MAMÁRIAS CANINAS

Foram utilizadas 83 amostras de neoplasias mamárias caninas, disponibilizadas pelo Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Paraná (UFPR). As amostras utilizadas são provenientes de tumores espontâneos de cães que realizaram cirurgia de remoção, portanto elas estavam fixadas em solução de formol a 10% e armazenadas em frascos plásticos.

As amostras foram identificadas histopatologicamente pelo patologista veterinário, de acordo com o “Consenso para diagnóstico, prognóstico e tratamento de tumores mamários caninos” por Cassali, 2011, sendo que toda a cadeia mamária unilateral foi descrita nos laudos, como tecidos normais, neoplásicos (benigno ou maligno) e alterações celulares como hiperplasia, por exemplo (CASSALI et al., 2011).

Das amostras analisadas, 32 eram compostas de tumores malignos e 42 de benignos. Foram analisadas também 9 amostras de tecido adiposo das mamas. Ao todo, cinco cadeias mamárias completas foram analisadas por difração de raios X.

Para o momento da análise, as amostras foram retiradas do formol e escorridas por cerca de 10 segundos, para que permanecesse a menor quantidade possível desse material na amostra.

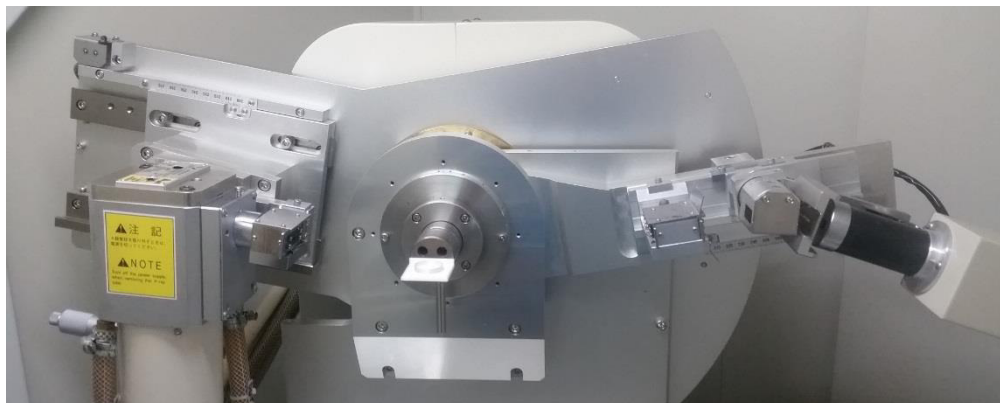
Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, sob o protocolo nº2016-009 (anexo A).

3.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Para análise dos perfis de espalhamento das amostras neoplásicas, foi utilizado um difratômetro comercial Shimadzu XRD-7000 (Fotografia 1) que pertence

ao Laboratório de Óptica de Raios X e Instrumentação (LORXI) da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Fotografia 1 - Difratômetro com o porta amostras encaixado.



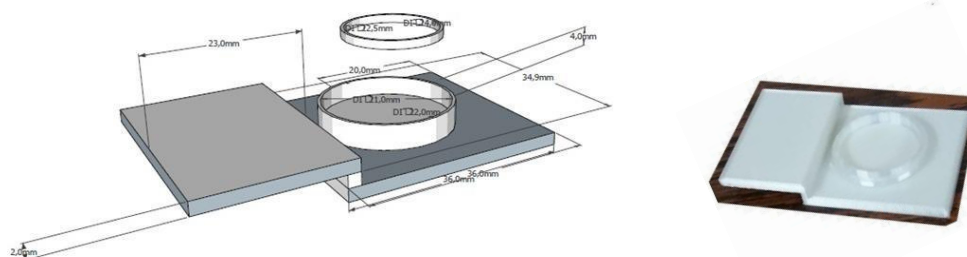
Fonte: A autoria própria

3.2.1 Desenvolvimento do porta amostras

As amostras foram colocadas em um cilindro do porta amostras desenvolvido para essa pesquisa, que foi impresso em Ácido Polilático por uma impressora 3D (Figura 8). O design do porta amostras considerou o encaixe no equipamento e a área de irradiação da amostra. Foram impressos quatro porta amostras.

As amostras foram cortadas em forma de disco, de 21,0 mm de diâmetro interno e com 4,0 mm de espessura e foram cobertas com policloreto de vinila (PVC) com dimensões de 1,5 μm , o qual permaneceu esticado e preso através de um aro que compunha o porta amostras. O uso do PVC foi importante para evitar evaporação da água da amostra e para uniformizar a superfície da mesma.

Figura 8 - Modelo do porta amostras e o porta amostras impresso em Ácido Polilático pela impressora 3D. As dimensões do porta amostra estão de acordo com o difratômetro e levam em consideração a localização do feixe de raios X.



Fonte: Autoria própria

3.2.2 Arranjo experimental

O difratômetro utilizado foi configurado no modo reflexão e foi configurado para fazer a varredura da amostra em um ângulo de espalhamento (2θ) de 6° a 76° , que corresponde ao intervalo do momento transferido de $4.27 \text{ nm}^{-1} \leq q (=4\pi \cdot \sin(\theta/2)/\lambda) \leq 50.18 \text{ nm}^{-1}$. Foi utilizado passo de $1/3$ de grau e 20 segundos por passo com uma tensão e corrente no tubo de raios X de 40,0 kV 20,0 mA, respectivamente.

O tubo de raios X pertencente ao equipamento possui anodo de cobre ($Z=29$; $K\alpha=8,04 \text{ KeV}$) sendo que o feixe de raios X emitido pelo tubo passa por uma fenda denominada “fenda divergente”. Essa fenda tem abertura variável para que a área irradiada na amostra seja sempre a mesma ($3,5\text{mm} \times 19,0\text{mm}$) independente do ângulo de incidência e difração. Após a fenda divergente, o feixe é paralelizado horizontalmente ao passar pela fenda Söller e então incide na amostra. O feixe emergente da interação com a amostra passa por outra fenda Söller antes de atingir o sistema de detecção composto por um monocromador e um detector cintilador de NaI como mostrado na Figura 9.

Figura 9 - Esquema exemplificando o funcionamento do difratômetro.



Fonte: Autoria própria

O monocromador de grafite ($2d=0,2708\text{nm}$) seleciona os fótons de $8,04\text{keV}$, correspondente ao espalhamento elástico dos fótons característicos (K_{α} do Cu). No detector, os fótons são registrados, convertidos em sinal elétrico e, em seguida o perfil de espalhamento é visualizado no monitor do microcomputador através do software de controle e visualização dos dados.

3.3 CORREÇÕES DOS PERFIS DE ESPALHAMENTO

O processo de correção dos dados obtidos se faz necessário pois as intensidades adquiridas nem sempre são advindas exclusivamente das amostras. O material do porta amostras, o PVC e o ar influenciam nas intensidades registradas, bem como alguns recursos como o uso da fenda divergente do monocromador e de efeitos geométricos afetam o perfil de espalhamento.

A equação 3.1 é utilizada para realizar as correções e assim obter o perfil de espalhamento corrigido ($I_{\text{corrigido}}$) das amostras analisadas é dada por:

$$I_{\text{corrigido}} = [(I_{\text{exp}}(q) - I_{\text{PVC}}(q) - I_{\text{PA}}(q)) \cdot (T_{\text{PVC}}(q) \cdot I_{\text{PA}}(q))] \cdot (K(q) \cdot P(q) \cdot A(q))^{-1} \quad (3.1)$$

em que $I_{\text{exp}}(q)$ é a intensidade medida da amostra, $I_{\text{PVC}}(q)$ a intensidade medida do PVC e $I_{\text{PA}}(q)$ a intensidade medida do porta amostras, além do fator de transmissão do PVC, $T_{\text{PVC}}(q)$, que correspondem às contribuições espúrias. Se faz necessário dividir esse primeiro termo pelo produto da irradiação por área constante $K(q)$, pela polarização $P(q)$ e pela atenuação e fatores geométricos $A(q)$.

Essas correções foram realizadas através de cálculos já determinados na literatura e serão descritas a seguir (DE OLIVEIRA, 2006; CONCEIÇÃO, 2008).

3.3.1 Correção por contribuições espúrias

Foi realizada a correção por contribuições espúrias, que são contribuições advindas dos fatores envolvidos nas medidas e que são detectadas influenciando os espectros.

As intensidades encontradas são provenientes da amostra mas também do porta amostras, do PVC e do ar, pois todos esses elementos estavam presentes no momento da medida.

Foi realizada uma medida do porta amostras vazio e com o PVC para cada porta amostras impresso, pois acreditava-se que as intensidades de cada um poderiam ser diferentes.

No momento da medida, cada amostra teve seu porta amostras identificado, a fim de facilitar os cálculos de correções.

Para obter a contribuição do PVC, foi utilizado o valor do Fator de Transmissão (T), que é obtido por $T = e^{-\mu^2 l}$, onde μ é o coeficiente de atenuação do material (obtido na tabela NIST), e l a espessura do material, que no caso do PVC é de 15 μm . Logo, encontrou-se o valor de 0,974 para o PVC.

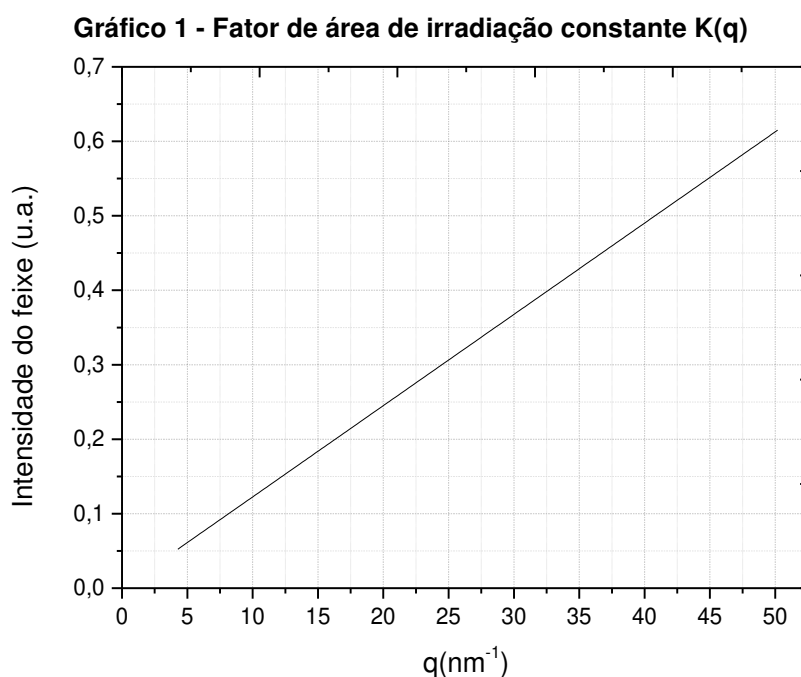
O espalhamento do porta amostras só é detectado a partir de $q \geq 32,5\text{nm}^{-1}$, representado por seu valor crítico. Logo, para $q \leq 32,5\text{nm}^{-1}$ a equação que traduz o μ_s é dada por:

$$I_{\text{corrigido}} = [(I_{\text{exp}}(q) - I_{\text{PVC}}(q)) \cdot (T_{\text{PVC}}(q))] \cdot (K(q) \cdot P(q) \cdot A(q))^{-1} \quad (3.2)$$

3.3.2 Correção por intensidade (área de irradiação constante) K(q)

A área de irradiação constante faz com que diferentes intensidades dos fótons de raios X cheguem até a amostra. A fenda divergente varia a abertura de acordo com o ângulo de espalhamento, sendo que quanto maior o ângulo maior a abertura das fendas.

A área constante das medidas desse trabalho foram de 3,5mm x 19,0mm, e a variação da intensidade do feixe de raios X se comporta como uma função $\sin(\theta)$, como demonstrado no Gráfico 1.



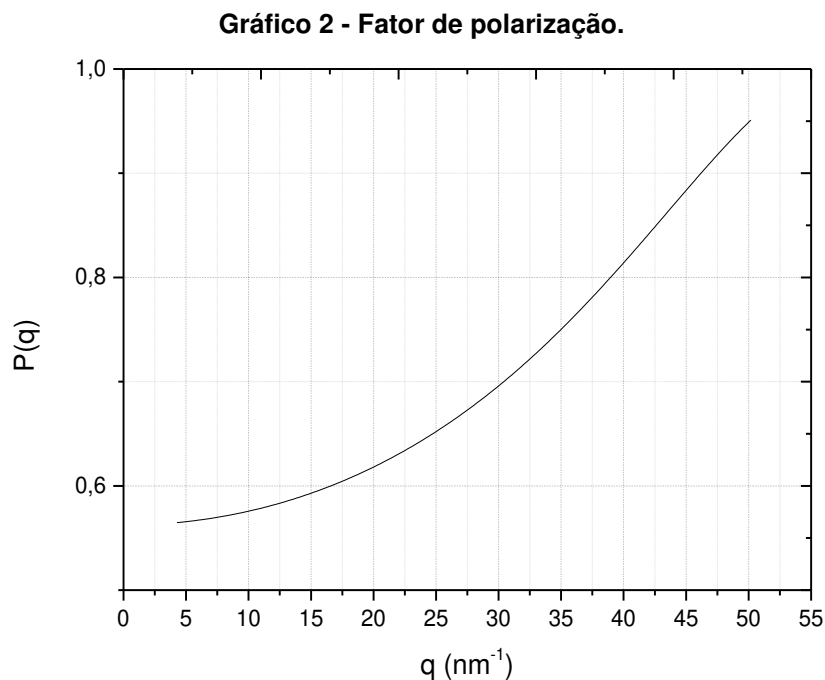
Fonte: Autoria própria

3.3.3 Correção por polarização P(q)

A correção por polarização se faz necessária pois foi utilizada um monocromador de grafite, e esse acessório interfere na intensidade medida. A correção é realizada através da equação:

$$P(q) = \frac{1 + \cos^2\theta \cos^2\theta_M}{1 + \cos^2\theta} \quad (3.3)$$

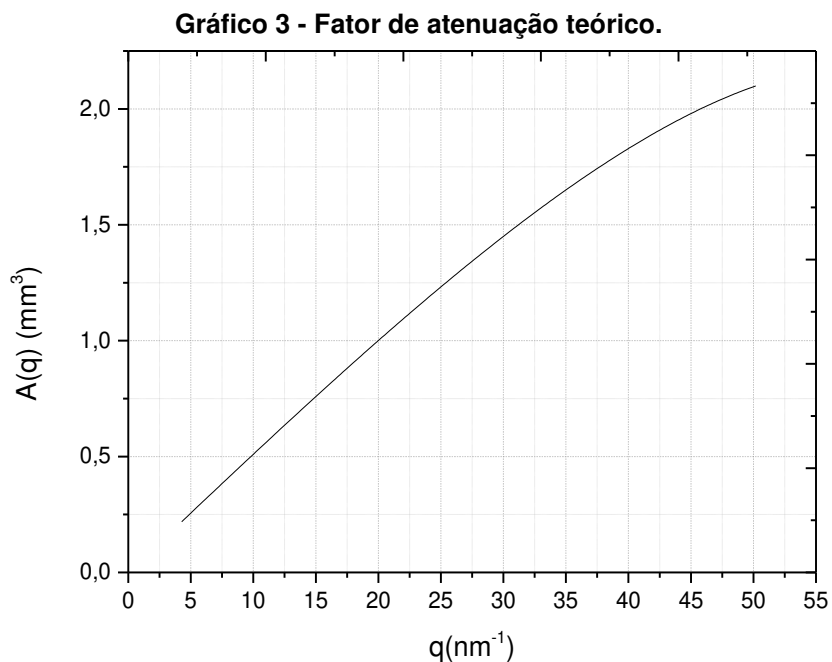
onde θ corresponde ao ângulo de espalhamento da amostra e θ_M ao ângulo de difração do monocromador, que nesse caso é de $34,66^\circ$. O Gráfico 2 mostra a curva de correção da polarização.



Fonte: Autoria própria

3.3.4 Correção por atenuação e efeitos geométricos $A(q)$

O volume irradiado da amostra depende do ângulo de incidência. No modo reflexão, de acordo com Milberg (1958), o volume irradiado abaixo do ângulo crítico, que nesse caso é de $\theta = 23,5^\circ$, equivale a um triângulo e para ângulos maiores, um trapézio (MILBERG, 1958). Desse modo, é possível calcular um fator de correção para essas intensidades (Gráfico 3).



Fonte: Autoria própria

3.4 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Para análise dos grupos funcionais de estruturas orgânicas presentes na amostra, foi utilizado o Espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared*) Varian modelo 640-IR (Fotografia 2).

Fotografia 2 - Equipamento de FTIR da UTFPR. O compartimento onde é acondicionado o acessório ATR está aberto na figura, e para a realização da medida esse deve ser fechado com o objetivo de reduzir influências externas do meio e evaporação da amostra.



Fonte: Autoria própria

As medidas foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Análises Químicas (LAMAQ) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

3.4.1 Arranjo Experimental

Existem alguns tipos de configurações experimentais que dependem do tipo de amostra e modificam a forma de aquisição dos dados. Os mais comuns são: modo de transmissão, transflexão e reflexão total atenuada, sendo o último utilizado para esse trabalho.

3.4.1.1 Modo de ATR (*Attenuated total reflection*)

A Reflexão Total Atenuada (ATR) é uma configuração do equipamento que permite o uso de um acessório composto de um cristal de ZnSe, nesse estudo foi utilizado o modelo Miracle da marca Pike, como demonstrado na Fotografia 3.

Fotografia 3 - Acessório ATR do equipamento de FTIR com uma amostra de neoplasia mamária canina.



Fonte: Autoria própria

O uso dessa configuração permite que sejam utilizadas amostras sem ou com pouco preparo, sólidas ou líquidas, sendo importante o contato da mesma com o elemento de reflexão interna, além de medidas mais rápidas.

O elemento de reflexão interna tem um índice de refração superior ao da amostra. A radiação incidente sofre reflexão interna total e forma uma onda evanescente, tendo sua energia concentrada próxima ao ponto de reflexão total.

3.4.2 Aquisição das medidas

Para fins de calibração do equipamento e pelas amostras estarem em solução de formaldeído foi feito uma medida inicial de controle denominada “branco”. Essa medida é usada como ferramenta de subtração do ruído causado pela solução aquosa (solução de formaldeído), melhorando assim a identificação das bandas de absorção da amostra.

As amostras utilizadas foram drenadas para que a solução de formol fosse reduzida, diminuindo assim a presença de ruído do espectro. Foram realizadas 32 varreduras no mesmo ponto com resolução de $4,0\text{ cm}^{-1}$ e com faixa de leitura entre 4000 e 650 cm^{-1} .

As amostras foram colocadas e fixadas em um porta amostra próprio do acessório, sendo importante para o sucesso dos resultados a região a ser avaliada da amostra estar em contato com o cristal.

O porta amostra do ATR foi limpo com álcool isopropílico para evitar contaminações entre as medidas.

3.4.3 Procedimento de correção dos dados

Os dados obtidos com a técnica de FTIR foram corrigidos para melhor visualização das bandas de absorção de interesse.

A primeira correção se deu no momento da aquisição da medida com a subtração do branco, como mencionado na seção anterior.

Logo após os dados foram normalizados para facilitar a comparação entre eles, sendo esse procedimento bastante utilizado na avaliação de dados adquiridos por FTIR.

Outro procedimento utilizado foi a suavização espectral (*smooth*) com o algoritmo de *Savitzky Golay* com 9 pontos com o objetivo de aumentar a relação sinal-ruído do espectro e assim melhorar a visualização de picos próximos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos com as técnicas de difração de raios X e FTIR. Foram analisados os perfis de espalhamento de raios X de cada grupo de amostras, divididos em neoplásicos (benigno e maligno) e não neoplásicos. Também foram analisados os espectros de absorção dessas amostras.

4.1 RESULTADOS OBTIDOS COM A TÉCNICA DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X (XRD)

Os resultados encontrados com a técnica de difração de raios X são visualizados por meio da intensidade dos perfis de espalhamento, representados por picos em diferentes valores de momento transferido. Os picos representam a intensidade corrigida e o valor do momento transferido corresponde à distância dos centros espalhadores da amostra.

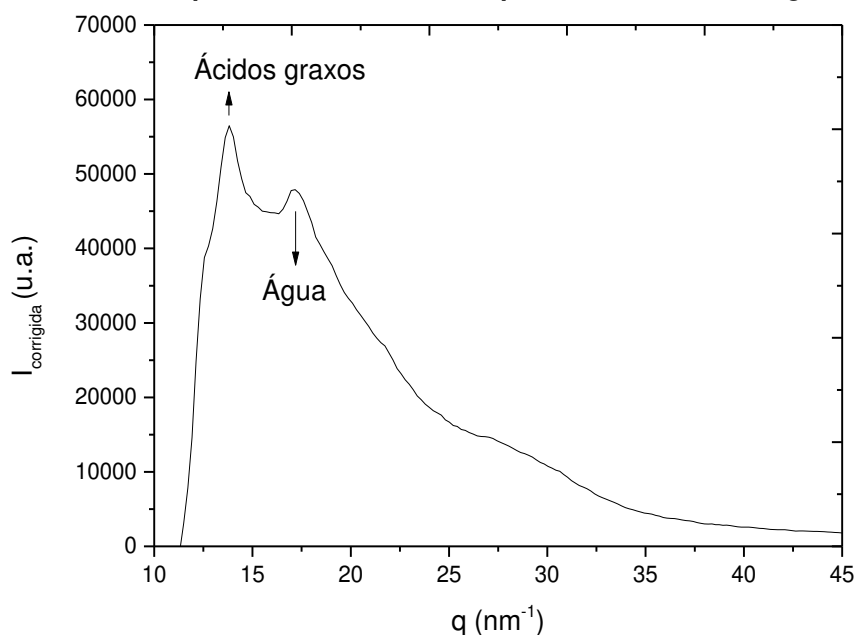
A distância dos centros espalhadores permite a identificação das moléculas que compõem a amostra. O propósito da avaliação com a técnica de difração de raios X é identificar estruturas menores, nesse caso moléculas que formam os tecidos mamários caninos.

De maneira geral, foram encontrados picos nas posições aproximadas de $q = 13,9 \text{ nm}^{-1}$ e $q = 19,8 \text{ nm}^{-1}$.

O perfil de espalhamento típico para os tecidos neoplásicos benignos caninos está exibido no Gráfico 4. A partir desse perfil, pode-se observar a presença de dois picos nas posições de $q = 13,9 \text{ nm}^{-1}$ e outro em $q = 19,8 \text{ nm}^{-1}$.

Os picos encontrados apresentam forma larga, diferente daqueles encontrados para estruturas cristalinas e expressam as interferências construtivas das densidades eletrônicas das estruturas moleculares que os compõem. As intensidades desses picos estão relacionadas à quantidade de centros espalhadores característicos de cada tecido.

Gráfico 4 - Perfil de espalhamento de raios X típico de um tumor benigno.



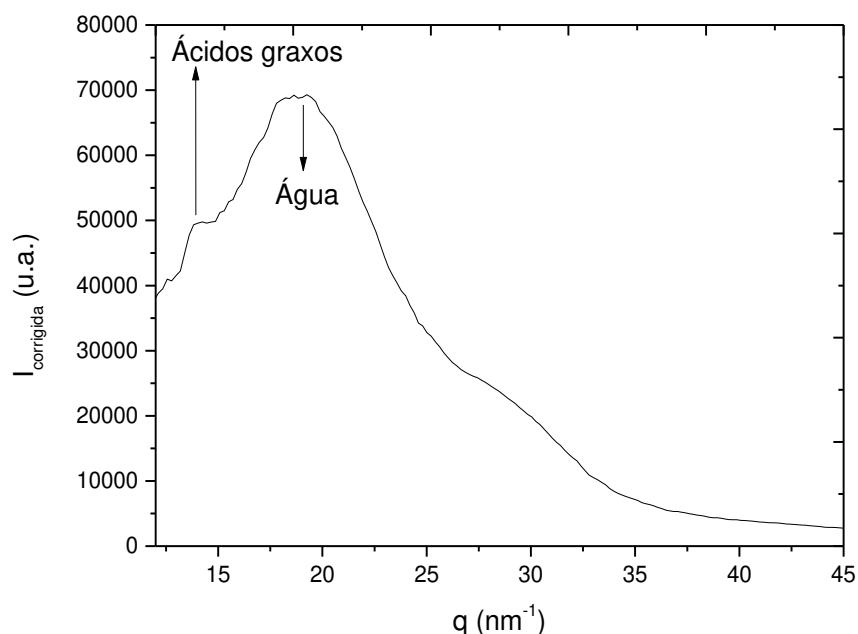
Fonte: Autoria Própria

Através da relação demonstrada em (2.4), a distância de correlação eletrônica de $13,9 \text{ nm}^{-1}$ corresponde às estruturas distantes entre si de $4,5 \text{ \AA}$, que está relacionada com a cadeia de ácidos graxos (LIDE, 2004). Logo, esse pico demonstra a presença de tecido adiposo na amostra, pois os triglicerídeos formam os ácidos graxos, que estão presentes nesse tecido.

Já o segundo pico encontrado no valor de $19,8 \text{ nm}^{-1}$ está relacionado com a distância dos centros espalhadores de $3,0 \text{ \AA}$. Essa distância de correlação corresponde à distância entre átomos de oxigênio em moléculas de água (LIDE, 2004).

Dos 42 perfis de espalhamento analisados, classificados como benignos, 40 estavam classificados histopatologicamente como adenomas. Esses tipos de tumores se desenvolvem com maior frequência na região das glândulas mamárias (EURELL; FRAPPIER, 2012), por esse motivo, os achados desses picos corroboram com o fato dos ácinos das glândulas mamárias serem compostos por água. Já o tecido adiposo está presente nas amostras, uma vez que junto O estroma das mamas é constituído por grande quantidade de tecido adiposo.

O perfil de espalhamento típico para tecidos tumorais malignos está demonstrado no Gráfico 5.

Gráfico 5 - Perfil de espalhamento típico de um tumor maligno.

Fonte: Autoria Própria

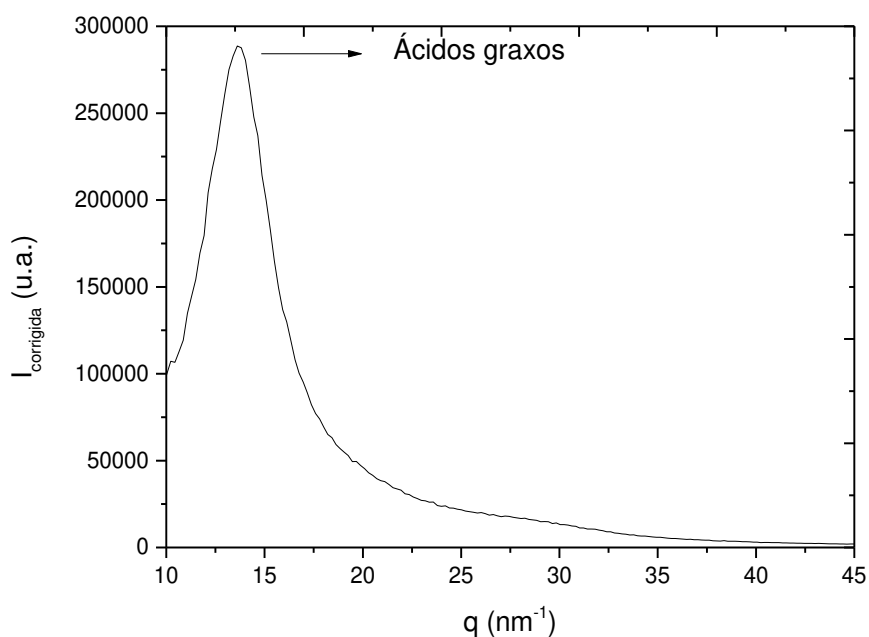
A ocorrência do pico encontrado em $q=13,9 \text{ nm}^{-1}$ não é tão pronunciada como nos tecidos benignos. A presença do pico em $q=19,8 \text{ nm}^{-1}$ corrobora o fato da maioria dos carcinomas estarem presentes no tecido de revestimento dos ductos mamários e com a invasão, aumenta a quantidade de células neoplásicas que são ricas em água e substituem o tecido adiposo (VOET; VOET; PRATT, 2016).

Sabe-se que os tumores malignos têm característica de infiltração, uma vez que as células epiteliais perdem a polaridade existente em um tecido saudável. Logo, a característica de infiltração desses tumores faz com que essas células, ricas em água, sejam identificadas pela substituição do tecido adiposo (KUMAR et al., 2010).

Os materiais biológicos não são homogêneos. Pode-se avaliar isto pela diversidade de tecidos que formam as glândulas mamárias, bem como a grande quantidade de classificações tumorais.

Em especial os tumores caninos, há a presença de diferentes tecidos na mesma amostra, bem como alterações teciduais pré-neoplásicas (como as hiperplasias).

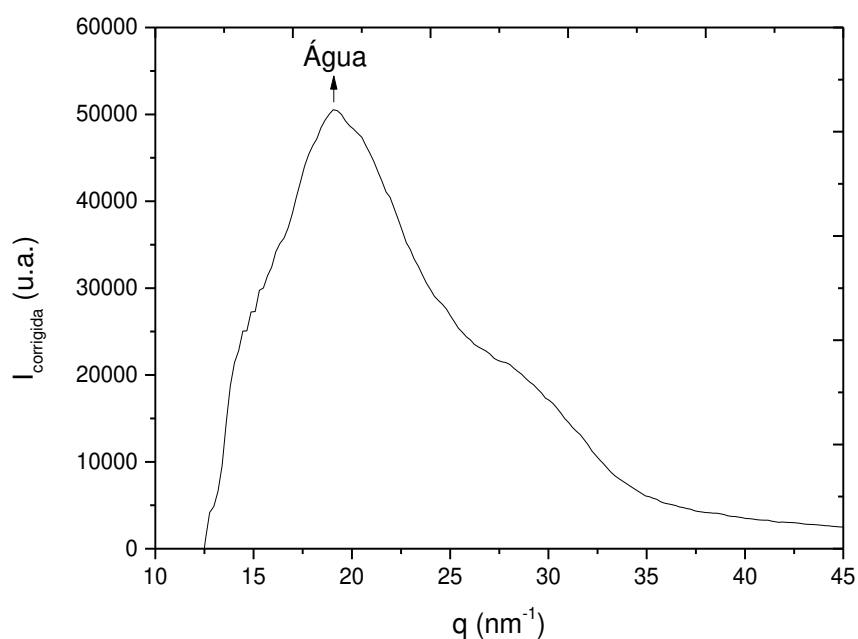
O Gráfico 6 retrata o perfil de espalhamento típico de um tecido adiposo, evidenciando alta intensidade de contagem para o pico situado em $q=13,9 \text{ nm}^{-1}$. Percebe-se que essa amostra tem o pico bem pronunciado, fato de que o tecido adiposo tem alta densidade de células.

Gráfico 6 - Perfil de espalhamento típico de tecido adiposo.

Fonte: Autoria Própria

O Gráfico 7 representa um perfil de espalhamento de uma amostra com hiperplasia. Para essa amostra, alguns picos com pouca intensidade foram identificados, porém não são estatisticamente consideráveis.

De um modo geral, as mudanças estruturais podem modificar os perfis de espalhamento de materiais como os tecidos biológicos.

Gráfico 7 - Perfil de espalhamento típico de tecido com hiperplasia.

Fonte: Autoria Própria

O uso da técnica de difração de raios X para identificação de perfis de espalhamento de tecidos biológicos já foi retratada na literatura. Os tecidos mamários humanos (saudáveis e neoplásicos) foram analisados por diversos autores, sendo o perfil de espalhamento típico desses tecidos foram determinados (EVANS et al., 1991; KIDANE et al., 1999; POLETTI; GONÇALVES; MAZZARO, 2002; CONCEIÇÃO; ANTONIASSI; POLETTI, 2010).

Outros materiais também foram identificados, como materiais equivalentes de tecidos, para auxiliar na construção de objetos simuladores. A partir dessas pesquisas pode-se afirmar que a água é um bom simulador do tecido fibroglandular pois os picos encontrados se assemelham. Da mesma forma, outros materiais foram identificados como bons simuladores de neoplasias e tecido adiposo (TARTARI et al., 1997; POLETTI; GONÇALVES; MAZZARO, 2004).

Os achados com difração de raios X além de permitirem a identificação de estruturas em escala nanométrica, corroboram a suspeita da semelhança entre tecidos biológicos mamários de humanos e caninos.

4.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Os resultados encontrados com a técnica de espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier são visualizados através dos espectros de absorção, representados por picos em diferentes valores de números de onda. Os picos representam a porcentagem de absorbância e o valor do número de onda corresponde às bandas de absorção da vibração das moléculas da amostra.

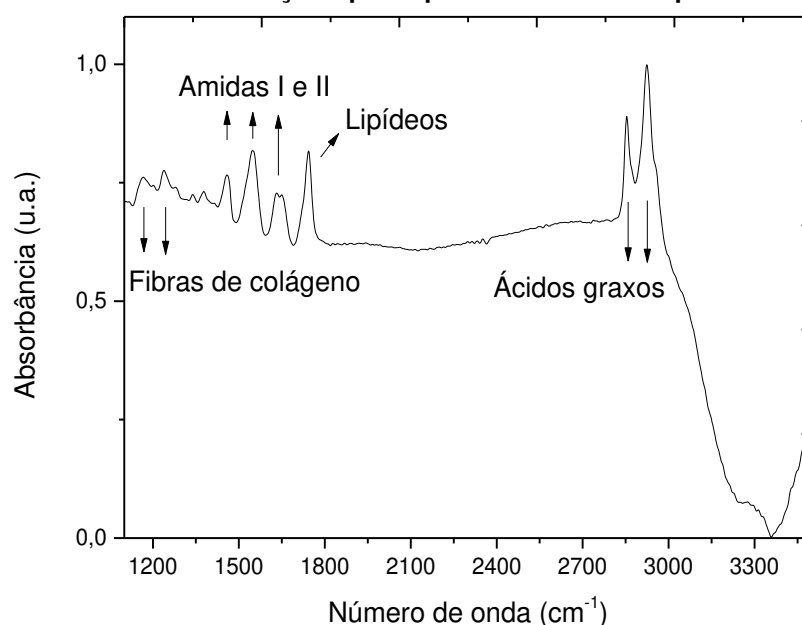
Os números de onda permitem a identificação das ligações químicas de estruturas que compõem a amostra. O propósito da avaliação com a técnica de FTIR é identificar estruturas maiores por meio das ligações químicas de moléculas, que vibram em frequências determinadas em literatura.

De maneira geral, foram encontradas bandas de absorção compreendidas dentro do intervalo de 1000 a 3100 cm^{-1} para os tecidos mamários caninos. Pode-se dizer que essa região é considerada como uma impressão digital dos tecidos mamários, sendo utilizadas para identificação dos mesmos (KOCHAN et al., 2015).

As bandas de absorção das regiões 1165 cm^{-1} , 1237 cm^{-1} e 1283 cm^{-1} correspondem às fibras de colágeno, que foram observados em diferentes tecidos mamários caninos, em especial os tecidos neoplásicos benignos e malignos (KUMAR; SHABI; GOORMAGHTIGH, 2014).

Foram encontradas bandas de absorção situadas em 1457 cm^{-1} , 1542 cm^{-1} e 1636 cm^{-1} que são característicos de bandas de proteína como amidas II e amidas I principalmente nos tecidos neoplásicos benignos e malignos, como demonstrado no Gráfico 8.

Gráfico 8 – Bandas de absorção típicas para os tecidos neoplásicos malignos



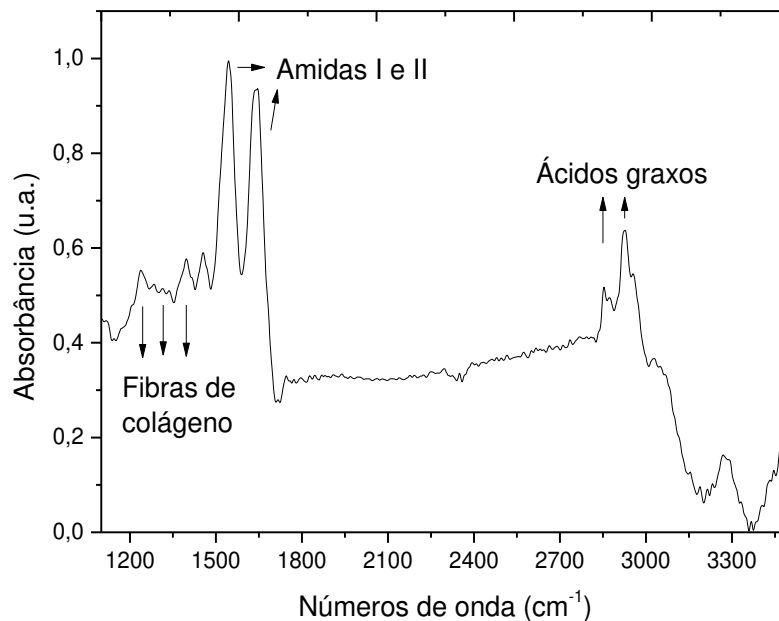
Fonte: Autoria Própria

As proteínas exercem papel fundamental para os organismos vivos. Amidas são polipeptídeos e sua identificação, na maioria dos casos, se dá pela identificação dos componentes C = O (no caso da amida I) e de N-H com a amida II (BARTH, 2007).

As amidas I e II podem fornecer informações estruturais importantes sobre o tecido, especialmente amida I devido a sua maior sensibilidade e porque traz informações sobre as dobras de proteínas e ligações de hidrogênio, revelando a presença de distúrbios em nível molecular. Foi encontrado também uma banda de absorção importante em 1742 cm^{-1} , que corresponde aos lipídios (KONG; YU, 2007).

Bandas de absorção ácidos graxos, relacionados às ligações de CH_2 e CH_3 podem ser identificados em 2850 cm^{-1} e 2911 cm^{-1} , respectivamente, como mostrado no Gráfico 9 (SIMONOVA; ILIANA, 2013).

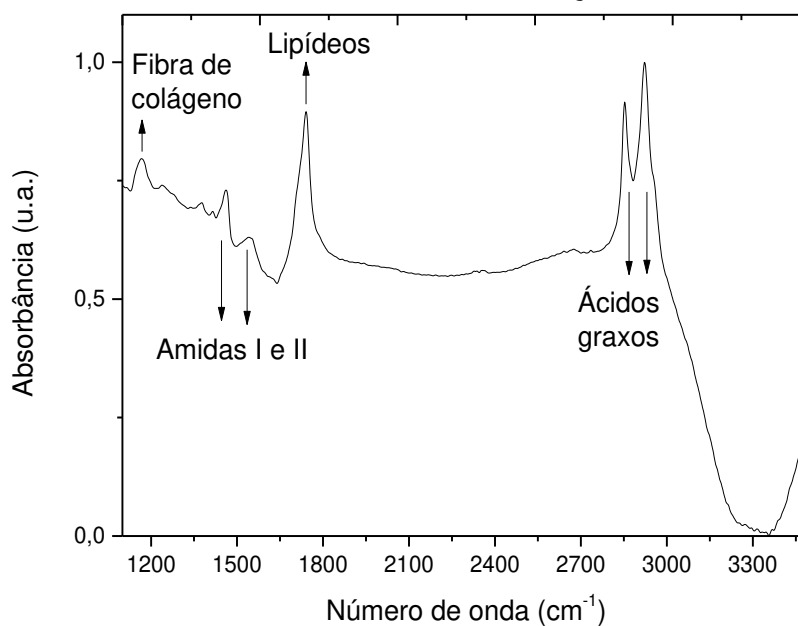
Gráfico 9 – Bandas de absorção típicas para os tecidos neoplásicos benignos



Fonte: Autoria Própria

As bandas correspondentes às amidas (I e II) e as fibras de colágeno têm pouca expressividade nos espectros de tecido adiposo, provando que este tecido é principalmente constituído por lipídios e ácidos graxos (Gráfico 10).

Gráfico 10 – Bandas de absorção



Fonte: Autoria Própria

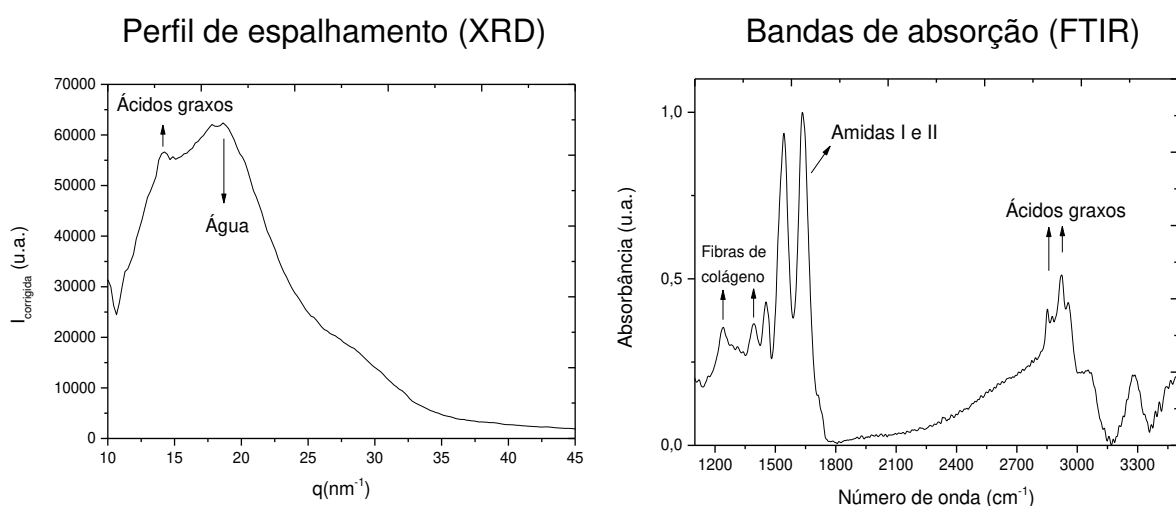
Os valores encontrados das bandas de absorção podem variar ligeiramente nos tecidos analisados devido a seu arranjo espacial, bem como suas formas de ligação.

Pequenas diferenças nos valores da banda de absorção diferentes tipos de tecidos podem ser ligados à forma como as proteínas e outros compostos na amostra estão dispostos. Além disso, a presença ou ausência de determinados picos pode indicar presença de compostos gerados por alterações moleculares. Portanto, a análise desses picos é uma maneira eficaz caracterizar tecidos.

4.3 COMBINAÇÃO ENTREAS TÉCNICAS DE XRD E FTIR

Os tecidos caninos neoplásicos malignos avaliados são, em sua maioria, adenocarcinomas. Um exemplo está no Gráfico 11, na qual são avaliados os dois espectros obtidos nas diferentes técnicas para a mesma amostra.

Gráfico 11 – Comparação entre XRD e FTIR para tecido neoplásico maligno



Fonte: Autoria Própria

Percebe-se um pico em torno de $q=13,9\text{nm}^{-1}$ no perfil de espalhamento, pico esse que está relacionado com os ácidos graxos presentes na amostra. Pode-se relacionar com os achados em FTIR, com as bandas de absorção na faixa de 2850cm^{-1} e 2911cm^{-1} de números de onda que são características das ligações CH_2 simétrica e assimétrica, relacionadas com os ácidos graxos.

Pode-se dizer que essa amostra de tecido neoplásico maligno também contém tecido adiposo na sua composição. Com relação ao pico $q=18,3\text{nm}^{-1}$ (XRD) relacionado à água, pode-se relacionar aos achados em FTIR, com os picos encontrados em 1457 cm^{-1} , 1542 cm^{-1} e 1636 cm^{-1} e também em 1239 cm^{-1} . Essa região está indicando que as estruturas das amidas I e II e fibras de colágeno estão presentes e em grande quantidade.

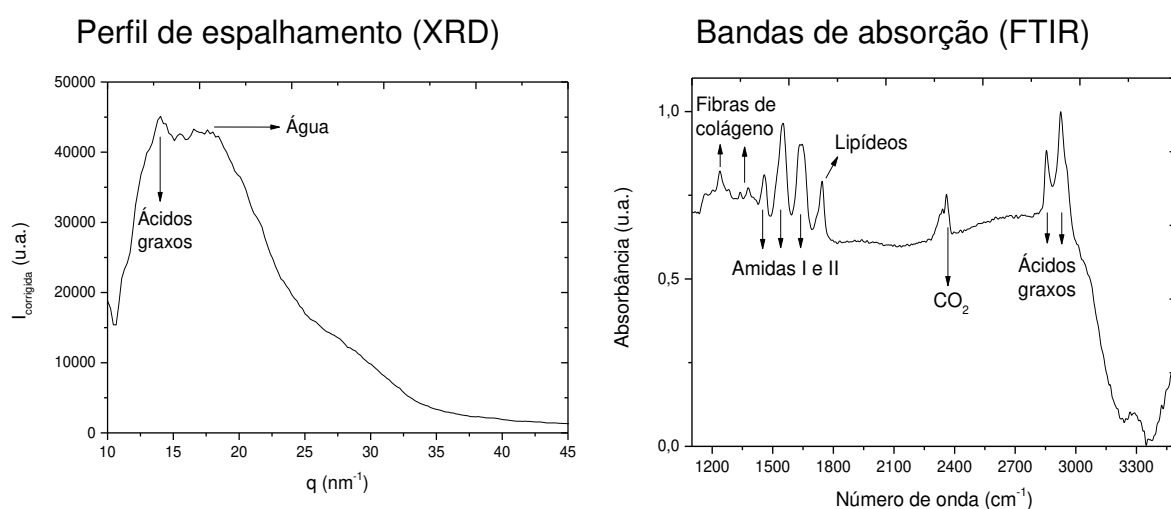
O pico da água da XRD está interligado à presença de tecido fibroglandular na amostra, o que é corroborado com as proteínas detectadas em FTIR.

A comparação entre os tecidos neoplásicos benignos encontrados na XRD e na FTIR está demonstrada no Gráfico 12. Os adenomas foram os tecidos mais analisados.

Diferente do tecido maligno, foi encontrada uma relação em que o pico dos ácidos graxos é mais intenso do que o da água para o tecido neoplásico benigno. Em contrapartida, usando a técnica de FTIR foi encontrada uma banda de absorção referente aos lipídeos, além das de ácido graxos em maior absorbância do que as de proteína.

A banda de absorção encontrada em aproximadamente 2350 cm^{-1} tem relação com a ligação de CO_2 e pode ser atribuída às condições experimentais como a presença desse gás no ar (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2010).

Gráfico 12 – Comparação entre XRD e FTIR para tecido neoplásico benigno



Fonte: Autoria Própria

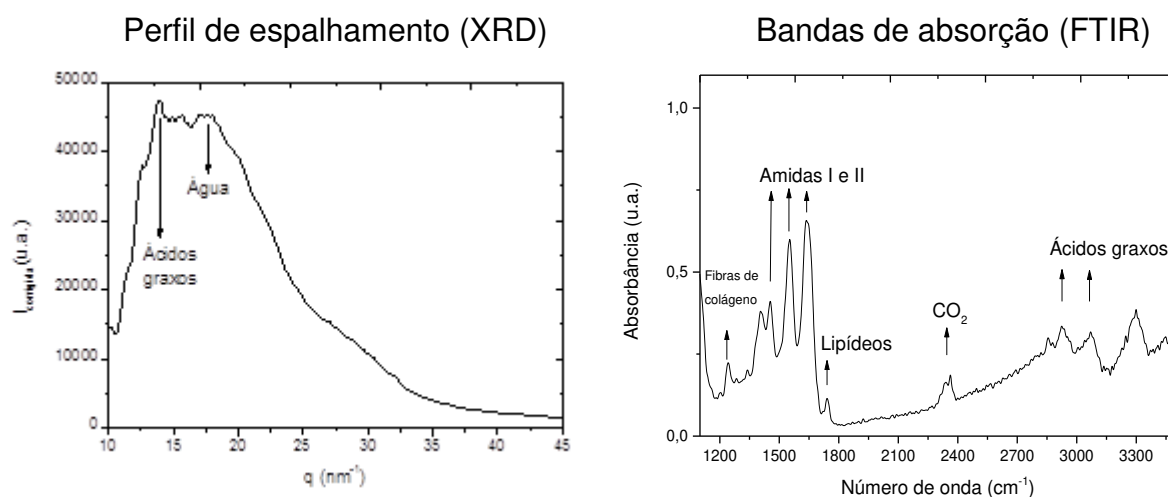
Pode-se dizer que a proporção de tecido adiposo e tecido fibroglandular é maior do que a do tecido neoplásico maligno nessa amostra.

O osteoma mamário é um tipo de tecido neoplásico benigno que difere a sua histologia se comparado aos adenomas mamários. Seu conteúdo ósseo o difere das composições dos adenomas, como mostrado no Gráfico 13.

Pode-se observar que as bandas de absorção referentes aos lipídeos e ácidos graxos tem pouca absorbância, sendo que as fibras acabam tendo maior visibilidade nessa amostra.

Isso demonstra que mesmo classificados como benignos, os tecidos apresentam composições distintas em nível microscópico.

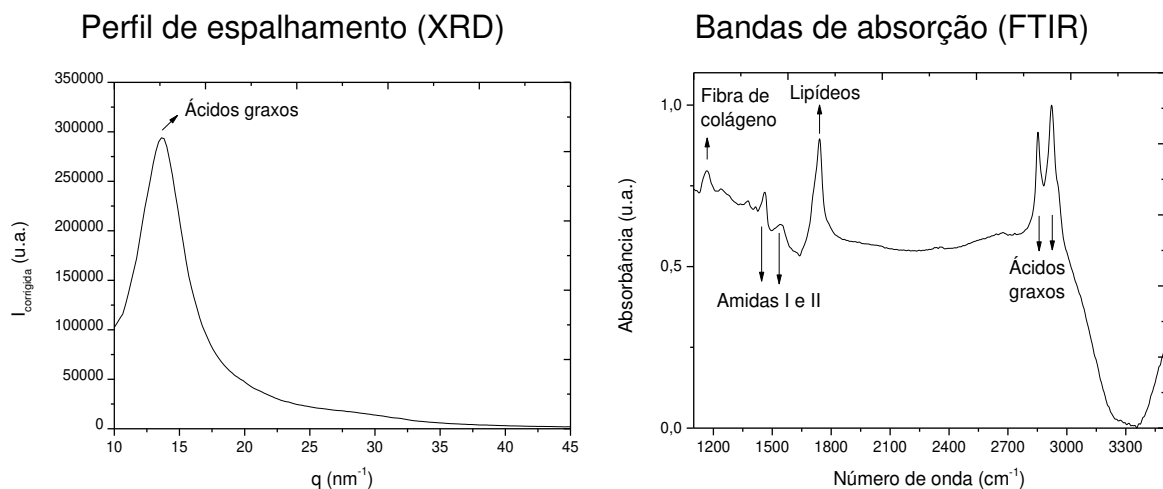
Gráfico 13 – Comparação entre XRD e FTIR para tecido neoplásico benigno (osteoma)



Fonte: Autoria Própria

O Gráfico 14 exemplifica a comparação entre as análises de tecido mamário adiposo com as técnicas de XRD e FTIR.

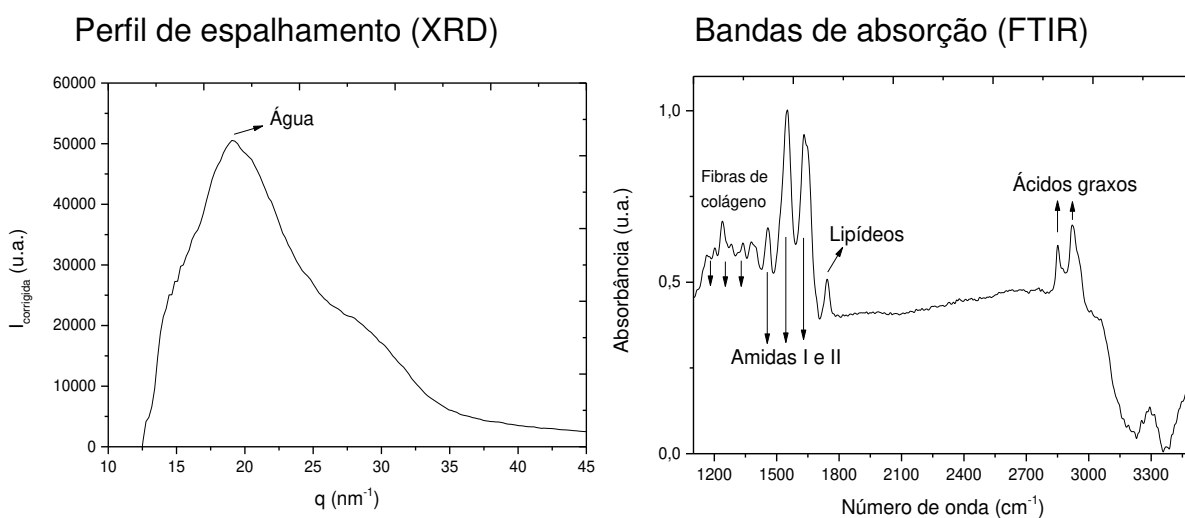
O tecido adiposo apresenta um pico único para XRD, em $q=13,9 \text{ nm}^{-1}$. Para a FTIR observa-se também os picos com alta absorbância das bandas de lipídeos e ácidos graxos, sendo assim facilmente diferenciado dos tecidos benignos e malignos.

Gráfico 14 - Comparação entre XRD e FTIR para tecido adiposo

Fonte: Autoria Própria

Outro tipo de modificação dos tecidos mamários caninos é a hiperplasia, que pode ser considerada como uma modificação pré-neoplásica e que está exemplificada no Gráfico 15.

Esse tipo de alteração é caracterizado estruturalmente por abundância de tecido fibroglandular, verificado pelo pico correspondente à água no perfil de espalhamento. Para a avaliação em FTIR, observa-se maior absorbância das amidas e das fibras de colágeno do que as bandas relacionadas à tecido adiposo.

Gráfico 15 - Comparação entre XRD e FTIR para tecido hiperplásico

Fonte: Autoria Própria

Pode-se inferir que nesse momento e nessa amostra, as alterações hiperplásicas acontecem primariamente nos tecidos fibrosos pois a proporção desse tecido é maior do que com o tecido adiposo.

Dessa forma a avaliação dos tecidos mamários caninos por meio das técnicas de XRD e FTIR permite complementar as informações estruturais dos tecidos neoplásicos em diferentes escalas de tamanho.

A identificação na XRD permite caracterizar o tipo de tecido presente em uma amostra de acordo com as moléculas identificadas (espalhamento identificado em diferentes posições de momento transferido). Já a FTIR permite a avaliação das vibrações de ligações químicas (absorção da radiação infravermelha), e dessa forma pode-se caracterizar estruturas maiores, por exemplo as proteínas. Sabe-se também que o valor diferente de cada banda de absorção é causado pelas diferentes ligações químicas da amostra.

Logo fica plausível detectar as diferenças morfológicas e em nível molecular, causadas por crescimentos anormais de células, como é o caso das neoplasias mamárias caninas.

5 CONCLUSÃO

Nesse trabalho foram utilizadas duas técnicas analíticas para identificação de alterações moleculares de tecidos mamários caninos, a difração de raios X (XRD) e a espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Pode-se afirmar que as duas técnicas possibilitam a identificação de estruturas que caracterizam os tecidos mamários caninos, em especial às alterações moleculares que permeiam os tecidos neoplásicos.

As duas técnicas se complementam pois identificam mudanças em diferentes escalas de comprimento, a XRD com moléculas menores e a FTIR para moléculas maiores.

5.1 SOBRE A DIFRAÇÃO DE RAIOS X: PERFIS DE ESPALHAMENTO

A partir dos perfis de espalhamento dos tecidos mamários caninos normais e neoplásicos, a identificação de estruturas referentes aos tecidos mamários caninos, como a presença de tecido adiposo por meio da identificação de moléculas de ácidos graxos e de moléculas de água que estão presentes em tecido fibroglandular foi possível.

A proporção da intensidade dos diferentes tecidos pode trazer informações com relação à classificação histopatológica. Foi possível detectar também que as alterações pré-neoplásicas, como a hiperplasia mamária podem ser identificadas com o uso da difração de raios X.

5.2 SOBRE A ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER: BANDAS DE ABSORÇÃO

Dos espectros de FTIR dos tecidos mamários caninos foi possível a identificação de moléculas características de cada tipo de tecido normal ou neoplásicos.

Estruturas como fibras de colágenos, proteínas ligadas com as amidas I e II, lipídeos e ácidos graxos foram identificadas nos diferentes espectros adquiridos.

Foi possível também observar as diferenças de bandas de absorção identificadas para tecidos neoplásicos benignos, malignos e adiposo, inclusive na absorbância dessas bandas nos diferentes tecidos.

Dessa forma, pode-se afirmar que a caracterização dos espectros de absorção típicos para cada tipo de tecido mamário canino é viável usando a técnica de FTIR.

5.3 SOBRE A COMPLEMENTARIEDADE ENTRE FTIR E XRD NO ESTUDO DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS

As estruturas identificadas nas técnicas de XRD e FTIR estão em escala de tamanho diferentes. A união dos resultados das duas técnicas possibilita a obtenção de uma visão mais completa do tecido.

A correlação dos achados permitiu conhecer mais profundamente os tecidos mamários caninos, bem como os tecidos neoplásicos. Sabe-se que as neoplasias produzem alterações moleculares nesses tecidos, e uma as técnicas utilizadas nesse trabalho possibilitaram essa visualização.

Um exemplo é a identificação na FTIR de fibras de colágeno e amidas que são exemplos de proteínas, e que com a XRD só é possível observar a presença de água. A complementariedade dessas informações pode levar à outros estudos e percepções dos tipos histológicos das neoplasias.

Com relação aos ácidos graxos, em FTIR, os mesmos sempre foram identificados nas amostras, porém a banda de absorção dos lipídeos nem sempre foi expressiva. Com a XRD, nos perfis de espalhamento, só há uma informação disponível com relação à essas moléculas, o pico de $q=13,9\text{nm}^{-1}$.

A intensidade tanto dos picos nos perfis de espalhamento quanto nas bandas de absorção também pode trazer informações com relação à concentração das moléculas detectadas, sendo que esse dado pode contribuir para informações histológicas.

Por fim, pode-se concluir que a complementariedade das técnicas de XRD e FTIR auxilia na identificação de alterações moleculares dos tecidos mamários caninos

neoplásicos e saudáveis, sendo que a diferença na escala de tamanho de estruturas identificadas em cada técnica traz informações que enriquecem a avaliação dos tecidos.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Pretende-se, com os dados obtidos, fazer a análise multivariada dos parâmetros retirados dos espectros e assim classificar estatisticamente os tecidos mamários caninos neoplásicos e saudáveis.

REFERÊNCIAS

ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de química: Questionando a vida moderna e o meio ambiente**. Porto Alegre: Artmed, 2012.

ATTIX, F. H. **Introduction to radiological physics and radiation dosimetry**. [s.l.] Wiley-VCH, 2004.

BANKS, W. J. **Histologia Veterinária Aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992.

BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1767, n. 9, p. 1073–1101, 2007.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo - Patologia Geral**. 5. ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 2013.

CASSALI, G. D. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 4, n. 2, p. 153–180, 2011. Disponível em: <<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20113227023>>.

CONCEIÇÃO, A.; ANTONIASSI, M.; POLETTI, M. Identificação de patologias mamárias através do espalhamento elástico de raios X. **Revista Brasileira de Física Médica**, v. 4, n. 3, p. 19–22, 2010.

CONCEIÇÃO, A. L. C. **Caracterização estrutural de tecidos mamários normais e neoplásticos através de espalhamento de raios X**. [s.l.: s.n.].

DALECK, C. R. et al. Aspectos clínico e cirúrgicos do tumor mamário canino: clinical and surgical evolution. **Ciência Rural**, v. 28, n. 1, p. 95–100, 1 mar. 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84781998000100016&lng=pt&tlng=pt>.

DE OLIVEIRA, O. R. **Determinação experimental dos perfis de espalhamento de tecidos mamários (normais e alterados) e sua potencialidade como ferramenta de diagnóstico**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59135/tde-20042010-101014/en.php>>.

DYCE, K. M. et al. **Tratado de anatomia veterinária**. [s.l.] Elsevier, 2004.

EURELL, J. A.; FRAPPIER, B. L. **Histologia Veterinária de Dellmann**. 6. ed. [s.l.] Manole, 2012.

EVANS, S. H. et al. Measurement of small-angle photon scattering for some breast tissues and tissue substitute materials. **Physics in Medicine and Biology**, v. 36, n. 1, p. 7–18, 1 jan. 1991. Disponível em: <<http://stacks.iop.org/0031-9155/36/i=1/a=002?key=crossref.e5b3f8bc752face3d3d52616b7ebfb8a>>.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. [s.l.] Elsevier, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa nacional de saúde 2013**. [s.l.: s.n.]

KIDANE, G. et al. X-ray scatter signatures for normal and neoplastic breast tissues. **Physics in Medicine and Biology**, v. 44, n. 7, p. 1791–1802, 1 jul. 1999. Disponível em: <<http://stacks.iop.org/0031-9155/44/i=7/a=316?key=crossref.45950787247c651b5be2f34f9822c53c>>.

KOCHAN, K. et al. Comparison of FTIR transmission and transfection substrates for canine liver cancer detection. **Analyst**, v. 140, n. 7, p. 2402–2411, 2015.

KONG, J.; YU, S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 39, n. 8, p. 549–559, 2007.

KUMAR, S.; SHABI, T. S.; GOORMAGHTIGH, E. A FTIR imaging characterization of fibroblasts stimulated by various breast cancer cell lines. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, 2014.

KUMAR, V. et al. **Patologia Bases Patológicas das Doenças**. [s.l.] Elsevier Health Sciences, 2010.

LEHNINGER, A. L. **Bioquímica: Componentes moleculares das células**. São Paulo: Edgard Blücher, 2000.

LIDE, D. R. **Handbook of Chemistry and Physics**. [s.l.] CRC Press, 2004.

LIMA, C. A. **CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE LESÕES NEOPLÁSICAS VIA ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER.** [s.l.: s.n.].

LODISH, H. et al. **Biologia Celular e Molecular.** Porto Alegre: Artmed, 2014.

MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Bases da patologia em Veterinária 5ª Ed.** [s.l.: s.n.]

MILBERG, M. E. Transparency Factor for Weakly Absorbing Samples in X-Ray Diffractometry. **Journal of Applied Physics**, v. 29, n. 1, p. 64–65, 15 jan. 1958. Disponível em: <<http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.1722945>>.

OLIVEIRA, L. O. de et al. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. **Acta Scientiae Veterinariae**, p. 105–110, 2003. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/19802>>.

OLIVEIRA, G. M. de. **Simetria de moléculas e cristais : fundamentos teóricos da espectroscopia vibracional.** [s.l.] Grupo A - Bookman, 2009.

POLETTI, M. E.; GONÇALVES, O. D.; MAZZARO, I. Coherent and incoherent scattering of 17.44 and 6.93 keV x-ray photons scattered from biological and biological-equivalent samples: characterization of tissues. **X-Ray Spectrometry**, v. 31, n. 1, p. 57–61, 1 jan. 2002. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/xrs.538>>.

POLETTI, M. E.; GONÇALVES, O. D.; MAZZARO, I. Measurements of X-ray scatter signatures for some tissue-equivalent materials. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 213, p. 595–598, 1 jan. 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168583X03016768>>.

RIBAS, C. R. et al. ALTERAÇÕES CLÍNICAS RELEVANTES EM CADELAS COM NEOPLASIAS MAMÁRIAS ESTADIADAS. **Archives of Veterinary Science**, v. 20, n. 2, p. 156–163, 2015.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** [s.l.] Grupo Gen - LTC, 2010.

SIMONOVA, D.; ILIANA. Biotechnology & Biotechnological Equipment Application of Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Tumor Diagnosis MB MEDICAL BIOTECHNOLOGY. **Biotechnology & Biotechnological Equipment Biotechnol. & Biotechnol. eq. Biotechnol. & Biotechnol. eq.**, v. 276, n. 276, p. 4200–4207, 2013. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=tbeq20%0Ahttps://doi.org/10.5504/BBEQ.2013.0106>>.

SMITH, B. C. **Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy.** [s.l.: s.n.]

SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 33, n. 3, p. 573–96, maio 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12852237>>.

SORENMO, K. U. et al. Development, Anatomy, Histology, Lymphatic Drainage, Clinical Features, and Cell Differentiation Markers of Canine Mammary Gland Neoplasms. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 85–97, 7 jan. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21147765>>.

TARTARI, A. et al. Molecular differential cross sections for x-ray coherent scattering in fat and polymethyl methacrylate. **Physics in Medicine and Biology**, v. 42, n. 12, p. 2551–2560, 1 dez. 1997. Disponível em: <<http://stacks.iop.org/0031-9155/42/i=12/a=018?key=crossref.2352fc1d643903978b640c6f352a0eff>>.

TURNER, J. E. (James E. **Atoms, radiation, and radiation protection.** [s.l.] Wiley-VCH, 2007.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level.** [s.l.: s.n.]

WASEDA, Y.; MATSUBARA, E.; SHINODA, K. **X-Ray Diffraction Crystallography.** [s.l.] Springer New York, 2011.

WERNER, P. **Patologia Geral Veterinária Aplicada.** 1. ed. [s.l.] Roca, 2011.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia Molecular Básica.** Porto Alegre: Artmed, 2014.

ANEXO A - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

APÊNDICE A - Artigo publicado na Revista *Radiation Physics and Chemistry*

APÊNDICE B - Artigo em revisão na Revista *Radiation Physics and Chemistry*

