

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

**NATÁLIA MARIANO PRADO DE OLIVEIRA**

**MAPEAMENTO DE TUMORES MAMÁRIOS CANINOS E TECIDOS  
ADJACENTES POR MEIO DA MICRODIFRAÇÃO DE RAIOS X**

**DISSERTAÇÃO**

**CURITIBA**

**2019**

NATÁLIA MARIANO PRADO DE OLIVEIRA

**MAPEAMENTO DE TUMORES MAMÁRIOS CANINOS E TECIDOS  
ADJACENTES POR MEIO DA MICRODIFRAÇÃO DE RAIOS X**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do grau de “Mestre em Ciências” – Área de Concentração: Engenharia Biomédica.

Orientador: André Luiz Coelho Conceição

Co-orientador: Pedro Zambianchi Jr.

**CURITIBA**

**2019**

#### **Dados Internacionais de Catalogação na Publicação**

O48m Oliveira, Natália Mariano Prado de  
Mapeamento de tumores mamários caninos e tecidos adjacentes por meio da microdifração de raios X [recurso eletrônico] / Natália Mariano Prado de Oliveira.-- 2019.

1 arquivo eletrônico (83 f.) : PDF ; 6,20 MB.

Modo de acesso: World Wide Web.

Texto em português com resumo em inglês.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial. Área de Concentração: Engenharia Biomédica, Curitiba, 2019.

Bibliografia: f. 75-80.

1. Engenharia elétrica - Dissertações. 2. Difração de Raios X. 3. Liofilização. 4. Raios X - Espalhamento. 5. Tumores em animais - Diagnóstico. 6. Cães - Histologia. 7. Histologia - Doenças. 8. Mamas - Câncer - Modelos animais. 9. Engenharia biomédica. I. Conceição, André Luiz Coelho, orient. II. Zambianchi Junior, Pedro, coorient. 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 do Câmpus Curitiba – UTFPR**  
**Bibliotecária: Luiza Aquemi Matsumoto CRB-9/794**

## TERMO DE APROVAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº 823

A Dissertação de Mestrado intitulada “**Mapeamento de Tumores Mamários Caninos e Tecidos Adjacentes Por Meio da Microdifração de Raios X**” defendida em sessão pública pelo(a) candidato(a) **Natália Mariano Prado de Oliveira**, no dia **22 de março de 2019**, foi julgada para a obtenção do título de Mestre 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). Irineu Mazzaro - (UFPR)

Prof(a). Dr(a). Anna Sílvia P. Setti da Rocha - (UTFPR)

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, 22 de março de 2019.

## AGRADECIMENTOS

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

Primeiramente, meus sinceros agradecimentos aos professores Dr. André Conceição e Dr. Pedro Zambianchi pela orientação, não apenas neste trabalho, mas nos mais diversos âmbitos da Academia.

Ao Departamento de Física da Universidade Federal do Paraná, por disponibilizar o equipamento de microdifração de raios X e ao técnico responsável, Daniel da Silva Costa, pela orientação em seu uso.

Ao Departamento Acadêmico de Química e Biologia da UTFPR, pela disponibilização da unidade Liofilizadora.

Ao professor Dr. Irineu Mazzaro, por auxiliar no desenvolvimento da metodologia aplicada, além de se mostrar presente e prestativo nos momentos finais de mais apuro.

Ao professor Renato Silva de Sousa, do Departamento de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Paraná – Campus Agrárias, por realizar o laudo histopatológico e disponibilizar as amostras estudadas.

À professora Dr<sup>a</sup>. Jaqueline Kappke Zambianchi, por me apresentar ao universo da pesquisa científica e me acompanhar nessa jornada.

Aos colegas do Grupo de Imagens e Espectroscopia de Raios X da UTFPR por todo o suporte, em especial à Alana F. Fagundes e minha melhor amiga, Camila de Almeida Salvego.

À Moema Zuccherelli, cuja generosidade possibilitou a escrita dessa dissertação.

À João Paulo Branco de Souza, por todo o carinho e amor incondicionais, além do constante exercício lógico estimulado em nosso cotidiano.

Finalmente, à minha família, especialmente à mamãe e papai, pela sólida educação e suporte concedidos, sempre repletos de esmero.

*“A matemática pura é, à sua maneira, a poesia das ideias lógicas.”*

Emmy Noether

## RESUMO

OLIVEIRA, N. M. P. MAPEAMENTO DE TUMORES MAMÁRIOS CANINOS E TECIDOS ADJACENTES POR MEIO DA MICRODIFRAÇÃO DE RAIOS X. 83 f. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2019.

O modelo canino é indicado para aplicações translacionais com humanos, devido à alta incidência de tumores espontâneos, exposição aos mesmos fatores ambientais e porque o desenvolvimento da doença apresenta características muito similares. Portanto, é possível presumir que as alterações estruturais observadas no mapeamento de tumores caninos podem ser comparadas ao câncer humano. O espalhamento de raios X em médio ângulo (WAXS) fornece informações a respeito na organização molecular dos tecidos, que podem contribuir para o entendimento da infiltração de tumores, levando a diagnósticos precisos e técnicas terapêuticas mais eficazes. O objetivo desse trabalho foi mapear as características estruturais de tecidos adjacentes a tumores mamários caninos, benignos e malignos, a fim de se determinar a abrangência de alterações estruturais, utilizando a microdifração de raios X em médio ângulo. Cinco amostras foram investigadas, incluindo um adenoma simples, um adenoma policístico, um carcinoma sólido e dois adenocarcinomas. Foram conservadas em formalina em temperatura ambiente e cobertas com uma fina camada de filme *Kapton* durante as medidas. Em seguida, as amostras foram liofilizadas e novamente submetidas ao experimento, a fim de se determinar a influência da água no processo de espalhamento elástico. Foi utilizado um difrattômetro D8 Discover da Bruker, com uma fonte de microfoco de cobre ( $K_{\alpha} = 8,04$  keV) e um detector de área Vantec 500. O momento transferido analisado foi de  $5,8 \text{ nm}^{-1}$  a  $41,3 \text{ nm}^{-1}$  com passos de  $0,005^{\circ}$  para as amostras fixadas em formalina e  $8,7 \text{ nm}^{-1}$  a  $39,1 \text{ nm}^{-1}$ , com passos de  $0,01^{\circ}$  para as liofilizadas, ambos com 600 segundos de exposição por passo. Fatores de correção relacionados à atenuação pela própria amostra e contribuições espúrias foram aplicados. Regiões de tecido fibroglandular apresentaram um pico principal em torno de  $q = 19,8 \text{ nm}^{-1}$ , associado à distância entre moléculas de água vizinhas. Um pico menos intenso em  $q = 30 \text{ nm}^{-1}$  também é observado, tanto nos perfis predominantemente glandulares quanto nos adiposos, e pode corresponder à conexão de hidroxilas entre moléculas de água ou ao espalhamento harmônico do pico de ácidos graxos. Tecidos adiposos apresentaram um pico mais estreito em torno de  $q = 13,8 \text{ nm}^{-1}$ , correspondente ao espaçamento da cadeia de ácidos graxos. Foi possível concluir que diferentes pontos de uma mesma amostra apresentaram perfis bastante variados, provando o quão heterogêneos são os tecidos ao redor do tumor. A redução da intensidade nas medidas pós-liofilização foi variada de ponto para ponto, mostrando que a perda de água é proporcional à quantidade de tecido fibroglandular na região. A supressão do pico em  $q = 19,8 \text{ nm}^{-1}$  nas amostras liofilizadas comprova a relação deste com as moléculas de água.

**Palavras-chave:** Microdifração de raios X; Neoplasias mamárias animais; Cães; Liofilização

## ABSTRACT

OLIVEIRA, N. M. P.. MAPPING CANINE MAMMARY TUMORS AND ADJACENT TISSUES WITH X-RAY MICRODIFFRACTION. 83 f. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2019.

Canine mammary tumors have been suggested as a model to study humans due to its high incidence rates, exposure to the same environmental factors and because both present similar development characteristics. Therefore, it is possible to assume that structural changes found in canine tumor monitoring can be extended to human cancer. Wide-angle X-ray scattering (WAXS) provides information regarding the molecular organization of tissues, which can increase the understanding of cancer infiltration and thus aid in its diagnosis and treatment. The purpose of this study was to map the structural changes in canine mammary tissues surrounding benign and malignant tumors, using X-ray microdiffraction. Five samples were investigated, including simple and polycystic adenoma, solid carcinoma and two adenocarcinomas. These were stored in formalin at room temperature and covered with a thin layer of Kapton film during the experiment. After measuring five points in each sample, these were lyophilized, in order to study the influence of water in the scattering process. Measurements were carried out in a D8 Discover Bruker Diffractometer, with a microfocus source ( $K_{\alpha} = 8.04$  keV), and a 2D Vantec 500 detector. The momentum transfer ranged from  $5.8 \text{ nm}^{-1}$  to  $41.3 \text{ nm}^{-1}$ , with steps of  $0.005^{\circ}$  for samples fixed in formalin, and from  $8.7 \text{ nm}^{-1}$  to  $39.1 \text{ nm}^{-1}$ , with  $0.01^{\circ}$  steps for the lyophilized ones, both with 600 seconds of exposition per step. Correction factors related to self-attenuation in the sample and external contributions were applied. Regions of glandular tissue peaked at  $q = 19.8 \text{ nm}^{-1}$ , which is related to the distance between oxygen particles in neighboring water molecules. A less intense peak around  $q = 30.0 \text{ nm}^{-1}$  is also noticeable, both in glandular and adipose tissues, and can be related either to the connection of hydroxyl groups between water molecules or to the harmonic scattering of the fatty acids' peak. Adipose tissue presented a narrower peak at  $q = 13.9 \text{ nm}^{-1}$ , consistent with the fatty acids chain. In conclusion, the analyzed spots presented very different profiles, proving how heterogeneous the tumoral sample is. By analyzing the lyophilized samples, it is observed that points containing more fibroglandular tissue lose more hydric content than others. In these samples the peak  $q = 19.8 \text{ nm}^{-1}$  was suppressed, reinforcing its link to water molecules.

**Keywords:** X-ray microdiffraction; Animal mammary neoplasms; Dogs; Freeze drying



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	– Cadeia de mamas canina e sistema linfático simplificado, incluindo os cinco pares mamários e sua nomenclatura. ....	17
FIGURA 2	– Anatomia da mama canina e papila. Os ductos mamários conectam as estruturas funcionais da mama até o exterior da papila, para alimentação da prole. ....	18
FIGURA 3	– Anatomia histológica dos ductos mamários, mostrando a camada de células epiteliais, mioepiteliais e membrana basal. ....	19
FIGURA 4	– Glândula mamária inativa vs ativa. ....	20
FIGURA 5	– Ductos das glândulas mamárias: normal e evolução das lesões proliferativas. ....	22
FIGURA 6	– Lâminas histológicas de um carcinoma sólido (à esquerda) e um adenoma simples (à direita), duas afecções neoplásicas estudadas neste trabalho. ..	23
FIGURA 7	– Componentes de campo elétrico e magnético das ondas eletromagnéticas. ....	26
FIGURA 8	– Ilustração dos principais componentes de um tubo de raios X convencional. ....	27
FIGURA 9	– Espectro de <i>bremssstrahlung</i> (filtrado) e radiação característica de um tubo com alvo de tungstênio operando com 90 keV. ....	29
FIGURA 10	– Espelhos de Montel, apresentando as multicamadas alternadas de material espaçador e absorvedor, que agem como centros espalhadores de distância $d$ . ....	31
FIGURA 11	– Sistema óptico Montel. (a) Colimação - espelho parabólico (b) Focalização - espelho elíptico (c) Monocromatização do feixe. ....	32
FIGURA 12	– Coeficiente de atenuação de massa total e dos efeitos Rayleigh, Fotoelétrico, Compton, Produção de Pares, em função da energia (em tecidos moles, em média $Z = 7$ ). ....	33
FIGURA 13	– Cinemática do efeito fotoelétrico. À esquerda observa-se um fóton transmitindo toda sua energia para o elétron, ejetando-o do átomo. À direita está representado o efeito em cascata de emissão de fótons característicos devido à lacuna deixada pelo fotoelétron. ....	34
FIGURA 14	– Cinemática do efeito Compton. Um fóton incidente interage com um elétron de camada mais externa da eletrosfera transferindo a ele parte de sua energia, seguindo com energia menor e trajetória alterada por um ângulo $\theta$ . ....	35
FIGURA 15	– Cinemática para o espalhamento elástico. O fóton incidente interage com o átomo e é espalhado com mesma energia e comprimento de onda, mas direção alterada. ....	36
FIGURA 16	– Difração de raios X. Fótons de comprimento de onda $\lambda$ incidem com ângulo $\theta$ em um cristal formado por centros espalhadores espaçados por uma distância $d$ . ....	39
FIGURA 17	– Comparação entre perfis de espalhamento típicos para materiais cristalinos, amorfos e gasosos. ....	40
FIGURA 18	– Cones de difração representados em um espaço tridimensional (plano do difractômetro e eixo Z). Observa-se o alcance de captação dos detectores pontual, linear e 2D. ....	42
FIGURA 19	– Alcance de captação do padrão difrativo dos detectores cintilador, linear e 2D. ....	43

FIGURA 20	– Mecanismo de detecção <i>microgap</i> . . . . .	43
FIGURA 21	– Mecanismos direto e indireto de dano ao DNA celular, causado por radiação ionizante. . . . .	44
FIGURA 22	– Elétron aprisionado entre moléculas de água orientadas. Este elétron é chamado elétron aquoso. . . . .	45
FIGURA 23	– Produtos reativos da interação da radiação ionizante com moléculas de água: (a) elétron aquoso; (b) radical de hidroxila; (c) radical de hidrogênio; (d) íon de hidroxila; (e) íon de hidrogênio. . . . .	46
FIGURA 24	– Diagrama dos estados físicos da água, com destaque para a sublimação, que ocorre com a redução da pressão e aumento da temperatura. . . . .	47
FIGURA 25	– Esquematização do funcionamento de uma unidade liofilizadora. . . . .	48
FIGURA 26	– Porta-amostra 1: utilizado para as amostras fixadas em formalina. (a) Dimensões do PA. (b) Posicionamento da amostra com filme <i>Kapton</i> . . . . .	50
FIGURA 27	– Porta-amostra 2: utilizado para as amostras liofilizadas, feito de alumínio. (a) Dimensões do segundo PA. (b) Posicionamento da amostra, fixada por pequenos ganchos de aço. . . . .	50
FIGURA 28	– Arranjo experimental do experimento em modo reflexão, ilustrando os principais componentes: tubo de raios X, sistema óptico de colimação, focalização e monocromatização, sistema laser-câmera de alinhamento, porta-amostra e detector 2D. . . . .	51
FIGURA 29	– Integração dos anéis de Debye para obtenção de dados unidimensionais com o software <i>Diffract.suite EVA 4.0</i> - figura meramente ilustrativa. . . . .	52
FIGURA 30	– Seleção das variáveis para análise dos perfis de espalhamento. . . . .	54
FIGURA 31	– Exemplo de perfis obtidos para a mesma região de uma amostra fixada em formalina e após liofilização. A diferença no número de contagens impossibilita a caracterização do perfil fixado. . . . .	55
FIGURA 32	– Perfis de espalhamento das contribuições espúrias. (a) Filme <i>Kapton</i> , usado nas amostras em estado fixado e (b) alumínio, material do PA usado nas amostras liofilizadas. . . . .	56
FIGURA 33	– Amostra 1: adenoma simples, com indicação dos pontos analisados (a). Os perfis de espalhamento obtidos no estado fixado em formalina e liofilizado são apresentados de (b) a (f), com as cores correspondentes aos pontos na fotografia. . . . .	57
FIGURA 34	– Amostra 2: adenoma policístico, com indicação dos pontos analisados (a). Os perfis de espalhamento obtidos no estado fixado em formalina e liofilizado são apresentados de (b) a (f), com as cores correspondentes aos pontos na fotografia. . . . .	60
FIGURA 35	– Amostra 3: adenocarcinoma simples - grau I, com indicação dos pontos analisados (a). Os perfis de espalhamento obtidos no estado fixado em formalina e liofilizado são apresentados de (b) a (f), com as cores correspondentes aos pontos na fotografia. . . . .	62
FIGURA 36	– Amostra 4: adenocarcinoma simples - grau I, com indicação dos pontos analisados (a). Os perfis de espalhamento obtidos no estado fixado em formalina e liofilizado são apresentados de (b) a (f), com as cores correspondentes aos pontos na fotografia. . . . .	64
FIGURA 37	– Comparação entre os perfis dos pontos P1 da amostra 3 e P2 da amostra 4, ambas adenocarcinomas, na região dérmica da papila mamária. . . . .	64
FIGURA 38	– Amostra 5: carcinoma sólido - grau I, com indicação dos pontos analisados	

	(a). Os perfis de espalhamento obtidos no estado fixado em formalina e liofilizado são apresentados de (b) a (f), com as cores correspondentes aos pontos na fotografia. ....	66
FIGURA 39	– Comparação entre os perfis de espalhamento obtidos no presente trabalho e outros publicados na literatura. (a) Tecido mamário humano fibroglandular. (b) Tecido mamário humano adiposo. ....	67
FIGURA 40	– Comparação entre os perfis obtidos no presente trabalho com os publicados na literatura para tecido mamário canino (a) fibroglandular e (b) adiposo. ....	68
FIGURA 41	– Comparação entre o perfil obtido no presente trabalho com o publicado por Conceição <i>et al</i> (2019) para tecido mamário normal liofilizado. ....	69
FIGURA 42	– Perfis de espalhamento obtidos para os primeiros pontos analisados de cada amostra e os mesmos pontos (P1-b) repetidos ao final do experimento. ...	70

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	– Sistema de estadiamento clínico TNM .....	22
TABELA 2	– Características de um modelo ideal para estudos de câncer e comparação com os modelos de cultura de células <i>in vitro</i> , camundongos e cães .....	25
TABELA 3	– Parâmetros técnicos típicos em tubos de raios X convencionais e de microfoco. ....	30
TABELA 4	– Sistemas ópticos usados na produção de microfexes de raios X .....	31
TABELA 5	– Detectores pontuais, lineares e de área comumente utilizados para raios X	41
TABELA 6	– Parâmetros obtidos a partir dos perfis da amostra 1 em estado fixado .....	58
TABELA 7	– Parâmetros obtidos a partir dos perfis da amostra 2 em estado fixado .....	59
TABELA 8	– Parâmetros obtidos a partir dos perfis da amostra 3 em estado fixado .....	61
TABELA 9	– Parâmetros obtidos a partir dos perfis da amostra 4 em estado fixado .....	63
TABELA 10	– Parâmetros obtidos a partir dos perfis da amostra 5 em estado fixado .....	65
TABELA 11	– Caracterização dos perfis obtidos neste trabalho em comparação com outros autores, a partir dos parâmetros: área, FWHM e centro dos picos. ....	68
TABELA 12	– Comparação dos parâmetros de perfis de espalhamento antes e após irradiação. ....	70

## LISTA DE SIGLAS

AD-XRD	<i>Angle-dispersive X-ray diffraction</i> (Difração de raios X dispersiva em ângulo)
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
ED-XRD	<i>Energy-dispersive X-ray diffraction</i> (Difração de raios X dispersiva em energia)
FWHM	<i>Full width at half maximum</i> (Largura à meia altura)
SAXS	<i>Small-angle X-ray scattering</i> (Espalhamento de raios X em baixos ângulos)
WAXS	<i>Wide-angle X-ray scattering</i> (Espalhamento de raios X em médios ângulos)
OMS	Organização Mundial da Saúde
XRD	<i>X-ray diffraction</i> (Difração de raios X)

## LISTA DE SÍMBOLOS

A	Massa atômica
d	Distância entre centros espalhadores
$h$	Constante de Planck
$I_{corrigida}$	Intensidade relativa corrigida
$I_{exp}(q)$	Intensidade experimental em função de (q)
$I_{ar}(q)$	Intensidade do ar em função de (q)
$I_k(q)$	Intensidade do filme <i>Kapton</i> em função de (q)
$T_k$	Fator de transmissão do filme <i>Kapton</i> = 0,976
$I_A$	Fator de correção para atenuação pela própria amostra
$\kappa$	Seção de choque para produção de pares
$\lambda$	Comprimento de onda
$\mu$	Coefficiente de atenuação linear
$N_A$	Número de Avogadro = $6.023 \times 10^{23}$
$\nu$	Frequência
$q$	Vetor de espalhamento ou momento transferido ( $\text{nm}^{-1}$ )
$\rho$	Densidade ou unidade de massa
$\sigma$	Seção de choque
$\tau$	Seção de choque para efeito fotoelétrico
$\theta$	Ângulo de espalhamento
Z	Número atômico

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
1.1 MOTIVAÇÃO	13
1.2 OBJETIVOS	14
1.2.1 Objetivo Geral	14
1.2.2 Objetivos Específicos	14
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>15</b>
<b>3 EMBASAMENTO TEÓRICO</b>	<b>17</b>
3.1 CARACTERIZAÇÃO DA GLÂNDULA MAMÁRIA CANINA	17
3.1.1 Anatomia e fisiologia	17
3.1.2 Histologia	19
3.1.3 Neoplasias mamárias	20
3.1.4 Similaridades em relação à mama humana	23
3.2 FUNDAMENTOS DA RADIAÇÃO X	26
3.2.1 Produção no tubo de raios X	27
3.2.1.1 Microfocalização dos raios X	29
3.2.2 Interação da radiação com a matéria	32
3.2.2.1 Espalhamento elástico	36
3.3 DIFRAÇÃO DE RAIOS X	37
3.3.1 Sistemas de detecção	41
3.4 EFEITO BIOLÓGICO IMEDIATO DA RADIAÇÃO	44
3.5 LIOFILIZAÇÃO	46
<b>4 METODOLOGIA</b>	<b>49</b>
4.1 AMOSTRAS	49
4.2 CONFIGURAÇÃO EXPERIMENTAL	51
4.3 OBTENÇÃO DOS PERFIS DE ESPALHAMENTO	52
4.3.1 Contribuições espúrias	53
4.3.2 Definição de variáveis	53
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>55</b>
5.1 PERFIS DE ESPALHAMENTO E INFLUÊNCIA DA ÁGUA	55
5.2 DANOS DA RADIAÇÃO	69
<b>6 CONCLUSÕES</b>	<b>72</b>
6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS	72
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>75</b>
<b>Anexo A – PARECER DE APROVAÇÃO DA CEUA</b>	<b>81</b>
<b>Apêndice A – LÂMINAS HISTOPATOLÓGICAS</b>	<b>83</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 MOTIVAÇÃO

A era industrial foi responsável por um aumento significativo no tempo de vida do ser humano nos séculos XX e XXI, devido a diversos fatores relacionados à boa nutrição, medicina preventiva e acompanhamento médico, incluindo vacinação em massa e boas condições de habitação. O mesmo padrão pode ser observado também nos animais domésticos, especialmente gatos e cachorros, que representam um papel cada vez mais expressivo na sociedade e, por viverem sob condições similares às dos seus donos, têm apresentado também um aumento no seu tempo de vida e, por consequência, doenças relacionadas à idade, como o câncer (COZZI *et al.*, 2017).

O câncer é uma das principais causas de morte em cães adultos e idosos. Aproximadamente 25% dos tumores caninos ocorrem nas glândulas mamárias (MORRIS; DOBSON, 2008), chegando até 70% nas fêmeas (MERLO *et al.*, 2008). Aproximadamente 50% desses tumores são malignos (GILBERTSON *et al.*, 1983). A incidência do câncer mamário aumenta com a idade, tanto em humanos quanto cachorros. O pico de incidência em cães ocorre em torno de oito a nove anos, equivalente a 50-58 em anos humanos (STRANDBERG; GOODMAN, 1974).

Estudos a respeito do câncer de mama canino não são apenas relevantes para a comunidade da medicina veterinária, mas também para a oncologia humana. Cães domésticos já foram sugeridos por diversos autores como um modelo apropriado para pesquisas relacionadas ao câncer de mama humano, devido à sua alta incidência de tumores espontâneos, exposição aos mesmos fatores ambientais e porque o desenvolvimento da doença apresenta características muito similares (PINHO *et al.*, 2012; VISAN *et al.*, 2016). Portanto, é possível presumir que as alterações estruturais observadas no mapeamento de tumores caninos podem ser estendidas ao câncer humano, servindo como poderosa ferramenta translacional que pode levar à diversas aplicações na oncologia humana, de forma a auxiliar no desenvolvimento de técnicas diagnósticas e terapêuticas eficazes, que irão beneficiar tanto pacientes caninos quanto humanos (PINHO *et al.*, 2012).

A difração de raios X (XRD) é uma técnica de determinação estrutural capaz de fornecer informações a respeito da organização dos materiais, incluindo materiais amorfos, como tecidos biológicos. Diversos estudos mostram que a XRD pode ser usada para classificar tecidos mamários humanos entre normais, benignos e malignos (CONCEIÇÃO *et al.*, 2010b;



CUNHA *et al.*, 2006; GRIFFITHS *et al.*, 2007; RYAN; FARQUHARSON, 2007). A XRD convencional analisa um volume de centenas a milhares de micrômetros cúbicos, fornecendo um valor médio de espalhamento daquela região. Em amostras heterogêneas, essa média de dispersão resulta em dados genéricos a respeito da arquitetura estrutural, dificultando a avaliação da função ou disfunção das moléculas (LIU, 2015). Portanto, o presente estudo utilizou a microdifração de raios X, uma variação da técnica de XRD na qual o feixe é colimado a uma escala micrométrica, possibilitando o estudo de uma área muito pequena e, portanto, mais homogênea.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 OBJETIVO GERAL

Mapear tumores mamários caninos e tecidos adjacentes usando a microdifração de raios X.

### 1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter os perfis de espalhamento elástico em médio ângulo de amostras mamárias caninas fixadas em formalina e liofilizadas, incluindo tecido tumoral e adjacente;
- Extrair e analisar variáveis relacionadas aos picos dos perfis obtidos a fim de se verificar a abrangência relativa das alterações estruturais dos tumores;
- Determinar a influência das moléculas de água no processo de espalhamento;
- Avaliar possíveis danos causados pela radiação ionizante nos tecidos estudados.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A literatura a respeito de análises estruturais por meio da difração de raios X da mama canina é muito escassa, porém da humana é relativamente extensa. Pesquisadores já usaram diferentes técnicas, incluindo difração dispersiva (AD-XRD) em baixo ângulo (SAXS) (CUNHA *et al.*, 2006; CONCEIÇÃO *et al.*, 2009, 2014), médio ângulo (WAXS) (PEPLOW; VERGHESE, 1998; POLETTI *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2008; CONCEIÇÃO *et al.*, 2011), ambas as técnicas combinadas (CONCEIÇÃO *et al.*, 2010a, 2010b) e difração dispersiva em energia (ED-XRD) (GRIFFITHS *et al.*, 2007; KIDANE *et al.*, 1999; RYAN; FARQUHARSON, 2007; SOSA *et al.*, 2017).

Alguns estudos, como o de Kidane *et al.* (1999), apresentam as curvas características de espalhamento elástico de cada tipo de tecido mamário (normal adiposo, glandular e tumorais), outros usam a difração para caracterizar os tecidos em termos de seus coeficientes de atenuação, como Johns e Yaffe (1987). Vários trabalhos (RYAN; FARQUHARSON, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2008; CONCEIÇÃO *et al.*, 2010a, 2011) utilizaram análises multivariadas para verificar a diferenciação entre os tecidos, de forma a usar a técnica como um método diagnóstico. O melhor modelo formulado por Ryan e Farquharson (2007) apresentou uma sensibilidade de 54% e especificidade de 100% entre tecido normal e maligno. O modelo de Oliveira *et al.* (2008) identificou 75% dos tecidos corretamente, com os melhores valores de sensibilidade e especificidade tendo sido 95,6% e 82,3%, respectivamente. Conceição *et al.* (2010a, 2011) obtiveram 100% de sensibilidade e especificidade na diferenciação de tecidos em várias categorias.

De maneira geral, os trabalhos citados mostram a presença de dois picos principais em amostras mamárias. O primeiro deles, na região de  $q = 13,9 \text{ nm}^{-1}$ , equivalente a  $4,5 \text{ \AA}$ . Essa distância é consistente com a cadeia carbônica de ácidos graxos, cujos átomos se separam por  $4,5 \text{ \AA}$  dos vizinhos da cadeia adjacente (Lide (1995) *apud* Conceição (2011)). Ou seja, esse pico corresponde ao componente de tecido adiposo da mama. O outro pico se encontra em torno de  $19,8 \text{ nm}^{-1}$ , indicando estruturas cujos centros espalhadores se distam por  $3,0 \text{ \AA}$ . Essa distância pode estar associada à separação de átomos de oxigênio de moléculas de água vizinhas (VOET; VOET, 2011). Portanto, esse segundo pico se refere ao componente fibroglandular das mamas, já que esse tecido é rico em ácinos, que por sua vez são compostos basicamente por água. Um pico menos intenso é observado nos perfis em torno de  $q = 30 \text{ nm}^{-1}$  e pode estar associado ao espalhamento harmônico do pico de ácidos graxos (sendo harmônico um múltiplo inteiro do momento transferido fundamental, no caso  $q = 13,9 \text{ nm}^{-1}$ ) (CONCEIÇÃO, 2011).

O único trabalho encontrado a respeito de da análise de mamas caninas com difração de raios X foi um recentemente publicado por Fagundes *et al.* (2019). Nesse estudo foi utilizado um difractômetro comercial XRD-7000 (Shimadzu, Kyoto) no modo reflexão e ânodo de cobre. As amostras foram analisadas em médio ângulo (de 6° a 76°, com passos de 1/3° e 20 segundos de exposição) com uma voltagem igual a 40 kV e corrente de 20 mA. A superfície irradiada nas amostras era de 21.0 mm de diâmetro, portanto os perfis de espalhamento obtidos representavam a média de padrões obtidos ao longo dessa área. O trabalho provou que os perfis de espalhamento de tecido mamário canino são similares ao humano, com picos principais nas mesmas posições. A razão dos picos de tecido adiposo e glandular ( $I_1/I_2$ ) foi utilizada para análise estatística. Como resultado, os autores observaram uma diferença significativa entre os tecidos adiposo, benigno e maligno, e relataram grande similaridade entre os perfis de espalhamento dos tecidos caninos em relação aos humanos.

Os trabalhos até então citados usaram amostras não-liofilizadas. Porque as glândulas mamárias contém principalmente tecido glandular, elas possuem um alto conteúdo hídrico em sua composição. Isso afeta a caracterização desses tecidos porque os perfis de espalhamento de amostras biológicas são dominados pela contribuição da água (KOSANETZKY *et al.*, 1987).

Conceição *et al.* (2019) e Elshemey *et al.* (2013) fizeram estudos em mamas humanas liofilizadas. O primeiro aplicou tanto SAXS quanto WAXS nessas amostras, e nos perfis de médio ângulo observou a supressão do pico em  $q = 19,8 \text{ nm}^{-1}$ , comprovando a correspondência deste pico às moléculas de água (CONCEIÇÃO *et al.*, 2019). Elshemey *et al.* (2013) observou um aumento na sensibilidade (chegando a 100%) na caracterização de tecido normal adiposo em relação ao maligno utilizando amostras liofilizadas. Seus resultados para especificidade e precisão diagnóstica foram similares às de amostras hidratadas.

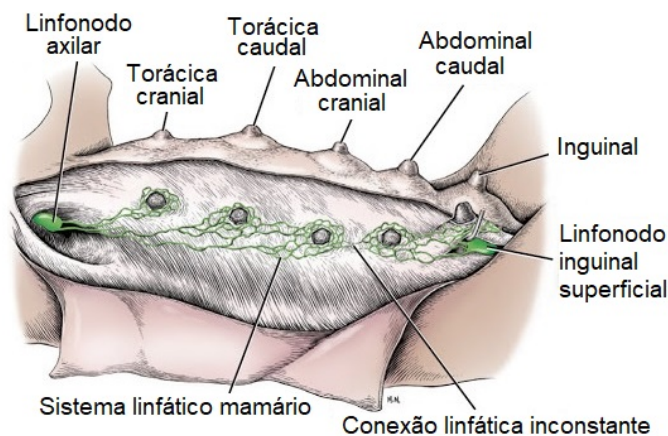
### 3 EMBASAMENTO TEÓRICO

#### 3.1 CARACTERIZAÇÃO DA GLÂNDULA MAMÁRIA CANINA

##### 3.1.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA

As mamas são estruturas glandulares encontradas em mamíferos, responsáveis pela produção de leite para alimentar a prole. Alguns autores classificam a glândula mamária como uma glândula acessória da pele (EVANS; LAHUNTA, 2012) e outros como uma glândula sudorípara apócrina. É constituída por uma rede de ductos que conectam as estruturas funcionais ao exterior, cercada por estroma fibroglandular e adipócitos (SORENMO *et al.*, 2011).

A evolução da glândula mamária é única, já que seu completo desenvolvimento se dá apenas na fase adulta, durante a gestação. Em cada gravidez ocorre a proliferação de tecido ductal, diferenciação de ácinos produtores de leite, secreção do leite pelas células acinares e, no fim da lactação, involução dos componentes secretores da glândula, preservando as estruturas ductais (SORENMO *et al.*, 2011).

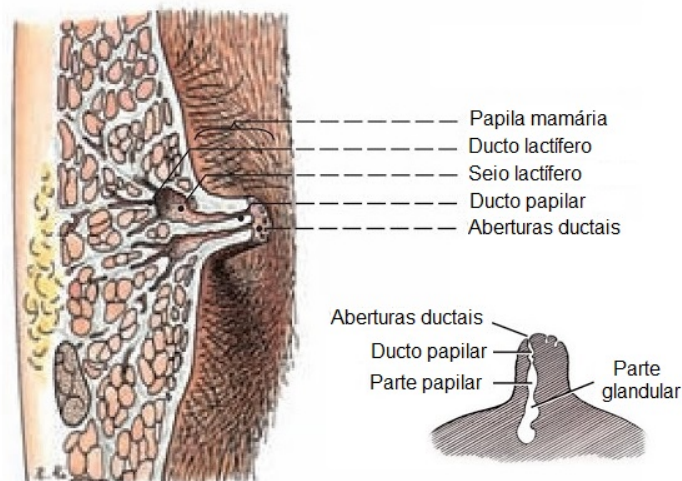


**Figura 1: Cadeia de mamas canina e sistema linfático simplificado, incluindo os cinco pares mamários e sua nomenclatura.**

**Fonte: Adaptado de Evans e Lahunta (2012)**

A maioria dos cães desenvolve cinco pares de mamas, apesar de quatro e seis pares já terem sido documentados. Como apresentado na Figura 1, existem dois pares (M1 e M2) que ficam na porção torácica, dois na abdominal (M3 e M4) e um na inguinal (M5) (SILVER, 1966).

Cada mama possui entre 7 e 16 aberturas ductais nas papilas, e cada um desses ductos formam um lóbulo da glândula adulta, que atuam como uma unidade funcional independente da glândula. Os ductos papilares ocupam aproximadamente um terço do comprimento da papila e são revestidos por epitélio escamoso estratificado. Na parte interna da papila, como apresentado na Figura 2, os ductos papilares se estendem até o seio lactífero, dividido em parte glandular e parte papilar. Este seio, por sua vez, estende-se até o parênquima da mama. Além das estruturas funcionais, o mamilo é formado por uma mistura de diversas fibras musculares e tecido conjuntivo (EVANS; LAHUNTA, 2012; SORENMO *et al.*, 2011).



**Figura 2: Anatomia da mama canina e papila. Os ductos mamários conectam as estruturas funcionais da mama até o exterior da papila, para alimentação da prole.**

**Fonte: Adaptado de Budras *et al.* (2007) e Evans e Lahunta (2012)**

Ao atingir a maturidade, o desenvolvimento mamário se inicia com a liberação de estrogênio dos ovários. A proliferação celular começa na porção terminal dos ductos, com a formação de botões. Quando se inicia uma gestação, ocorre a liberação de progesterona, o que resulta em um crescimento por alongamento e ramificação terciária do sistema de ductos dos lóbulos. Os ductos dão origem a múltiplos lóbulos, de onde se formam os alvéolos, que são as unidades secretoras da glândula mamária. Sob a influência de prolactina a célula alveolar torna-se secretora. Assim, no momento do parto, a glândula mamária é constituída por uma estrutura ducto-lobular-alveolar, por meio da qual os produtos da unidade túbulo-alveolar são transportados até a parte terminal dos ductos, para remoção pelo recém-nascido. Em torno de dez dias após o parto inicia-se a regressão alveolar, que leva cerca de 40 dias para ser finalizada, e nesse ponto apenas os ductos pré-existentes no complexo túbulo-alveolar são encontrados (SILVER, 1966; SORENMO *et al.*, 2011).

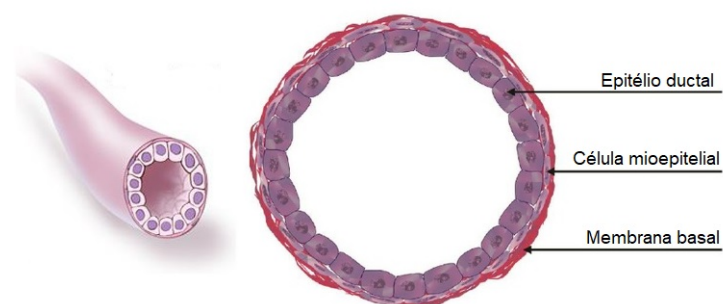
### 3.1.2 HISTOLOGIA

As estruturas mamárias podem ser divididas em dois componentes: estrutural e funcional. A parte funcional das mamas é composta, basicamente, de tecido epitelial e conjuntivo fibroso. As estruturas inclusas nesse grupo são aquelas responsáveis pela função de lactação. A parte estrutural inclui os tecidos responsáveis pela sustentação das estruturas funcionais, que incluem: tecido conjuntivo fibroso, tecido adiposo, vasos sanguíneos, nervos e vasos linfáticos (EVANS; LAHUNTA, 2012; SORENMO *et al.*, 2011).

#### Componente mamário funcional

A papila mamária é coberta por uma camada de epiderme considerada incompleta, já que nela faltam estruturas adnexas (apêndices). Na ponta da papila, para permitir a saída de leite pelos ductos, a pele é bem fina (composta por um epitélio escamoso estratificado, geralmente com um tampão de queratina nos lúmens), e aumenta de espessura conforme se aproxima da base (EVANS; LAHUNTA, 2012; SORENMO *et al.*, 2011).

Em torno da abertura exterior (que os ligam à papila) dos ductos há um esfíncter muscular. Os ductos maiores são revestidos por um epitélio cúbico de camada dupla e circundados por células mioepiteliais fusiformes, enquanto os ductos menores têm uma única camada de epitélio cúbico e células mioepiteliais fusiformes (SORENMO *et al.*, 2011). Uma esquematização simplificada dos ductos mamários caninos é apresentada na Figura 3.

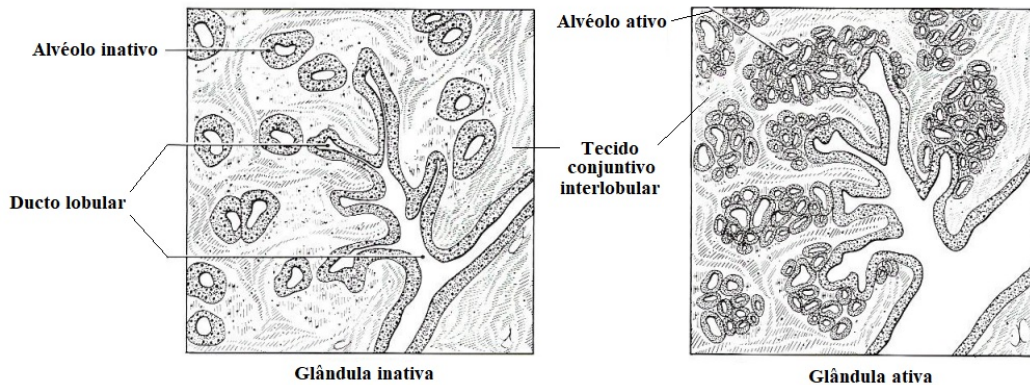


**Figura 3: Anatomia histológica dos ductos mamários, mostrando a camada de células epiteliais, mioepiteliais e membrana basal.**

**Fonte: Adaptado de Cassali *et al.* (2014)**

Internamente, o ducto se abre para o seio lactífero, que é revestido por um epitélio colunar de camada dupla, externo ao qual estão as células mioepiteliais fusiformes. O alvéolo, em seu estado não-secretório, é similar aos pequenos ductos (possuem uma única camada de

epitélio cúbico e células mioepiteliais fusiformes). Quando em atividade secretória, em seu entorno existem células mioepiteliais em forma de estrela, compondo uma espécie de cesta. Na Figura 4 é possível observar as diferenças da glândula quanto ativa e inativa. O epitélio mamário é circundado por uma membrana basal contínua, composta principalmente por colágeno tipo IV, laminina, nidogênio e proteoglicano de sulfato de heparina (SORENMO *et al.*, 2011).



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

**Fonte: Adaptado de Banks *et al.* (1993)**

### **Componente mamário estrutural**

O conjunto de tecidos responsáveis pela sustentação das glândulas mamárias é chamado estroma. Este contém tecido conjuntivo fibroso, tecido adiposo, vasos sanguíneos, nervos e vasos linfáticos. O tecido conjuntivo fibroso pode ser subdividido em dois componentes: o intralobular, que circunda os ductos intralobulares e consiste em fibras colágenas mais finas circundadas por uma matriz extracelular mais extensa, e o interlobular, que separa os lóbulos e possui fibras colágenas maiores com menos matriz extracelular. O estroma interlobular é composto, também, por tecido adiposo (adipócitos). Quando em atividade secretória, a região interlobular pode apresentar números variáveis de adipócitos que se acumulam no lúmen alveolar. A quantidade de tecido mamário adiposo e fibroglandular é variável, sendo que o adiposo costuma ser mais abundante nos pares abdominal e inguinal (M4 e M5), que são maiores (BANKS *et al.*, 1993; SORENMO *et al.*, 2011).

### **3.1.3 NEOPLASIAS MAMÁRIAS**

Nas glândulas mamárias se desenvolvem 25% de todos os tumores que acometem os cães, chegando a 70% nas fêmeas (MERLO *et al.*, 2008). Aproximadamente 50% destes tumores são malignos. A incidência de neoplasias nas glândulas mamárias varia de acordo com

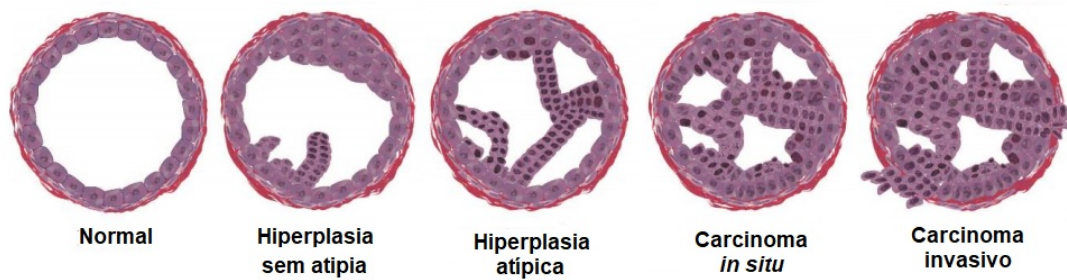
diversos fatores, tanto intrínsecos ao animal (idade, raça, fatores genéticos) quanto extrínsecos, referentes à fatores ambientais e culturais (alimentação, tratamentos hormonais, castração) (MORRIS; DOBSON, 2008; SLATTER, 2003).

Neoplasmas são massas anormais de tecido cujo crescimento é acelerado e descoordenado, diferente do tecido normal. Esse crescimento persiste mesmo depois de cessado o estímulo que o provocou. As células neoplásicas se proliferam descontroladamente, desobedecendo os mecanismos normais de proliferação celular, sem diferenciação funcional. Portanto, essas células atuam como um parasita no organismo, competindo com as células normais por energia e substratos nutricionais (WITHROW *et al.*, 2013).

O desenvolvimento de tumores pode ser desencadeado por diversos fatores, incluindo eventos genéticos espontâneos ou herdados e estímulos externos biológicos (vírus, parasitas e hormônios), físicos (luz UV, radiação, trauma) e químicos (COYLE, 2004; MORRIS; DOBSON, 2008).

As afecções neoplásicas podem ser classificadas em benignas e malignas, de acordo com suas características. A afecção maligna, também conhecida como câncer, é caracterizada por seu crescimento rápido e invasivo. Sua massa tumoral apresenta bordas indefinidas, já que suas células se infiltram nos tecidos adjacentes. São capazes de se espalhar para outras regiões do corpo (metástase) por meio de rotas linfáticas e/ou hematogênicas. Devido às suas características destrutivas e capacidade de metástase, os tumores malignos são mortais, a não ser que medidas terapêuticas sejam tomadas a tempo. Já as afecções benignas crescem de forma expansiva ao invés de invasiva, e portanto apresentam bordas bem definidas, facilitando diferenciar o limite entre tecido neoplásico e normal. Não são capazes de metástase, e oferecem risco à vida quando se desenvolvem em órgãos vitais (no cérebro, por exemplo). Alterações moleculares no epitélio mamário sugerem que lesões intraepiteliais ou intraductais (hiperplasia ductal e lobular e carcinoma ductal *in situ*) representam estágios evolutivos no processo de progressão da lesão maligna (Figura 5) (CASSALI *et al.*, 2014; MORRIS; DOBSON, 2008; WITHROW *et al.*, 2013).





**Figura 5: Ductos das glândulas mamárias: normal e evolução das lesões proliferativas.**

**Fonte: Adaptado de Cassali *et al.* (2014)**

A determinação do estadiamento clínico permite definir a extensão do tumor, o que permite estabelecer um prognóstico e planejar um tratamento adequado. O estadiamento é definido pelo sistema TNM, estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (OWEN *et al.*, 1980). Nesse sistema, é considerado o tamanho da lesão primária (T), se há envolvimento de linfonodos (N) e se há metástase (M) (CASSALI *et al.*, 2014). A Tabela 1 apresenta os estágios de cada um desses fatores.

**Tabela 1: Sistema de estadiamento clínico TNM**

<b>Tumor primário (T)</b>	<b>Linfonodos regionais (N)</b>	<b>Metástase distante (M)</b>
<b>T1</b> <3 cm	<b>N0</b> Sem metástase	<b>M0</b> Sem metástase
<b>T2</b> 3 a 5 cm	<b>N1</b> Com metástase	<b>M1</b> Metástase detectada
<b>T3</b> >5 cm		

**Fonte: Adaptado de Cassali *et al.* (2014)**

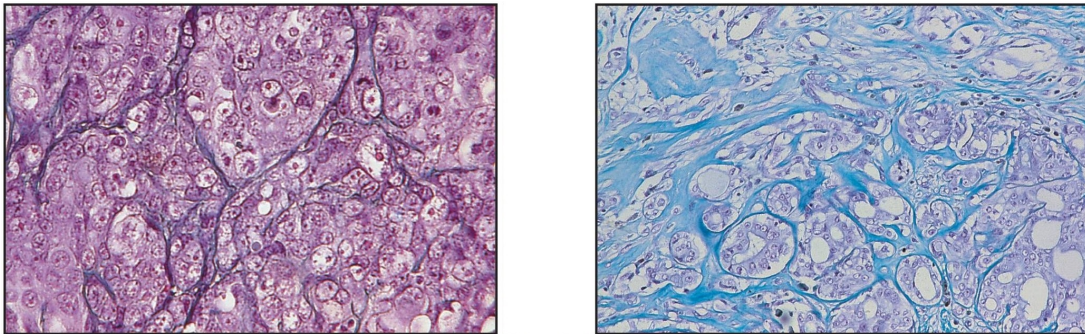
Existem diversos métodos de classificação das neoplasias mamárias na literatura. Essas patologias são definidas a partir de uma classificação histopatológica, que avalia a arquitetura da célula neoplásica e alterações no seu núcleo (CASSALI *et al.*, 2014).

A nomenclatura dos tumores se dá a partir da sua célula e tecido de origem, padrão de crescimento e comportamento biológico. O sufixo “OMA”, quando acoplado a um prefixo que denota determinado tipo celular, indica uma neoplasia benigna. O adenoma é, por exemplo, um tumor benigno do tecido glandular. Nos tumores malignos, considera-se a origem embrionária dos tecidos de que deriva o tumor, portanto tumores malignos originados dos epitélios de revestimento externo e interno são denominados carcinomas; quando o epitélio de origem é glandular, passam a ser chamados adenocarcinomas. Tumores malignos originados dos tecidos conjuntivos (mesenquimais) têm o acréscimo de sarcoma ao final do termo que corresponde ao tecido. As neoplasias mamárias podem ser constituídas, simultaneamente, por células de

origem epitelial e mesenquimal, sendo então denominados tumores mamários mistos (INCA, 2018; SLATTER, 2003).

Em cães, cerca de 50% dos tumores mamários são benignos, sendo a maioria deles fibroadenomas e tumores mistos. Os tumores mistos representam 50 a 66% das neoplasias mamárias na cadela, sendo apenas 4% destes malignos. Os neoplasmas malignos mais comuns são carcinoma sólido, adenocarcinoma tubular e papilar, e carcinoma anaplásico. Os sarcomas constituem apenas 5% dos tumores na glândula mamária, incluindo osteosarcoma, fibrosarcoma e osteocondrosarcoma. A espécie canina pode apresentar tumores mamários de diferentes histologias ao mesmo tempo. Em torno de 37% dos cães acometidos por neoplasias mamárias apresentam neoplasias benignas e malignas simultaneamente (SLATTER, 2003).

O adenoma é uma neoplasia benigna de células epiteliais ou mioepiteliais bem diferenciadas. Quando apresentam ductos dilatados e císticos são classificados como cistoadenomas, ou adenoma (poli)cístico. O carcinoma sólido é uma lesão maligna na qual há proliferação de células epiteliais organizadas em um arranjo sólido. As células tumorosas apresentam núcleos hipercromáticos pequenos, alta atividade mitótica e sem diferenciação. São altamente invasivos. O adenocarcinoma é um carcinoma desenvolvido a partir do tecido glandular (CASSALI *et al.*, 2014; BABA; CÂTOI, 2007). Na figura 6 tem-se lâminas histológicas de adenoma simples e um carcinoma sólido.



**Figura 6: Lâminas histológicas de um carcinoma sólido (à esquerda) e um adenoma simples (à direita), duas afecções neoplásicas estudadas neste trabalho.**

**Fonte: Baba e Câtoi (2007)**

#### 3.1.4 SIMILARIDADES EM RELAÇÃO À MAMA HUMANA

Os cães domésticos são sugeridos pela literatura como um modelo apropriado para o estudo translacional de câncer humano, devido às diversas similaridades no desenvolvimento destes, discutidas a seguir (AL-MANSOUR *et al.*, 2018; KUMARAGURUPARAN *et al.*, 2006;

PINHO *et al.*, 2012; QUEIROGA *et al.*, 2011; VISAN *et al.*, 2016). A Tabela 2 apresenta as características desejáveis em um modelo ideal para estudo de câncer e o quanto o modelo canino adequa-se a elas. Devido à alta incidência de tumores espontâneos em cadelas, que chega a ser três vezes maior que em humanos (OWEN, 1979), o estudo com estes animais é preferível, inclusive, por questões éticas, uma vez que substitui práticas como a indução de tumores em camundongos, por exemplo (GORDON; KHANNA, 2010).

Tanto em humanos quando cachorros a incidência do câncer mamário aumenta com a idade. O pico de incidência em cães ocorre em torno de oito a nove anos, equivalente a 50-58 em anos humanos. Histologicamente, as lesões benignas em mamas humanas são bastante similares às caninas. A maioria das lesões malignas em mamas humanas são carcinomas ductais infiltrantes, e apresentam características histológicas similares aos tumores malignos epiteliais infiltrantes que acometem as mamas caninas. A incidência de adenocarcinomas, carcinomas lobulares e carcinomas lobulares *in situ* é similar em humanos e cães. Outra semelhança histológica mamária entre as duas espécies é que ambas podem desenvolver sarcomas, mas tal ocorrência é muito rara. Uma diferença observável é que ambas as espécies apresentam tumores mistos nas mamas, porém em humanos eles são muito raros enquanto em cães estes representam quase 40% das ocorrências neoplásicas. O câncer mamário canino, como o humano, é capaz de metástase, e normalmente inicia-se nos linfonodos (SLATTER, 2003; STRANDBERG; GOODMAN, 1974).

Como os animais de companhia e seus donos dividem o mesmo ambiente, é possível presumir que estão expostos à fatores carcinogênicos similares. Esse tipo de exposição é algo que estudos *in vitro* em laboratório são incapazes de simular (KUMARAGURUPARAN *et al.*, 2006). Os fatores ambientais a que essas duas espécies estão expostas que têm relação com o desenvolvimento de câncer de mama incluem químicos (solventes e pesticidas - que mesmo não sendo ingeridos diretamente deixam resíduos de seus componentes no ar - e metais), radiação ionizante (de fontes naturais, como radiação solar e cósmica, radônio-222 presente em solos, rádio-226 presente em águas, etc; e fontes artificiais, como exposições médicas), fumo passivo de tabaco e infecções virais (COYLE, 2004).

O sequenciamento do genoma canino é bastante similar ao genoma humano (muito mais que o genoma dos roedores) (LINDBLAD-TOH *et al.*, 2005). Uva *et al.* (2009) analisaram a expressão do genoma humano e canino em amostras mamárias normais e tumorosas. Estes pesquisadores observaram uma sobreposição significativa de genes humanos e caninos desregulados nas amostras de tumores mamários, em comparação aos normais, revelando um alto grau de similaridade na perturbação de muitas vias relacionadas ao câncer. Além disso,

mostraram que as assinaturas gênicas observadas no câncer de mama humano são amplamente mantidas no modelo canino, sugerindo grande similaridade inter-espécies na rede de circuitos de sinalização do câncer (PINHO *et al.*, 2012; UVA *et al.*, 2009).

A etiologia hormonal em cães por estudos imuno-histoquímicos identificaram receptores de estrogênio e progesterona em lesões benignas e malignas. Os receptores de estrogênio são mais intensamente expressos em neoplasias benignas ou tecidos mamários normais do que nos malignos (RUTTEMAN *et al.*, 1988). Em mulheres, o status de receptores de estrogênio do câncer de mama foi estabelecido como um útil preditor de dependência hormonal do tumor e pode, conseqüentemente, estabelecer a probabilidade de obtenção de resposta positiva a uma terapia endócrina (BLOCK *et al.*, 1975). Tanto em tumores mamários caninos quanto humanos é observado um aumento na diferenciação celular com níveis crescentes de estrogênio e progesterona. A dependência hormonal é, portanto, outra característica comum entre as duas espécies (QUEIROGA *et al.*, 2011).

**Tabela 2: Características de um modelo ideal para estudos de câncer e comparação com os modelos de cultura de células *in vitro*, camundongos e cães**

<b>Modelo ideal</b>	<i>in vivo</i>	<b>Modelo murino</b>	<b>Modelo canino</b>
Apresenta similaridades histopatológicas com o tumor humano	Não	Variável	Sim
Progride pelas mesmas etapas que o câncer humano	Não	Raramente	Sim
Envolve os mesmos genes e percurso no início, progressão e metástase do câncer humano	Não	Não	Sim
	Não	Variável	Frequente
Reflete a resposta do tumor humano correspondente a terapias	Variável	Variável	Frequente
Permite avaliar a influência da variação genética germinativa na resposta do tumor a medicamentos	Não	Não	Sim

**Fonte: Adaptado de Gordon e Khanna (2010)**

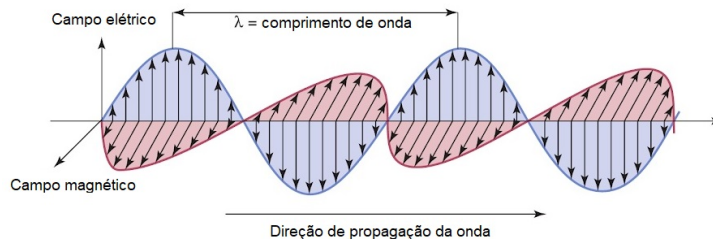
Em suma, o uso do modelo canino para estudos é adequado pois replica várias das características complexas do câncer humano. Especialmente quando comparado às técnicas translacionais atualmente utilizadas, como cultura de células *in vitro* e indução de tumores em camundongos, o modelo canino com tumores espontâneos é mais adequado como modelo humano, como resumido na Tabela 2. Portanto, o uso do modelo canino pode proporcionar múltiplas aplicações translacionais para a oncologia humana, auxiliando no desenvolvimento de

técnicas mais efetivas de diagnóstico e terapia que poderão beneficiar tanto pacientes humanos quanto caninos (GORDON; KHANNA, 2010; PINHO *et al.*, 2012).

### 3.2 FUNDAMENTOS DA RADIAÇÃO X

A radiação X é uma onda eletromagnética ionizante. As ondas eletromagnéticas não possuem massa, não são afetadas por campos elétricos e/ou magnéticos e possuem velocidade constante num determinado meio. Apesar de propagarem pela matéria, essas ondas podem se propagar também pelo vácuo, onde alcançam sua velocidade máxima ( $2,998 \times 10^8$  m/s). Sua velocidade em outros meios depende das características dos mesmos. As ondas eletromagnéticas seguem uma trajetória linear, porém esta pode ser alterada por interações com a matéria na qual estão se propagando, podendo ser espalhadas, absorvidas ou transformadas em partícula (convertidas de energia para massa). Os raios X são considerados ionizantes pois possuem a capacidade de interagir com e ejetar elétrons, ionizando átomos (ATTIX, 1986; BUSHBERG; BOONE, 2011).

As ondas eletromagnéticas são caracterizadas por sua polarização, comprimento de onda ( $\lambda$ ), frequência ( $\nu$ ) e energia ( $h\nu$ ). Possuem componentes de campo elétrico e magnético que são perpendiculares entre si, variam senoidalmente na mesma frequência e em fase. Oscilam no sentido perpendicular à direção de propagação da onda. A Figura 7 mostra os componentes de campo elétrico e magnético das ondas eletromagnéticas. Estas apresentam comportamento duplo, pois além de se comportarem como ondas comportam-se também como pacotes discretos de energia - partículas - chamados fótons (ATTIX, 1986; BUSHBERG; BOONE, 2011).



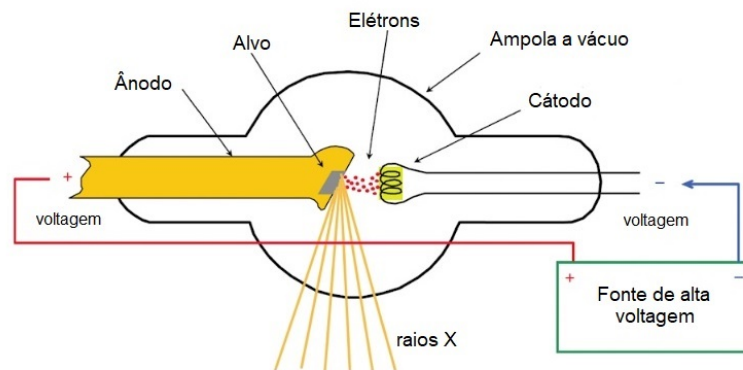
**Figura 7: Componentes de campo elétrico e magnético das ondas eletromagnéticas.**

**Fonte: Adaptado de Bushberg e Boone (2011)**

### 3.2.1 PRODUÇÃO NO TUBO DE RAIOS X

No difractômetro utilizado nesta pesquisa, a radiação é produzida por um tubo de raios X, portanto seu funcionamento será explicado a seguir. Cabe ressaltar, porém, que raios X podem ser produzidos por aceleradores de partículas (como síncrotron, betatron, cíclotron) e por fontes naturais, na forma de raios X característicos, que são emitidos como resultado de transições eletrônicas entre níveis atômicos e decaimento radioativo (BUSHBERG; BOONE, 2011).

Um tubo de raios X convencional é composto, basicamente, pelos itens esquematizados na Figura 8. Ele possui uma fonte de elétrons (cátodo) e um alvo de alto número atômico (ânodo), confinados em uma ampola (de metal, ou mais comumente, de vidro) cujo interior possui vácuo para evitar perdas energéticas (interações entre os elétrons e partículas do ar, por exemplo). Possui um sistema de resfriamento e seu entorno deve ser blindado. O sistema é abastecido por uma fonte de energia externa que fornece a voltagem necessária para acelerar os elétrons. O gerador também é responsável pela escolha da corrente e tempo de exposição, componentes que, quando combinados à voltagem, definem a intensidade, penetrabilidade e distribuição espacial do feixe de raios X (CURRY *et al.*, 1990; BUSHBERG; BOONE, 2011).



**Figura 8: Ilustração dos principais componentes de um tubo de raios X convencional.**

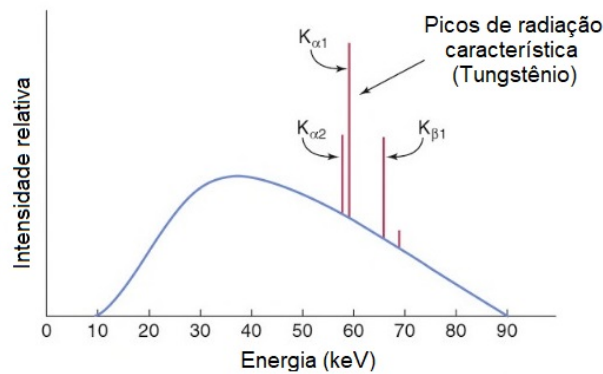
**Fonte: Adaptado de Bushberg e Boone (2011)**

A produção dos raios X ocorre por meio da interação de elétrons acelerados de alta energia com um material de elevado número atômico, convertendo sua energia cinética em radiação eletromagnética. Esses elétrons são produzidos no cátodo, por emissão termo-iônica. São acelerados no vácuo em direção ao alvo por meio de uma diferença de potencial aplicada por alta tensão. A posição no ânodo para a qual os elétrons são direcionados chama-se ponto focal. O ponto focal deve ser tão pequeno quanto possível para concentrar a energia dos elétrons

em uma pequena área do alvo e assim ter um alto fluxo de fótons (alta intensidade por unidade de área) (CULLITY; STOCK, 2014a). Atualmente, existem equipamentos que substituem o ânodo metálico sólido por um jato metálico líquido, que suporta maiores potências e portanto gera feixes de maior intensidade. Mais detalhes a respeito dessa técnica podem ser encontrados em Hemberg *et al.* (2003) e suas respectivas referências.

Na interação dos elétrons com o alvo, para a faixa energética do radiodiagnóstico, cerca de 99% da energia é transformada em calor e dissipada pelo sistema de resfriamento. Os restantes 1% são interações eficazes, que produzem raios X. Essa produção se dá pelo freamento de elétrons ou *bremsstrahlung*, que ocorre porque os elétrons, altamente acelerados, são repentinamente freados devido à atração pelos núcleos dos átomos do material anódico, o que resulta em uma perda brusca de energia cinética, que é convertida em radiação eletromagnética e emitida na forma de fótons.

A energia de um fóton produzido por *bremsstrahlung* pode variar de zero até o valor máximo da energia cinética do elétron defletido. Portanto, quando ocorrem múltiplas interações, o resultado é um espectro contínuo de energia, como mostrado na Figura 9. Após a interação dos elétrons acelerados com o ânodo, os átomos do alvo podem ficar com lacunas nas camadas onde houveram emissões de elétrons. Essas lacunas são preenchidas por elétrons de camadas mais externas, que por sua vez deixam novas lacunas, preenchidas por elétrons de camadas ainda mais externas, e assim por diante. Essa série de transições é chamada cascata de elétrons. A diferença de energia entre as camadas é emitida na forma de um fóton, chamado raio X característico. Esses raios X característicos somam-se ao espectro de raios X de freamento e aparecem como picos destacados nesse espectro (Figura 9) (PODGORSAK *et al.*, 2005; CURRY *et al.*, 1990; BUSHBERG; BOONE, 2011)..



**Figura 9:** Espectro de *bremsstrahlung* (filtrado) e radiação característica de um tubo com alvo de tungstênio operando com 90 keV.

**Fonte:** Adaptado de Bushberg e Boone (2011)

Neste trabalho foi utilizado um tubo de microfoco, que apresenta algumas diferenças em seu funcionamento a fim de se desmagnificar o feixe de raios X. Basicamente, existem mudanças nas características do ponto focal e sistema óptico de focalização, colimação e monocromatização, que são discutidos a seguir.

### 3.2.1.1 MICROFOCALIZAÇÃO DOS RAIOS X

A microdifração de raios X exige feixes extremamente finos, que são produzidos por tubos de raios X especiais chamados “tubos de microfoco”. Esses tubos possuem pontos focais especialmente pequenos. Tamanhos típicos são apresentados na Tabela 3. Esse foco resulta em uma densidade de potência muito alta quando comparado aos tubos tipicamente utilizados em laboratório (Tabela 3), o que pode levar ao superaquecimento e até derretimento do ânodo. Por isso, aumentar a densidade de potência (aumentando a potência ou reduzindo o ponto focal) não é tão simples. Outras técnicas devem ser implantadas para alcançar os parâmetros desejados na colimação e focalização do feixe (HASSE *et al.*, 2017).

A desmagnificação dos feixes de raios X é limitada pelas imperfeições dos elementos ópticos usados, pela sua geometria e pelo limite de difração. Portanto, uma grande desmagnificação requer que se trabalhe com pequenas distâncias entre os elementos e resulta em um aumento na divergência do campo das ondas eletromagnéticas. Essa divergência, por sua vez, limita o menor ângulo de espalhamento acessível e sua resolução angular (SEECK; MURPHY, 2015; TSUJI *et al.*, 2005).



**Tabela 3: Parâmetros técnicos típicos em tubos de raios X convencionais e de microfoco.**

	<b>Tubo convencional</b>	<b>Tubo de microfoco</b>	<b>Tubo convencional com ânodo rotativo</b>	<b>Tubo de microfoco com ânodo rotativo</b>
Potência (W)	1200	30 - 50	5000	2000 - 3000
Ponto focal no ânodo (mm <sup>2</sup> )	0,4 x 8	<0,05 x 0,3	0,3 x 3	<0,15 x 1,5
Densidade de potência (W/mm <sup>2</sup> )	375	4000 - 5000	5500	>15000

**Fonte: Adaptado de Hasse *et al.* (2017)**

Essas limitações podem ser superadas às custas da redução da performance de outros fatores. Por exemplo, um feixe pode ser bem focalizado com baixa divergência se o tamanho da fonte for reduzido com uma fenda, porém, isso resulta na redução da intensidade de fótons. Ao usar elementos ópticos difrativos ao invés dos refrativos, remove-se as limitações geométricas, porém, isso impõe outras, como, por exemplo, uma forte dependência da distância focal na energia da radiação incidente. A escolha da configuração óptica dependerá dos objetivos do experimento, considerando tipo de técnica e amostra, e um balanço deverá ser feito para decidir quais fatores são mais relevantes de se conservar, principalmente entre intensidade, resolução ou coerência espacial e angular. Existem diversas técnicas para produzir feixes de escala micrométrica, citadas na Tabela 4 (SEECK; MURPHY, 2015; TSUJI *et al.*, 2005).

### **Sistema óptico de Montel**

O sistema óptico de Montel trata-se de uma variação do espelho de Kirkpatrick–Baez, em que os espelhos perpendiculares são adjacentes, formando um “L”. É capaz de monocromatizar, focalizar e colimar o feixe de raios X. Comparado ao espelho Kirkpatrick–Baez convencional, a ótica Montel é mais compacta e capaz de maior desmagnificação (RESTA *et al.*, 2015).

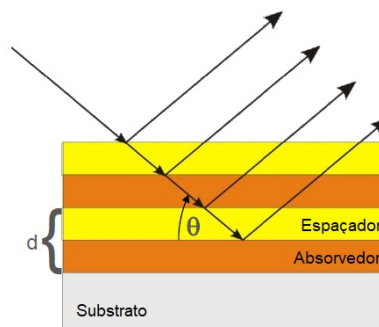
Os espelhos são compostos por camadas alternadas de material leve e pesado, que agem como espaçador e absorvedor, respectivamente, formando as multicamadas (Figura 10). Alguns materiais utilizados como absorvedor são: tungstênio, siliceto de tungstênio, rutênio, vanádio, latânio, molibdênio e dióxido de titânio. Como espaçador são usados carbono, silício, nitreto ou carbetto de boro. O substrato pode ser composto por quartzo, sílica fundida ou zerodur (vidro-cerâmica de lítio-aluminossilicato) (HONNICKE *et al.*, 2010).

**Tabela 4: Sistemas ópticos usados na produção de microfeixes de raios X**

Método	Nomenclatura do sistema óptico
Reflexão	Espelho de Kirkpatrick–Baez
	Espelho Wolter
	Placa de multicanais
	Lentes Kumakov (policapilar)
	XGT (capilar)
	Policapilares
Difração	Placas de zona
	Schwartzchild
	Cristal Johnson
	Multicamadas
	Placa de zona Bragg-Fresnel
	Cristal de reflexão assimétrica
Refração	Lentes refrativas (de silicone, liga metálica, diamante, polímero)
Fenda	Fenda colimadora

**Fonte: Adaptado de Tsuji *et al.* (2005)**

Na configuração em “L”, os raios incidentes atingem um dos espelhos primeiro, depois o outro e são redirecionados para o ponto focal. Alguns feixes podem atingir apenas um dos espelhos ou nenhum, e devem ser bloqueados por aberturas na entrada e saída do sistema óptico, para evitar a contaminação de fótons fora do ponto focal (INCOATEC, 2018; SEECK; MURPHY, 2015).

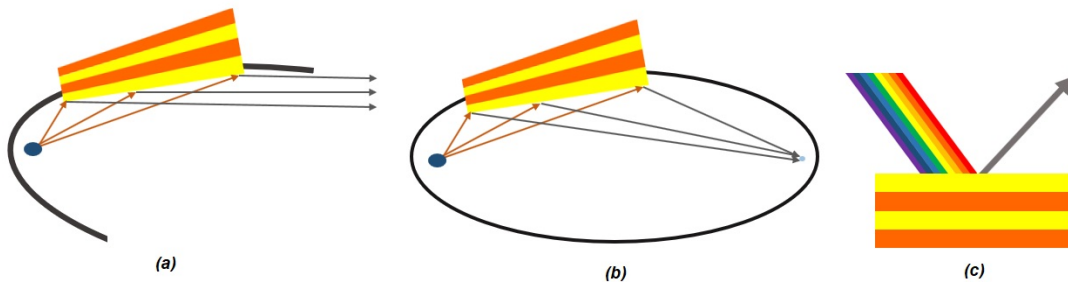


**Figura 10: Espelhos de Montel, apresentando as multicamadas alternadas de material espaçador e absorvedor, que agem como centros espalhadores de distância  $d$ .**

**Fonte: Adaptado de Incoatec (2018)**

O sistema óptico de Montel pode focalizar ou colimar o feixe, ou ambos (Figura 11). Para focalizar, é utilizado um substrato com formato elíptico, enquanto para colimar o substrato possui formato parabólico. O sistema híbrido possui um espelho com cada formato, de forma

a focalizar o feixe em uma direção e colimar na outra. Por possuir características difractivas, outra habilidade deste sistema é a monocromatização do feixe (Figura 11-c), que é alcançada devido às condições impostas pela lei de Bragg, discutida na seção 3.3. A fonte de raios X I $\mu$ S (*Incoatec micro source*), utilizada na presente pesquisa, realiza a dupla reflexão do feixe, o que resulta no quadrado do efeito monocromatizador (INCOATEC, 2018; SEECK; MURPHY, 2015).



**Figura 11: Sistema óptico Montel. (a) Colimação - espelho parabólico (b) Focalização - espelho elíptico (c) Monocromatização do feixe.**

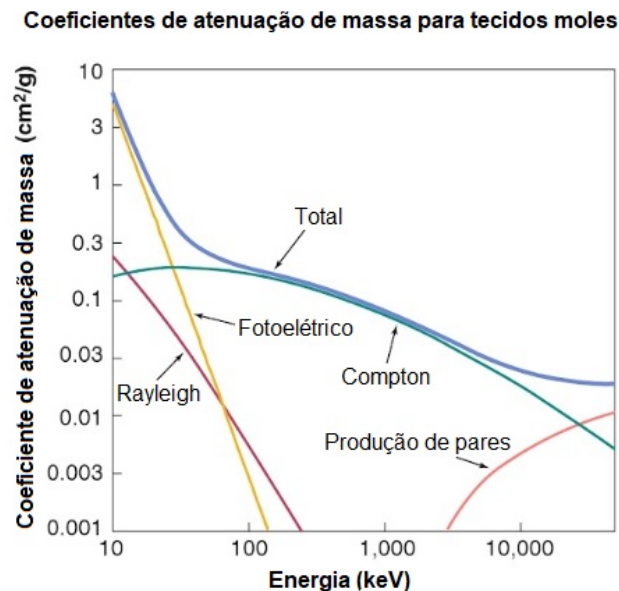
### 3.2.2 INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO COM A MATÉRIA

As ondas eletromagnéticas ionizantes são capazes de transferir sua energia para elétrons, que podem, por sua vez, causar ionizações secundárias. Os fótons de raios X possuem grande poder de penetração devido a sua alta energia. A probabilidade de interação depende das características do meio no qual está se propagando e de sua energia. Neste contexto, define-se *interações* como processos nos quais a energia e/ou a direção da radiação é alterada. Tais processos são randômicos e, portanto, só é possível discutir a probabilidade de ocorrência dessas interações. A probabilidade de interação por unidade de fluência é chamada *seção de choque* ( $\sigma$ ), em que fluência é o número de partículas por unidade de área (BUSHBERG; BOONE, 2011; CURRY *et al.*, 1990).

Para uma dada espessura de material, a probabilidade de interação depende do número de átomos que os raios X encontram em sua trajetória por unidade de distância. A densidade ( $\rho$ , em g/cm<sup>3</sup>) do material afeta esse número. Portanto, é comum utilizar uma normalização para a densidade, chamada *coeficiente de atenuação de massa* ( $\mu/\rho$ , em cm<sup>2</sup>/g). A soma dos coeficientes parciais de seção de choque para cada um dos principais efeitos (descritos a seguir) é proporcional a este coeficiente de atenuação. Esses efeitos são: espalhamento coerente ( $\sigma_{coer}$ ), incoerente ou Compton ( $\sigma_{inc}$ ), fotoelétrico ( $\tau$ ) e produção de pares ( $\kappa$ ) (YOSHIMURA, 2009).

$$\frac{\mu}{\rho} \propto \frac{\sigma_{coer}}{\rho} + \frac{\sigma_{inc}}{\rho} + \frac{\tau}{\rho} + \frac{\kappa}{\rho} \quad (1)$$

Na Figura 12 pode-se observar o coeficiente de atenuação de massa em função da energia para os principais efeitos sob os quais a radiação passa quando interage com a matéria na faixa energética do radiodiagnóstico (o efeito de produção de pares, presente na imagem, não é relevante para este trabalho pois ocorre apenas em altas energias). Observa-se que, em baixas energias, o efeito fotoelétrico e o espalhamento elástico são os mais contribuintes para atenuação em materiais de baixo número atômico ( $Z$ ), como tecidos moles. Porém, para energias mais altas, o efeito Compton é o mais predominante para esse mesmo valor de  $Z$  (BUSHBERG; BOONE, 2011; YOSHIMURA, 2009).



**Figura 12: Coeficiente de atenuação de massa total e dos efeitos Rayleigh, Fotoelétrico, Compton, Produção de Pares, em função da energia (em tecidos moles, em média  $Z = 7$ ).**

**Fonte: Adaptado de Bushberg e Boone (2011)**

A produção de pares ocorre apenas em altas energias (acima de 1,02 MeV), portanto sua discussão se faz irrelevante neste contexto.

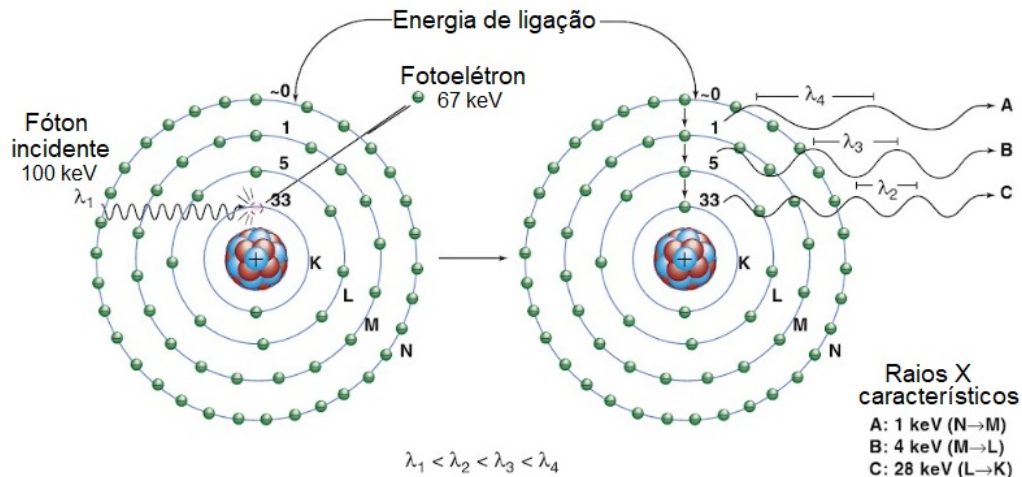
### **Efeito fotoelétrico**

No efeito fotoelétrico, o fóton incidente interage com um elétron orbital, transmitindo a ele toda sua energia. Como resultado o fóton desaparece e o elétron é expelido do átomo e passa a ser chamado fotoelétron. A energia cinética resultante ( $E_K$ ) do fotoelétron é dada pela

Equação 2, em que  $h\nu$  é a energia do fóton incidente e  $E_B$  é a energia de ligação do elétron (BUSHBERG; BOONE, 2011; PODGORSK *et al.*, 2005).

$$E_K = h\nu - E_B \quad (2)$$

A Figura 13 apresenta uma esquematização da cinemática do efeito fotoelétrico. Pode-se observar que a emissão do fotoelétron causa um efeito em cascata, resultando na emissão de diversos raios X característicos. Isso ocorre devido à lacuna deixada pelo fotoelétron emitido, que passa a ser ocupada por um elétron de órbita mais externa. A diferença de energia de ligação entre esses orbitais é emitida na forma de radiação característica (BUSHBERG; BOONE, 2011; PODGORSK *et al.*, 2005).



**Figura 13:** Cinemática do efeito fotoelétrico. À esquerda observa-se um fóton transmitindo toda sua energia para o elétron, ejetando-o do átomo. À direita está representado o efeito em cascata de emissão de fótons característicos devido à lacuna deixada pelo fotoelétron.

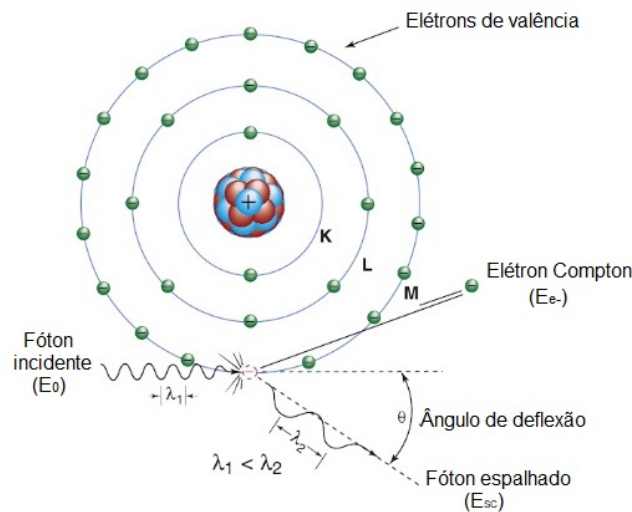
Fonte: Adaptado de Bushberg e Boone (2011)

O efeito fotoelétrico é predominante em baixas energias (até 50 keV) e em elementos de elevado número atômico ( $Z$ ), pois a probabilidade de sua ocorrência por unidade de massa ( $\tau/\rho$ ) é proporcional à Equação 3 na qual  $Z$  é o número atômico do material e  $h\nu$  é a energia do fóton incidente. A probabilidade máxima de ocorrência deste efeito ocorre quando a energia do fóton incidente é igual à de ligação do elétron com o átomo (ATTIX, 1986; YOSHIMURA, 2009).

$$\frac{\tau}{\rho} \propto \left( \frac{Z}{h\nu} \right)^3 \quad (cm^2/g) \quad (3)$$

### Efeito Compton ou espalhamento inelástico

O efeito Compton, ou espalhamento inelástico/coerente, ocorre quando o fóton incidente interage com o elétron de uma camada mais externa do átomo, que passa a ser chamado elétron Compton (BUSHBERG; BOONE, 2011; PODGORSK *et al.*, 2005). Sua cinemática está esquematizada na Figura 14.



**Figura 14: Cinemática do efeito Compton. Um fóton incidente interage com um elétron de camada mais externa da eletrosfera transferindo a ele parte de sua energia, seguindo com energia menor e trajetória alterada por um ângulo  $\theta$ .**

**Fonte: Adaptado de Bushberg e Boone (2011)**

A energia incidente  $h\nu$  deve ser muito maior que a energia de ligação do elétron orbital  $E_B$  para que este efeito ocorra. O fóton incidente transfere parte de sua energia para o elétron Compton e é espalhado com energia menor e trajetória alterada. Obedecendo a conservação de energia e momento, temos a Equação 4, em que a energia do fóton incidente  $h\nu$  é igual à soma da energia do fóton espalhado  $h\nu'$  com a energia cinética do elétron Compton  $E_{e^-}$  (BUSHBERG; BOONE, 2011; PODGORSK *et al.*, 2005).

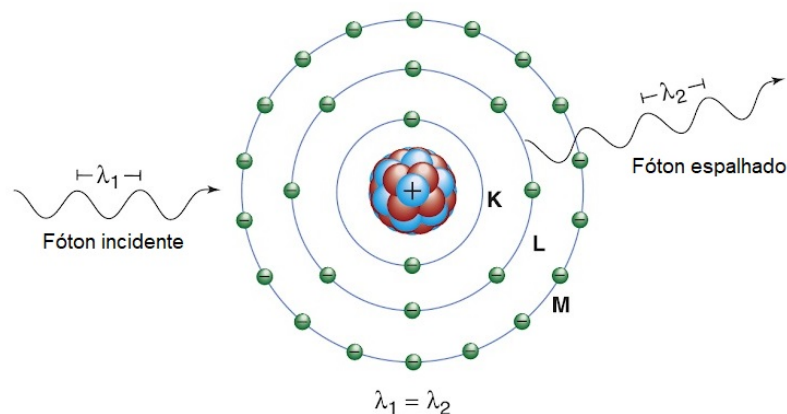
$$h\nu = h\nu' + E_{e^-} \quad (4)$$

A probabilidade de ocorrência do efeito Compton é proporcional à energia do fóton incidente e à densidade eletrônica do material (número de elétrons/g). Ele é predominante, para tecidos moles, na faixa energética entre 26 keV e 30 MeV. A seção de choque por unidade de massa ( $\sigma/\rho$ ) para o efeito Compton é descrita na Equação 5, na qual  $N_A$  é o número de Avogadro ( $6.023 \times 10^{23}$ ),  $A$  é a massa atômica,  $Z$  o número atômico e  $e\sigma$  é a seção de choque por elétron (ATTIX, 1986; YOSHIMURA, 2009).

$$\frac{\sigma_{inc}}{\rho} \propto \frac{N_A Z}{A} e\sigma \quad (cm^2/g) \quad (5)$$

### 3.2.2.1 ESPALHAMENTO ELÁSTICO

Este é o efeito que fundamenta a difração de raios X. Também chamado espalhamento coerente ou Rayleigh, ocorre quando o fóton incidente interage excitando o átomo todo, não apenas um único elétron, como no caso dos efeitos fotoelétrico e Compton. Nessa interação, o campo elétrico da onda eletromagnética incidente faz com que todos os elétrons do átomo oscilem em fase. A nuvem de elétrons do átomo imediatamente irradia essa energia por meio da emissão de um fóton de mesma frequência, mas com direção ligeiramente alterada. Nesse tipo de espalhamento nenhum elétron é expelido e, portanto, não ocorre ionização (BUSHBERG; BOONE, 2011). Na Figura 15 pode-se observar um diagrama da cinemática do espalhamento elástico, no qual o fóton incidente  $\lambda_1$  interage com o átomo e o fóton  $\lambda_2$  é emitido com exatamente mesma energia e comprimento de onda.



**Figura 15: Cinemática para o espalhamento elástico. O fóton incidente interage com o átomo e é espalhado com mesma energia e comprimento de onda, mas direção alterada.**

**Fonte: Adaptado de Bushberg e Boone (2011)**

O espalhamento elástico pode ocorrer devido a um **elétron livre**, recebendo o nome de espalhamento por elétron livre ou espalhamento Thomson. Porém, se o átomo for de qualquer material que não Hidrogênio, é necessário considerar o espalhamento por múltiplos elétrons e, portanto, a carga elétrica dos elétrons vizinhos influenciam o ângulo de espalhamento da onda incidente. A amplitude total espalhada devido a cada elemento de carga dependerá do fator de espalhamento por elétron. O espalhamento também pode ser descrito para um **átomo livre**, sendo denominado espalhamento por átomo livre ou espalhamento Rayleigh. Esse caso considera os elétrons ligados e organizados no modelo atômico. As ondas espalhadas por cada elétron sofrem interferência construtiva devido à diferença de caminho ótico percorrido no átomo. Outra descrição considera uma **molécula livre**, ou seja, considera-se um arranjo de átomos. **Conjuntos de moléculas** e **estruturas supramoleculares** também agem como centros espalhadores. Essas estruturas são arranjos compostos por grandes cadeias ( $> 10 \text{ \AA}$ ), compreendidos na região de espalhamento em baixo ângulo (ATTIX, 1986; CULLITY; STOCK, 2014a; JOHNS; CUNNINGHAM, 1983).

O espalhamento coerente torna-se relevante em materiais de alto número atômico e feixes de baixa energia (Figura 12), já que sua probabilidade de ocorrência é inversamente proporcional ao quadrado da energia ( $h\nu$ ) (ATTIX, 1986; YOSHIMURA, 2009). A seção de choque para esse efeito é dada por:

$$\frac{\sigma_{coer}}{\rho} \propto \frac{Z}{(h\nu)^2} \quad (cm^2/g) \quad (6)$$

Este processo também pode ser descrito em termos do parâmetro  $x$  (que é igual a  $(\sin\theta/2)/\lambda$ ) e seu coeficiente é dado por:

$$\frac{d\sigma}{d\theta} = \frac{r_0^2}{2} (1 + \cos^2\theta) [F(x, Z)]^2 2\pi \sin\theta \quad (7)$$

Em que  $[F(x, Z)]^2$  é o fator de forma atômico e  $r_0$  é o raio clássico do elétron. Para baixos valores de  $\theta$ , o fator de forma se aproxima de  $Z$ , enquanto para valores altos ele tende a zero (JOHNS; CUNNINGHAM, 1983).

### 3.3 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Em 1912, o físico alemão von Laue (1879 - 1960) argumentou que, se os cristais são compostos de átomos espaçados regularmente que podem atuar como centros espalhadores de



raios X, e se os raios X são ondas eletromagnéticas de comprimento de onda de mesma ordem de grandeza que a distância interatômica nos cristais, então deveria ser possível difratar raios X por meio de cristais. Laue então testou essa hipótese usando um cristal de cloreto de sódio (NaCl) e descobriu que os raios X primários podiam sim ser difratados pelo cristal. Seus experimentos provaram, ao mesmo tempo, a natureza ondulatória dos raios X e a periodicidade do arranjo atômico dos cristais (CULLITY; STOCK, 2014a).

O físico britânico W. L. Bragg (1890 - 1971) deu continuidade a estes estudos e apresentou fórmulas matemáticas bem mais simples que as de von Laue para expressar as condições necessárias para difração, como a lei de Bragg. Ele também foi o primeiro a determinar as estruturas completas dos cristais cloreto, brometo e iodeto de potássio (KCl, KBr e KI), do diamante, entre outros (BRAGG *et al.*, 1913a; BRAGG, 1913b).

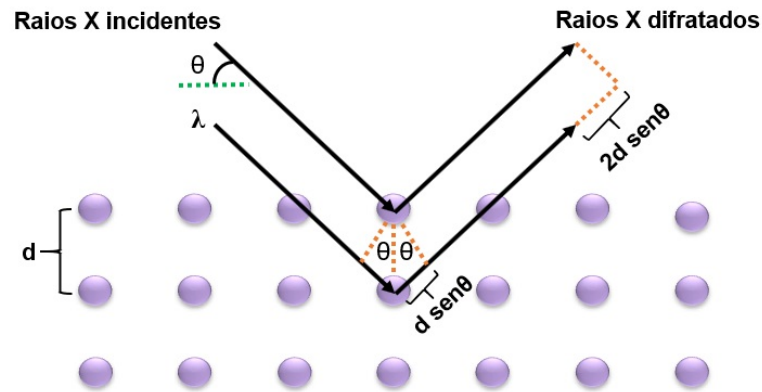
De forma geral, a difração é uma consequência que emerge da interferência na onda ao passar por um obstáculo. Ao se tratar de ondas de raios X, seu espalhamento elástico não se distribui uniformemente no espaço, mas em função da distribuição eletrônica da amostra. O arranjo atômico dos materiais pode ser ordenado, como em cristais, ou desordenado, como no vidro e líquidos. Portanto, a intensidade e distribuição espacial dos raios X espalhados formam um padrão de difração específico que é como uma “impressão digital” da amostra (HE, 2003; SURYANARAYANA; NORTON, 1998).

Bragg formulou a lei descrita na Equação 8, estabelecendo os critérios necessários para que possa ocorrer difração de ondas eletromagnéticas. Primeiramente, é necessário que o comprimento ( $\lambda$ ) da onda incidente seja da mesma ordem de magnitude que a distância entre centros espalhadores ( $d$ ). A difração de uma onda ultravioleta em um cristal, por exemplo, não seria observável por que a interferência seria mínima.  $n$  é chamado de ordem de reflexão e é igual ao número de comprimentos de onda na diferença de percurso de raios espalhados por planos adjacentes. Pode assumir qualquer valor inteiro consistente com o  $\sin(\theta)$ . O menor valor que  $n$  pode assumir é 1, pois 0 corresponde a um fóton difratado na mesma direção que o transmitido, e portanto não pode ser detectado (BRAGG *et al.*, 1913c).

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (8)$$

O feixe de difração é formado por raios espalhados em fase (reforçando um ao outro - interferência construtiva) pelos átomos dos planos cristalinos (Figura 16). Os feixes espalhados em outras direções estão fora de fase e anulam-se uns aos outros (interferência destrutiva). Portanto, o feixe difratado é mais forte que a soma de todos os raios espalhados na mesma

direção, devido ao reforço que ocorre; porém é bem mais fraco que o feixe incidente, já que os átomos de um cristal espalham elasticamente apenas uma pequena fração da energia neles incidente (CULLITY; STOCK, 2014a).



**Figura 16: Difração de raios X. Fótons de comprimento de onda  $\lambda$  incidem com ângulo  $\theta$  em um cristal formado por centros espalhadores espaçados por uma distância  $d$ .**

O feixe incidente, o plano normal e o feixe espalhados são sempre coplanares. O ângulo entre o feixe difratado e o transmitido é sempre  $2\theta$  (assim como entre o feixe incidente e o difratado).  $2\theta$  é conhecido como ângulo de difração, e é ele que, em geral, é medido experimentalmente ao invés de  $\theta$  (CULLITY; STOCK, 2014a).

A intensidade obtida é comumente aplicada em função do vetor de espalhamento  $q$  ( $\text{nm}^{-1}$ ) (Equação 9), ou momento transferido, para expressar os padrões de difração. Este se trata da resultante geométrica entre os vetores do feixe incidente e do espalhado (CULLITY; STOCK, 2014b; SEECK; MURPHY, 2015).

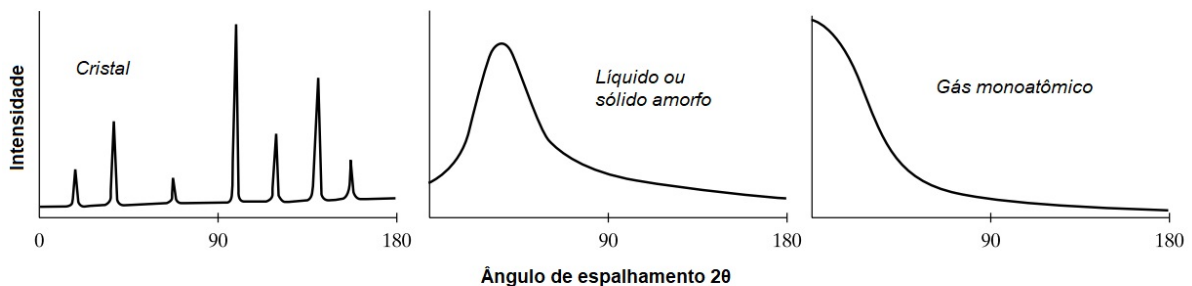
$$q = \frac{4\pi \sin\theta}{\lambda} \quad (\text{nm}^{-1}) \quad (9)$$

Relacionando a lei de Bragg com o vetor de espalhamento  $q$ , tem-se que este é inversamente proporcional à distância entre centros espalhadores pela relação:  $q = 2\pi/d$  (CULLITY; STOCK, 2014b; SEECK; MURPHY, 2015).

Dependendo do nível de ordem estrutural do material, o perfil de espalhamento terá características diferentes. Líquidos e sólidos amorfos apresentam um certo grau de ordem em escala atômica. Cristais revelam uma estrutura ordenada em escala macroscópica (SEECK; MURPHY, 2015).

A Figura 17 apresenta perfis de difração típicos para materiais cristalinos, amorfos e gasosos, plotados em termos de intensidade vs ângulo de espalhamento. A intensidade

da curva para sólidos cristalinos é praticamente zero para a maioria dos ângulos, exceto em alguns onde aparecem picos estreitos: estes são os feixes difratados. Esse padrão acontece devido ao alto grau de ordem destes materiais, cujo espaçamento entre centros espalhadores é extremamente uniforme. Já os materiais amorfos e líquidos têm estruturas caracterizadas por uma quase completa falta de periodicidade e uma tendência à “ordem” no sentido de que seus átomos ficam acumulados com muita proximidade e apresentam preferência estatística por uma distância interatômica em particular; o resultado é uma curva de espalhamento com um ou mais picos de maior intensidade, mas não tão estreitos quanto os cristalinos. Finalmente, os gases monoatômicos não apresentam periodicidade estrutural alguma, pois as posições de seus átomos variam constantemente com o tempo. Seu perfil de difração não apresenta picos, apenas uma queda regular na intensidade conforme se aumenta o ângulo de espalhamento, o que acontece porque os átomos isoladamente espalham mais intensamente em baixos ângulos (CULLITY; STOCK, 2014a).



**Figura 17: Comparação entre perfis de espalhamento típicos para materiais cristalinos, amorfos e gasosos.**

**Fonte: Adaptado de Cullity e Stock (2014a)**

A difração pode ser aplicada usando raios X de comprimento de onda  $\lambda$  conhecido (em um feixe monocromático) para medir o ângulo de espalhamento  $\theta$ , e a partir desses dados determinar o espaçamento entre centros espalhadores  $d$ . Esta técnica é conhecida como difração de raios X dispersiva em ângulo (AD-XRD). Outra forma de medir essa distância  $d$  é fixar um ângulo  $\theta$  e variar a energia (e portanto, o comprimento de onda  $\lambda$ ), tal técnica é chamada difração de raios X dispersiva em energia (ED-XRD) (CULLITY; STOCK, 2014b; SEECK; MURPHY, 2015).

As técnicas de espalhamento elástico também podem ser classificadas em WAXS, SAXS e Rayleigh. O WAXS trata-se do espalhamento de raios X em médio ângulo ( $2^\circ \leq 2\theta \leq 120^\circ$ ), e é utilizado quando se tem interesse em estudar o espaçamento entre

moléculas pequenas (ácidos graxos, por exemplo). O SAXS compreende o espalhamento de raios X em baixo ângulo ( $2\theta < 2^\circ$ ), e é usado para analisar estruturas maiores, como arranjo de moléculas e estruturas supramoleculares (fibras de colágeno e celulose, por exemplo). Finalmente, no espalhamento Rayleigh altos ângulos são utilizados ( $2\theta > 120^\circ$ ) para estudos no nível atômico (CHATTERJEE, 2010; CULLITY; STOCK, 2014a).

### 3.3.1 SISTEMAS DE DETECÇÃO

Na Tabela 5 estão listados diversos sistemas de detecção usados no espalhamento de raios X. Estes sistemas podem ser do tipo pontual, em que cada ponto da amostra é medido individualmente, e portanto torna-se necessário fazer uma varredura quando se quer medir uma área maior; lineares, nos quais pode-se medir uma linha no plano de  $2\theta$ ; e de área, em que mede-se simultaneamente nas duas direções,  $2\theta$  e  $\gamma$ , como ilustrado nas Figuras 18 e 19 (HE, 2003).

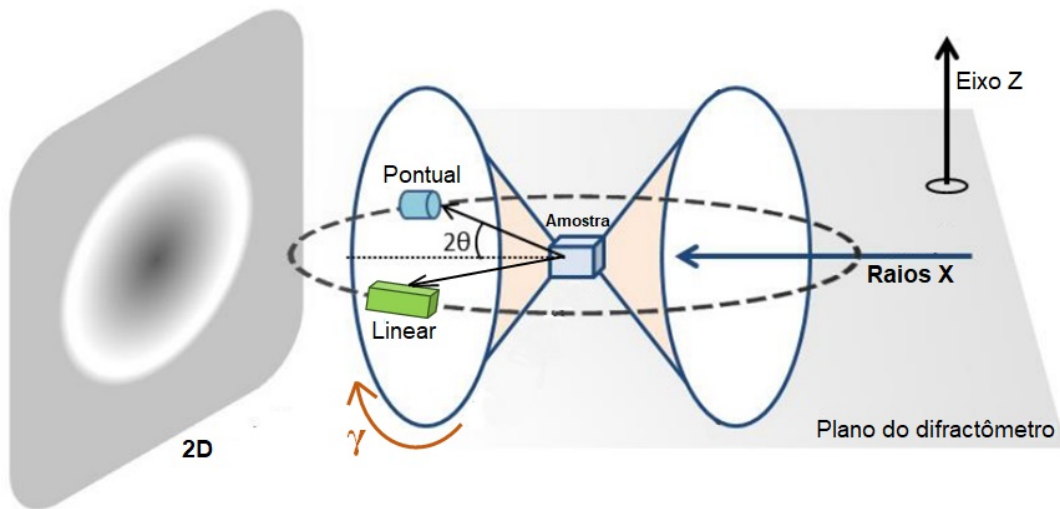
**Tabela 5: Detectores pontuais, lineares e de área comumente utilizados para raios X**

<b>Detectores pontuais (0-D)</b>	<b>Detectores lineares (1-D)</b>	<b>Detectores de área (2-D)</b>
Contador de cintilação	Detector microgap	Contador proporcional multi-fios
Contador proporcional	Tira de silício composto	Detector microgap <sup>1</sup>
Estado sólido Si(Li)	Contador proporcional de fio único	Com pixel
Estado sólido Ge		CMOS
Diodo PIN de silício		
Com desvio de silício		
Câmaras de ionização		

**Fonte: Adaptado de Bruker (2018), Suryanarayana e Norton (1998), Tsuji *et al.* (2005)**

Quando irradiados por raios X, materiais policristalinos espalham essa radiação conicamente, formando um padrão de difração conhecido como “cones ou anéis de Debye”. O padrão de difração convencional, obtido com detector pontual ou linear, é resultado da intensidade de raios X espalhados em diferentes ângulos em  $2\theta$ . Esses detectores são capazes de detectar apenas os raios espalhados no plano do difractômetro ( $2\theta$ ), mas não no eixo Z (Figura 18). Os detectores bidimensionais permitem a detecção nos três eixos, possibilitando a obtenção dos anéis de Debye (HE, 2003).

<sup>1</sup>Detector utilizado nesse trabalho.



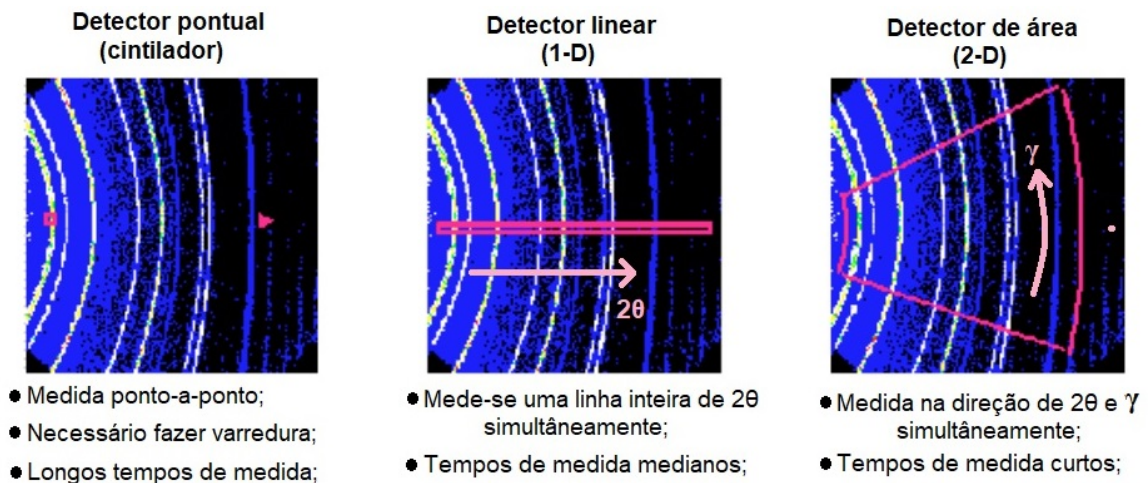
**Figura 18: Cones de difração representados em um espaço tridimensional (plano do difratômetro e eixo Z). Observa-se o alcance de captação dos detectores pontual, linear e 2D.**

**Fonte: Adaptado de Quaranta *et al.* (2017)**

A Figura 19 descreve algumas das principais diferenças entre detectores pontuais, lineares e de área, mostrando a área medida em cada uma das três técnicas na direção de  $2\theta$  e  $\gamma$  em uma amostra de pó de Corindo. Na figura também é possível observar a imagem dos anéis de Debye (HE, 2009).

Os detectores bidimensionais com tecnologia *microgap* apresentam como diferencial uma redução na distância cátodo-ânodo e intensidade do campo elétrico elevada, o que reduz o tempo de coleta dos íons, aumentando seu número de contagens em várias ordens de magnitude se comparado a outros detectores 2D. Porém, para um alto número de contagens, os detectores *microgap* sofrem uma redução no ganho, resolução energética e espacial devido a descargas elétricas e faíscas (HE, 2009).

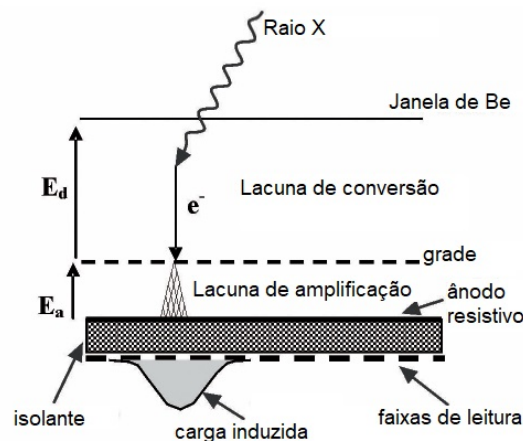
A Figura 20 apresenta o mecanismo de detecção do *microgap*. Este consiste em uma câmara de placas paralelas com um ânodo resistivo separado do eletrodo de leitura por um isolante. Os componentes são contidos em um recipiente selado, preenchido por uma mistura gasosa, com uma janela de berílio. O ânodo é composto por uma camada resistiva depositada em um substrato de cerâmica. A resistividade escolhida deve ser alta o suficiente para limitar as descargas elétricas, mas baixa o suficiente para permitir um alto número de contagens. Portanto, o ânodo resistivo auxilia na redução dos efeitos de descarga elétrica e faísca. A grade é uma malha de metal fotoquímica perfurada que separa as lacunas de conversão e amplificação. Na



**Figura 19: Alcance de captação do padrão difrativo dos detectores cintilador, linear e 2D.**

**Fonte: Adaptado de He *et al.* (2000)**

banda de conversão, os fótons incidentes liberam elétrons primários por ionização do gás. Esses elétrons se movem em direção ao ânodo por influência do campo elétrico. O número de elétrons é multiplicado na banda de amplificação. Essa banda é bem fina, de forma a reduzir os efeitos de volume de carga. A separação do eletrodo de leitura do ânodo por uma camada de isolante otimiza a distribuição espacial do sinal de saída (HE, 2009).

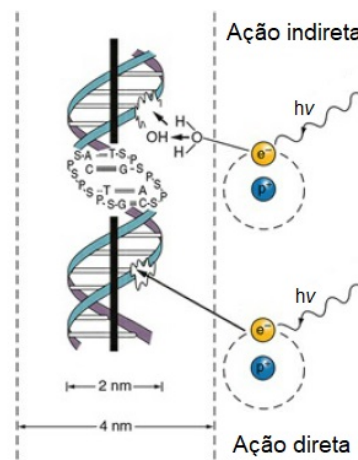


**Figura 20: Mecanismo de detecção *microgap*.**

**Fonte: Adaptado de He (2009)**

### 3.4 EFEITO BIOLÓGICO IMEDIATO DA RADIAÇÃO

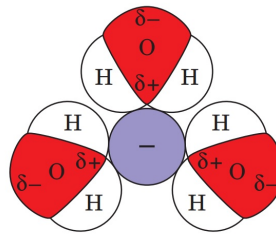
Ao interagir com tecidos biológicos, a radiação ionizante causa diversas mudanças físicas e químicas em suas células. Como estas são compostas majoritariamente por água (em torno de 70%), a maioria da energia depositada é absorvida por essas moléculas. Isso leva a uma sucessão de processos (descritos abaixo) que podem resultar em dano indireto ao DNA. É possível que o dano ocorra diretamente, quando o elétron ionizado pela radiação incidente interage com o DNA (Figura 21) (JOHNS; CUNNINGHAM, 1983; HALL; GIACCIA, 2018).



**Figura 21: Mecanismos direto e indireto de dano ao DNA celular, causado por radiação ionizante.**

**Fonte: Adaptado de Hall e Giaccia (2018)**

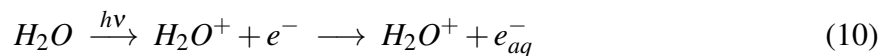
Quando um fóton de raios X interage com uma molécula de água, esta pode ser ionizada como descrito na Equação 10, formando uma molécula de água H<sub>2</sub>O<sup>+</sup> e um elétron e<sup>-</sup> (JOHNS; CUNNINGHAM, 1983; HALL; GIACCIA, 2018). Este elétron deixa a molécula-mãe e fica aprisionado entre outras moléculas de água que, devido à sua natureza polar, tendem a ter seus átomos de hidrogênio (mais positivamente carregados) voltados para o elétron e os átomos de oxigênio (mais negativos) voltados contra o elétron (como ilustrado na Figura 22. Neste arranjo, no qual o elétron está preso entre as moléculas de água, ele é chamado elétron aquoso (e<sub>aq</sub><sup>-</sup>) (HALL; GIACCIA, 2018; VOET; VOET, 2011).



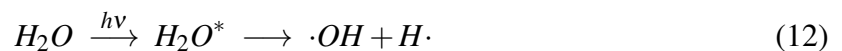
**Figura 22: Elétron aprisionado entre moléculas de água orientadas. Este elétron é chamado elétron aquoso.**

**Fonte: Voet e Voet (2011)**

A molécula ionizada de água se quebra em um íon de hidrogênio (próton  $H^+$ , Figura 23 (e)) e um radical de hidroxila ( $\cdot OH$ , Figura 23 (b)), como apresentado na Equação 11. Esse radical livre sem carga precisa de apenas um elétron para alcançar a estabilidade e, portanto, é altamente reativo, durando apenas cerca de  $1 \mu s$  (JOHNS; CUNNINGHAM, 1983; HALL; GIACCIA, 2018).

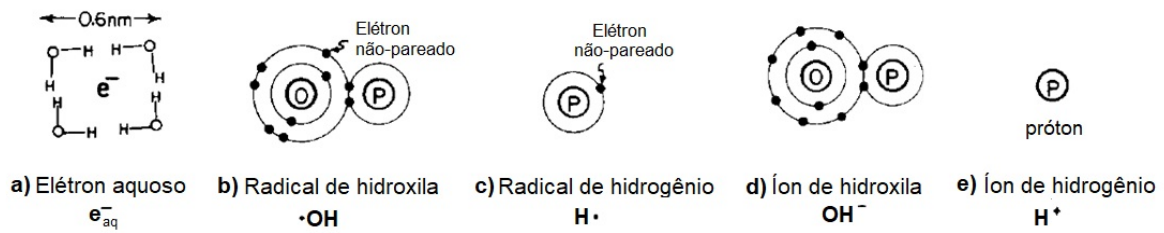


Outra possibilidade é a radiação incidente excitar a molécula de água ( $H_2O^*$ ), que se quebra dando origem a um radical de hidrogênio ( $H\cdot$ ) e um de hidroxila ( $\cdot OH$ ), como expressado na Equação 12 (JOHNS; CUNNINGHAM, 1983; HALL; GIACCIA, 2018).



Como resultado desses processos, são produzidos três importantes elementos reativos:  $e_{aq}^-$ ,  $\cdot OH$  e  $H\cdot$ , com uma proporção de 45%, 45% e 10%, respectivamente, se observado alguns segundos após a interação. Estes elementos resultam em danos no sistema biológico pois causam modificações em outras moléculas na célula. A hidroxila  $\cdot OH$  é considerada como o reativo mais danoso, pois é um agente oxidante capaz de extrair um átomo de hidrogênio do DNA, deixando nele uma vacância. Essa alteração pode levar a mudanças nas bases do DNA ou à quebra das moléculas de açúcar e fosfato. Essas quebras podem ocorrer em uma ou duas hélices (JOHNS; CUNNINGHAM, 1983; HALL; GIACCIA, 2018).





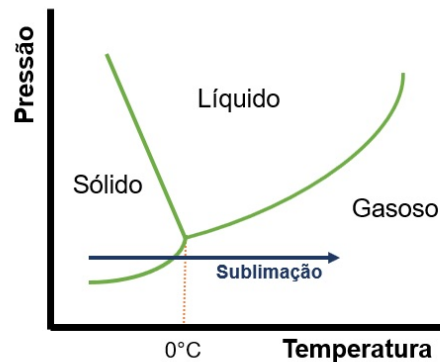
**Figura 23: Produtos reativos da interação da radiação ionizante com moléculas de água: (a) elétron aquoso; (b) radical de hidroxila; (c) radical de hidrogênio; (d) íon de hidroxila; (e) íon de hidrogênio.**

**Fonte: Adaptado de Johns e Cunningham (1983)**

As células possuem elaborados mecanismos de reparação dos danos causados pela radiação ionizante, mas sua eficácia depende de diversos fatores, tanto referentes às características da radiação incidente (tipo e energia) e do próprio tecido (sensibilidade intrínseca, etapa do ciclo celular que a célula em questão se encontra, quantidade de oxigênio presente, etc), portanto nem todos os danos são perpetuados na divisão celular (JOHNS; CUNNINGHAM, 1983; HALL; GIACCIA, 2018).

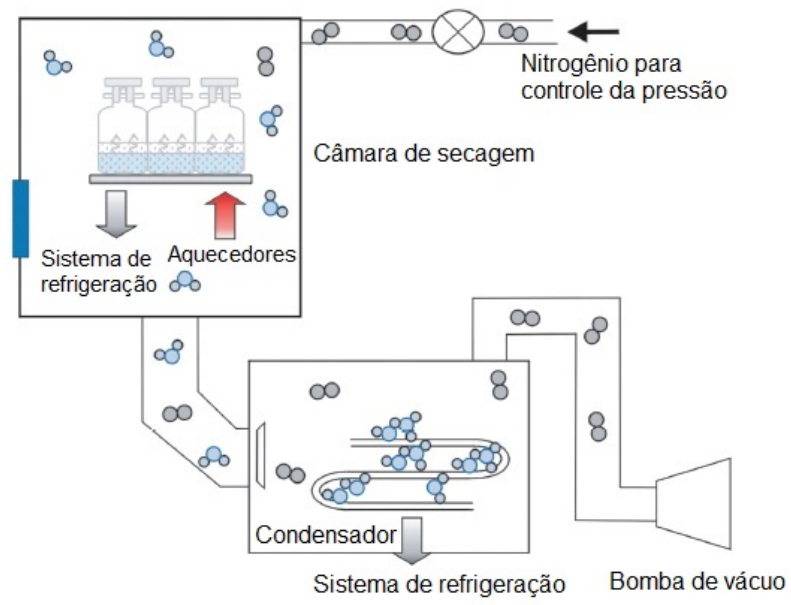
### 3.5 LIOFILIZAÇÃO

A liofilização, também conhecida como criodessecação, é um processo de remoção de água de amostras congeladas em uma câmara à vácuo. A água congelada é convertida diretamente em água vaporizada sem passar por um estado intermediário líquido. É uma técnica não destrutiva de preservação de amostras biológicas (ELSHEMEY *et al.*, 2013). A Figura 24 apresenta um diagrama com as fases da água. É possível perceber que reduzindo a pressão e aumentando a temperatura de uma amostra sólida esta passará pelo processo de sublimação.



**Figura 24: Diagrama dos estados físicos da água, com destaque para a sublimação, que ocorre com a redução da pressão e aumento da temperatura.**

Um processo típico de liofilização consiste em três estágios: congelamento, secagem primária e secundária. No congelamento, a maior parte do solvente, normalmente água, é separado do soluto para formar gelo. Conforme o congelamento progride, o soluto torna-se altamente concentrado e é chamado “concentrado congelado”. Até o fim do processo de congelamento, quando alcança-se em torno de  $-40^{\circ}\text{C}$ , esse concentrado terá em torno de 20% da quantidade de água que havia antes da formação do gelo. O secamento primário, ou sublimação do gelo, começa quando a pressão da câmara é reduzida e a temperatura aumentada. A pressão cai até ficar menor que a pressão do vapor de gelo, de forma a permitir uma boa taxa de sublimação. Para a maioria das aplicações, uma pressão entre 6 kPa e 26 kPa costuma ser utilizada. A sublimação e a cristalização permitem que o gelo seja transferido do produto para as placas frias ( $< -50^{\circ}$ ) do condensador. Após a secagem primária, um produto amorfo ainda contém entre 5% e 20% de água residual. Portanto, o objetivo da secagem secundária é reduzir a umidade restante. Nessa etapa a temperatura é aumentada ainda mais (chegando até  $50^{\circ}$ ) para que a dessorção de água ocorra rapidamente (TANG; PIKAL, 2004). A Figura 25 mostra uma esquematização do funcionamento de uma unidade liofilizadora.



**Figura 25: Esquematização do funcionamento de uma unidade liofilizadora.**

**Fonte: Adaptado de Sundaram *et al.* (2010)**

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 AMOSTRAS

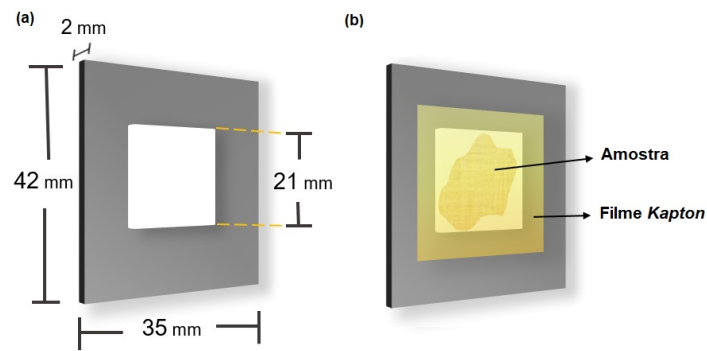
O uso de amostras mamárias caninas nessa pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (CEUA - UTFPR), sob o protocolo 2017-029/2017 (Anexo A). Elas foram disponibilizadas pelo Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Paraná - Campus Agrárias, com seus respectivos laudos histopatológicos, cujo método usado para análise foi o consenso de Cassali *et al.* (2014), que por sua vez se baseia na classificação de Misdorp *et al.* (1999), amplamente utilizada na comunidade veterinária mundial. Estas amostras foram conservadas em formalina (solução de formol tamponado a 10%) em temperatura ambiente. Tratam-se de descartes oriundos de tumores mamários espontâneos da espécie *Canis lupus Familiaris* (cão doméstico).

#### **Amostras fixadas em formalina**

Cinco amostras foram analisadas, incluindo duas com lesões benignas (adenoma simples e policístico) e três com lesões malignas (um carcinoma sólido e dois adenocarcinomas simples, grau I). Suas lâminas histopatológicas podem ser encontradas no Apêndice A. Foram cortadas com aproximadamente 2 mm de espessura e 1.5 cm<sup>2</sup> de área. Os cortes incluíram pelo menos parte do tumor e tecido normal ao seu redor. Com auxílio do sistema laser-video do equipamento, foram selecionados cinco pontos para análise em cada amostra. Esses pontos foram escolhidos de forma a incluir a área claramente lesionada (região do tumor) e os tecidos adjacentes.

Previamente ao experimento, as amostras foram levemente enxugadas com um papel absorvente para remover o excesso de formalina. Foram colocadas no primeiro porta-amostra, de alumínio, esquematizado na Figura 26, e cobertas por uma fina camada (0,025 mm) de filme *Kapton*, dos dois lados do porta-amostra, para evitar a perda de umidade por evaporação durante as medidas.

Ao final do experimento, o primeiro ponto escolhido para análise, de cada amostra, passou por uma nova medida, a fim de se avaliar a extensão do dano causado pela radiação no tecido.

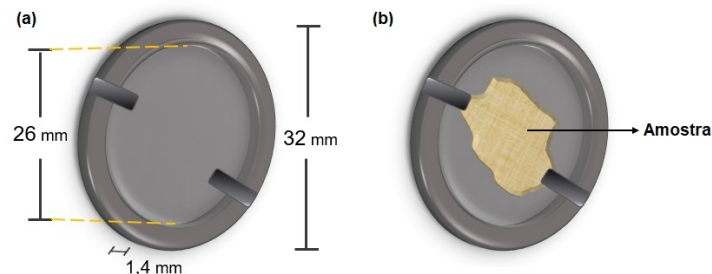


**Figura 26: Porta-amostra 1: utilizado para as amostras fixadas em formalina. (a) Dimensões do PA. (b) Posicionamento da amostra com filme *Kapton*.**

### Amostras liofilizadas

Após a realização dos experimentos nas amostras fixadas, as mesmas foram submetidas a um processo de liofilização, usando o Liofilizador L101 (Liotop, Brasil) disponibilizado pelo Departamento Acadêmico de Química e Biologia da UTFPR. Cada amostra foi pesada antes e depois de passar por tal processo, a fim de se estabelecer seu conteúdo hídrico. Então foram armazenadas em um compartimento plástico vedado, em uma temperatura média de 5 °C, até a ocasião do experimento.

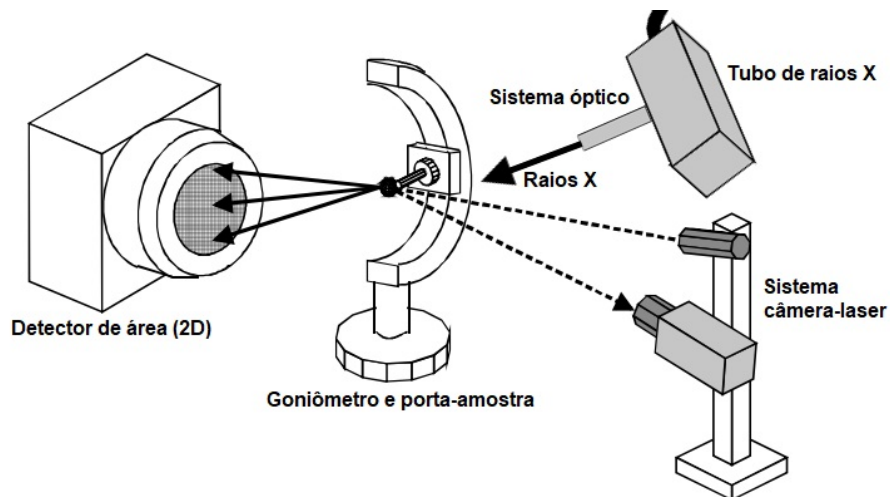
Por não possuírem água, não houve necessidade de cobri-las com filme *Kapton* no momento da medida e, portanto, um porta-amostra diferente foi utilizado (Figura 27), no qual as amostras foram fixadas por pequenos ganchos de aço. Os mesmos pontos analisados nas amostras hidratadas foram selecionados para medida nessa configuração.



**Figura 27: Porta-amostra 2: utilizado para as amostras liofilizadas, feito de alumínio. (a) Dimensões do segundo PA. (b) Posicionamento da amostra, fixada por pequenos ganchos de aço.**

## 4.2 CONFIGURAÇÃO EXPERIMENTAL

Os experimentos foram conduzidos em um difractômetro D8 Discover (Bruker, Alemanha), pertencente ao Laboratório de Óptica de Raios X e Instrumentação do Departamento de Física da Universidade Federal do Paraná (LORXI - UFPR), em modo reflexão. O arranjo experimental é ilustrado abaixo (Figura 28). A distância fonte-amostra utilizada foi de 520 mm e a distância amostra-detector foi de 200 mm para amostras hidratadas e 135 mm para as amostras liofilizadas. Essa diferença na distância amostra-detector se deu para redução do tempo de medida, já que essa aproximação possibilita a leitura de todos os ângulos de interesse em um único *frame*.



**Figura 28:** Arranjo experimental do experimento em modo reflexão, ilustrando os principais componentes: tubo de raios X, sistema óptico de colimação, focalização e monocromatização, sistema laser-câmera de alinhamento, porta-amostra e detector 2D.

Fonte: Adaptado de He (2003)

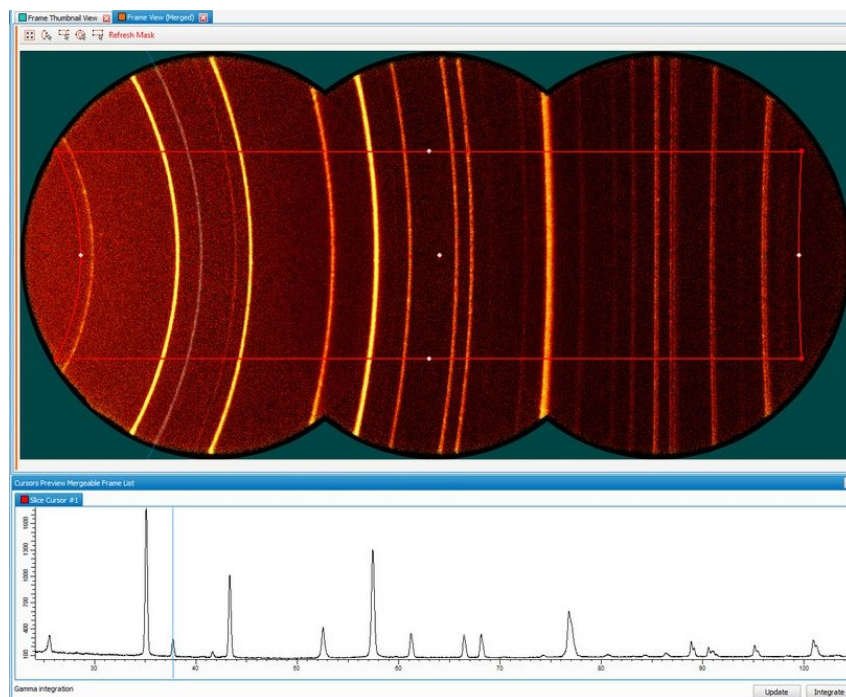
A fonte de raios X utilizada foi a  $I\mu S$  2.0 (Incoatec, Alemanha), com microfoco de cobre ( $Z_{Cu} = 29$ ,  $K\alpha_{Cu} = 8,04$  keV,  $\lambda_{K\alpha-Cu} = 1,54$  Å), com sistema óptico de focalização, colimação e monocromatização Montel (descrito na seção 3.2.1.1). A fonte operou com um ponto focal de 1,0 mm, tensão de 50,0 keV, corrente de 1,0 mA e potência de 50,0 W. O arranjo contava, também, com um detector de área (bidimensional) com tecnologia *microgap* (descrita na seção 3.3.1), o VANTEC-500 (Bruker, Alemanha), que possui uma área sensível especialmente ampla (140 mm de diâmetro) e eficiência de 80% para a energia selecionada (BRUKER, 2018).

As amostras foram posicionadas verticalmente no goniômetro com auxílio dos porta-amostras de alumínio (Figuras 26 e 27). Os pontos analisados foram selecionados com o

sistema câmera-laser, que indica a exata posição do feixe na amostra, permitindo selecionar precisamente as regiões de interesse para medida. A varredura foi feita no modo reflexão, de  $8,2^\circ < 2\theta < 60,8^\circ$  com passos de  $0,005^\circ$  para amostras fixadas em formalina e  $12,2^\circ < 2\theta < 57,3^\circ$  com passos de  $0,01^\circ$  para as liofilizadas, ambos com 600 segundos de exposição por passo. O momento transferido equivalente  $q$  (definido na Equação 9) foi de  $5,8 \text{ nm}^{-1}$  a  $41,3 \text{ nm}^{-1}$  (amostras hidratadas) e  $8,7 \text{ nm}^{-1}$  a  $39,1 \text{ nm}^{-1}$  (amostras liofilizadas).

### 4.3 OBTENÇÃO DOS PERFIS DE ESPALHAMENTO

Primeiramente, as imagens dos anéis de Debye obtidos pelo detector de área foram integrados ao longo de  $2\theta$  para obter dados unidimensionais com o software *Diffraç. suite EVA 4.0* (Bruker, Alemanha), como ilustrado na Figura 29. As contagens por tempo, referidas como intensidade relativa ( $I_{exp}$ ), foram então plotadas em função do momento transferido  $q$  ( $\text{nm}^{-1}$ ). Finalmente, os valores de intensidade obtidos experimentalmente passaram por algumas correções, descritas a seguir.



**Figura 29:** Integração dos anéis de Debye para obtenção de dados unidimensionais com o software *Diffraç. suite EVA 4.0* - figura meramente ilustrativa.

Fonte: (BRUKER, 2018)

#### 4.3.1 CONTRIBUIÇÕES ESPÚRIAS

Os dados coletados passaram por correções para remoção de contribuições espúrias, estas sendo consideradas como qualquer contagem de fótons que cheguem ao detector não oriundas da amostra de tecido analisada. No caso das amostras fixadas em formalina, as fontes de contribuição foram: o ar ( $I_{ar}$ ), filme *kapton* ( $I_k$ ) e atenuação pela própria amostra ( $I_A$ ). A equação aplicada nos dados obtidos experimentalmente ( $I_{exp}(q)$ ) para remoção dessas contribuições e obtenção da intensidade corrigida ( $I_{corrigida}$ ) está expressa na Equação 13.

$$I_{corrigida} = \frac{I_{exp}(q) - [I_{ar}(q) \cdot (I_k(q) \cdot T_k)]}{I_A} \quad (13)$$

em que  $T_k$  corresponde ao fator de transmissão do filme *kapton*, obtido a partir de sua espessura (0,025 mm) e coeficiente de transmissão para a energia selecionada (0,4830 mm<sup>-1</sup>).  $T_k$  foi considerado constante e igual a 0,976. Já que a determinação absoluta de valores de espalhamento não era o objetivo deste trabalho, mas sim uma comparação relativa entre os perfis, a contribuição do ar foi considerada desprezível (igual a 1) e a intensidade corrigida está em função da auto-atenuação da amostra.

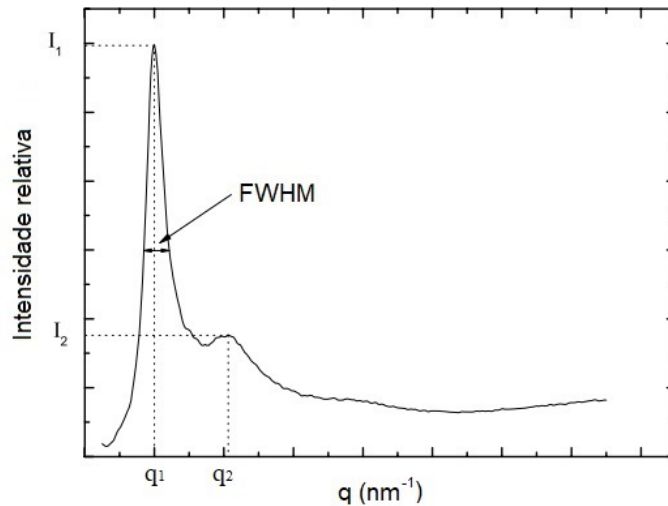
As amostras liofilizadas foram posicionadas com um porta-amostra diferente (Figura 27), que dispensava o uso de filme *kapton*, porém possuía alumínio no fundo. Dessa forma, dependendo da espessura da amostra após a liofilização, e de sua composição na região medida, a intensidade da contribuição do PA variou de amostra para amostra e de ponto para ponto (em uma mesma amostra), já que em alguns casos o feixe foi capaz de atravessar o tecido e interagir diretamente com o alumínio no fundo. Essa diferença no padrão da contribuição do PA impossibilitou a redução generalizada de suas contagens para todas as medidas. O perfil de espalhamento do alumínio foi obtido, com os mesmos parâmetros, para verificar a posição dos picos deste material, de forma a correlacionar e identificar quais picos nos perfis liofilizados não são resultado da própria amostra, já que suas intensidades não puderam ser reduzidas.

#### 4.3.2 DEFINIÇÃO DE VARIÁVEIS

Uma vez corrigidas, as intensidades foram plotadas em função do momento transferido  $q$  (nm<sup>-1</sup>) com o *software* Origin Pro 9.0 (Originlab, Massachusetts), obtendo assim os perfis de espalhamento elástico. A partir dessas curvas foram extraídas as seguintes variáveis para análise: posição do primeiro pico (na posição associada ao tecido adiposo) ( $q_1$ ) e do segundo pico (associado ao tecido fibroglandular) ( $q_2$ ), intensidades ( $I_1$  e  $I_2$ ), largura à meia altura



(FWHM) e a razão entre as intensidades dos dois picos ( $I_1/I_2$ ). A escolha destas variáveis foi motivada por trabalhos anteriores (CUNHA, 2006; EVANS *et al.*, 1991; FAGUNDES *et al.*, 2019; KIDANE *et al.*, 1999; POLETTI *et al.*, 2002). A figura 30 exemplifica as variáveis extraídas.



**Figura 30: Seleção das variáveis para análise dos perfis de espalhamento.**

**Fonte: Adaptado de Cunha (2006)**

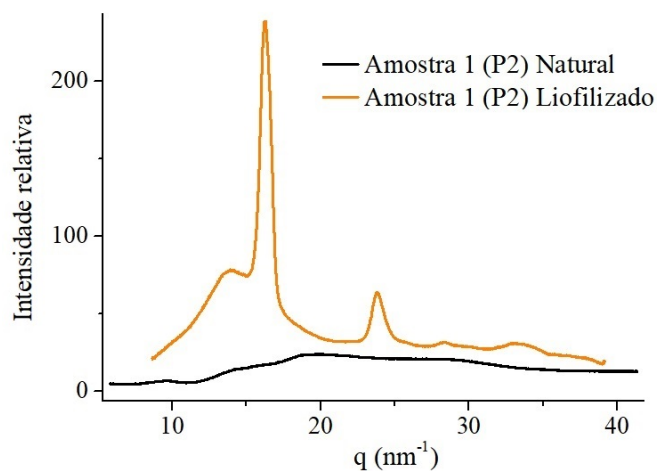
Os perfis corrigidos são apresentados na seção 5. Em cada amostra são comparados os dados obtidos em estado fixado em formalina e liofilizado. Cada região analisada recebeu uma denominação de ponto 1 a 5 (P1 a P5), e estão demarcadas nas fotografias das amostras com a mesma cor com que se apresenta seu perfil de espalhamento. As lâminas histológicas usadas para realizar o laudo (por um patologista externo) dessas amostras foram anexadas ao trabalho (Apêndice A).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PERFIS DE ESPALHAMENTO E INFLUÊNCIA DA ÁGUA

#### Considerações gerais

As intensidades relativas foram normalizadas para possibilitar a comparação dos picos, já que as amostras liofilizadas apresentaram um número significativamente maior de contagens que as amostras fixadas em formalina, como mostra a Figura 31.



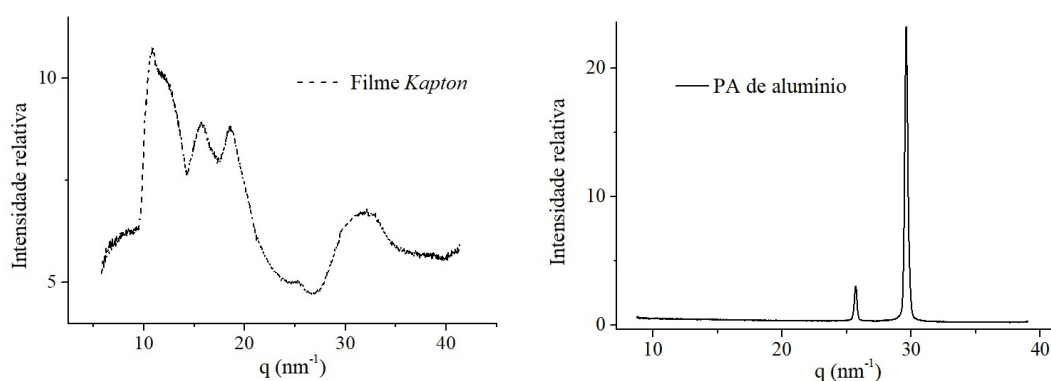
**Figura 31:** Exemplo de perfis obtidos para a mesma região de uma amostra fixada em formalina e após liofilização. A diferença no número de contagens impossibilita a caracterização do perfil fixado.

Na referida imagem é possível observar que essa diferença de intensidade impossibilita a visualização dos perfis de amostras hidratadas. O pico na posição de  $q = 13,9 \text{ nm}^{-1}$ , posição referente ao tecido adiposo, chega a 77 contagens na amostra liofilizada e apenas 13 na fixada. Essa diferença se dá devido a perda de átomos de oxigênio e hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}$ ) no tecido, levando ao rearranjo das moléculas, o que resulta, por sua vez, em um aumento na concentração de nitrogênio e carbono, átomos com densidade eletrônica muito maior que a do hidrogênio. Por este motivo, no estado liofilizado ocorre mais espalhamento elástico e, portanto, são geradas mais contagens. Na Figura 33 (c), os perfis para a mesma região estão apresentados com a intensidade normalizada, e observa-se que, dessa forma, a comparação se torna possível.

#### Contribuições espúrias

Na Figura 32 (a) encontra-se o perfil de espalhamento elástico do filme *Kapton*. Suas

contagens foram subtraídas dos perfis obtidos para as amostras em estado fixado, conforme discutido na seção de metodologia. Em (b) está apresentado o perfil do alumínio, material que compõe o porta-amostra usado para amostras liofilizadas (Figura 27). Sua contribuição não foi removida das medidas pois foi muito variada de ponto para ponto (dependendo da espessura da amostra pós-liofilização e composição no local), mas pode-se estabelecer que os picos estreitos observados em alguns perfis de amostras liofilizadas (com intensidades variadas), nas posições de  $q = 26,8 \text{ nm}^{-1}$  e  $30,9 \text{ nm}^{-1}$ , provém do fundo de alumínio do porta-amostra.

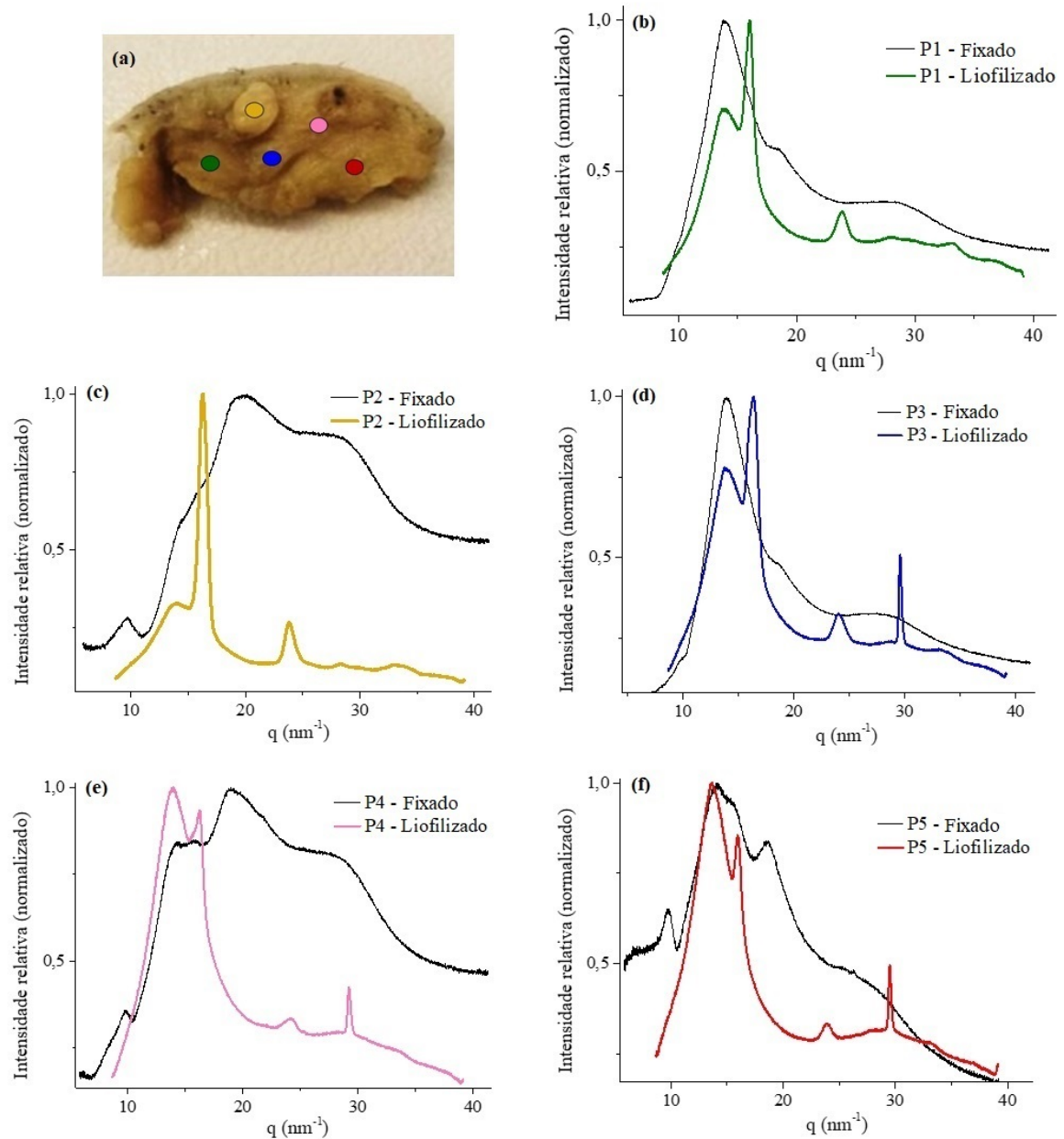


**Figura 32: Perfis de espalhamento das contribuições espúrias. (a) Filme *Kapton*, usado nas amostras em estado fixado e (b) alumínio, material do PA usado nas amostras liofilizadas.**

### Amostra 1

A primeira amostra analisada trata-se de um adenoma simples (Figura 33-a), retirada de um trecho entre o terceiro e o quarto par de mamas de um cão da raça *Lhasa apso*, de seis anos de idade. Na foto da amostra estão salientados os cinco pontos analisados (P1 a P5), e suas cores correspondem aos perfis apresentados na Figura 33 (b) - (f). A amostra passou de 0,5208 g para 0,3925 g após o processo de liofilização, o que significa que continha 24,6% de água em sua composição. Observando a Tabela 6 tem-se que o pico adiposo apresentou o centro, em média, em  $q = 13,9 \text{ nm}^{-1}$ , com intensidade máxima de 55,8 contagens. O pico glandular em  $q = 19,0 \text{ nm}^{-1}$ , com um máximo de 27,9 contagens (em estado fixado).

Analisando as curvas obtidas com a amostra em estado fixado (em preto), pode-se observar a presença de dois pontos majoritariamente adiposos (P1 e P3), cujas razões  $I_1/I_2$  foram 2,0 e 2,4, respectivamente (Tabela 6). O pico em  $q = 13,9 \text{ nm}^{-1}$  está associado à distância ( $4,5 \text{ \AA}$ ) entre carbonos de cadeias vizinhas de ácidos graxos (KANICKY; SHAH, 2002). Por serem constituídas por tecido adiposo, não se observa tanta diferenciação nessas regiões após retirada de água. O contraste na perda de intensidade após liofilização dos pontos P1 e P3 (15% e 20%) quando comparados aos outros pontos (que chegaram a reduzir em 82%



**Figura 33: Amostra 1: adenoma simples, com indicação dos pontos analisados (a). Os perfis de espalhamento obtidos no estado fixado em formalina e liofilizado são apresentados de (b) a (f), com as cores correspondentes aos pontos na fotografia.**

sua intensidade) prova que essa redução hídrica não é homogênea por toda a amostra, mas se concentra, principalmente, nas regiões de tecido fibroglandular. Um ombro em torno de  $q = 28,0 \text{ nm}^{-1}$  é observado em todos os perfis, mas no caso dos pontos P1 e P3 pode estar relacionado ao espalhamento harmônico do pico de ácidos graxos. Nos outros pontos, que são predominantemente fibroglandulares, o pico nesta posição pode estar associado ao espaçamento entre hidrogênio-oxigênio de moléculas de água vizinhas.

**Tabela 6: Parâmetros obtidos a partir dos perfis da amostra 1 em estado fixado**

	Primeiro pico (adiposo)					Segundo pico (glandular)				
	Ponto	Área	FWHM	Centro	I <sub>1</sub>	Área	FWHM	Centro	I <sub>2</sub>	I <sub>1</sub> /I <sub>2</sub>
Amostra 1	P1	227,9	5,4	13,8	52,7	-	-	-	26,0	2,0
	P2	-	-	-	14,0	130,8	5,8	20,1	23,8	0,6
	P3	218,9	4,9	13,9	55,8	-	-	-	23,0	2,4
	P4	-	-	-	23,6	83,5	3,1	19,0	27,9	0,8
	P5	18,5	1,1	14,2	16,9	-	-	-	14,2	1,2

Como o tumor benigno dessa amostra apresentava contornos bem definidos, foi possível selecionar um ponto exatamente nele (P2). Este ponto apresenta um perfil predominantemente glandular, com um pico largo em  $q = 20,9 \text{ nm}^{-1}$ , correspondente à distância entre átomos de oxigênio de moléculas de água vizinhas. Sua razão  $I_1/I_2$  foi de 0,58, demonstrando pouca contribuição de tecido adiposo. O pico em  $10 \text{ nm}^{-1}$  (também observado nos pontos P4 e P5) pode ser contribuição do filme *Kapton*, já que estes perfis apresentaram intensidades bastante baixas (variando de 15 a 25 contagens), e portanto a influência do *Kapton* é observável mesmo após a correção. O ponto P4 também apresenta um pico na região do tecido glandular, em  $q = 19,6 \text{ nm}^{-1}$ , mas também uma intensidade substancial no pico de  $q = 14,4 \text{ nm}^{-1}$ , mostrando que é composto por um misto dos tecidos adiposo e fibroglandular (razão  $I_1/I_2 = 0,8$ ). Nos pontos P2 e P4 é possível observar grande diferença nos perfis dos seus equivalentes liofilizados, já que a perda hídrica nesses pontos foi mais intensa (redução de 82% e 59% na intensidade, respectivamente).

O ponto P5, cujas contagens foram muito baixas (16,9 no pico mais intenso), apresenta um perfil incomum. Um pico em  $10,0 \text{ nm}^{-1}$  é bem visível, contribuição remanescente do filme *Kapton*, e o primeiro pico apresenta um ombro à direita, em  $15,4 \text{ nm}^{-1}$ . Essas anormalidades, também vistas em pontos de outras amostras, são provavelmente consequência do baixo índice de contagens, que não permitiu a obtenção de informações suficientes a respeito das estruturas da região.

Conforme demonstrado na Figura 32 (b), o pico em  $q = 30,0 \text{ nm}^{-1}$ , visualizável nos pontos P2 a P5 das medidas liofilizadas (em colorido), são contribuição do porta-amostra. O surgimento de picos em  $q = 15,9 \text{ nm}^{-1}$  e  $23,8 \text{ nm}^{-1}$ , (correspondentes a uma distância entre centros espalhadores de  $3,9 \text{ \AA}$  e  $2,6 \text{ \AA}$ , respectivamente) podem ser consequência do rearranjo molecular das estruturas durante o processo de liofilização. Outra possibilidade é que estes picos sejam característicos da amostra, mas normalmente não são visualizados devido ao pico da água, que domina o perfil de espalhamento.

## Amostra 2

A segunda amostra estudada possui um adenoma policístico (Figura 34-a). Provém do quarto par de mamas de um cão sem raça definida, de sete anos de idade. A amostra passou de 0,8118 g para 0,4520 g após o processo de liofilização, indicando que 44,3% do seu peso correspondia a conteúdo aquoso. Nenhum dos pontos analisados apresentou um perfil majoritariamente adiposo, como pode-se observar na Figura 34 (b) - (f), portanto as razões entre os picos  $I_1/I_2$  não ultrapassaram 1,0 em nenhuma região, variando de 0,4 (P4) a 0,95 (P2). Na Tabela 7 observa-se que o único ponto com pico adiposo apresentou o centro em  $q = 15,2 \text{ nm}^{-1}$ , com intensidade máxima de 26,8 contagens. O pico glandular ficou, em média, em  $q = 19,2 \text{ nm}^{-1}$ , com um máximo de 28,2 contagens.

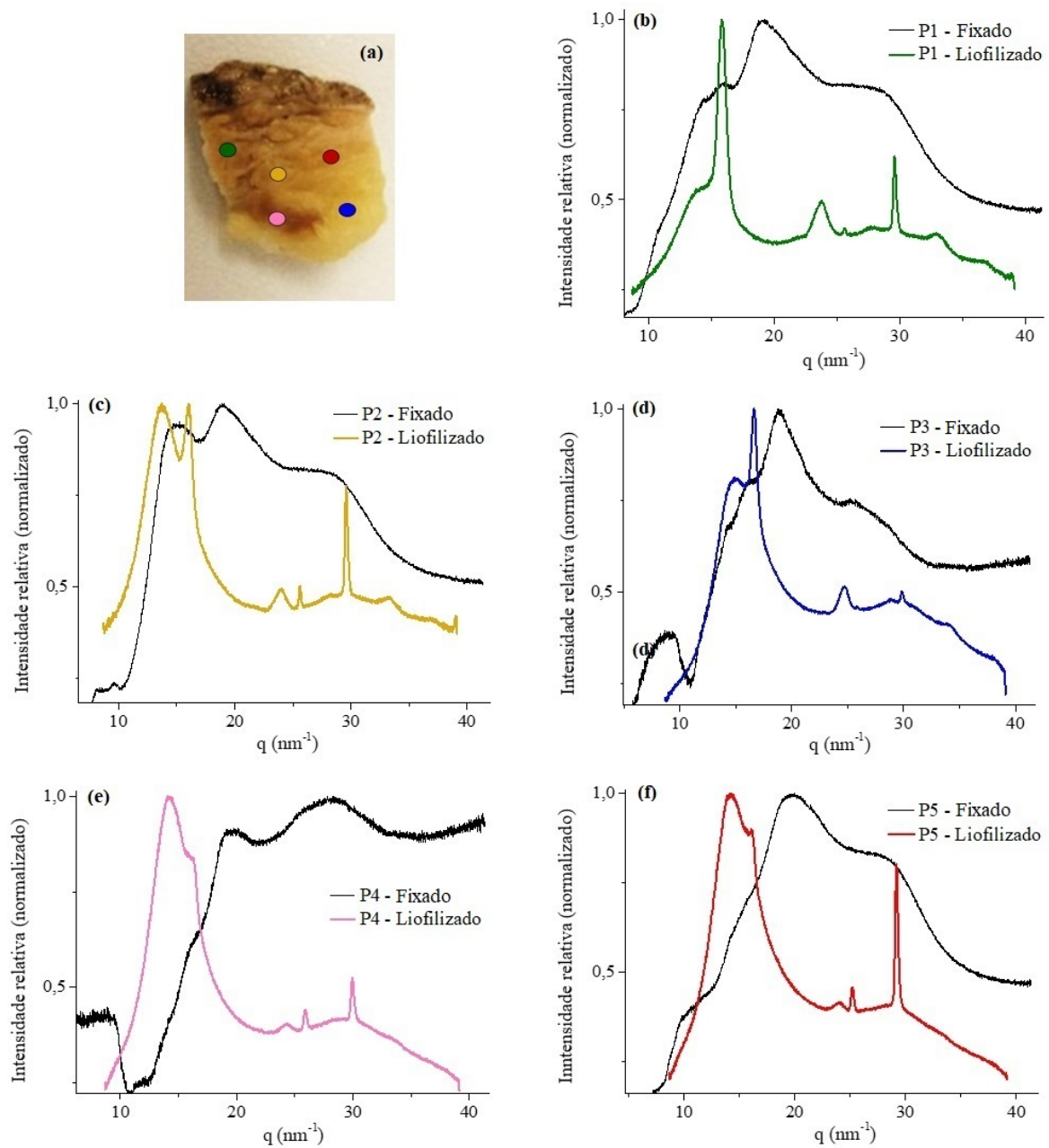
**Tabela 7: Parâmetros obtidos a partir dos perfis da amostra 2 em estado fixado**

	Primeiro pico (adiposo)					Segundo pico (glandular)				
	Ponto	Área	FWHM	Centro	$I_1$	Área	FWHM	Centro	$I_2$	$I_1/I_2$
	<b>P1</b>	-	-	-	21,5	122,5	5,0	19,2	26,0	0,8
	<b>P2</b>	58,1	2,2	15,2	26,8	98,1	3,6	19,1	28,2	0,9
<b>Amostra 2</b>	<b>P3</b>	-	-	-	6,7	34,4	3,6	18,8	10,3	0,7
	<b>P4</b>	-	-	-	3,5	18,5	2,3	19,7	8,3	0,4
	<b>P5</b>	-	-	-	14,6	133,7	5,5	20,0	25,5	0,6

Os perfis das regiões analisadas nessa amostra, em estado fixado, não apresentaram tantas diferenças entre si. Todos possuem o segundo pico ( $q = 19,2 \text{ nm}^{-1}$ ) mais pronunciado, indicando que continham uma quantia significativa de água em sua composição (este pico está associado à distância O-O entre moléculas de água). As curvas liofilizadas mostram a ausência do pico associado ao tecido glandular e a redução da intensidade pós-liofilização variou de 24% a 46 %, portanto a perda hídrica dessa amostra foi relativamente homogênea ao longo de sua área. Por serem majoritariamente glandulares, os perfis apresentaram também o pico em  $q = 28 \text{ nm}^{-1}$ , (2,24 Å), distância H-O entre moléculas de água (VOET; VOET, 2011).

Os pontos P1 e P2, posicionados bem na região policística (afecção benigna), apresentaram mais intensidade na região referente ao tecido adiposo que os outros pontos, com razões  $I_1/I_2$  de 0,82 e 0,95, respectivamente, mostrando que os cistos além de ricos em conteúdo hídrico, possuem também adipócitos em sua composição.

Os pontos P3 e P4 apresentaram contagens extremamente baixas (em torno de 10), e portanto as informações contidas em seus perfis são difíceis de se avaliar. Como característico dos perfis com baixa intensidade estudados neste trabalho, estes também apresentaram o pico em  $q = 10,0 \text{ nm}^{-1}$ , uma contribuição remanescente do filme *Kapton*.



**Figura 34: Amostra 2: adenoma policístico, com indicação dos pontos analisados (a). Os perfis de espalhamento obtidos no estado fixado em formalina e liofilizado são apresentados de (b) a (f), com as cores correspondentes aos pontos na fotografia.**

Nas amostras liofilizadas, é possível observar grande variação na intensidade dos picos do porta-amostra (em  $q = 25,6 \text{ nm}^{-1}$  e  $29,5 \text{ nm}^{-1}$ ). No ponto P3, por exemplo, o pico em  $25,6 \text{ nm}^{-1}$  não aparece, e o pico em  $29,5 \text{ nm}^{-1}$  é discreto. Já no ponto P5, ambos aparecem claramente. Este padrão justifica que a contribuição do porta-amostra não tenha sido subtraída de forma generalizada das medidas. Ainda analisando os perfis liofilizados, nota-se que o aparecimento dos picos em  $q = 15,9 \text{ nm}^{-1}$  e  $23,8 \text{ nm}^{-1}$  ocorre também nesta amostra.

### Amostra 3

Esta amostra continha um adenocarcinoma simples, de grau I, com bordas bem delimitadas (Figura 35-a). Foi retirada do terceiro par de mamas de um cão sem raça definida, de nove anos de idade. Visualmente, os tecidos adjacentes ao tumor pareciam ser predominantemente adiposos. Porém, os perfis obtidos provam que a maioria dos pontos analisados possuíam mais conteúdo fibroglandular, exceto pelo ponto P4, que apresentou uma razão  $I_1/I_2$  igual a 1,1. O peso original da amostra era de 0,4846 g, e pós-liofilização passou a ser 0,3282 g, portanto seu conteúdo aquoso representava 32,3% do seu peso. A posição média do pico adiposo foi em  $q = 15,1 \text{ nm}^{-1}$  e do glandular em  $q = 19,1 \text{ nm}^{-1}$ , como apresentado na Tabela 8. As intensidades máximas obtidas foram de 28,7 contagens na posição adiposa e 26,5 na posição glandular.

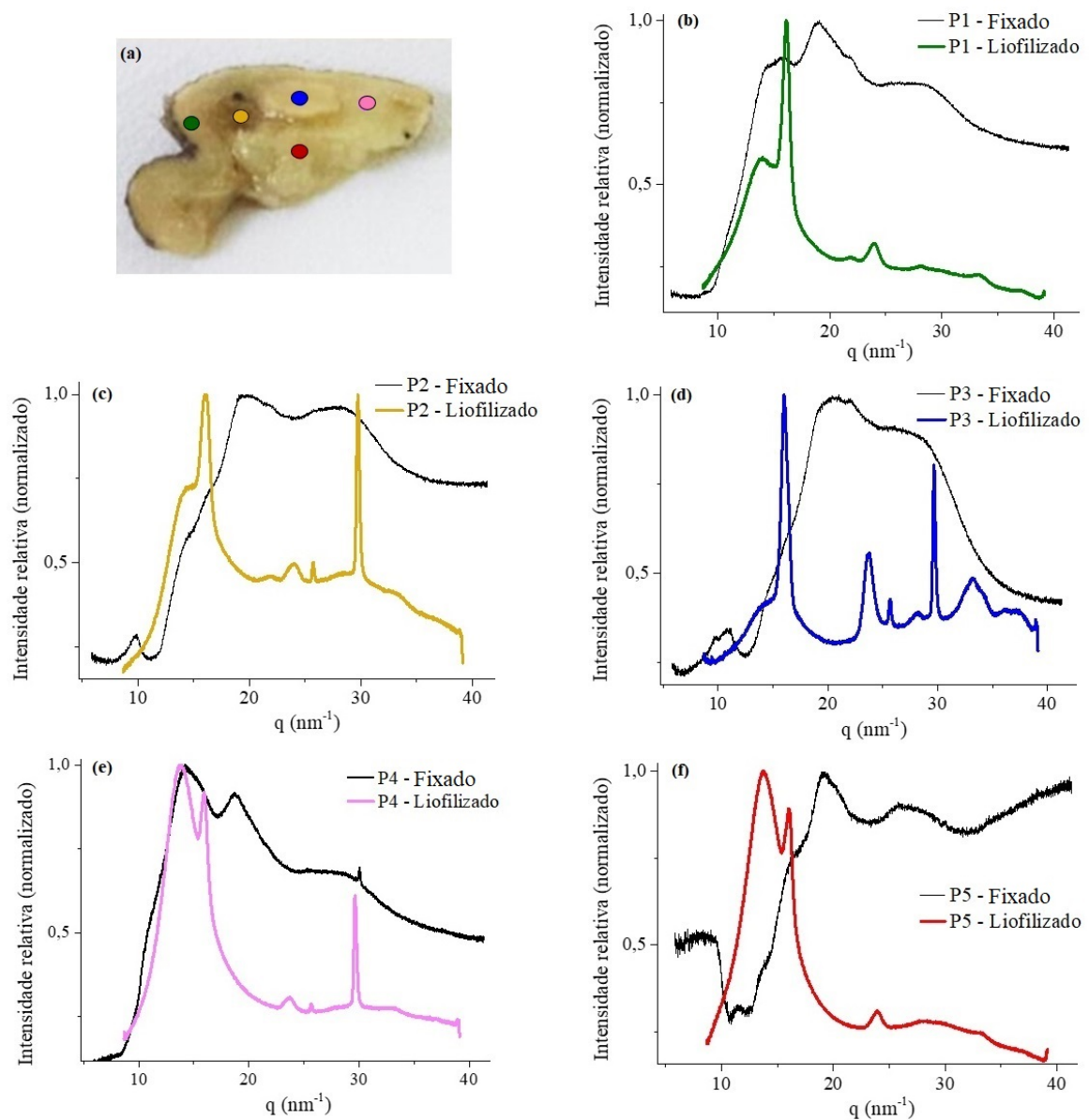
**Tabela 8: Parâmetros obtidos a partir dos perfis da amostra 3 em estado fixado**

	Primeiro pico (adiposo)					Segundo pico (glandular)				
	Ponto	Área	FWHM	Centro	$I_1$	Área	FWHM	Centro	$I_2$	$I_1/I_2$
	P1	41,2	1,8	16,0	23,1	78,4	3,2	19,1	25,8	0,9
	P2	-	-	-	10,0	83,6	4,3	20,1	19,9	0,5
Amostra 3	P3	-	-	-	7,7	77,2	4,3	21,0	18,4	0,4
	P4	96,4	3,6	14,2	28,7	57,6	2,3	18,7	26,3	1,1
	P5	-	-	-	3,4	21,2	2,9	19,0	7,5	0,4

O primeiro ponto (P1) se encontrava numa região muito próxima à derme da papila mamária, e apresentou uma proporção equilibrada de tecidos, com  $I_1/I_2$  igual a 0,9. Este ponto sofreu uma queda de 72% na intensidade após a liofilização, valor muito próximo do observado no ponto P5 (77%), mostrando que essas duas regiões possuíam uma quantia considerável de água. Os pontos P2 e P4 tiveram uma redução de 55% e 52% na sua intensidade pós-liofilização, indicando, novamente, que a perda de água no processo de liofilização não ocorre homogeneamente por toda a amostra.

O terceiro ponto (P3), na região do tumor maligno, apresentou uma intensidade baixa (chegando a 18,3 contagens no ponto mais alto do pico), portanto é possível observar um pico em  $q = 10 \text{ nm}^{-1}$ , referente ao filme *Kapton* (observado também em P2). Uma vez liofilizado, a intensidade na posição do pico adiposo continuou proporcionalmente baixa (17 contagens). Esse fato, somado à alta intensidade dos picos estreitos em  $25,6 \text{ nm}^{-1}$  e  $29,5 \text{ nm}^{-1}$ , mostram que as contagens obtidas tiveram muita influência do porta-amostras. Este ponto, P3, apresentou picos em  $q = 16,0 \text{ nm}^{-1}$  e  $23,7 \text{ nm}^{-1}$  bem intensos, que podem estar relacionados ao rearranjo das moléculas durante a liofilização, mostrando que a região tumoral sofreu alterações estruturais





**Figura 35: Amostra 3: adenocarcinoma simples - grau I, com indicação dos pontos analisados (a). Os perfis de espalhamento obtidos no estado fixado em formalina e liofilizado são apresentados de (b) a (f), com as cores correspondentes aos pontos na fotografia.**

no processo de secagem. Um pico relativamente largo em  $q = 33,0 \text{ nm}^{-1}$  também é observado, podendo, também, ser consequência desse rearranjo.

O último ponto (P5), obteve o menor número de contagens dos experimentos, apenas 7,5 no pico em  $q = 19,0 \text{ nm}^{-1}$ , por isso as bordas do perfil ( $q < 10 \text{ nm}^{-1}$  e  $q > 32 \text{ nm}^{-1}$ ) aparecem intensamente.

#### Amostra 4

Uma segunda amostra laudada com adenocarcinoma simples de grau I foi analisada. Foi retirada do terceiro par de mamas de um cão sem raça definida de treze anos. Assim como no adenocarcinoma discutido acima, apresentou perfis majoritariamente fibroglandulares (posição média do segundo pico em  $q = 19,1 \text{ nm}^{-1}$ ) em todos os pontos (suas razões  $I_1/I_2$  variaram de 0,37 a 0,67), como apresentado na Tabela 9. Isso é corroborado pelo fato dela ser 67% composta por água, já que possuía um peso de 0,6213 g inicialmente e passou a pesar 0,2022 g após ser liofilizada. Diferente da outra amostra de adenocarcinoma, esta não apresenta delimitações claras da área tumoral.

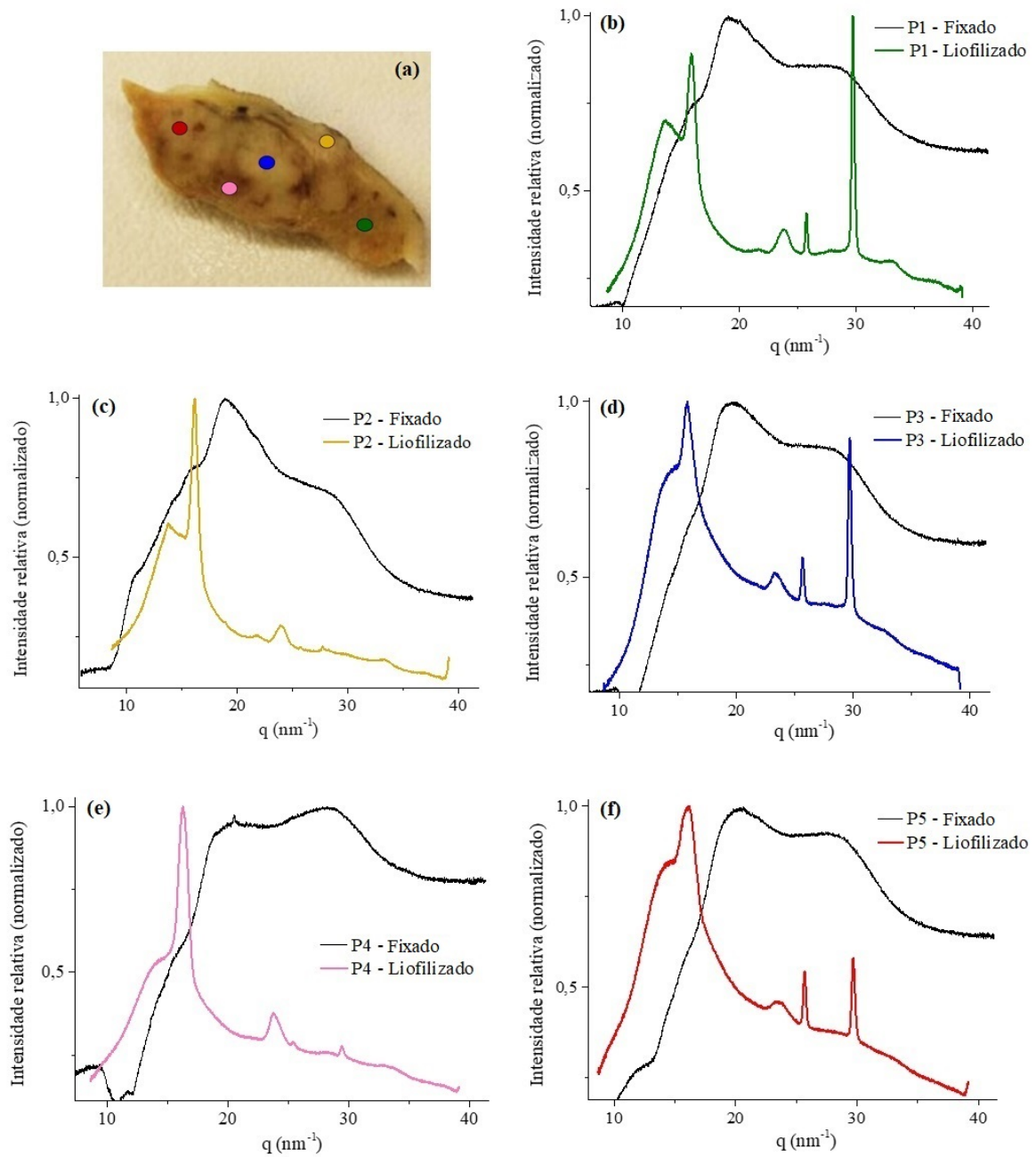
**Tabela 9: Parâmetros obtidos a partir dos perfis da amostra 4 em estado fixado**

	Primeiro pico (adiposo)					Segundo pico (glandular)				
	Ponto	Área	FWHM	Centro	$I_1$	Área	FWHM	Centro	$I_2$	$I_1/I_2$
	P1	-	-	-	15,0	120,6	5,1	19,1	25,1	0,6
	P2	-	-	-	18,9	87,2	3,2	18,9	28,1	0,7
Amostra 4	P3	-	-	-	11,5	108,4	4,7	19,9	24,1	0,5
	P4	-	-	-	7,4	-	-	-	17,6	0,4
	P5	-	-	-	8,9	96,7	4,2	20,7	23,7	0,4

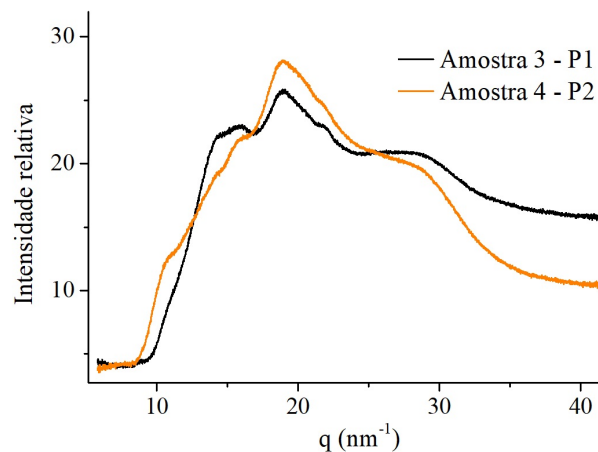
Nessa amostra não houveram grandes variações nas características dos perfis ao longo de sua área. O ponto P4 obteve poucas contagens (17,6 no ponto mais intenso) e seu perfil ficou irregular, com o pico em  $q = 28,0 \text{ nm}^{-1}$ , mais intenso que o qualquer um dos picos foco de estudo, adiposo e fibroglandular. Também observa-se um pico largo em torno de  $q = 8,0 \text{ nm}^{-1}$ , possivelmente uma contribuição remanescente do filme *Kapton*, como visto em outros perfis de baixa intensidade.

Nos perfis obtidos em estado liofilizado, observa-se que a redução de intensidade foi relativamente homogênea ao longo da extensão da amostra, com uma variação máxima de 21% (entre P3 e P4). A contribuição do porta-amostras varia significativamente, com picos muito intensos em  $q = 29,7 \text{ nm}^{-1}$  nos pontos P1 e P3, menos intensos em P4 e P5, e não existente em P2. Já o pico em  $q = 26,0 \text{ nm}^{-1}$ , que também provém do PA, é apenas visível em P1, P3 e P5. Novamente, essa variação na contribuição se dá devido à espessura após a liofilização e composição da amostra.

Todos os pontos apresentaram um pico em torno de  $q = 28,0 \text{ nm}^{-1}$ , relacionado à distância H-O entre moléculas de água (VOET; VOET, 2011). O segundo ponto (P2) foi obtido de uma região próxima à derme da papila mamária, assim como o ponto P1 da amostra 3 (apresentada acima). A Figura 37 mostra uma comparação destes dois pontos.



**Figura 36: Amostra 4: adenocarcinoma simples - grau I, com indicação dos pontos analisados (a). Os perfis de espalhamento obtidos no estado fixado em formalina e liofilizado são apresentados de (b) a (f), com as cores correspondentes aos pontos na fotografia.**



Seus perfis são bastante similares, com um pico principal em  $q = 18,9 \text{ nm}^{-1}$ , mais intenso no caso da amostra 4. A região dérmica da amostra 3, porém, apresentou mais contribuição de tecido adiposo, com uma razão  $I_1/I_2$  de 0,89, enquanto na amostra 4 essa razão foi de 0,67.

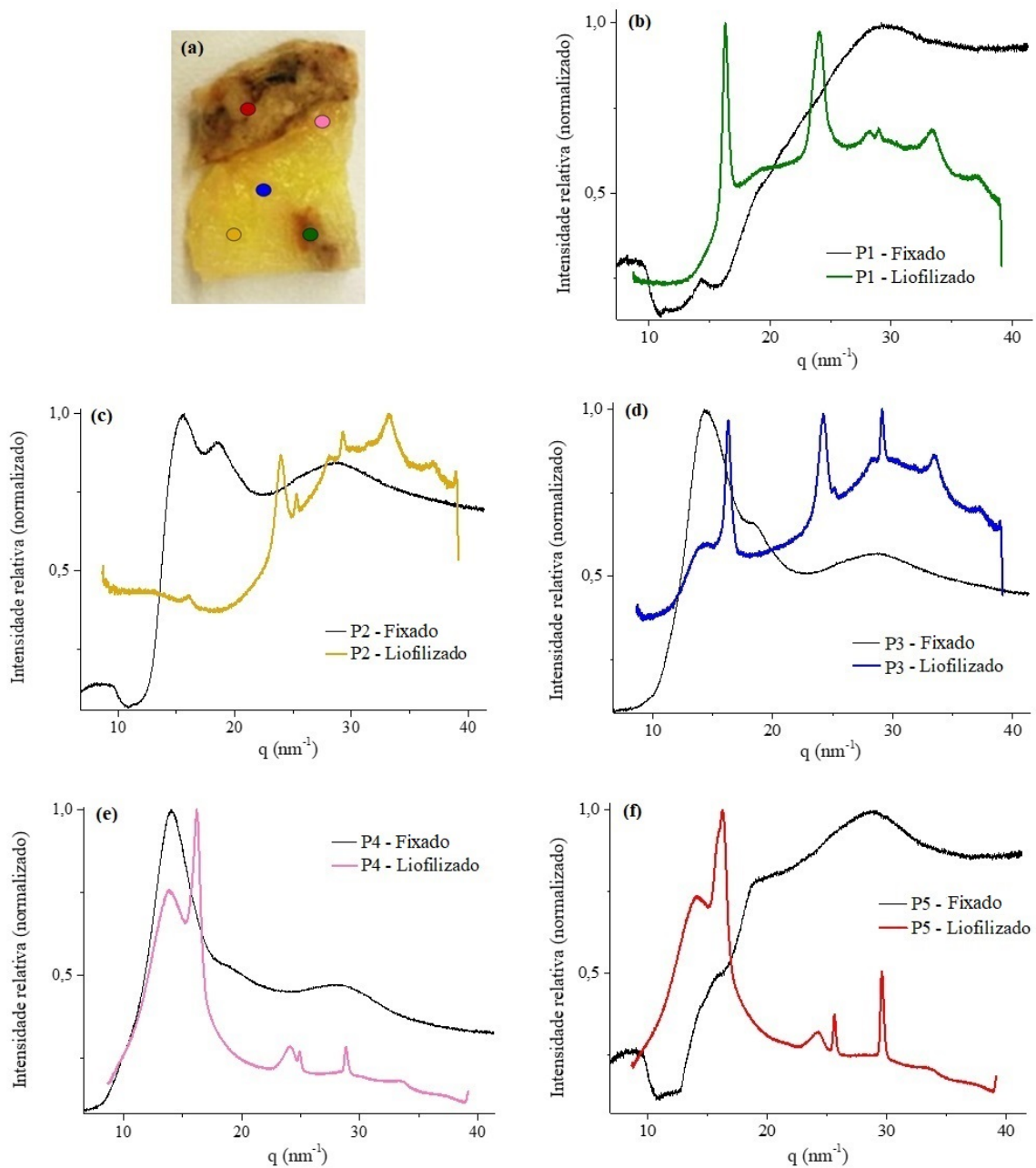
### Amostra 5

A última amostra estudada trata-se de um carcinoma sólido de grau I. Foi retirada do quinto par de mamas de um cão da raça *Beagle*, de treze anos. Observando sua imagem na Figura 38 (a), pode-se observar que a região do tumor está concentrada na parte superior (onde foi selecionado o ponto P5, em vermelho). O resto da amostra aparenta ser composto por tecido adiposo, e os perfis obtidos corroboram essa impressão. Quanto ao seu conteúdo aquoso, essa amostra passou de 1,0063 g para 0,6244 g após a liofilização, indicando que 41,4% da sua composição era de água.

Os experimentos com essa amostra geraram vários perfis anômalos: os pontos P1, P2 e P3 liofilizados, e P1 e P5 em estado fixado. No caso dos liofilizados, a intensidade dos picos correspondentes ao material do porta-amostras (em  $q = 26,0 \text{ nm}^{-1}$  e  $30,0 \text{ nm}^{-1}$ ) está muito alta se comparado à contribuição da própria amostra. Os pontos P1 e P5 em estado fixado geraram pouquíssimas contagens (13 e 15, respectivamente, no ponto mais alto do pico em  $28,6 \text{ nm}^{-1}$ ; 3,3 e 5,5 na posição do pico adiposo; 7,7 e 11,5 no pico glandular, como mostra a Tabela 10). Essas anomalias impedem que informações relevantes a respeito dessas regiões da amostra possam ser obtidas.

**Tabela 10: Parâmetros obtidos a partir dos perfis da amostra 5 em estado fixado**

	Primeiro pico (adiposo)					Segundo pico (glandular)				
	Ponto	Área	FWHM	Centro	$I_1$	Área	FWHM	Centro	$I_2$	$I_1/I_2$
	<b>P1</b>	-	-	-	3,3	-	-	-	7,7	0,4
	<b>P2</b>	57,5	2,1	15,7	28,3	33,2	1,3	18,4	25,8	1,1
<b>Amostra 5</b>	<b>P3</b>	149,9	4,0	14,3	42,8	-	-	-	24,0	1,8
	<b>P4</b>	158,0	4,4	14,1	43,4	-	-	-	21,0	2,1
	<b>P5</b>	-	-	-	5,5	-	-	-	11,5	0,5



**Figura 38: Amostra 5: carcinoma sólido - grau I, com indicação dos pontos analisados (a). Os perfis de espalhamento obtidos no estado fixado em formalina e liofilizado são apresentados de (b) a (f), com as cores correspondentes aos pontos na fotografia.**

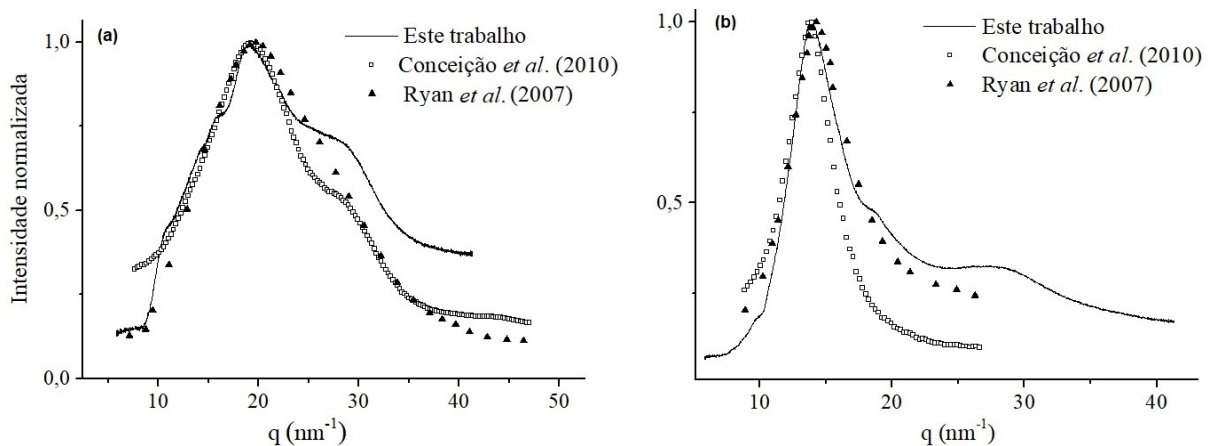
Os perfis dos pontos P3 e P4 em estado fixado apresentaram picos bem intensos com características clássicas de tecido adiposo (o pico ficou, em média, em  $q = 14,2 \text{ nm}^{-1}$ , distância entre cadeias de ácidos graxos). Suas razões  $I_1/I_2$  foram de 1,8 e 2,1, respectivamente. O segundo ponto (P2) apresentou um pico na região do tecido adiposo bem proeminente, porém na região do fibroglandular também é visível um pico com um pouco menos de intensidade, resultando em uma razão dos picos igual a 1,1. Estes três pontos apresentam, também, o pico em torno de  $q = 28,0 \text{ nm}^{-1}$ , relacionado à distância O-H de moléculas vizinhas de água (P2) e

espalhamento harmônico do pico de ácidos graxos (P2, P3 e P4).

### Comparação com a literatura

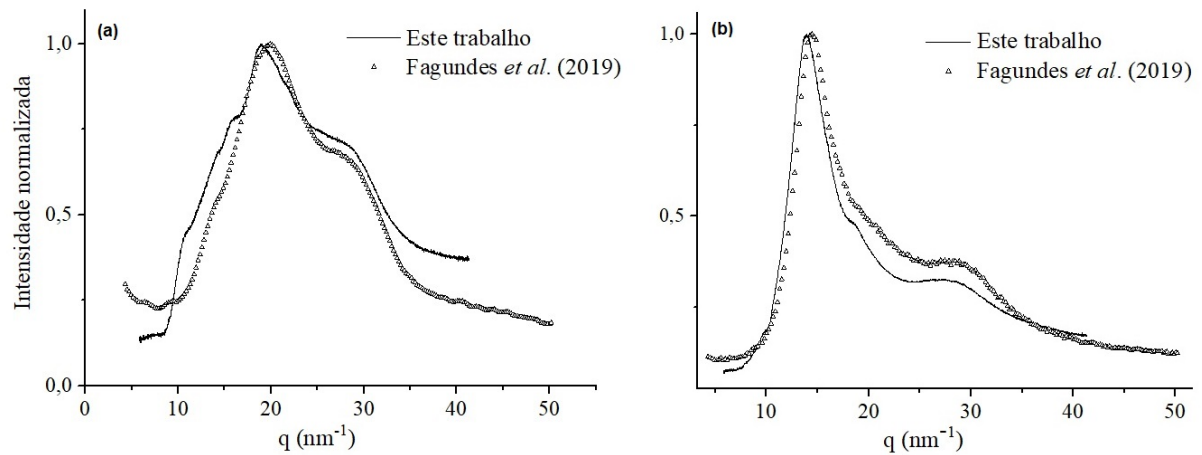
Como previamente descrito na revisão bibliográfica deste trabalho, diversos autores estudaram tecidos mamários humanos com difração de raios X. Os resultados obtidos por Conceição *et al.* (2010a) e Ryan e Farquharson (2007) para tecidos normais (adiposo e fibroglandular) foram comparados aos perfis obtidos neste trabalho (Figura 39 e Tabela 11).

É possível observar grande semelhança na posição dos picos principais (cujos centros se encontram em média em  $q = 14,1 \text{ nm}^{-1}$  para tecido adiposo e  $q = 19,4 \text{ nm}^{-1}$  para o tecido fibroglandular). A principal diferença observada foi na intensidade dos picos, já que as técnicas utilizadas pelos autores citados (WAXS e EDXRD, respectivamente) resultam em um número mais significativo de contagens, uma vez que foram usados feixes de diâmetro maior para analisar uma área mais ampla da amostra. Para facilitar a comparação as intensidades relativas foram normalizadas.



**Figura 39:** Comparação entre os perfis de espalhamento obtidos no presente trabalho e outros publicados na literatura. (a) Tecido mamário humano fibroglandular. (b) Tecido mamário humano adiposo.

As mesmas conclusões podem ser retiradas da comparação com os dados recentemente publicados por Fagundes *et al.* (2019), que estudaram tecidos mamários caninos com difração de raios X. Além dos picos principais, os perfis se assemelham quanto à presença do pico em  $28,0 \text{ nm}^{-1}$ , relacionado espaçamento entre hidrogênio-oxigênio de moléculas de água vizinhas no perfil predominantemente fibroglandular (a) e ao espalhamento harmônico do pico de ácidos graxos no perfil predominantemente adiposo (b) (Figura 40).



**Figura 40:** Comparação entre os perfis obtidos no presente trabalho com os publicados na literatura para tecido mamário canino (a) fibroglandular e (b) adiposo.

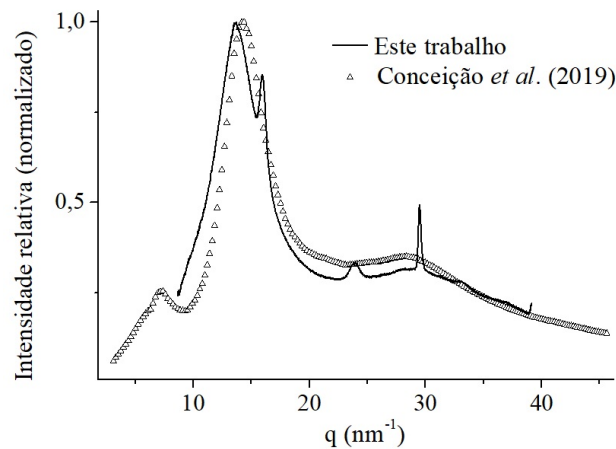
Na Tabela 11, observa-se que, no primeiro pico, tanto a área quanto a largura à meia altura (FWHM) dos picos obtidos neste trabalho ficaram dentro dos valores apresentados por outros autores. Já o segundo pico apresentou valores mais baixos de área (35% menor) e de FWHM (52% menor).

**Tabela 11:** Caracterização dos perfis obtidos neste trabalho em comparação com outros autores, a partir dos parâmetros: área, FWHM e centro dos picos.

	Autor	Área	FWHM	Centro
<b>Primeiro pico (adiposo)</b>	Este trabalho	4,19	5,44	13,93
	Ryan et al. (2007)	5,18	5,83	14,27
	Conceição et al. (2010)	4,08	4,61	13,87
	Fagundes et al. (2019)	4,04	6,35	14,45
<b>Segundo pico (glandular)</b>	Este trabalho	5,86	6,48	18,88
	Ryan et al. (2007)	9,94	13,84	19,74
	Conceição et al. (2010)	9,02	13,39	19,16
	Fagundes et al. (2019)	7,44	13,25	19,88

O trabalho publicado por Conceição *et al.* (2019) apresentou perfis de espalhamento para tecidos mamários liofilizados. Na Figura 41 tem-se uma comparação entre um perfil apresentado por estes autores para tecido mamário humano e um encontrado nesta pesquisa. Pode-se observar que o pico principal desse trabalho se encontra em  $q = 13,8 \text{ nm}^{-1}$  e o de Conceição *et al.* (2019) em  $14,3 \text{ nm}^{-1}$ , ambos referentes ao espaçamento entre cadeias de ácidos graxos, e portanto associados ao tecido adiposo. Nota-se que em ambos, o pico na região do tecido fibroglandular ( $q = 19,8 \text{ nm}^{-1}$ ) foi suprimido, comprovando a correspondência deste pico

às moléculas de água (removidas na liofilização).



**Figura 41: Comparação entre o perfil obtido no presente trabalho com o publicado por Conceição *et al.* (2019) para tecido mamário normal liofilizado.**

Na curva de Conceição *et al.* (2019) aparece um pico em  $q = 7 \text{ nm}^{-1}$  que não está dentro da faixa angular analisada neste trabalho. Os picos em  $15,4 \text{ nm}^{-1}$  e  $23,9 \text{ nm}^{-1}$  não aparecem no perfil do outro autor, podendo indicar que as estruturas associadas a eles só são identificadas com a microdifração, e ficam encobertas quando a análise difrativa cobre uma área maior (fazendo uma média desta). O pico em  $q = 29,4 \text{ nm}^{-1}$  é contribuição do porta-amostras de alumínio.

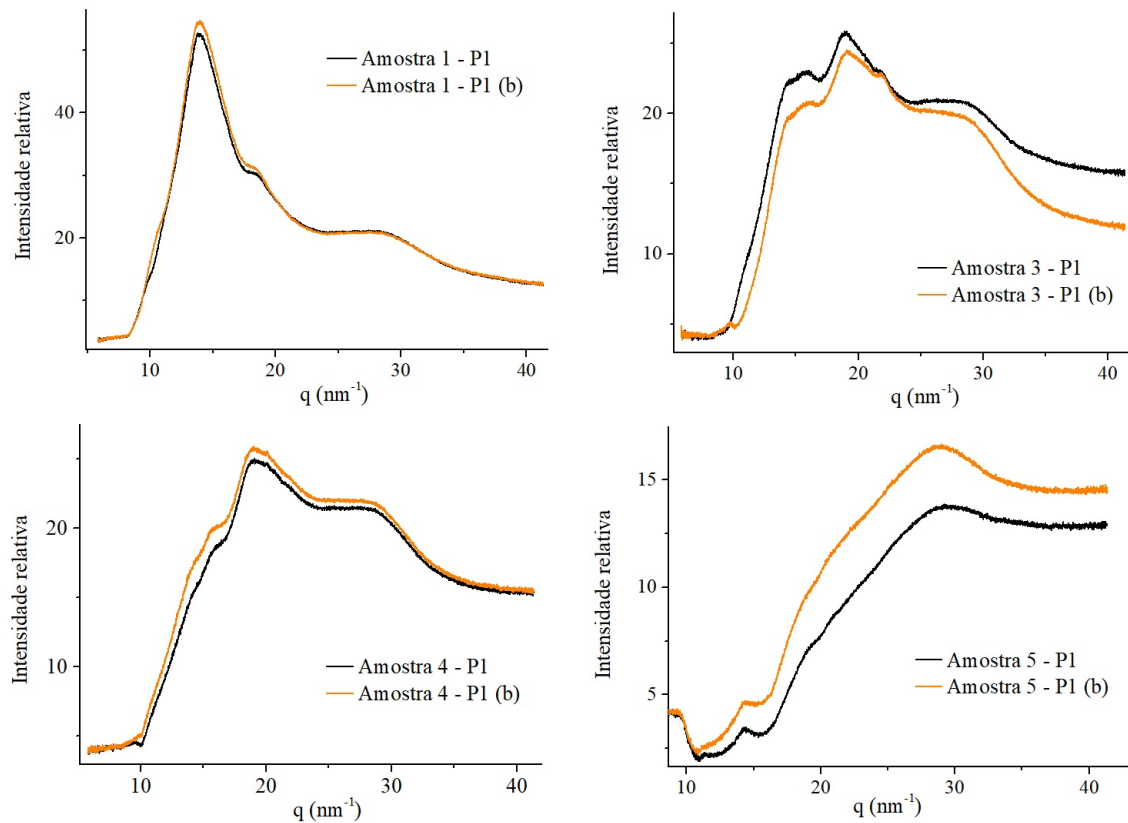
## 5.2 DANOS DA RADIAÇÃO

O primeiro ponto analisado de cada amostra foi submetido a uma nova medida ao final do experimento. A comparação entre os perfis iniciais (P1) e finais (P1-b) estão apresentados na Figura 42 e seus parâmetros (área, largura à meia-altura, intensidade e razão dos picos) na Tabela 12.

Na amostra 1 houve um aumento de 4% na intensidade do pico adiposo, porém a área foi reduzida em 1,5%. Não houve mudança significativa na posição dos picos tampouco na intensidade na posição do pico glandular.

Na amostra 4, tanto a intensidade quanto a área do pico principal aumentaram. Não houve deslocamento significativo na posição do pico ( $0,1 \text{ nm}^{-1}$  para a esquerda), tampouco na razão das intensidades.





**Figura 42:** Perfis de espalhamento obtidos para os primeiros pontos analisados de cada amostra e os mesmos pontos (P1-b) repetidos ao final do experimento.

**Tabela 12:** Comparação dos parâmetros de perfis de espalhamento antes e após irradiação.

	Ponto	Primeiro pico (adiposo)				Segundo pico (glandular)				
		Área	FWHM	Centro	$I_1$	Área	FWHM	Centro	$I_2$	$I_1/I_2$
<b>Amostra 1</b>	P1	228,0	5,4	13,8	52,7	-	-	-	26,0	2,0
	P1 (b)	224,5	5,0	13,9	54,8	-	-	-	26,0	2,1
<b>Amostra 3</b>	P1	41,2	1,8	16,0	23,1	78,4	3,2	19,1	25,8	0,9
	P1 (b)	24,3	1,2	16,4	20,9	70,5	3,0	19,1	24,5	0,9
<b>Amostra 4</b>	P1	-	-	-	15	120,6	5,1	19,1	25,1	0,6
	P1 (b)	-	-	-	16,8	129,0	5,3	19,0	25,9	0,6
<b>Amostra 5</b>	P1	-	-	-	3,3	-	-	-	7,7	0,4
	P1 (b)	-	-	-	4,6	-	-	-	10,7	0,4

A amostra 5 apresentou um pico anômalo que impediu a obtenção de todas as variáveis. Apenas as intensidades na posição esperada para os picos foram medidas e foi observado um aumento em ambas (28,9% no adiposo e 28% no glandular), de forma que a razão dos picos manteve-se constante.

A amostra 3 apresentou um padrão diferente, já que sua intensidade foi reduzida em

9,5% no pico adiposo e em 5% no glandular após a irradiação. A área foi reduzida em ambos os picos, porém no adiposo essa diferença foi maior, com 41% de redução. O pico adiposo se deslocou ligeiramente para a direita ( $0,4 \text{ nm}^{-1}$ ) e o glandular para a esquerda ( $0,3 \text{ nm}^{-1}$ ).

Considerando os efeitos apresentados na seção 3.4, as moléculas de água presentes nas amostras passam por várias mudanças ao serem irradiadas por raios X, de forma que, ao final do processo, tem-se a formação de um radical de hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ), um íon ( $\text{H}^+$ ) e/ou um radical de hidrogênio ( $\text{H}\cdot$ ). Tendo em vista essas alterações, era esperado que o pico referente ao espaçamento entre átomos de oxigênio de moléculas vizinhas de água ( $3,0 \text{ \AA}$ ) sofresse alguma alteração. Não foram observadas mudanças nas posições dos picos. A intensidade dos perfis aumentou (exceto na amostra 3), porém a razão entre os picos foi mantida constante. Portanto, conclui-se que a baixa intensidade obtida com o experimento impossibilitou que informações relevantes fossem obtidas na verificação de dano ao tecido devido à radiação incidente.

## 6 CONCLUSÕES

O mapeamento de tumores mamários caninos foi realizado por meio da obtenção de perfis de espalhamento elástico na região tumoral e tecidos adjacentes. De forma geral, as intensidades relativas dos perfis obtidos ficaram baixas, mas estes apresentaram as características esperadas para tecido mamário, conforme dados da literatura. Foram encontrados dois picos principais, um na região de  $q = 13,9 \text{ nm}^{-1}$ , correspondente a  $4,5 \text{ \AA}$ , distância entre átomos de carbono das cadeias de ácidos graxos, ou seja, contribuição do tecido adiposo, e outro referente à contribuição de tecido fibroglandular, em  $q = 19,8 \text{ nm}^{-1}$ , correspondente a  $3,0 \text{ \AA}$ , distância entre átomos de oxigênio de moléculas de água vizinhas.

As variáveis obtidas a partir desses perfis mostraram que a maioria foi predominantemente fibroglandular. Pontos em uma mesma amostra apresentaram perfis bem diferentes, provando a heterogeneidade da amostra tumoral. Essas diferenças, mesmo em regiões tão próximas umas das outras, justificam o uso do feixe de microfoco, pois na difração convencional a informação obtida se refere a uma média dos padrões de toda a área da amostra, e não de uma região específica, como é o caso da microdifração.

Após a liofilização, as amostras perderam de 24,6% a 67,5% do seu conteúdo aquoso, porém a redução na intensidade dos perfis variou de 15% a 82% entre pontos de uma mesma amostra, mostrando que a perda de conteúdo hídrico não ocorre homogeneamente ao longo de sua área, mas se concentra nas regiões com mais tecido fibroglandular (que são ricos em moléculas de água). Nestes perfis, foi possível observar a supressão do pico em  $q = 19,8 \text{ nm}^{-1}$ , comprovando sua relação com a água. Dois novos picos apareceram nas amostras liofilizadas, um em  $q = 15,9 \text{ nm}^{-1}$  e outro em  $23,8 \text{ nm}^{-1}$ , (correspondentes a distância entre centros espalhadores de  $3,9 \text{ \AA}$  e  $2,6 \text{ \AA}$ , respectivamente). Estes podem ser consequência do rearranjo molecular das estruturas durante o processo de liofilização.

A investigação de dano ao tecido devido à radiação incidente no próprio experimento não forneceu informações significativas para análise.

### 6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir dos resultados obtidos, tem-se as seguintes perspectivas para futuros trabalhos:

- Realizar o experimento com mais amostras, analisando mais pontos em cada uma delas, e aumentar o tempo de exposição a fim de se obter um número maior de contagens;
- Complementar as informações nanoestruturais com medidas de espalhamento em baixo ângulo (SAXS);
- Utilizar uma fonte de radiação síncrotron para fazer um mapeamento completo de novas amostras;
- Desenvolver um porta-amostras que não contribua para os perfis na faixa angular medida, e analisar mais amostras liofilizadas para investigar o surgimento dos novos picos.

## REFERÊNCIAS

- AL-MANSOUR, M. A. *et al.* Comparative histopathology and immunohistochemistry of human and canine mammary tumors. **Open veterinary journal**, v. 8, p. 243–249, 2018.
- ATTIX, F. H. **Introduction to radiological physics and radiation physics**. New York: John Wiley & Sons, 1986.
- BABA, A. I.; CĂTOI, C. Mammary gland tumors. In: **Comparative Oncology**. [S.l.]: The Publishing House of the Romanian Academy, 2007.
- BANKS, W. J. *et al.* **Applied veterinary histology**. Philadelphia: Mosby-Year Book, Inc, 1993.
- BLOCK, G. E.; JENSEN, E. V.; POLLEY, T. Z. The prediction of hormonal dependency of mammary cancer. **Annals of surgery**, Lippincott, Williams, and Wilkins, v. 182, n. 3, p. 342, 1975.
- BRAGG, W. H.; BRAGG, W. L. *et al.* The structure of the diamond. **Proc. R. Soc. Lond. A**, The Royal Society, v. 89, n. 610, p. 277–291, 1913a.
- BRAGG, W. H. *et al.* The reflection of x-rays by crystals.(ii.). **Proc. R. Soc. Lond. A**, The Royal Society, v. 89, n. 610, p. 246–248, 1913c.
- BRAGG, W. L. The structure of some crystals as indicated by their diffraction of x-rays. **Proc. R. Soc. Lond. A**, The Royal Society, v. 89, n. 610, p. 248–277, 1913b.
- BRUKER. **Product Sheet XRD 37 - VÅNTEC-500: Area Detector for XRD**. 2018. Disponível em: <<https://www.bruker.com/products/x-ray-diffraction-and-elemental-analysis/x-ray-diffraction/components/xrd-components/detectors/material-download.html>>. Acesso em: 04 dec. 2018.
- BUDRAS, K. D. *et al.* **Anatomy of the dog: an illustrated text**. Frankfurt: Schlütersche, 2007.
- BUSHBERG, J. T.; BOONE, J. M. **The essential physics of medical imaging**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2011.
- CASSALI, G. D. *et al.* Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors-2013. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, Brazilian Association of Veterinary Pathology, v. 7, n. 2, p. 38–69, 2014.
- CHATTERJEE, S. K. **X-ray diffraction: Its theory and applications**. 2. ed. New Delhi: PHI Learning Pvt. Ltd., 2010.
- CONCEIÇÃO, A. *et al.* Multivariate analysis of the scattering profiles of healthy and pathological human breast tissues. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment**, Elsevier, v. 652, n. 1, p. 870–873, 2011.

CONCEIÇÃO, A. *et al.* Preliminary study of human breast tissue using synchrotron radiation combining waxes and saxs techniques. **Applied Radiation and Isotopes**, Elsevier, v. 68, n. 4-5, p. 799–803, 2010b.

CONCEIÇÃO, A. L. C. **Estudo das organizações moleculares e supramoleculares de tecidos mamários normais e neoplásicos por espalhamento de fótons**. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2011.

CONCEIÇÃO, A. L. C. *et al.* Mapping transitions between healthy and pathological lesions in human breast tissues by diffraction enhanced imaging computed tomography (DEI-CT) and small angle x-ray scattering (SAXS). **Radiation Physics and Chemistry**, v. 95, p. 313–316, 2014.

CONCEIÇÃO, A. L. C.; ANTONIASSI, M.; POLETTI, M. E. Analysis of breast cancer by small angle X-ray scattering (SAXS). **The Analyst**, v. 134, n. 6, p. 1077, 2009.

CONCEIÇÃO, A. L. C. *et al.* The influence of hydration on the architectural rearrangement of normal and neoplastic human breast tissues. **Heliyon**, Elsevier, v. 5, n. 2, 2019.

CONCEIÇÃO, A. L. C.; POLETTI, M. E.; SIU, K. K. W. Identification Of Molecular Structures Of Normal And Pathological Human Breast Tissue Using Synchrotron Radiation. p. 72–77, 2010a.

COYLE, Y. M. The effect of environment on breast cancer risk. **Breast cancer research and treatment**, Springer, v. 84, n. 3, p. 273–288, 2004.

COZZI, B. *et al.* aging and veterinary care of cats, dogs, and horses through the records of three university veterinary hospitals. **Frontiers in veterinary science**, Frontiers, v. 4, p. 14, 2017.

CULLITY, B. D.; STOCK, S. R. **Elements of X-ray Diffraction**. Harlow: Pearson Education, 2014.

CULLITY, B. D.; STOCK, S. R. **Elements of X-ray Diffraction**. Harlow: Pearson Education, 2014.

CUNHA, D. *et al.* X-ray scattering profiles of some normal and malignant human breast tissues. **X-Ray Spectrometry**, Wiley Online Library, v. 35, n. 6, p. 370–374, 2006.

CUNHA, D. M. Caracterização de tecidos mamários através de modelos estatísticos utilizando o espalhamento de raios-X. **Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto.**, 2006.

CURRY, T. S.; DOWDEY, J. E.; MURRY, R. C. **Christensen's physics of diagnostic radiology**. Media: Lippincott Williams & Wilkins, 1990.

ELSHEMEY, W. M.; MOHAMED, F. S.; KHATER, I. M. X-ray scattering for the characterization of lyophilized breast tissue samples. **Radiation Physics and Chemistry**, Elsevier, v. 90, p. 67–72, 2013.

EVANS, H. E.; LAHUNTA, A. D. **Miller's anatomy of the dog-E-Book**. St. Louis: Elsevier Health Sciences, 2012.

EVANS, S. H. *et al.* Measurement of small-angle photon scattering for some breast tissues and tissue substitute materials. **Phys. Med. Biol.**, v. 36, n. 1, p. 7–18, 1991.

FAGUNDES, A. *et al.* Structural characterization of canine mammary tissue by x-ray diffraction. **Radiation Physics and Chemistry**, Elsevier, v. 155, p. 22–25, 2019.

GILBERTSON, S. *et al.* Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. **Veterinary Pathology**, SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA, v. 20, n. 2, p. 127–142, 1983.

GORDON, I. K.; KHANNA, C. Modeling opportunities in comparative oncology for drug development. **ILAR journal**, Institute for Laboratory Animal Research, v. 51, n. 3, p. 214–220, 2010.

GRIFFITHS, J. A. *et al.* Correlation of energy dispersive diffraction signatures and microCT of small breast tissue samples with pathological analysis. **Physics in Medicine and Biology**, v. 52, n. 20, p. 6151–6164, 2007.

HALL, E. J.; GIACCIA, A. J. **Radiobiology for the radiologist**. 8. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2018.

HASSE, B. *et al.* New developments in laboratory-based x-ray sources and optics. In: INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICS AND PHOTONICS. **Advances in Laboratory-based X-Ray Sources, Optics, and Applications VI**. San Diego, 2017.

HE, B.; PRECKWINKEL, U.; SMITH, K. L. Fundamentals of two-dimensional x-ray diffraction ( xrd 2 ). In: INTERNATIONAL CENTRE FOR DIFFRACTION DATA. Wisconsin, 2000.

HE, B. B. Introduction to two-dimensional x-ray diffraction. **Powder diffraction**, Cambridge University Press, v. 18, n. 2, p. 71–85, 2003.

HE, B. B. **Two-dimensional X-ray diffraction**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2009.

HEMBERG, O.; OTENDAL, M.; HERTZ, H. Liquid-metal-jet anode electron-impact x-ray source. **Applied Physics Letters**, AIP, v. 83, n. 7, p. 1483–1485, 2003.

HONNICKE, M. G. *et al.* Tracing x-rays through an l-shaped laterally graded multilayer mirror: a synchrotron application. **Journal of synchrotron radiation**, International Union of Crystallography, v. 17, n. 3, p. 352–359, 2010.

INCA. **ABC do Câncer - Abordagens Básicas para o Controle do Câncer**. 4. ed. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2018.

INCOATEC. **Montel Optics - 2D Multilayer Mirrors for X-ray Diffractometry**. 2018. Disponível em: <www.incoatec.de>. Acesso em: 04 dec. 2018.

JOHNS, H. E.; CUNNINGHAM, J. R. **The physics of radiology**. 4. ed. Illinois: Charles C Thomas Publisher, 1983.

JOHNS, P. C.; YAFFE, M. J. X-ray characterisation of normal and neoplastic breast tissues. **Physics in Medicine & Biology**, IOP Publishing, v. 32, n. 6, p. 675, 1987.

KANICKY, J. R.; SHAH, D. O. Effect of degree, type, and position of unsaturation on the pka of long-chain fatty acids. **Journal of colloid and interface science**, Elsevier, v. 256, n. 1, p. 201–207, 2002.

KIDANE, G. *et al.* X-ray scatter signatures for normal and neoplastic breast tissues. **Phys. Med. Biol. Phys. Med. Biol.**, v. 44, n. 44, p. 1791–1802, 1999.

KOSANETZKY, J. *et al.* X-ray diffraction measurements of some plastic materials and body tissues. **Medical physics**, v. 14, n. 4, p. 526–532, 1987.

KUMARAGURUPARAN, R.; PRATHIBA, D.; NAGINI, S. Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 2, p. 218–224, 2006.

LIDE, D. R. **CRC handbook of chemistry and physics: a ready-reference book of chemical and physical data**. [S.l.]: CRC press, 1995.

LINDBLAD-TOH, K. *et al.* Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. **Nature**, Nature Publishing Group, v. 438, n. 7069, p. 803, 2005.

LIU, J. **Scanning x-ray microdiffraction studies of the molecular architecture of biological tissues**. Tese (Doutorado) — Northeastern University, Boston, 2015.

MERLO, D. F. *et al.* Cancer incidence in pet dogs: findings of the animal tumor registry of genoa, italy. **Journal of veterinary internal medicine**, Wiley Online Library, v. 22, n. 4, p. 976–984, 2008.

MISDORP, W. Histological classification of the mammary tumors of the dog and the cat. **World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals second series**, AFIP, v. 7, p. 1–59, 1999.

MORRIS, J.; DOBSON, J. **Small animal oncology**. Oxford: John Wiley & Sons, 2008.

OLIVEIRA, O. R. *et al.* Identification of Neoplasias of Breast Tissues Using a Powder Diffractometer. **Journal of Radiation Research**, v. 49, n. 5, p. 527–532, 2008.

OWEN, L. A comparative study of canine and human breast cancer. **Investigative & cell pathology**, v. 2, n. 4, p. 257–275, 1979.

OWEN, L. N.; ORGANIZATION, W. H. *et al.* Tnm classification of tumours in domestic animal. Geneva: World Health Organization, 1980.

PEPLOW, D. E.; VERGHESE, K. Measured molecular coherent scattering form factors of animal tissues, plastics and human breast tissue. **Phys. Med. Biol. Phys. Med. Biol.**, v. 43, p. 2431–2452, 1998. ISSN 0031-9155.

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

PODGORSKAK, E. B. *et al.* Radiation oncology physics. **Vienna: International Atomic Energy Agency**, p. 123–271, 2005.



POLETTI, M. E.; GONÇALVES, O. D.; MAZZARO, I. X-ray scattering from human breast tissues and breast-equivalent materials. **Phys. Med. Biol. Phys. Med. Biol**, v. 47, n. 47, p. 47–63, 2002. ISSN 0031-9155.

QUARANTA, E. *et al.* Update on 2016 irradiation of the collimator materials at bnl and post-irradiation analyses. In: EUCARD-2 ANNUAL MEETING. CERN, 2017.

QUEIROGA, F. L. *et al.* Canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: most recent findings. **In vivo (Athens, Greece)**, v. 25, n. 3, p. 455–465, 2011.

RESTA, G.; KHAYKOVICH, B.; MONCTON, D. Nested kirpatrick–baez (montel) optics for hard x-rays. **Journal of Applied Crystallography**, International Union of Crystallography, v. 48, n. 2, p. 558–564, 2015.

RUTTEMAN, G. *et al.* Oestrogen (er) and progesterin receptors (pr) in mammary tissue of the female dog: different receptor profile in non-malignant and malignant states. **British journal of cancer**, Nature Publishing Group, v. 58, n. 5, p. 594, 1988.

RYAN, E. A.; FARQUHARSON, M. J. Breast tissue classification using x-ray scattering measurements and multivariate data analysis. **Physics in Medicine and Biology**, v. 52, n. 22, p. 6679–6696, 2007.

SEECK, O. H.; MURPHY, B. **X-ray diffraction: Modern experimental techniques**. Boca Raton: Pan Stanford, 2015.

SILVER, I. Symposium on mammary neoplasia in the dog and cat\*—i the anatomy of the mammary gland of the dog and cat. **Journal of small animal Practice**, Wiley Online Library, v. 7, n. 11, p. 689–696, 1966.

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

SORENMO, K. *et al.* Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. **Veterinary pathology**, SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA, v. 48, n. 1, p. 85–97, 2011.

SOSA, C. *et al.* Compact energy dispersive X-ray microdiffractometer for diagnosis of neoplastic tissues. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 137, n. December 2015, p. 125–129, 2017.

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

SUNDARAM, J. *et al.* Design space development for lyophilization using doe and process modeling. **BioPharm International**, v. 23, n. 9, 2010.

SURYANARAYANA, C.; NORTON, M. **X-Ray Diffraction—A Practical approach**. New York: Plenum Press, 1998.

TANG, X. C.; PIKAL, M. J. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. **Pharmaceutical research**, Springer, v. 21, n. 2, p. 191–200, 2004.

TSUJI, K.; INJUK, J.; GRIEKEN, R. V. **X-ray spectrometry: recent technological advances**. Chichester: John Wiley & Sons, 2005.

UVA, P. *et al.* Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. **BMC genomics**, BioMed Central, v. 10, n. 1, p. 135, 2009.

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

VOET, D.; VOET, J. G. Biochemistry, 4-th edition. **New York: John Wiley & Sons Inc**, p. 492–496, 2011.

WITHROW, S. J.; PAGE, R.; VAIL, D. M. **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology-E-Book**. Missouri: Elsevier Health Sciences, 2013.

YOSHIMURA, E. M. Física das radiações: interação da radiação com a matéria. **Revista Brasileira de Física Médica**, v. 3, n. 1, p. 57–67, 2009.

## ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DA CEUA



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS



PARECER: 2017-029/2017 - CEUA  
PROCESSO Nº: 23064.025904/2017-55  
INTERESSADO: ANDRÉ LUIZ COELHO CONCEIÇÃO

Curitiba, 13 de dezembro de 2017.

### PROJETO DE PESQUISA / AULA PRÁTICA

<b>DADOS DO PROJETO / AULA PRÁTICA</b>	<b>Protocolo nº 2017-029</b>
<b>Título:</b> Avaliação da Região de Transição Entre Tecido Sadio e tumoral em Mamas Caninas por Meio da Microdifração de Raios X	
<b>Pesquisador / Professor:</b> Prof <sup>ª</sup> . Dr André Luiz Coelho Conceição	
<b>Área temática:</b> Engenharia Biomédica	
<b>Instituição:</b> UTFPR/Campus Curitiba	
<b>Financiamento:</b> CAPES	
<b>PARECER CONSUBSTANCIADO DA CEUA</b>	<b>Data da relatoria:</b> 13/12/2017
<p><b>Apresentação do Projeto:</b></p> <p>Trata-se de Projeto de Mestrado de aluna do Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial – CPGEI, da UTFPR-Curitiba, o qual pretende-se analisar 10 amostras de mamas caninas por meio da técnica de microdifração de Raios X. Serão selecionadas amostras que contenham tecido sadio adjacente ao tumor, para fins de comparação. Serão avaliados 5 pontos em cada amostra, incluindo a região tumoral e a sadia, afim de se determinar se há alterações estruturais na região de transição entre o tecido sadio e o tumoral. As amostras serão cedidas pelo Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Campus Agrárias. São amostras de descarte oriundas de um banco de dados devidamente catalogadas. Após coletadas, as amostras serão armazenadas em formol tamponado a 10% (formalina) e mantidas à temperatura ambiente. Os tumores presentes nas mamas caninas foram desenvolvidos espontaneamente e não induzidos por meios artificiais. Não haverá qualquer tipo de eutanásia.</p>	
<p><b>Objetivo:</b></p> <p>- Avaliar os perfis de espalhamento de mamas caninas por meio da microdifração de raios X, incluindo tecido patológico e sadio adjacente, para determinar se há alterações estruturais a nível molecular em volta do tumor.</p>	
<p><b>Avaliação dos Riscos e Benefícios:</b></p> <p><u>Avaliação dos Riscos:</u> Observa-se que não haverá nenhum risco a animais vivos, pois as amostras a serem utilizadas provêm de cirurgias realizadas previamente, e material enviado ao Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Paraná, se constituindo especificamente de tumores mamários espontâneos. Não há em nenhum momento a indução artificial de tumor ou eutanásia animal.</p> <p><u>Benefícios:</u> Devido às muitas semelhanças das características entre a carcinogênese canina e humana, o estudo dos tumores mamários caninos poderá ajudar a fornecer informações que possibilitem o entendimento dos fatores associados à doença na espécie humana, na expectativa de que estes possam ser identificados, eliminados ou controlados. Considera-se ainda a alta incidência do câncer mamário em cadelas, podendo servir como alternativa à prática de indução de tumores em ratos e camundongos para estudos desta patologia.</p>	
<p><b>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:</b></p> <p>As similaridades etiológicas e histológicas entre tumores mamários caninos e humanos são de grande interesse, já que os tumores caninos podem servir como modelo comparativo para a mama humana. Além disso, estudos com tumores espontâneos em cães, já que sua incidência é naturalmente alta, podem vir a substituir a prática de indução de tumores em ratos e camundongos, o que seria eticamente preferível. Porém, estudos sobre os aspectos que influenciam o desenvolvimento de tumores mamários e suas características, tanto em humanos quanto em cães, ainda são escassos, destacando a relevância deste estudo. Ressalta-se ainda que os tumores a serem estudados foram espontâneos e não induzidos por meios artificiais, e que as amostras se tratam de peças de descarte de exames anatomopatológicos do Laboratório de Patologia Veterinária da UFPR, e que em momento algum qualquer animal vivo será submetido a algum procedimento.</p>	

<b>Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:</b>	
Foram apresentados os seguintes:	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Requerimento de avaliação preenchido e assinado pelo pesquisador responsável pelo projeto;</li> <li>2. Formulário unificado de encaminhamento do CEUA/UTFPR/DV;</li> <li>3. Projeto de pesquisa completo no modelo da PROPPG-CEUA;</li> <li>4. Declaração de não início do projeto (com assinatura e data);</li> <li>5. Registro de projeto junto à DIRPPG por meio de uma declaração do coordenador do programa;</li> <li>6. Declaração do veterinário responsável pelo laboratório que cederá as amostras com assinatura do mesmo;</li> </ol>	
Todos atendendo os requisitos legais vigentes do CEUA/UTFPR.	
<b>Vigência do projeto:</b>	05 de fevereiro de 2018 a 04 de fevereiro de 2019.
<b>Espécie/linhagem:</b>	Cão doméstico ( <i>Canis lupus familiaris</i> )
<b>Número de animais:</b>	10 amostras ( de 5 animais)
<b>Peso/Idade:</b>	Diversas
<b>Sexo:</b>	Fêmeas
<b>Origem:</b>	Acervo de peças cirúrgicas (tumores espontâneos) preservadas em formol disponibilizadas pelo Laboratório de Patologia Veterinária da UFPR.
<b>Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:</b> Sem pendências ou inadequações.	
<b>Situação do Parecer:</b> APROVADO	
<b>Considerações Finais a Critério da CEUA:</b>	
Todos os procedimentos devem seguir a lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008.	

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da Região de Transição Entre Tecido Sadio e tumoral em Mamas Caninas por Meio da Microdifração de Raios X", protocolo nº 2017/029, sob a responsabilidade de **André Luiz Coelho Conceição**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UTFPR) da UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ, em reunião de 12/12/2016.

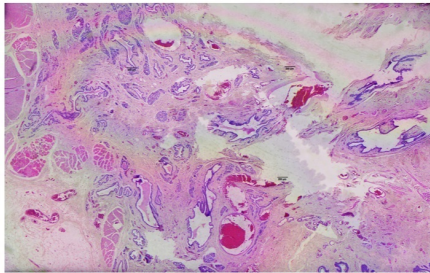


Documento assinado eletronicamente por **NEDIA DE CASTILHOS GHISI, PRESIDENTE DE COMISSÃO**, em 13/12/2017, às 16:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

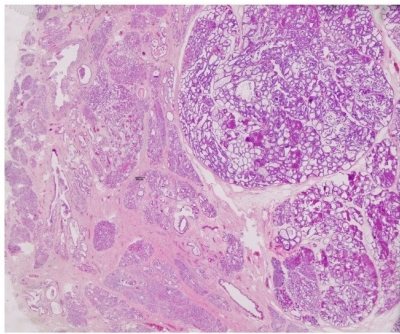


A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.utfpr.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_externo=0](https://sei.utfpr.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_externo=0), informando o código verificador **0124892** e o código CRC **E4315DFD**.

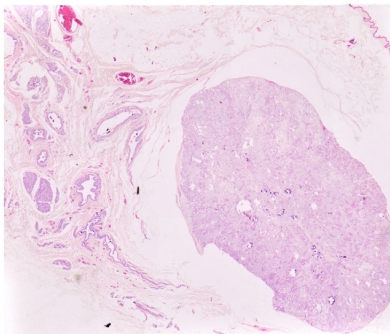
## APÊNDICE A - LÂMINAS HISTOPATOLÓGICAS



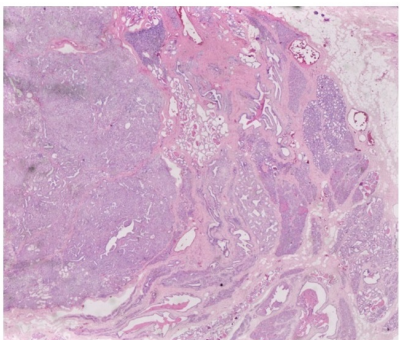
Amostra 1: adenoma simples



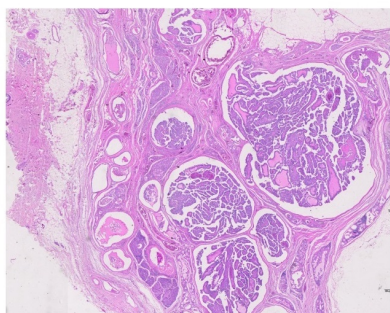
Amostra 2: adenoma cístico



Amostra 3: adenocarcinoma simples, grau I



Amostra 4: adenocarcinoma simples, grau I



Amostra 5: carcinoma sólido, grau I