

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

CAMILA DE ALMEIDA SALVEGO

**CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIAÇÕES NA CONCENTRAÇÃO DE
ELEMENTOS-TRAÇO E DENSIDADE ELETRÔNICA EM TUMORES
MAMÁRIOS CANINOS**

DISSERTAÇÃO

CURITIBA

2019

CAMILA DE ALMEIDA SALVEGO

**CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIAÇÕES NA CONCENTRAÇÃO DE
ELEMENTOS-TRAÇO E DENSIDADE ELETRÔNICA EM TUMORES
MAMÁRIOS CANINOS**

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: Prof. Dr. André Luiz Coelho
Conceição

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Antoniassi

CURITIBA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S183c Salvego, Camila de Almeida
Correlação entre as variações na concentração de elementos-traço e densidade eletrônica em tumores mamários caninos [recurso eletrônico] / Camila de Almeida Salvego.-- 2019.
1 arquivo eletrônico (85 f.) : PDF ; 6,54 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. 76-82.

1. Engenharia elétrica - Dissertações. 2. Elementos traços - Análise. 3. Elétrons - Distribuição. 4. Tumores em animais. 5. Mamas - Câncer. 6. Cães - Doenças. 7. Espectroscopia de raios X. 8. Espectroscopia de fluorescência. 9. Efeito Compton. 10. Espalhamento elástico. 11. Métodos de simulação. 12. Engenharia biomédica. I. Conceição, André Luiz Coelho, orient. II. Antoniassi, Marcelo, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial. IV. Título.

CDD: Ed. 23 -- 621.3

TERMO DE APROVAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº 822

A Dissertação de Mestrado intitulada “**Correlação Entre as Variações na Concentração de Elementos-traço e Densidade Eletrônica em Tumores Mamários Caninos.**” defendida em sessão pública pelo(a) candidato(a) **Camila de Almeida Salvego**, no dia **10 de abril 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). Sérgio Francisco Pichorim- Presidente – (UTFPR)

Prof(a). Dr(a). Fábio Luiz Melquiades - (UEL)

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

Prof(a). Dr(a). André Luiz Coelho Conceição – (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, 10 de abril de 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Izaura e Dilso, pela vida, amor incondicional, e esforços a mim dedicados, em todos os sentidos. Também à minha irmã Karina, por ser a “gêmea” forte e meu porto seguro.

Aos professores Dr. André Luiz Coelho Conceição e Dr. Marcelo Antoniassi, pela orientação, incentivo e apoio para realização deste trabalho.

À Natália Prado, minha grande amiga e companheira. Agradeço por ter caminhado ao meu lado e dado força durante esse período, além da troca de experiências e conhecimento.

Aos meus colegas de grupo, em especial à Alana F. Fagundes, por tudo, sem exceções. O desenvolvimento desse projeto só foi possível graças ao apoio dela. Também ao Felipe Burielle, por estar disposto a me ajudar até nas férias.

A todas as amigas e amigos que dão sentido à minha vida. Com destaque à Ana Paula Pedrotti, pela constante presença, e ao João Gervásio, por salvar a minha vida nessa reta final.

Aos meus primos Bruno, Katielen e Maria Eduarda, e também ao meu cunhado Matheus, por todos os momentos felizes que passei na presença deles esse ano.

Ao meu querido Milan, por proporcionar aprendizados diversos em todos os âmbitos da minha vida, além da prestatividade em ajudar sempre que eu precisei.

Aos professores Dr. Fábio Cesar Gozzo e Dra. Aline Mara dos Santos, da UNICAMP, e ao doutorando Daniel Andrés Rodríguez, por terem sido tão solícitos em ajudar com a preparação das minhas amostras.

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

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, pela oportunidade de realizar meus experimentos, e aos responsáveis pela Linha de Luz XRF, por todo auxílio.

Aos membros da banca avaliadora.

À UTFPR, pela estrutura para desenvolver o projeto, e à CAPES pelo apoio financeiro.

“Mrs. Dalloway said she would buy the flowers herself.”

Virginia Woolf

RESUMO

SALVEGO, C. A.. CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIAÇÕES NA CONCENTRAÇÃO DE ELEMENTOS-TRAÇO E DENSIDADE ELETRÔNICA EM TUMORES MAMÁRIOS CANINOS. 86 f. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2019.

A expectativa de vida canina cresceu significativamente na última década. Como consequência, observou-se um aumento no aparecimento de doenças relacionadas à idade, como as neoplasias. Para as cadelas, neoplasias mamárias são o tipo de câncer mais comum, e aproximadamente 50% delas são malignas. Uma vez que os tumores são causados por alterações químicas e físicas nas células, estudos que caracterizem essas anormalidades são essenciais. A fluorescência de raios X (XRF) é uma das técnicas mais utilizadas para determinar a composição elementar dos tecidos. A técnica de espalhamento Compton, por sua vez, permite o cálculo da densidade eletrônica das amostras, fornecendo informações sobre a matriz tecidual. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi estudar as variações nas concentrações de elementos-traço (Fe, Cu e Zn) e densidade eletrônica, em amostras de tecido mamário canino normais e neoplásicos, combinando técnicas de XRF e espalhamento Compton. Inicialmente, foram realizadas simulações computacionais visando a otimização das condições experimentais. Após as simulações, treze amostras foram analisadas no Instituto de Física Gleb Wataghin (IFGW), utilizando um arranjo de fluorescência de raios X por dispersão de energia (ED-XRF), para se obter simultaneamente as concentrações dos elementos-traço e as densidades eletrônicas das amostras. Outras sete amostras foram analisadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em dois experimentos separados. Primeiramente, aplicou-se a técnica de microfluorescência de raios X (μ -XRF) para mapear a distribuição espacial de Fe, Cu e Zn ao redor dos tumores. Em seguida, medições de espalhamento Compton foram feitas em pontos selecionados das amostras, com o intuito de se obter valores de densidade eletrônica nesses pontos. Os resultados das simulações permitiram otimizar as condições experimentais, proporcionando um melhor uso do tempo de feixe para os experimentos realizados no LNLS. Os resultados obtidos nos experimentos com o arranjo de ED-XRF, apesar das flutuações percentuais, serviram como base para uma estimativa dos valores de concentração de Cu e Zn e de densidade eletrônica das amostras. Os experimentos de μ -XRF forneceram mapas com as distribuições espaciais dos elementos Fe, Cu e Zn ao redor dos tumores, que foram comparados aos laudos das lâminas histológicas e aos valores de densidade eletrônica encontrados no experimento de espalhamento Compton. Observou-se uma concentração elevada do elemento Cu em uma amostra de tumor benigno (adenoma simples), e aumento de Fe em regiões próximas a tumores, e o Zn estava distribuído de maneira homogênea em grande parte das amostras. Quanto às densidades eletrônicas, verificou-se concordância com outros trabalhos presentes na literatura, com valores mais altos em regiões tumorais, e menores nas áreas de tecido adiposo. Dessa forma, observa-se que a combinação das técnicas de XRF e espalhamento Compton é uma forma eficaz de se obter informações complementares em estudos com tumores mamários caninos.

Palavras-chave: Tumores mamários caninos, Elementos-traço, Densidade eletrônica.

ABSTRACT

SALVEGO, C. A.. CORRELATION BETWEEN VARIATIONS IN TRACE ELEMENTS CONCENTRATION AND ELECTRON DENSITY IN CANINE MAMMARY TUMORS. 86 f. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2019.

Canine life expectancy has increased significantly in the last decade. Consequently, there was a higher incidence of age-related diseases, such as neoplasms. For female dogs, breast neoplasms are the most common type of cancer, and approximately 50% of them are malignant. Once tumors are caused by chemical and physical changes in the cell, studies that characterize these abnormalities are essential. X-Ray Fluorescence (XRF) is one the most common technique used for determining the elemental composition of tissues. The Compton scattering technique, on the other hand, allows determining the electron density of samples, providing information about the tissue matrix. In this sense, the objective of this work was to study the variations in trace elements (Fe, Cu and Zn) concentration and electron density, in normal and neoplastic canine mammary tissues, combining XRF and Compton scattering techniques. Initially, computational simulations were carried out aiming the optimization of the experimental conditions. After the simulations, thirteen samples were analyzed at the Instituto de Física Gleb Wataghin (IFGW), using an energy dispersive X-ray fluorescence (ED-XRF) arrangement, to obtain the trace elements concentrations and the electron densities of the samples, simultaneously. Another seven samples were analyzed at the Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), in two separate experiments. First, the micro X-ray fluorescence (μ -XRF) technique was applied for mapping the spatial distribution of Fe, Cu and Zn around the tumors. Then, the Compton scattering measurements were performed at selected points of the samples, in order to obtain values of electron density at these points. The simulations results optimized the experimental conditions, providing a better use of the beam time for the experiments carried out at the LNLS. The results obtained in the experiments with the ED-XRF arrangement, despite the percentage fluctuations, served as the basis for an estimation of the concentration values of Cu and Zn and the sample's electron densities. The μ -XRF experiments provided maps with the spatial distributions of Fe, Cu and Zn around the tumors, which were compared to the histological slides and the electron density values found in the Compton scattering experiment. A higher concentration of Cu was observed in a benign tumor sample (simple adenoma), and increased Fe in regions close to tumors, and Zn was homogeneously distributed in most of the samples. Regarding the values of electron density, there was agreement with other works present in the literature, with higher values in tumor regions, and smaller in the areas of adipose tissue. Therefore, it is observed that the combination of XRF and Compton scattering techniques is an effective way for obtaining complementary information in studies with canine mammary tumors.

Keywords: Canine mammary tumors, Trace elements, Electron density.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	– Anatomia da mama canina.	19
FIGURA 2	– Representação da cadeia mamária canina. Os cinco pares de mamas são denominados: torácicas craniais (1), torácicas caudais (2), abdominais craniais (3), abdominais caudais (4) e inguinais (5).	20
FIGURA 3	– Sistema linfático e de irrigação sanguínea das mamas caninas. 1 - Linfonodos axilares e axilares acessórios; 2- Ramo da artéria torácica lateral; 3 - Ramos perfurantes de vasos torácicos internos; 4 - Ramos dos vasos epigástricos superficiais cranianos; 5 - Artéria epigástrica superficial caudal; 6 - Linfonodos inguinais superficiais; 7 - Ramo labial ventral para vulva; 8 - Artéria pudenda externa.	21
FIGURA 4	– Estrutura do alvéolo e ducto associado.	22
FIGURA 5	– Glandula mamária ativa <i>versus</i> inativa.	23
FIGURA 6	– Lâminas histológicas correspondentes a um adenoma simples em a) e um carcinoma sólido em b).	24
FIGURA 7	– Lâminas histológicas de tecido mamário normal e neoplásico (carcinoma), correspondentes a cães (esquerda) e humanos (direita).	28
FIGURA 8	– Esquema de um tubo de raios X.	31
FIGURA 9	– Espectro de raios X de freamento (componente contínua) e característicos, para um tubo de raios X com alvo de tungstênio (W).	32
FIGURA 10	– Produção de raio X característico.	33
FIGURA 11	– Vista esquemática de uma instalação de radiação síncrotron.	34
FIGURA 12	– Vista esquemática de um anel de armazenamento com os elementos principais (ímãs defletores, dispositivos de inserção (ondulador, <i>wiggler</i>) e a cavidade de radiofrequência (RF)).	34
FIGURA 13	– Emissão do feixe de radiação de uma estrutura magnética multipolar <i>wiggler</i>	35
FIGURA 14	– Configuração típica de um arranjo de ED-XRF.	37
FIGURA 15	– Configuração típica de μ -XRF.	38
FIGURA 16	– Processo de formação do mapa de μ -XRF.	38
FIGURA 17	– Cinemática do efeito fotoelétrico.	39
FIGURA 18	– Cinemática do efeito Compton.	42
FIGURA 19	– Feixe estreito incidindo em uma placa. O número de fótons que atingem uma profundidade x sem ter uma interação é dada por $N = N_0 e^{-\mu x}$, onde μ é o coeficiente de atenuação linear.	44
FIGURA 20	– Exemplos de uma geometria utilizada nas simulações.	45
FIGURA 21	– Esquema do porta-amostras utilizado nas medições feitas no IFGW.	46
FIGURA 22	– Esquemática do posicionamento das amostras para os experimentos de μ -XRF. Em a), tem-se a amostra fixada no filme Mylar [®] . Em b), tem-se o modelo do porta-amostras de acrílico utilizado nos experimentos e em c), a amostra aparece posicionada para realização das medições.	47
FIGURA 23	– Exemplo de uma amostra emblocada em parafina em a) e, em b), a porção remanescente da amostra, cuja parafina foi derretida.	47

FIGURA 24	– Arranjo experimental utilizado nas medições realizadas no IFGW.	48
FIGURA 25	– Arranjo experimental utilizado nas medidas realizadas no LNLS.	49
FIGURA 26	– Exemplo das imagens obtidas com o estereomicroscópio. Em a), tem-se a imagem da amostra, com demarcação da região de interesse a ser escaneada. Em b), tem-se a lâmina histológica correspondente a essa amostra, também com a região de interesse demarcada.	49
FIGURA 27	– Exemplo de um mapa de μ -XRF do elemento Zn (a), com a respectiva lâmina histológica (b), correspondente à região escaneada.	52
FIGURA 28	– Arranjo experimental utilizado nas medições de massa real e aparente das amostras.	55
FIGURA 29	– Porta-amostras utilizado para medições dos materiais de referência. Vista frontal em a) e vista transversal em b).	56
FIGURA 30	– Exemplo de um resultado obtido com as simulações, utilizando energia de 12 keV. Observa-se que os picos de espalhamento Compton e Rayleigh apresentam separação adequada. Os picos de fluorescência também são visíveis.	57
FIGURA 31	– Exemplo de espectro obtido na irradiação de uma padrão para calibração do sistema	58
FIGURA 32	– Curvas de calibração dos elementos Cu e Zn (a) e b), respectivamente). ..	58
FIGURA 33	– <i>Boxplot</i> com as concentrações dos elementos Cu (a) e Zn (b) nas amostras de tecidos normais e tecidos neoplásicos benignos e malignos. As linhas pontilhadas demarcam os limites de detecção.	59
FIGURA 34	– Curva $Y \times \mu$ utilizada na determinação dos parâmetros k e L_0	61
FIGURA 35	– <i>Boxplot</i> com os valores de densidade eletrônica encontrados para os tecidos normais e neoplásicos (benignos e malignos).	62
FIGURA 36	– Densidade eletrônica experimental <i>versus</i> real para os materiais de referência utilizados neste trabalho.	63
FIGURA 37	– Amostra 1: Tecido normal (majoritariamente fibroglandular). Correlação entre os mapas de distribuição dos elementos Fe, Cu e Zn (esquerda), lâmina histológica (centro) e valores de densidade eletrônica calculados para as regiões marcadas com os pontos a), b), c) e d).	65
FIGURA 38	– Amostra 2: Tecido normal (adiposo e fibrovascular). Correlação entre os mapas de distribuição dos elementos Fe, Cu e Zn (esquerda), lâmina histológica (centro) e valores de densidade eletrônica calculados para as regiões marcadas com os pontos a), b), c) e d).	65
FIGURA 39	– Amostra 3: Adenoma simples. Correlação entre os mapas de distribuição dos elementos Fe, Cu e Zn (esquerda), lâmina histológica (centro) e valores de densidade eletrônica calculados para as regiões marcadas com os pontos a), b), c), d), e) e f).	67
FIGURA 40	– Amostra 4: Adenoma simples. Correlação entre os mapas de distribuição dos elementos Fe, Cu e Zn (esquerda), lâmina histológica (centro) e valores de densidade eletrônica calculados para as regiões marcadas com os pontos a), b), c) e d).	68
FIGURA 41	– Amostra 5: Carcinoma sólido. Correlação entre os mapas de distribuição dos elementos Fe, Cu e Zn (esquerda), lâmina histológica (centro) e valores de densidade eletrônica calculados para as regiões marcadas com os pontos a), b), c), d) e e).	69
FIGURA 42	– Amostra 6: Adenocarcinoma papilífero a complexo. Correlação entre os	

	mapas de distribuição dos elementos Fe, Cu e Zn (esquerda), lâmina histológica (centro) e valores de densidade eletrônica calculados para as regiões marcadas com os pontos a), b), c) e d).	70
FIGURA 43	– Amostra 7: Adenocarcinoma simples. Correlação entre os mapas de distribuição dos elementos Fe, Cu e Zn (esquerda), lâmina histológica (centro) e valores de densidade eletrônica calculados para as regiões marcadas com os pontos a), b), c) e d).	71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	– Estadiamento clínico (TNM) de tumores mamários caninos	25
TABELA 2	– Classificação histológica das neoplasias mamárias caninas	26
TABELA 3	– Similaridades entre tumores mamários humanos e caninos	29
TABELA 4	– Concentrações dos sais nos padrões utilizados para confecção das curvas de calibração nos experimentos de ED-XRF	51
TABELA 5	– Composições químicas, densidades físicas (ρ) e eletrônicas (ρ_e) dos materiais de referência	54
TABELA 6	– Valores de densidades físicas das amostras de tecido mamário canino, obtidas pelo método de pesagem hidrostática	61
TABELA 7	– Valores médios de densidade eletrônica encontradas neste trabalho e por Antoniassi (2009) e Ryan <i>et al.</i> (2005)	62
TABELA 8	– Densidades eletrônicas reais e experimentais, utilizadas para verificar a exatidão do processo experimental nas medidas de espalhamento Compton com radiação síncrotron	64

LISTA DE SIGLAS

μ -XRF	<i>Micro X-ray fluorescence</i> (Microfluorescência de raios X)
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CPU	<i>Central Process Unit</i> (Unidade Central de Processamento)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ED-XRF	<i>Energy dispersive X-ray fluorescence</i> (Fluorescência de raios X por dispersão de energia)
IFGW	Instituto de Física Gleb Wataghin
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
MMPs	Metaloproteinases de matriz
OMS	Organização Mundial da Saúde
PLA	Biopolímero ácido polilático
PMMA	Polimetilmetacrilato
RAM	<i>Random Access Memory</i> (Memória de acesso aleatório)
RF	Radiofrequência
ROI	<i>Region of Interest</i> (Região de interesse)
TXRF	<i>Total Reflection X-Ray Fluorescence</i> (Fluorescência de raios X por reflexão total)
XRF	<i>X-ray fluorescence</i> (Fluorescência de raios X)
XRMC	<i>X-ray Monte Carlo</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

C	Carbono
Ca	Cálcio
Cu	Cobre
eV	Elétron-volt
Fe	Ferro
H	Hidrogênio
K	Potássio
N	Nitrogênio
Ni	Níquel
O	Oxigênio
P	Fósforo
Rb	Rubídio
S	Enxofre
Se	Selênio
V	Vanádio
W	Tungstênio
Zn	Zinco
h	Constante de Planck
κ	Secção de choque para produção de pares
σ_{ela}	Secção de choque para o espalhamento elástico
σ_{inel}	Secção de choque para o espalhamento inelástico
$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{in}$	Secção de choque diferencial inelástica
Ω	Ângulo sólido
λ	Comprimento de onda
μ	Coefficiente de atenuação linear
μ/ρ	Coefficiente de atenuação de massa
r_0	Raio clássico do elétron
ρ	Densidade ou unidade de massa
ρ_e	Densidade eletrônica
σ	Secção de choque
τ	Secção de choque para efeito fotoelétrico
θ	Ângulo de espalhamento
ν	Frequência
Z	Número atômico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 MOTIVAÇÃO	13
1.2 OBJETIVOS	14
1.2.1 Objetivo Geral	14
1.2.2 Objetivos Específicos	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS	19
3.1 CARACTERIZAÇÃO DA MAMA CANINA	19
3.1.1 Anatomia e fisiologia	19
3.1.2 Histologia	21
3.1.3 Neoplasias mamárias	23
3.1.4 Similaridades com relação à mama humana	27
3.1.5 Composição química dos tumores	29
3.2 FONTES DE PRODUÇÃO DE RAIOS X	31
3.2.1 Tubo de raios X	31
3.2.1.1 Espectros de raios X	32
3.2.2 Radiação Síncrotron	33
3.3 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X	35
3.4 INTERAÇÕES DA RADIAÇÃO COM A MATÉRIA	39
3.4.1 Efeito fotoelétrico	39
3.4.1.1 Cinemática do efeito fotoelétrico	39
3.4.1.2 Secção de choque para o efeito fotoelétrico	40
3.4.2 Espalhamento elástico	41
3.4.3 Espalhamento inelástico	41
3.4.3.1 Cinemática do espalhamento inelástico	41
3.4.3.2 Secção de choque para o espalhamento inelástico	42
3.4.4 Coeficientes de atenuação	43
4 MATERIAIS E MÉTODO	45
4.1 SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS	45
4.2 AMOSTRAS	46
4.3 ARRANJO EXPERIMENTAL	48
4.3.1 Medições com tubo de raios X	48
4.3.2 Medições com radiação síncrotron	48
4.4 MÉTODO DE ANÁLISE	50
4.4.1 Determinação das concentrações e mapas de distribuição dos elementos-traço	50
4.4.2 Determinação das densidades eletrônicas	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1 SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS	57
5.2 EXPERIMENTOS COM TUBO DE RAIOS X	58
5.2.1 Concentração dos elementos-traço	58
5.2.2 Valores de densidade eletrônica	60

5.3 EXPERIMENTOS REALIZADOS COM RADIAÇÃO SÍNCROTRON	63
5.3.0.1 Teste de exatidão para o cálculo das densidades eletrônicas	63
5.3.1 Análise dos mapas de μ -XRF e valores de densidade eletrônica	64
6 CONCLUSÕES	73
6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS	75
REFERÊNCIAS	76
Anexo A – PARECER DE APROVAÇÃO DA CEUA	83
Anexo B – PROTOCOLO DE PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 MOTIVAÇÃO

A expectativa de vida dos cães cresceu significativamente nos últimos anos, em razão de uma maior demanda por monitoramento veterinário, vacinação e uma dieta apropriada (PAOLONI; KHANNA, 2008). No entanto, observou-se um aumento de doenças relacionadas à idade, dentre as quais as neoplasias se destacam como um dos processos com a maior interferência na saúde e bem-estar desses animais (RICHARDS *et al.*, 2001). Os tumores mamários fazem parte das doenças mais representativas que afetam cadelas e aproximadamente 50% deles são malignos (GRAHAM; MYERS, 1999).

Mesmo com evidências de alta malignidade e crescente conscientização dos tutores com a saúde desses animais, há poucos estudos investigando as alterações químicas e físicas em tecidos mamários caninos acometidos por tumores (PAOLONI; KHANNA, 2008; SILVA *et al.*, 2013). Os cães compartilham algumas características comuns do câncer de mama com a espécie humana, tais como predominância de carcinoma, padrão metastático, dependência hormonal e desenvolvimento do tumor. Dessa forma, as neoplasias mamárias caninas parecem representar um modelo apropriado para o estudo da biologia do câncer de mama humano, além de auxiliar no desenvolvimento de técnicas diagnósticas e terapêuticas, que irão beneficiar ambas as espécies (VISAN *et al.*, 2016).

Sabe-se que tumores são causados por alterações químicas e bioquímicas na célula, com consequências nos tecidos e estruturas que a compõem (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Da mesma forma, a concentração de elementos-traço está associada a vários processos metabólicos e biológicos. Mudanças nessas concentrações foram relacionadas a processos patológicos em tecidos humanos (SCHWARTZ, 1975; GARG *et al.*, 1994; SILVA *et al.*, 2013). Estudos adicionais são necessários para investigar a associação desses elementos no desenvolvimento e/ou manutenção de tumores de mama em cães, e as ferramentas utilizadas nesses estudos devem ser capazes de identificar a diferenciação tecidual.

A fluorescência de raios X (XRF) é uma ferramenta muito utilizada para obtenção de informações a respeito de elementos químicos presentes em amostras de tecido tumoral, além de permitir a análise de vários elementos simultaneamente (CESAREO, 1988; FILHO, 1999; SILVA *et al.*, 2013). Dentre essas técnicas, tem-se a fluorescência de raios X por dispersão de energia (ED-XRF), que se baseia na excitação dos átomos de uma amostra, após exposição a

um feixe de raios X com determinado valor de energia, e detecção da radiação característica emitida pelos elementos desta amostra (FILHO, 1999). Mais detalhadamente, a técnica de microfluorescência de raios X (μ -XRF) permite a focalização de um feixe primário de raios X em áreas muito pequenas, permitindo mapear a distribuição espacial de elementos-traço nessas amostras (GRIEKEN; MARKOWICZ, 2001).

No geral, as técnicas de XRF não são sensíveis a elementos de baixo número atômico, como carbono e oxigênio, constituintes principais dos tecidos mamários. Consequentemente, estes experimentos não fornecem dados sobre a morfologia e composição da matriz tecidual (ANTONIASSI *et al.*, 2019), cujas alterações podem estar associadas à presença de neoplasias (CONKLIN; KEELY, 2012). Para suprir essas limitações, pode-se utilizar a técnica de espalhamento Compton, que permite determinar as densidades eletrônicas das amostras em análise. Isso é possível pois o número de fótons espalhados inelasticamente está diretamente relacionado com a densidade eletrônica (número de elétrons por unidade de volume) do material (ANTONIASSI, 2009). O uso do espalhamento Compton para determinar a densidade eletrônica de materiais tem sido observado em diversas aplicações clínicas, no entanto, há poucos trabalhos envolvendo neoplasias mamárias humanas (RYAN *et al.*, 2005; RYAN; FARQUHARSON, 2007; ANTONIASSI *et al.*, 2010, 2012).

Dessa forma, as técnicas de fluorescência de raios X e de espalhamento de Compton podem ser combinadas para fornecer resultados a respeito da diferenciação dos vários tecidos mamários. As habilidades complementares destas técnicas, para obtenção de informações morfológicas e químicas de amostras de tecido mamário canino, foram aplicadas nesse trabalho.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a variação nas concentrações de elementos-traço (Fe, Cu e Zn) e densidade eletrônica em tecidos mamários caninos normais e neoplásicos, combinando as técnicas de XRF e espalhamento Compton.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos desse trabalho são:

- Otimizar as condições experimentais para realização de μ -XRF e espalhamento Compton em uma fonte de radiação síncrotron, por meio de simulações computacionais com a

ferramenta XRMC (*X-ray Monte Carlo*).

- Determinar as concentrações de Fe, Cu e Zn em um grupo de amostras de tecido mamário canino (normais e neoplásicos) utilizando um tubo de raios X, por meio da técnica de ED-XRF, e analisar os picos de espalhamento Compton para obter suas respectivas densidades eletrônicas.
- Mapear a distribuição espacial de Fe, Cu e Zn em amostras de tecido mamário canino (normais e neoplásicos), por meio da μ -XRF, correlacionar com as respectivas lâminas histológicas, e estimar as densidades eletrônicas em pontos selecionados dessas amostras, em uma fonte de radiação síncrotron.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma breve revisão bibliográfica dos trabalhos que fizeram uso das técnicas espectroscópicas de XRF (com foco na ED-XRF e μ -XRF), e da técnica de espalhamento Compton, para caracterização de tecidos mamários humanos, com uma breve abordagem dos trabalhos com tecidos mamários caninos.

Técnicas de XRF tem sido muito utilizadas para investigação de elementos-traço em tecidos mamários humanos (RIZK; SKY-PECK, 1984; GERAKI *et al.*, 2002, 2003; POLETTI *et al.*, 2004; FARQUHARSON *et al.*, 2007; KUBALA-KUKUŚ *et al.*, 2007; MAJEWSKA *et al.*, 2007; FARQUHARSON *et al.*, 2008; AL-EBRAHEEM *et al.*, 2009; FARQUHARSON *et al.*, 2009; SILVA, 2011; SILVA *et al.*, 2012, 2013). Rizk e Sky-Peck (1984) analisaram 25 amostras de tecido mamário humano por ED-XRF. Eles observaram aumentos significativos de Ca, V, Cu, Zn, Se e Rb. Aplicando-se uma comparação entre tecidos histologicamente normais e neoplásicos do mesmo indivíduo, verificou-se que Zn e Rb eram consistentemente mais altos no tumor, enquanto os níveis de Ca, Cu e V variavam de normais a altos. Além deles, Silva *et al.* (2012) também utilizaram ED-XRF para analisar as concentrações dos elementos Ca, Fe, Cu e Zn em 106 amostras de tecidos mamários humanos normais e neoplásicos. Eles encontraram concentrações maiores dos elementos em tecidos neoplásicos (malignos e benignos) quando comparados com tecidos normais.

Utilizando radiação síncrotron, Geraki *et al.* (2003) analisaram os espectros de XRF emitidos pelos elementos Fe, Cu, Zn e K, em tecidos mamários saudáveis e cancerosos. Modelos de calibração resultantes da irradiação de soluções aquosas padrão foram utilizados para a quantificação dos elementos. A análise estatística das concentrações elementares dos diferentes grupos de amostras revelou que os quatro elementos apresentaram níveis elevados nos espécimes tumorais. O aumento foi menos pronunciado para Fe e Cu e mais para K e Zn.

Kubala-Kukuś *et al.* (2007) utilizaram a de fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF) para estudar as concentrações de elementos-traço em tecidos neoplásicos benignos e malignos de mama humana, e observaram um aumento das concentrações de P (248%), S (137%), K (252%), Ca (290%), Fe (177%), Ni (165%), Se (151%) e Rb (190%) em amostras de tecidos malignos, em comparação com os benignos. Majewska *et al.* (2007) também fizeram uso da TXRF para estudar as concentrações de Fe, Cu, Zn e Se em tecidos cancerosos e benignos.

nos da mama, e encontraram diferenças estatisticamente significantes entre as distribuições de concentração de Fe e Se. Já Geraki *et al.* (2002) e Poletti *et al.* (2004) utilizaram XRF com fonte de radiação monoenergética, para analisar respectivamente 80 e 9 amostras de tecido mamário humano, e determinar a concentração de elementos como Ca, Fe, Cu, Zn, K e Mn. Ambos encontraram níveis elevados desses elementos em tecidos neoplásicos malignos.

Al-Ebraheem *et al.* (2009) encontraram concentrações elevadas de elementos-traço em células cancerosas de tecidos mamário, em especial Fe, Zn, Cu e Ca, utilizando a técnica de μ -XRF. Também com o uso desta técnica, combinada à ED-XRF, Silva *et al.* (2013) observaram que a expressão dos elementos Fe e Zn e fator de crescimento endotelial vascular estão relacionados, indicando que níveis mais elevados desses elementos podem estar associados ao processo angiogênico no câncer de mama.

Similarmente, Farquharson *et al.* (2007) mapearam 10 amostras de carcinomas de mama invasivos, fixadas em parafina e dispostas em TMAs (*tissue microarray*), por meio da μ -XRF. Os mapas foram comparados com imagens de microscopia de transmissão, e em seguida as amostras foram coradas para identificação das regiões neoplásicas. O principal elemento de investigação deste trabalho foi o Cu, embora os achados não foram significativos, uma vez que as concentrações encontradas foram relativamente baixas. Por fim, Farquharson *et al.* (2009) mediram as concentrações de Zn em 59 amostras de carcinoma ductal invasivo de mama. As amostras estavam em TMAs, e fixadas em formalina. Os níveis relativos de Zn em áreas tumorais de tecido foram comparadas com os níveis de áreas de tecido circundante não-tumorais. Houve um aumento significativo do Zn nas regiões neoplásicas.

No âmbito das neoplasias mamárias caninas, poucos trabalhos foram realizados, mas pode-se citar os de Cozer (2016) e Sakamoto (2011) como os mais relevantes. Ambos analisaram as concentrações de elementos-traço em amostras de tecido mamário canino normais e neoplásicos, especificamente dos elementos Ca, Cu, Fe e Zn, utilizando a técnica de ED-XRF. Sakamoto (2011) encontrou valores elevados nos níveis de Ca, Fe e Zn, em comparação a um grupo controle utilizado no estudo. Cozer (2016) encontraram valores elevados de Zn em tecido neoplásico com relação aos benignos.

Na investigação das densidades eletrônicas utilizando técnicas de espalhamento Compton, poucos trabalhos são encontrados (AL-BAHRI; SPYROU, 1998; RYAN *et al.*, 2005; RYAN; FARQUHARSON, 2007; ANTONIASSI *et al.*, 2010, 2012). Por meio do uso de uma fonte de amerício (Am-241), Al-Bahri e Spyrou (1998) estudaram amostras normais e patológicas de tecido mamário de 9 pacientes com câncer de mama. O objetivo do estudo era fornecer informações de densidade eletrônica em apoio à introdução de novos materiais substitutos

de tecidos para *phantoms* de mamografia. Ryan *et al.* (2005) fizeram medidas de densidade eletrônica em 22 amostras de tecido mamário humano (adiposos, malignos, fibroadenomas e alterações fibrocísticas), utilizando um tubo de raios X industrial, com alvo de Tungstênio (W). Os fótons de raios X foram coletados a um ângulo de espalhamento de 30°. Os resultados encontrados mostraram uma diferença de 9% entre tecidos adiposos e malignos, e de 12% entre os tecidos com alterações fibrocísticas e adiposos.

Por fim, Antoniassi *et al.* (2010) utilizaram um tubo de raios X, com alvo de Molibdênio (Mo), para analisar 109 amostras e encontrar suas respectivas densidades eletrônicas. Os resultados encontrados mostraram que o tecido mamário adiposo possui menor densidade eletrônica em comparação a tecidos fibrosos e neoplásicos (fibroadenoma e carcinoma), fato relacionado à menor densidade de seus constituintes histológicos. Em outro estudo mais recente, Antoniassi *et al.* (2012) determinaram os valores de densidade eletrônica utilizando radiação síncrotron. Neste estudo, 33 amostras foram analisadas, incluindo tecidos normais (adiposos e fibroglandulares) e neoplásicos (benignos e malignos). Seus resultados mostraram que os tecidos normais adiposos exibiram valores mais baixos de densidade eletrônica, em comparação com tecidos malignos.

3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA MAMA CANINA

3.1.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA

As glândulas mamárias caninas são glândulas sudoríparas modificadas e aumentadas, cuja secreção nutre os filhotes. O leite modificado (colostró), produzido imediatamente após o parto, tem um papel adicional na transferência passiva de imunidade ao recém-nascido (DYCE *et al.*, 2009). O desenvolvimento dessa glândula passa por vários estágios, sendo que os últimos ocorrem na fêmea adulta apenas durante a gravidez (SORENMO *et al.*, 2011).

Cada glândula consiste em tecido glandular embutido no tecido conjuntivo e revestido por um epitélio secretor, conforme mostrado na Figura 1. O leite produzido é drenado através de uma rede de seios que eventualmente formam canais da papila mamária. Estes se abrem para a superfície de cada papila, conhecidos como orifícios papilares. Cada glândula tem uma papila, mas cada papila contém vários orifícios (ASPINALL; CAPPELLO, 2015).

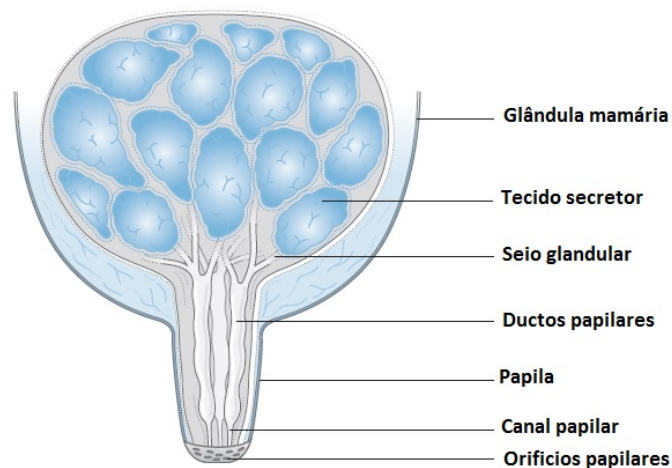


Figura 1: Anatomia da mama canina.

Fonte: Adaptado de Aspinall e Cappello (2015)

O número de aberturas para ductos nas papilas mamárias varia entre 7 e 16. As aberturas dos ductos estão localizadas na extremidade mais rígida do mamilo, apresentando um padrão irregular. Os ductos periféricos tendem a formar um círculo, enquanto que os centrais formam desenhos irregulares (EVANS; LAHUNTA, 2012; DYCE *et al.*, 2009).

Os cães geralmente apresentam cinco pares de glândulas mamárias, organizadas como linhas bilaterais simétricas, que se estendem do tórax ventral até a região inguinal (BANKS *et al.*, 1993). A Figura 2 representa a distribuição dessa cadeia mamária:

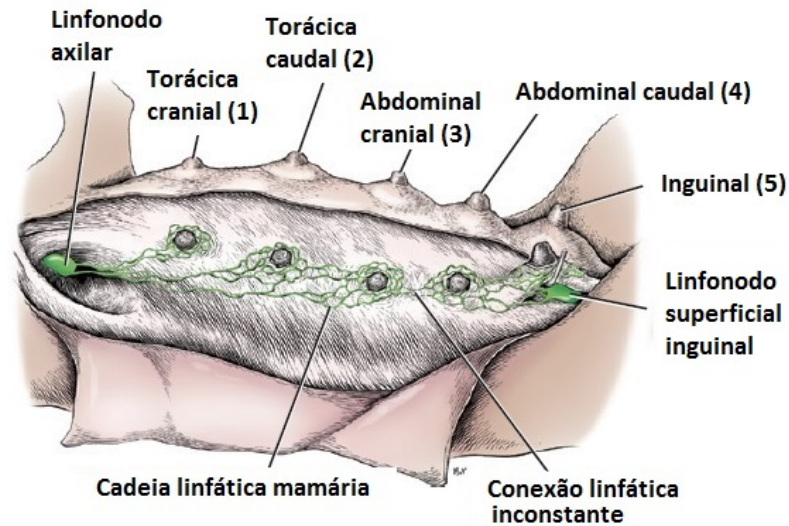


Figura 2: Representação da cadeia mamária canina. Os cinco pares de mamas são denominados: torácicas craniais (1), torácicas caudais (2), abdominais craniais (3), abdominais caudais (4) e inguinais (5).

Fonte: Adaptado de Evans e Lahunta (2012)

As glândulas mamárias são altamente vascularizadas, com as veias sendo mais extensas que as artérias. As mamas torácicas recebem o suprimento sanguíneo arterial dos ramos cranianos perfurantes das artérias torácicas internas. Estes penetram a parede torácica através dos espaços intercostais. As artérias torácicas intercostal e lateral também podem contribuir com sangue para as glândulas torácicas. As mamárias abdominais e inguinais são supridas por ramos mamários das artérias epigástricas superficiais. A artéria epigástrica superficial cranial origina-se da artéria epigástrica cranial (EVANS; LAHUNTA, 2012; KÖNIG; LIEBICH, 2013).

A linfa das três glândulas craniais vai para os linfonodos axilar, acessório axilar e esternal, e das duas glândulas caudais vai para o nódulo inguinal superficial (mamário), que está localizado na região dorsal até a borda caudal da glândula mamária inguinal. No cão, o terceiro par geralmente drena em direção ao linfonodo axilar, mas também pode drenar caudalmente. Os linfonodos inguinais superficiais drenam a parte adjacente da parede abdominal, além das glândulas mamárias caudais (DYCE *et al.*, 2009; KÖNIG; LIEBICH, 2013). Na Figura 3, a seguir, estão rerepresentados os vasos sanguíneos e linfáticos das glândulas mamárias caninas:

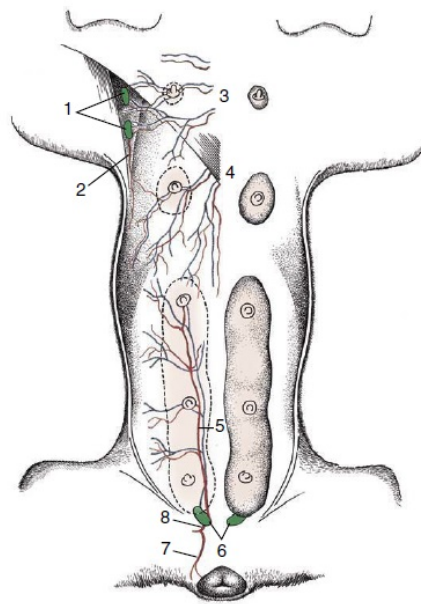


Figura 3: Sistema linfático e de irrigação sanguínea das mamas caninas. 1 - Linfonodos axilares e axilares acessórios; 2 - Ramo da artéria torácica lateral; 3 - Ramos perforantes de vasos torácicos internos; 4 - Ramos dos vasos epigástricos superficiais cranianos; 5 - Artéria epigástrica superficial caudal; 6 - Linfonodos inguinais superficiais; 7 - Ramo labial ventral para vulva; 8 - Artéria pudenda externa.

Fonte: Adaptado de Dyce *et al.* (2009)

O desenvolvimento da mama canina sofre alterações juntamente com o desenvolvimento do animal. Do nascimento, passando pela puberdade e chegando à fase reprodutiva, a glândula passa por um processo morfogênético controlado pelo ambiente hormonal e fatores de crescimento produzidos em ciclos estrais (também conhecidos como “cio”) sucessivos (SORENMO *et al.*, 2011; ASPINALL; CAPPELLO, 2015).

3.1.2 HISTOLOGIA

Histologicamente, as glândulas mamárias são estruturas tubuloalveolares compostas. O componente secretor destas glândulas tem duas partes. A primeira parte é composta de células colunares que formam o epitélio alveolar. A segunda parte é composta de células colunares que formam os ductos intralobulares. O epitélio secretor inativo geralmente apresenta um perfil mais baixo ou uma aparência mais cubóide. O espaço entre os alvéolos e os ductos é absorvido por tecido conjuntivo frouxo e bem vascularizado. Células mioepiteliais ou epiteliais com propriedades contráteis estão presentes ao redor das estruturas alveolares (JENNINGS; PREMANANDAN, 2017). Essa estrutura alveolar pode ser observada na Figura 4.

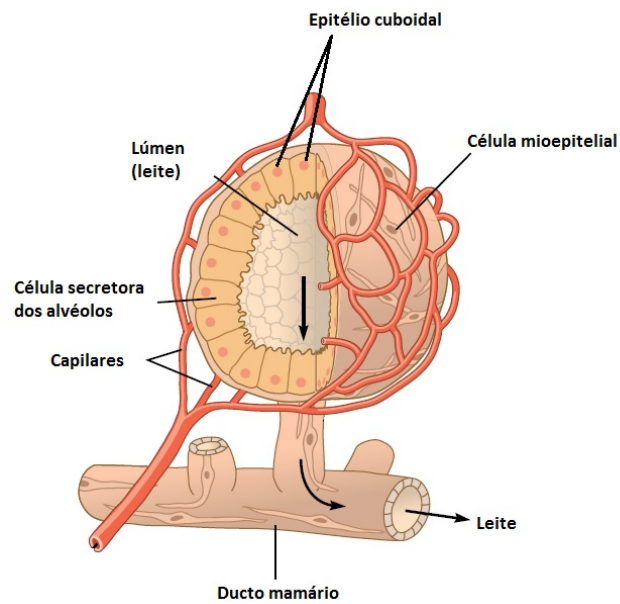


Figura 4: Estrutura do alvéolo e ducto associado.

Fonte: Adaptado de Jones e Lopez (2013)

Os alvéolos secretórios da glândula mamária possuem forma esférica a ovoide com um grande lúmen (espaço interno de uma estrutura tubular) (DELLMANN *et al.*, 1998). Um ou dois alvéolos drenam para cada ducto intralobular. Os ductos intralobulares drenam para um ducto lobular e vários ductos lobulares drenam para dentro e formam um ducto lobar. Cada ducto lobar drena um lobo da glândula mamária. Muitos ductos lobares drenam para o seio lactífero, a câmara comum na base de cada glândula, também conhecido como canal da papila. Enquanto a maior parte do seio lactífero é revestida por epitélio colunar estratificado, o canal é revestido por epitélio escamoso estratificado (JENNINGS; PREMANANDAN, 2017).

O tecido intersticial da glândula mamária fornece importante suporte estrutural para as unidades secretoras e contém vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos. Cada unidade secretora é cercada por tecido conjuntivo frouxo com um extenso plexo de sangue e capilares linfáticos. O tecido conjuntivo interlobular é espesso e contém os ductos interlobulares e vasos sanguíneos e linfáticos maiores (DELLMANN *et al.*, 1998). Nas glândulas mamárias em lactação, o número de alvéolos é muito maior do que o número de glândulas mamárias inativas. As glândulas inativas possuem grandes quantidades de tecido glandular substituído por tecido conjuntivo fibroso e tecido adiposo. Os elementos ductais maiores permanecem intactos nessas glândulas (JENNINGS; PREMANANDAN, 2017). Na Figura 5 é possível observar as diferenças da glândula quanto ativa e inativa.

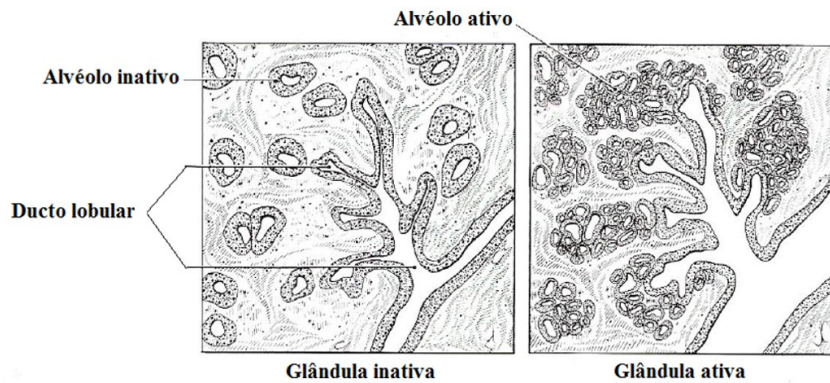


Figura 5: Glândula mamária ativa versus inativa.

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

3.1.3 NEOPLASIAS MAMÁRIAS

A glândula mamária é um dos locais mais comuns de desenvolvimento de tumores em cães (MORRISON, 2002) e 50% desses tumores são considerados malignos (SLATTER, 2003; MAXIE, 2007). No momento do diagnóstico, 50% dos tumores malignos apresentam metástase (SLATTER, 2003) e as estimativas mostram que o risco de vida para esses tumores variam de 2% a mais de 20%, ultrapassando de duas a cinco vezes a taxa de mortalidade dos tumores benignos (LANA *et al.*, 2007). O desenvolvimento do tumor é um processo de várias etapas, que envolve um acúmulo de alterações ou “erros” no DNA celular. Os passos que levam à transformação neoplásica de uma célula não são totalmente compreendidos, mas a mudança fundamental envolve o rompimento dos genes que controlam o crescimento e a diferenciação celular (MORRIS; DOBSON, 2008).

A maioria das neoplasias mamárias ocorre na meia idade para cães mais velhos, com uma incidência muito baixa em cães jovens. O pico de incidência é entre 7 e 13 anos de idade. No entanto, a idade em que os tumores se desenvolvem depende da raça e do tamanho do cão, uma vez que as raças grandes desenvolvem tumores mamários em idade mais jovem do que as raças pequenas (MORRIS; DOBSON, 2008; SORENMO *et al.*, 2011). O uso de hormônios também diminui a idade em que as neoplasias mamárias se desenvolvem. Baixas doses de progestina estão associadas ao desenvolvimento de neoplasias benignas, enquanto uma combinação de progestinas e estrogênios podem induzir o desenvolvimento de neoplasias malignas (SORENMO *et al.*, 2013). Da mesma forma, a esterilização influencia no aparecimento de tumores mamários, uma vez que, quando realizada em idades mais jovens, reduz significativamente o risco da cadela desenvolver câncer, sendo menor que 0,05% quando realizado antes do primeiro cio (SORENMO *et al.*, 2013; SLATTER, 2003).

A aparência macroscópica dos tumores é caracterizada por diferentes tamanhos, formas, cores e consistências, que dependem de muitos fatores, como localização, tipo de tumor, suprimento de sangue, taxa de crescimento e o tempo que o tumor está presente no organismo. Microscopicamente, o tumor é composto de células que se assemelham ao tipo de tecido/órgão envolvido (CHAUHAN; CHAUHAN, 2010). Neoplasias bem diferenciadas, que crescem lentamente por expansão e não invadem a membrana basal são chamadas de neoplasias benignas. Elas permanecem localizadas, encapsuladas e podem ser removidas por cirurgia. Em geral, os tumores benignos são designados ligando o sufixo oma ao nome do tipo de célula a partir do qual o tumor se origina. Por exemplo, um tumor benigno que surge no tecido fibroso é chamado de fibroma, enquanto um tumor benigno de tecido glandular é um adenoma (CHAUHAN; CHAUHAN, 2010).

Tumores malignos são coletivamente referidos como cânceres, derivados da palavra latina para caranguejo, porque eles tendem a aderir a qualquer parte que eles aproveitam de maneira obstinada. Os tumores malignos podem invadir e destruir estruturas adjacentes e se espalhar para locais distantes (metastizar) para causar a morte. A nomenclatura de tumores malignos segue essencialmente o mesmo esquema usado para neoplasias benignas, com certas adições. Tumores malignos que surgem em tecidos mesenquimais sólidos são geralmente chamados de sarcomas. Neoplasias malignas de origem de células epiteliais, derivadas de qualquer uma das três camadas germinativas, são chamadas de carcinomas (KUMAR *et al.*, 2014).

A Figura 6 exemplifica a aparência dos tumores mencionados, por meio das imagens das lâminas histológicas correspondentes a um tumor benigno (adenoma simples) e um maligno (carcinoma sólido).

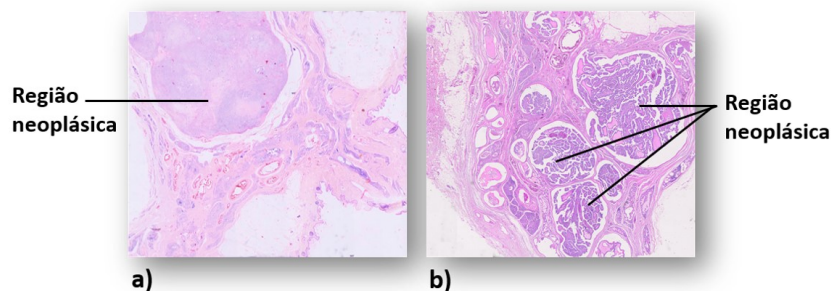


Figura 6: Lâminas histológicas correspondentes a um adenoma simples em a) e um carcinoma sólido em b).

Muitos cães têm mais de uma neoplasia mamária no momento do exame clínico, e as glândulas caudais são normalmente mais acometidas. Neoplasias pequenas (<1 cm de diâmetro) têm maior probabilidade de serem benignas, enquanto neoplasias maiores (> 3 a

5 cm de diâmetro) são frequentemente malignas (SORENMO *et al.*, 2013). Dos cães com tumores de glândula mamária, a grande maioria apresenta tumores múltiplos. Nesse sentido, um estadiamento clínico preciso é importante antes do início do tratamento. O estadiamento clínico é determinado de acordo com o sistema TNM (Tabela 1) estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (OWEN *et al.*, 1980) para tumores mamários caninos. Com base nesse sistema, o tamanho da lesão primária (T), a extensão de sua disseminação para os linfonodos regionais (N) e a presença ou ausência de metástases à distância (M) devem ser avaliados (LANA *et al.*, 2007; CASSALI *et al.*, 2014).

Tabela 1: Estadiamento clínico (TNM) de tumores mamários caninos

Sistema modificado

T—Tumor primário

T1 <3 cm de diâmetro máximo

T2 3-5 cm de diâmetro máximo

T3 >5 cm de diâmetro máximo

N—Linfonodos regionais

N0 Histológico ou citológico — Sem metástase

N1 Histológico ou citológico — Metástase presente

M—Metástase distante

M0 Nenhuma metástase à distância detectada

M1 Metástase à distância detectada

Estadiamento

I: T1 N0 M0

II: T2 N0 M0

III: T3 N0 M0

IV: Qualquer T N1 M0

V: Qualquer T Qualquer N M1

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

Além do estadiamento clínico, existem sistemas de classificação histológica que são baseados no reconhecimento de padrões teciduais histológicos que identificam a origem histogênica das células tumorais. De acordo com Cassali *et al.* (2014), os métodos para classificação de tumores mamários caninos variam consideravelmente, mas a mais adotada foi publicada por Misdorp (1999) e se encontra na Tabela 2. Essa classificação também foi estabelecida pela OMS, e acredita-se que esta subdivisão classifica os tumores aumentando o potencial para malignidade (LANA *et al.*, 2007).

Tabela 2: Classificação histológica das neoplasias mamárias caninas

<u>Lesão epitelial não neoplásica</u>
Hiperplasia epitelial
Hiperplasia ductal
Hiperplasia Lobular
Adenose
Lesões de células colunares
Alteração de célula colunar
Hiperplasia de células colunares
Lesões de células colunares atípicas
<u>Tumores benignos</u>
Adenoma
Adenoma complexo ou adenomioepitelioma
Adenoma basaloide
Fibroadenoma
Tumor benigno misto
Papiloma ductal
<u>Tumores malignos</u>
Carcinomas
Carcinomas <i>in situ</i>
Carcinoma ductal <i>in situ</i>
Carcinoma lobular <i>in situ</i>
Carcinoma de tumor misto
Carcinoma complexo ou adenomioepitelioma maligno
Carcinoma papilar
Carcinoma tubular
Carcinoma sólido
Carcinomas de tipo especial
Carcinoma Micropapilar
Carcinoma lobular invasivo
Carcinoma lobular pleomórfico
Carcinoma secretor
Carcinoma mucinoso
Carcinoma rico em lipídeos
Carcinoma de células escamosas
Carcinoma de células fusiformes
Carcinoma anaplásico
Neoplasias mamárias com diferenciação sebácea
Sarcomas
Fibrossarcoma
Osteossarcoma
Carcinossarcoma
Sarcomas tumorais mistos
Outros sarcomas
Condrosarcoma Puro
Lipossarcoma
Hemangiossarcoma

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

Os tumores de interesse para esse trabalho serão abordados brevemente a seguir, e estão divididos em grupos principais (adenoma, adenocarcinoma e carcinoma), para apresentar suas características gerais:

- Adenoma: Os **adenomas simples** são lesões nodulares não infiltrativas bem demarcadas, compostas por células dispostas em túbulos que ocasionalmente contêm uma secreção anfílica amorfa. O estroma fibrovascular de suporte é escasso a moderado (GOLDSCHMIDT *et al.*, 2011). Os **adenomas complexos** são originados da proliferação de células epiteliais e mioepiteliais. Sua diferenciação de carcinomas complexos e bem diferenciados pode ser difícil. A presença de uma cápsula, ausência de necrose e baixa atividade mitótica é a base para o diagnóstico (CASSALI *et al.*, 2014).
- Adenocarcinoma: Um carcinoma cujo arranjo é predominantemente glandular com um lúmen; os adenocarcinomas podem ser subdivididos em tipos tubulares e papilares (MISDORP *et al.*, 1972). Na classificação atual, baseada no consenso de Cassali (CASSALI *et al.*, 2014), o termo “adenocarcinoma” já não aparece, mas alguns patologistas ainda utilizam essa nomenclatura.
- Carcinoma sólido: é aquele em que as células são predominantemente dispostas em massas sólidas. É composto de células intimamente compactadas para formar lóbulos densos, de tamanho irregular, suportados por um estroma fibrovascular fino. As células são poligonais a ovais, e frequentemente apresentam margens celulares pouco demarcadas. Frequentemente ocorre infiltração de células neoplásicas em vasos linfáticos na periferia da neoplasia, com metástase para linfonodos regionais (GOLDSCHMIDT *et al.*, 2011).

3.1.4 SIMILARIDADES COM RELAÇÃO À MAMA HUMANA

Estudos relatam semelhanças entre tecidos mamários humanos e caninos, envolvendo aspectos moleculares, epidemiológicos e histológicos. Além disso, experimentos com cães têm provado ser eficazes como modelo para estudos a respeito do câncer de mama em humanos (SCHNEIDER, 1970; UVA *et al.*, 2009; PAOLONI; KHANNA, 2008; VISAN *et al.*, 2016). No caso de ambas as espécies, os fatores ambientais, idade, sexo e reprodução que levam à progressão e desenvolvimento do câncer são idênticos (VISAN *et al.*, 2016).

A Figura 7 compara lâminas histológicas de tecidos humanos e caninos (normais e neoplásicos), sendo notável a semelhança entre as estruturas.

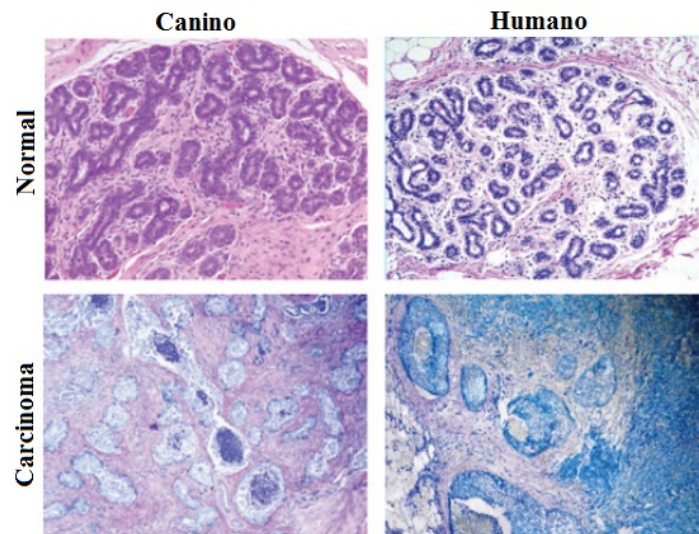


Figura 7: Lâminas histológicas de tecido mamário normal e neoplásico (carcinoma), correspondentes a cães (esquerda) e humanos (direita).

Fonte: Adaptado de Abdelmegeed e Mohammed (2018)

Tumores mamários caninos possuem diversas características semelhantes aos tumores mamários humanos. Esses tipos de tumores são frequentes nas duas espécies, com as taxas de incidência ajustadas sendo três vezes maiores nos cães do que nas mulheres. Entre os tumores benignos (incidência: mulher, 40%; cão, 60-70%), fibroadenomas são os mais frequentes em mulheres, enquanto adenomas complexos e tumores benignos mistos são os mais comuns em cães (MISDORP, 2002). Outra similaridade notável entre tumores caninos e humanos é a influência hormonal, que está ligada aos ciclos reprodutivos de ambas as espécies. Embora a cadela seja tenha ciclos estrais sazonais, com ciclos a cada 6 meses, e a mulher passe por vários ciclos durante o ano, os hormônios ovarianos e da hipófise anterior normalmente funcionam da mesma maneira em ambas (HOLLIDAY, 1996). Quanto à influência de hormônios endócrinos, a menopausa artificial tem demonstrado reduzir o risco de câncer mamário em mulheres, enquanto que nas cadelas, a castração também mostra uma redução desse risco quando realizada até o terceiro cio (SCHNEIDER, 1970).

A Tabela 3 apresenta um resumo com as principais similaridades entre os tumores de mama caninos e humanos.

Tabela 3: Similaridades entre tumores mamários humanos e caninos

Características similares	Humanos	Cachorros
Ocorrência	Espontâneo	Espontâneo
Idade de início	Idade média, 62 anos	Idade média, 10,5 ¹
Curso da doença	Idêntico em humanos e cães	Idêntico em humanos e cães
Tamanho do tumor	Semelhante em humanos e cães	Semelhante em humanos e cães
Estadiamento clínico	Idêntico em ambas as espécies	Idêntico em ambas as espécies
Invasão para os linfonodos	Idêntico em humanos e cães	Idêntico em humanos e cães
Neoplasia espontânea mais comum	Neoplasia mamária	Neoplasia mamária
Dependência de estrogênio	Longa exposição ao estrogênio aumenta o risco de ocorrência de tumor	Cães não esterilizados têm um risco quatro vezes maior de ocorrência de tumor do que cães esterilizados <2 anos de idade
Tipo histológico mais comum	Carcinoma ductal invasivo	Carcinoma
Lesões pré-malignas	Prevalentes	Prevalentes
Marcadores moleculares	Genes identificados desempenham um papel crítico na carcinogênese dos tumores mamários	Foi determinado que esses genes têm papel idêntico na carcinogênese dos tumores mamários caninos.
Anomalias mamográficas	Neoplasias mamárias de cães e humanos têm microcalcificações e macrocalcificações semelhantes	Neoplasias mamárias de cães e humanos têm microcalcificações e macrocalcificações semelhantes

Fonte: Adaptado de Abdelmegeed e Mohammed (2018)

3.1.5 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS TUMORES

Elementos químicos estão presentes em todos os tecidos vivos. Dentre eles, C, H, O, N, P e S possuem importância vital na biologia. Aos outros elementos, que ocorrem em proporções muito pequenas em relação às quantidades dos principais constituintes dos tecidos, é atribuído o termo “elemento-traço”. Os elementos-traço geralmente representam menos de 1% da massa de um material e podem ser classificados como essenciais e não essenciais, dependendo da sua função no organismo (CESAREO, 1988; UNDERWOOD *et al.*, 1971).

¹equivalente a uma mulher de 65,5 anos

Os elementos essenciais, segundo Cesareo (1988) são: Ca, Cl, Co, Cu, Fe, I, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Se e Zn, em níveis normais no organismo, são responsáveis por uma ampla variedade de processos biológicos, como ativação ou inibição de reações enzimáticas ou ativação celular, por exemplo. Todos os tecidos apresentam uma composição de elementos-traço semelhante, que varia de acordo com a função exercida pelo tecido ou órgão. Alterações nas concentrações desses elementos têm sido correlacionadas ao desenvolvimento patológico em tecidos mamários humanos (KUBALA-KUKUŠ *et al.*, 2007), e também em tecidos mamários caninos (COZER, 2016; SAKAMOTO, 2011).

Sabe-se que o Fe é o elemento-traço mais abundante no corpo, e seu excesso pode causar vários danos. O processo de oxidação celular está diretamente ligado a um aumento da concentração de Fe, e pode resultar na liberação de radicais livres e induzir danos ao DNA, que podem contribuir para as chances de desenvolvimento do câncer (MAGALHAES *et al.*, 2008). Um acúmulo de Fe em tecidos neoplásicos malignos pode estar relacionado ao nível de proteínas receptoras de Fe, que aparece em maior quantidade nas neoplasias mamárias malignas (KABAT; ROHAN, 2007). O elemento Cu é essencial para muitos processos bioquímicos, mas pode ser relativamente tóxico. Também é considerado um cofator da angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos). Portanto, um excesso desse elemento nos tumores de mama pode promover angiogênese com possível dano oxidativo ao DNA (HUANG *et al.*, 1999). O Zn está correlacionado com o sistema de defesa do corpo. Por isso, a sua ausência ou o seu excesso representa-se por uma deficiência no sistema imune do organismo, e esta falta pode resultar em células cancerosas (CAVALLO *et al.*, 1991). Além disso, Kelleher *et al.* (2009) afirmaram que níveis elevados de Zn podem influenciar no aumento da atividade celular, uma vez que ele participa da ativação de enzimas necessárias a esse processo.

3.2 FONTES DE PRODUÇÃO DE RAIOS X

Wilhelm Conrad Roentgen, em dezembro de 1895, descobriu um tipo de radiação, até então desconhecido, a qual ele chamou de “raios X” (JOHNS; CUNNINGHAM, 1983). Os raios X são radiações eletromagnéticas de alta energia, com comprimentos de onda relativamente curtos, e descrevem uma grande região no espectro eletromagnético, com intervalo de energia de centenas de elétron-volts (eV) (raios X moles, próximo a radiação ultravioleta) até energias de centenas de keV (raios X duros). Os raios X são produzidos sempre que uma substância é bombardeada por elétrons com alta velocidade (JOHNS; CUNNINGHAM, 1983). Algumas fontes de geração de raios X serão abordadas nas próximas sessões.

3.2.1 TUBO DE RAIOS X

O tubo de raios X é composto por dois eletrodos metálicos (catodo e anodo), contidos dentro de uma ampola de vidro a vácuo (JOHNS; CUNNINGHAM, 1983). O catodo corresponde ao filamento que, quando aquecido, libera elétrons por emissão termoiônica (também denominada de efeito termoiônico). O anodo é o alvo onde esses elétrons colidem. Os elétrons liberados são acelerados por meio de um campo elétrico associado a uma diferença de potencial (ddp), da ordem de dezenas de quilovolts, aplicada entre o catodo e o anodo. Na colisão com o alvo, feito normalmente de tungstênio ou molibdênio, os elétrons perdem velocidade e transferem energia aos átomos com os quais interagem. Normalmente, menos de 1% da energia dos elétrons é convertida em raios X úteis que emergem através de uma janela no tubo. Os outros 99% da energia, perdidos em colisões eletrônicas, são convertidos em calor, que deve ser removido do anodo (JOHNS; CUNNINGHAM, 1983; TURNER, 2008). O esquema de um tubo de raios X é mostrado na Figura 8.

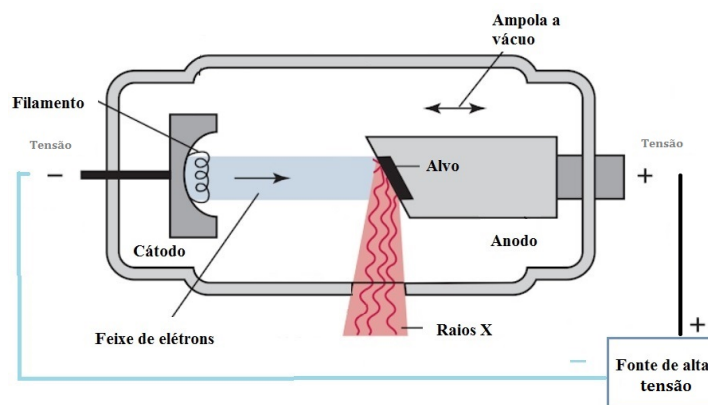


Figura 8: Esquema de um tubo de raios X.

Fonte: Adaptado de Ianucci e Howerton (2012)

3.2.1.1 ESPECTROS DE RAIOS X

O espectro do tubo de raios X contém duas componentes principais: componente contínua (*Bremsstrahlung* ou radiação de freamento) e componente discreta (raios X característicos) (BUSHBERG; BOONE, 2011), conforme mostra a Figura 9. Elas serão abordadas a seguir.

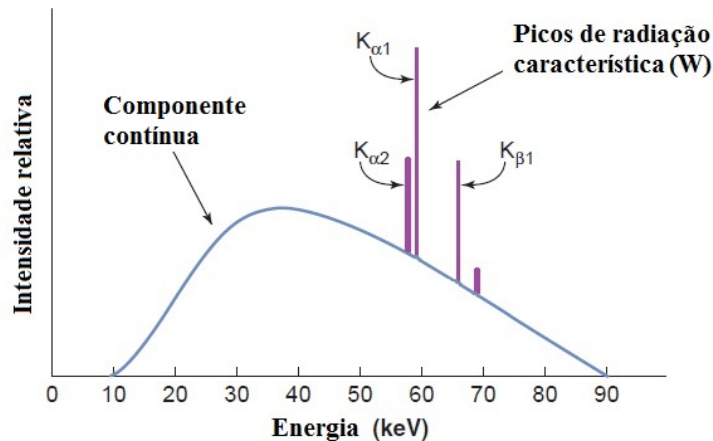


Figura 9: Espectro de raios X de freamento (componente contínua) e característicos, para um tubo de raios X com alvo de tungstênio (W).

Fonte: Adaptado de Bushberg e Boone (2011)

Espectro contínuo

A radiação de freamento, também chamada de *Bremsstrahlung*, é produzida quando os elétrons de alta energia são desacelerados pelos núcleos dos átomos do anodo, resultando em uma grande perda de energia cinética, e por consequência, a emissão de fótons de raios X com espectro contínuo de energia. Desta forma, a energia dos raios X emitidos pode variar desde valores próximos de zero até um valor máximo, que corresponde à energia cinética do elétron (BUSHBERG; BOONE, 2011).

Raios X característicos

Os raios X característicos são produzidos quando um elétron de uma camada externa preenche a vacância formada devido a ejeção de um elétron de uma camada mais interna do átomo (Figura 10) (ATTIX, 1986). Isso acontece pois os elétrons de um átomo estão distribuídos em diferentes níveis de energia, cada qual com uma energia de ligação. Essas energias são “características” dos elementos. As transições podem ocorrer em diferentes camadas eletrônicas, e a energia necessária para deslocar um elétron de uma camada para outra é diferente para di-

ferentes níveis energéticos (JOHNS; CUNNINGHAM, 1983). Sendo assim, quando energia de um elétron incidente, determinada pela tensão aplicada ao tubo de raios X, excede a energia de ligação de uma camada eletrônica em um átomo-alvo, uma interação colisional pode ejetar um elétron de sua camada correspondente, criando uma vacância (BUSHBERG; BOONE, 2011).

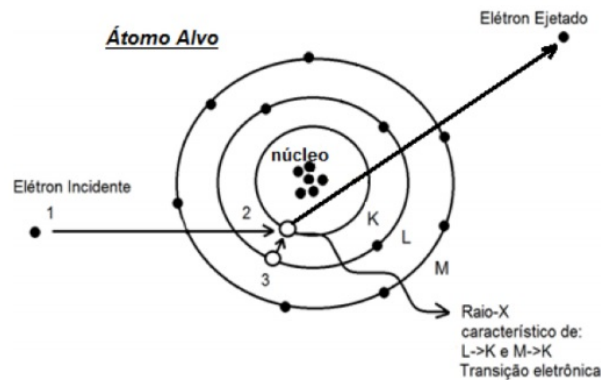


Figura 10: Produção de raio X característico.

Fonte: Valente *et al.* (2013)

O raios X característicos são usualmente nominados pelas letras K, L, M e N, que dizem respeito à camada eletrônica para a qual o elétron transitou. São seguidas pelas letras gregas α , β e γ , que representam a camada de onde se originou a transição. Assim, um espectro de raios X característico $K\alpha$ é resultado da transição de um elétron da camada L para a K, enquanto que um espectro $K\beta$ é originado na transição da camada M para a K (ATTIX, 1986).

3.2.2 RADIAÇÃO SÍNCROTRON

Os elétrons viajando a uma velocidade próxima a velocidade da luz, e forçados a mudar a direção de seu movimento sob o efeito de campos magnéticos (perpendiculares à direção de seu movimento), emitem luz, com características peculiares, conhecidas como radiação síncrotron. As fontes desta radiação são aceleradores circulares de energia, ou anéis de armazenamento. Eles consistem em tubos evacuados, onde os elétrons são forçados a seguir caminhos circulares sob a ação de ímãs colocados ao longo da circunferência (ímãs defletores). Os elétrons entram no anel de armazenamento somente depois de terem sido acelerados por um acelerador linear ou “linac” até que sua energia atinja vários milhões de elétron-volts (MeV) e então por um *booster* que lhes dá um impulso na energia de milhões a bilhões ou giga elétron-volts (GeV); nesse ponto, eles são transferidos para o anel de armazenamento (DUKE, 2000; LIFSHIN, 1999; MOBILIO *et al.*, 2016), como mostrado na Figura 11.

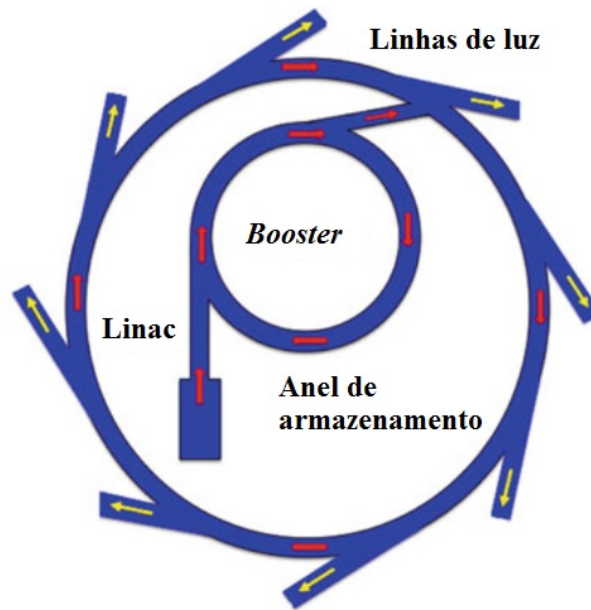


Figura 11: Vista esquemática de uma instalação de radiação síncrotron.

Fonte: Adaptado de Mobilio *et al.* (2016)

Quando os elétrons atingem a energia esperada, eles estão em uma situação quase estacionária; forçados a seguir caminhos circulares pelo campo magnético dos ímãs de flexão, eles liberam, durante cada volta, parte de sua energia, emitindo radiação síncrotron. A energia perdida dessa maneira é totalmente recuperada ao passar pelas cavidades de Radiofrequência (RF). Mais precisamente, os anéis de armazenamento consistem em uma matriz de ímãs para focalizar e dobrar o feixe, conectados por seções lineares retas (Figura 12) (MOBILIO *et al.*, 2016).

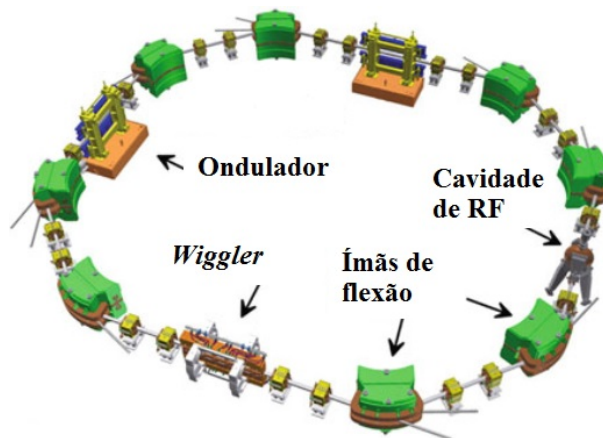


Figura 12: Vista esquemática de um anel de armazenamento com os elementos principais (ímãs defletores, dispositivos de inserção (ondulador, *wiggler*) e a cavidade de radiofrequência (RF)).

Fonte: Adaptado de Mobilio *et al.* (2016)

Após sua descoberta em 1947, durante a década de 1960 e início dos anos 1970, o uso pioneiro da luz foi feito nas chamadas instalações de radiação síncrotron de primeira geração. Em meados dos anos 1970, instalações totalmente dedicadas à luz síncrotron foram construídas, também conhecidas como segunda geração. Posteriormente, a otimização de estruturas magnéticas tornou possível a realização de novas fontes de radiação síncrotron, as chamadas fontes de terceira geração (MOBILIO *et al.*, 2016).

Em instalações modernas, além dos ímãs defletores, outros sistemas magnéticos, chamados de “dispositivos de inserção” - também funcionam como fontes de luz síncrotron. Eles aumentam a flexibilidade na produção de luz com as características desejadas, e a alcançar uma qualidade de fonte extremamente alta. Um dispositivo de inserção consiste em uma série periódica de ímãs que forçam os elétrons a ondular levemente na direção transversal. Existem duas classes amplas de dispositivos de inserção: “*wigglers*” e “onduladores” (MOBILIO *et al.*, 2016). Nos chamados onduladores, ocorrem oscilações discretas. Além disso, há uma interferência construtiva entre as ondas das radiações de sucessivas fontes pontuais, resultando em um feixe colimado com comprimentos de onda harmônicos. Já no *wiggler* (Figura 15), as oscilações são maiores. Nestes, o fenômeno da interferência não é relevante. Nos pólos N dos ímãs, soma-se as intensidades, e a distribuição espectral se assemelha à distribuição contínua de radiação dos ímãs defletores (CONCEIÇÃO, 2009).

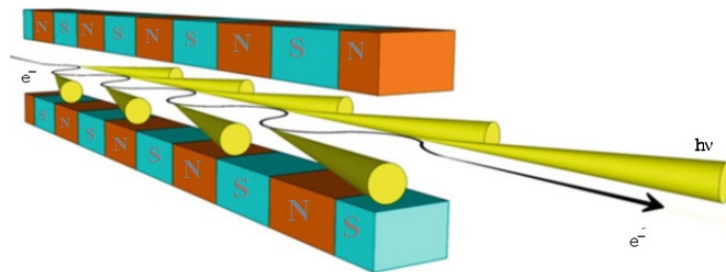


Figura 13: Emissão do feixe de radiação de uma estrutura magnética multipolar *wiggler*.

Fonte: Adaptado de Mobilio *et al.* (2016)

3.3 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

Nos últimos anos, a fluorescência de raios X (XRF) induzida por fótons emergiu como uma técnica muito poderosa para a análise elementar de amostras biomédicas e ambientais. A análise de XRF consiste na excitação de uma amostra utilizando radiação de energia e intensidade adequadas, e a medição dos raios X característicos emitidos pela amostra excitada (CESAREO, 1988). Basicamente, se um fóton incidente possuir energia igual ou maior à energia

de ligação do elétron, este será ejetado do átomo formando uma vacância. Conforme abordado na Subseção 3.2.1.1, para preencher essa vacância, um elétron de uma camada mais externa faz uma transição para a camada que teve o elétron ejetado (JOHNS; CUNNINGHAM, 1983). Essa transição faz com que o átomo perca energia, emitindo um fóton de raios X característico, com energia correspondente à diferença de energia entre as camadas (SILVA, 2011). Dentre os tipos de análise por XRF, pode-se citar a fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF), a fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda (WD-XRF), a fluorescência de raios X por dispersão de energia (ED-XRF) e a microfluorescência de raios X (μ -XRF) (FILHO, 1999).

Na técnica de TXRF, faz-se com que a radiação incida em um ângulo rasante na superfície da amostra, para que ocorra reflexão total do feixe. Os fótons de raios X excitam os átomos presentes na superfície da amostra, que emitem radiação fluorescente. No método dispersão por comprimento de onda (WD-XRF) os raios X característicos são selecionados por um cristal difrator de acordo com seus comprimentos de onda, obedecendo a lei de Bragg da difração (FILHO, 1999). As técnicas de ED-XRF e μ -XRF serão melhor detalhadas a seguir, por serem relevantes a este trabalho.

Fluorescência de raios X por dispersão de energia

A análise de fluorescência de raios X por energia dispersiva (ED-XRF) é uma técnica não destrutiva, multi-elementar e simples, baseada na irradiação de uma amostra por um feixe de raios X de baixa intensidade e pela detecção de raios X secundários emitidos pela amostra. A energia destes raios X secundários caracteriza os elementos presentes na amostra, onde a intensidade é proporcional à sua concentração (TSUJI *et al.*, 2005).

Um sistema típico de ED-XRF consiste em uma fonte de excitação, um objeto de medida, um detector de radiação e um sistema de leitura (LIFSHIN, 1999). Fontes polienergéticas (tubo de raios X, radiação síncrotron) ou monoenergéticas (radionuclídeos), podem ser utilizadas para fazer a excitação da amostra. A utilização de fontes monoenergéticas permite escolher o valor de energia incidente, o que aumenta a eficácia da excitação dos elementos, e reduz o espalhamento (SILVA, 2011). Neste trabalho foi utilizada uma excitação direta por fonte polienergética através de um tubo de raios X. Além da fonte de excitação, é necessário um material de medida (amostra), um detector, um amplificador e um sistema de leitura (*software*). A Figura 14 exemplifica esse arranjo.

O detector absorve a energia dos fótons incidentes (absorvendo, por exemplo, os elétrons gerados pelo efeito fotoelétrico) e converte a energia em um pulso eletrônico. A amplitude do

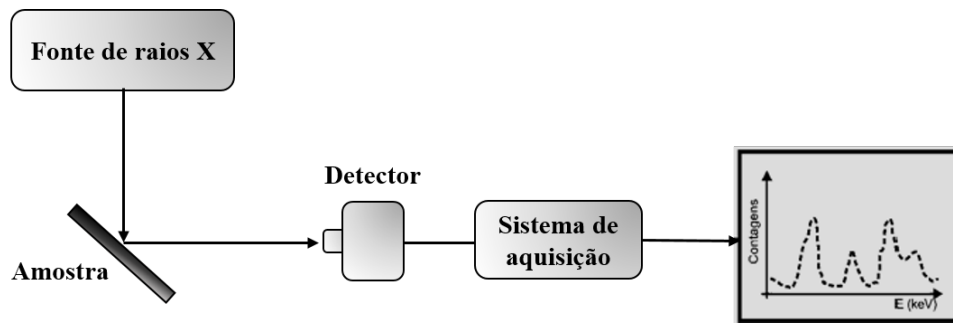


Figura 14: Configuração típica de um arranjo de ED-XRF.

Fonte: Adaptado de Silva (2011)

pulso é proporcional à energia do fóton. Analisadores multicanais, compostos por um conversor analógico digital e uma memória, são utilizados para interpretar essas informações, medindo a amplitude de cada pulso, convertendo-a em número digital, e a armazenando em forma de um histograma, para posterior análise e interpretação dos dados (CESAREO, 1988).

Microfluorescência de raios X

A espectroscopia de microfluorescência de raios X (μ -XRF) é um dos ramos mais recentes e muito dinâmicos da espectroscopia de XRF. O termo “micro” indica que regiões localizadas de uma amostra são investigadas com resolução espacial na escala do micrômetro. A μ -XRF desenvolveu-se muito rapidamente na última década, principalmente devido ao uso de radiação síncrotron. A razão para essa preferência é a intensidade muito maior da radiação síncrotron em comparação com a radiação do tubo de raios X (BECKHOFF *et al.*, 2007).

Com a μ -XRF, não apenas a composição elementar de uma amostra é acessível, mas também a distribuição espacial relacionada. Além disso, o uso de radiação síncrotron estende as possibilidades de μ -XRF em relação à faixa elementar para elementos de luz e aumenta tanto a sensibilidade elementar quanto a resolução espacial. Outra vantagem do uso da radiação síncrotron é a possibilidade de combinar a μ -XRF com outros métodos microanalíticos (BECKHOFF *et al.*, 2007). Uma configuração de μ -XRF (Figura 15) consiste essencialmente de quatro partes principais:

1. Uma fonte de raios X;
2. Um dispositivo de focalização ou colimação;
3. Um porta-amostras motorizado + microscópio;
4. Um ou mais detectores.

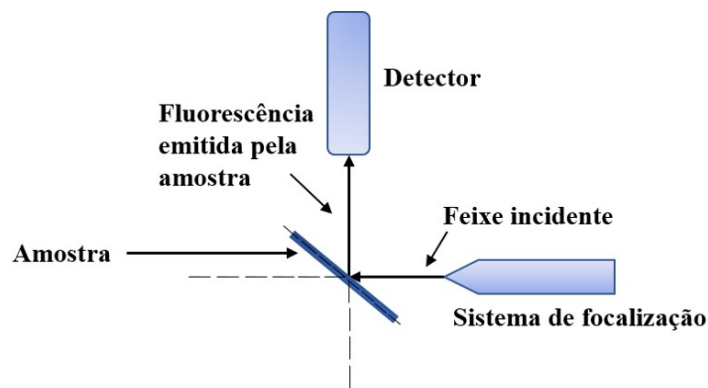


Figura 15: Configuração típica de μ -XRF.

Fonte: Adaptado de Farquharson *et al.* (2009)

A fonte de raios X e o dispositivo de focalização (capilar) definirão as propriedades espectrais do feixe primário. O porta-amostras deve permitir que a posição da amostra seja controlada de maneira remota. Pode-se usar ainda, um microscópio convencional ou uma câmera, para auxiliar na identificação das regiões de interesse a serem analisadas. O diâmetro interno do capilar define o tamanho do feixe, e com a ajuda de um microscópio óptico, esse feixe é posicionado (FARQUHARSON *et al.*, 2009; GRIEKEN; MARKOWICZ, 2001). A Figura 16 ilustra o processo de formação dos mapas elementares a partir da fluorescência emitida pela amostra:

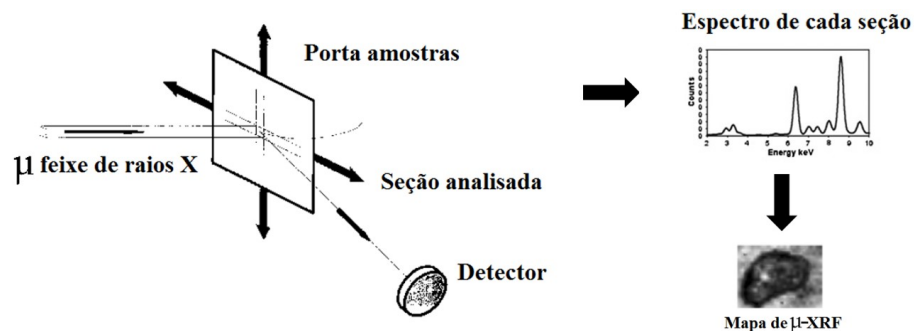


Figura 16: Processo de formação do mapa de μ -XRF.

Fonte: Adaptado de Farquharson *et al.* (2009), Grieken e Markowicz (2001)

Para cada seção analisada, um espectro de fluorescência é adquirido. A intensidade dos picos está relacionada com a concentração de cada elemento-traço na amostra. Para uma análise qualitativa dos mapas de μ -XRF, a intensidade dos picos pode ser convertida para uma escala de cores (GRIEKEN; MARKOWICZ, 2001). Esses mapas permitem identificar a distribuição espacial de cada elemento em estudo nas amostras, bem como uma associação entre eles.

3.4 INTERAÇÕES DA RADIAÇÃO COM A MATÉRIA

Ao contrário das partículas carregadas, os fótons de raios X são eletricamente neutros e não perdem energia constantemente à medida que penetram na matéria. Em vez disso, eles podem viajar uma certa distância antes de interagir com um átomo. Até onde um determinado fóton irá penetrar depende da sua energia do fóton e do material no qual ele está incidindo. Quando ocorre uma interação, ele pode ser absorvido e desaparecer ou pode ser espalhado, mudando sua direção, com ou sem perda de energia (TURNER, 2008). A interação dos raios X com a matéria ocorre por meio de processos de absorção ou espalhamento, que consistem, respectivamente, na absorção total da energia do fóton incidente ou alteração de sua direção e/ou energia. Nesta seção, serão abordadas interações com maior relevância ao entendimento deste estudo.

3.4.1 EFEITO FOTOELÉTRICO

O efeito fotoelétrico é a interação mais importante de fótons de baixa energia com a matéria. A descrição desse efeito pode ser subdividida em dois aspectos: cinemática e secção de choque (ATTIX, 1986).

3.4.1.1 CINEMÁTICA DO EFEITO FOTOELÉTRICO

Quando um fóton com energia incidente $h\nu$, onde h é a constante de Planck e ν é a frequência do fóton, interage com um elétron fortemente ligado ao átomo e com energia de ligação E_B , o fóton transfere essa energia para o elétron. Caso a energia do fóton seja maior ou igual a E_B , o elétron é ejetado do átomo (ATTIX, 1986). Este elétron ejetado é chamado de fotoelétron. O fóton é totalmente absorvido na interação e deixa de existir. Esse processo é exemplificado na Figura 17.

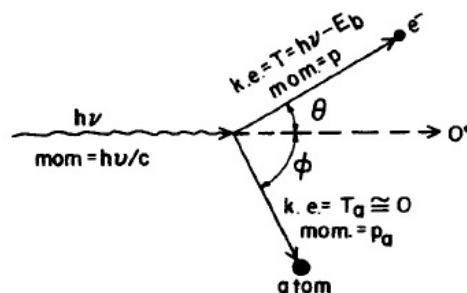


Figura 17: Cinemática do efeito fotoelétrico.

Fonte: Attix (1986)

A energia cinética resultante (T) do fotoelétron, independente do seu ângulo de espalhamento θ , é dada pela Equação 1 (ATTIX, 1986).

$$T = h\nu - E_B - T_a \quad (1)$$

Para a faixa de energia utilizada neste estudo, a energia de recolhimento do átomo (T_a) pode ser desprezada. Logo, a Equação 1 pode ser reescrita como

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

O elétron se afasta da interação em um ângulo θ em relação à direção de incidência do fóton, carregando um momento p . Como o fóton foi totalmente absorvido, ele não fornece fótons espalhados para auxiliar na conservação do momento, como no caso do efeito Compton. No efeito fotoelétrico, esse papel é assumido pelo átomo do qual o elétron foi removido. Embora sua energia cinética (T_a) seja $\cong 0$, seu momento p_a não pode ser negligenciado. A direção tomada pelo átomo de recuo é de pouca importância, uma vez que carrega um valor de energia cinética insignificante. Pode-se dizer que o átomo se espalha na direção necessária para conservar o momento em cada evento fotoelétrico, e que $0 < \phi < 180^\circ$ (ATTIX, 1986; TURNER, 2008).

3.4.1.2 SECÇÃO DE CHOQUE PARA O EFEITO FOTOELÉTRICO

A probabilidade de ocorrência do efeito fotoelétrico está relacionada com a secção de choque de interação fotoelétrica (τ). A secção de choque para o efeito fotoelétrico, integrando todos os ângulos de emissão fotoelétrica pode ser descrita como sendo (ATTIX, 1986):

$${}_a\tau \cong k \left(\frac{Z^n}{h\nu^m} \right) \quad (cm^2/\text{átomo}) \quad (3)$$

sendo ${}_a\tau$ a secção de choque para efeito fotoelétrico; k uma constante; Z o número atômico; n variando de 4 (para energia $h\nu = 0,1$ MeV) a 4,6 (para energia $h\nu = 3$ MeV); e m variando de 3 (para energia $h\nu = 0,1$ MeV) e a 1 (para energia $h\nu = 5$ MeV) (ATTIX, 1986).

Na região de energia $h\nu \cong 0,1$ MeV e abaixo, onde o efeito fotoelétrico se torna mais importante, é conveniente lembrar que

$${}_a\tau \propto \frac{Z^4}{(h\nu)^3} \quad (cm^2/\text{átomo}). \quad (4)$$

Da Equação 4 é possível observar que a probabilidade de ocorrência do efeito fotoelétrico é maior para materiais de elevado número atômico Z e para fótons de baixa energia.

3.4.2 ESPALHAMENTO ELÁSTICO

Também conhecido como espalhamento Rayleigh, ocorre quando um fóton interage com a matéria desviando-se da sua trajetória inicial de modo que ele não sofra variação na sua energia (JOHNS; CUNNINGHAM, 1983). A distribuição angular dos fótons elasticamente espalhados num material é governada pela secção de choque diferencial de espalhamento do meio, $(\frac{d\sigma}{d\Omega})_{el}$. Considerando que os elétrons estejam ligados ao material, a secção de choque diferencial para o espalhamento Rayleigh pode ser expressa como

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{el} = F^2(x, Z) \left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{th} \quad (5)$$

onde $(d\sigma/d\Omega)_{th}$ é a secção de choque diferencial para o espalhamento Thomsom (considerando um elétron livre), $x = \lambda^{-1} \text{sen}(\theta/2)$ é proporcional ao momento transferido p na interação do fóton com o átomo, Z é o número atômico e $F(x, Z)$ é chamado de fator de forma atômico (JOHNS; CUNNINGHAM, 1983). O espalhamento elástico ocorre principalmente para baixas energias.

3.4.3 ESPALHAMENTO INELÁSTICO

O espalhamento inelástico, ou Compton, pode ter sua descrição subdividida em dois aspectos: cinemática e secção de choque. A primeira relaciona as energias e ângulos das partículas participantes quando ocorre um evento Compton; o segundo prevê a probabilidade de ocorrer uma interação Compton (ATTIX, 1986).

3.4.3.1 CINEMÁTICA DO ESPALHAMENTO INELÁSTICO

A Figura 18 mostra esquematicamente um fóton de energia $h\nu$ interagindo com um elétron. O momento do fóton é $h\nu/c$, onde c é a velocidade da luz no vácuo (ATTIX, 1986).

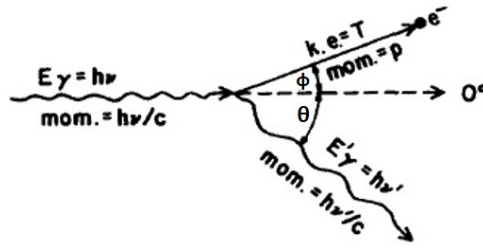


Figura 18: Cinemática do efeito Compton.

Fonte: Attix (1986)

Após a colisão, o elétron parte no ângulo ϕ , com energia cinética (T) e momento p . O fóton se espalha no ângulo θ com uma nova energia mais baixa $h\nu'$ e momento $h\nu'/c$ (ATTIX, 1986). A Equação 6 relaciona a energia do fóton espalhado com a energia do fóton incidente e o ângulo de espalhamento (TURNER, 2008):

$$h\nu' = \frac{h\nu}{1 + (h\nu/mc^2)(1 - \cos\theta)} \quad (6)$$

3.4.3.2 SECÇÃO DE CHOQUE PARA O ESPALHAMENTO INELÁSTICO

A secção de choque diferencial inelástica $\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{in}$, expressa a probabilidade dos fótons incidentes sofrerem interações Compton, sendo então espalhados inelasticamente em um determinado ângulo de espalhamento (ANTONIASSI, 2009). Duas abordagens serão empregadas para descrevê-la: por elétron livre (Klein-Nishina) e por elétron ligado (Compton Atômico) (JOHNS; CUNNINGHAM, 1983).

Espalhamento inelástico por elétron livre

De acordo com Antoniassi (2009), admitindo-se que os elétrons dos átomos do material alvo sejam considerados livres e em repouso (para altas energias do fóton incidente e baixo Z do material), a secção de choque diferencial inelástica pode ser escrita da seguinte forma:

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{in} = Z \left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{KN} \quad (7)$$

onde $\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{KN}$ é a secção de choque diferencial de Klein-Nishina (KLEIN; NISHINA, 1929), que representa a probabilidade de um fóton ser espalhado por um elétron livre em repouso através de um determinado ângulo de espalhamento.

Espalhamento inelástico por elétron ligado

Em toda a discussão acima os elétrons envolvidos no processo de interação foram considerados como se estivessem livres e estacionários. Para se lidar com a situação real, deve-se levar em conta o fato de que os elétrons no átomo estão em movimento e que é necessária uma energia para ejetar esse elétron do átomo (JOHNS; CUNNINGHAM, 1983), o faz com que a probabilidade de ocorrer uma interação Compton seja reduzida para baixos momentos transferidos. As razões para isso podem incluir fótons incidindo com baixa energia ou ângulos de espalhamento pequenos (ANTONIASSI, 2009).

Uma solução pode ser obtida considerando a secção de choque diferencial inelástica como produto de dois fatores. O primeiro é dado pela secção de choque Klein-Nishina para um elétron livre, que fornece a probabilidade de um fóton ser defletido em um ângulo θ , e o elétron adquirir um momento p , como se estivesse livre (JOHNS; CUNNINGHAM, 1983; ANTONIASSI, 2009). O segundo fator, $S(x,Z)$, representa a probabilidade de que um elétron atômico, tendo recebido momento $p = |\vec{p}|$ irá deixar o átomo de energia de ligação E (JOHNS; CUNNINGHAM, 1983). Esse segundo fator é dado pela função de espalhamento incoerente $S(x,Z)$, apresentado geralmente em função da variável de momento transferido $x = \sin(\frac{\theta}{2})/\lambda$ (ANTONIASSI, 2009). Assim a secção de choque diferencial inelástica é dada por:

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{in} = S(x,Z) \left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{KN} \quad (8)$$

3.4.4 COEFICIENTES DE ATENUAÇÃO

Conforme já abordado, a penetração de fótons na matéria é governada estatisticamente pela probabilidade (por unidade de distância percorrida) que um fóton interaja por um processo físico ou outro. Essa probabilidade, denotada por μ , é chamada de coeficiente de atenuação linear, e tem as dimensões de comprimento inverso (cm^{-1}). O coeficiente μ depende da energia do fóton e do material que está sendo atravessado. O coeficiente de atenuação de massa μ/ρ é obtido dividindo μ pela densidade ρ do material, expresso em $\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ (TURNER, 2008).

Fótons monoenergéticos são atenuados exponencialmente em um alvo uniforme. A Figura 19 representa um feixe estreito de fótons monoenergéticos N_0 incidentes normalmente em uma placa. À medida que o feixe penetra no absorvedor, alguns fótons podem ser espalhados e alguns absorvidos.

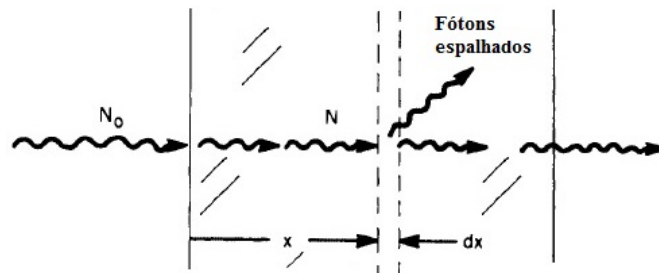


Figura 19: Feixe estreito incidindo em uma placa. O número de fótons que atingem uma profundidade x sem ter uma interação é dada por $N = N_0 e^{-\mu x}$, onde μ é o coeficiente de atenuação linear.

Fonte: Adaptado de Turner (2008)

O número de fótons N transmitidos por uma espessura x da amostra é dado por:

$$N = N_0 e^{-\mu x} \quad (9)$$

O coeficiente de atenuação linear para fótons de uma determinada energia em um determinado material compreende a soma dos coeficientes parciais de secção de choque para cada um dos principais efeitos, já abordados nas secções anteriores (com exceção da produção de pares, por não ser relevante ao entendimento deste trabalho) (TURNER, 2008). Assim, pode-se escrever:

$$\mu = \sigma_{coer} + \sigma_{incoer} + \tau + \kappa \quad (10)$$

onde (σ_{coer}) e (σ_{incoer}) representam as secções de choque para o espalhamentos Rayleigh e Compton, respectivamente, τ é a secção de choque fotoelétrica e κ para produção de pares. Os respectivos coeficientes de atenuação de massa são (τ/ρ) , (σ_{incoer}/ρ) , (σ_{coer}/ρ) e (κ/ρ) , para um material de densidade ρ (ATTIX, 1986; TURNER, 2008).

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS

Com o objetivo de investigar as condições experimentais adequadas para realização dos experimentos de μ -XRF e espalhamento Compton, principalmente no que diz respeito à faixa de energia adequada para uma possível combinação das duas técnicas para análise de tecidos mamários, utilizou-se o programa *X-ray Monte Carlo (XRMC)*. Essa ferramenta permite a simulação de experimentos de imagens de raios X e espectroscopia (GOLOSIO *et al.*, 2014).

Os computadores usados nas simulações foram *desktops* com Intel Core i7, 8 núcleos, CPU de 4,00 GHz e 16 GB de RAM. A amostra simulada consistia em um cilindro medindo 2 cm de diâmetro e 1 cm de altura, no qual foi adicionado a composição química típica de um carcinoma. As simulações foram executadas utilizando energias que variavam de 10 keV a 25 keV (com incrementos de 1 keV). Um detector medindo 5.0 x 5.0 mm² foi posicionado em diferentes ângulos (45°, 90° e 135°), para testar as geometrias. O número de fótons incidentes foi de 10¹⁰, visando a utilização de uma fonte de radiação síncrotron para a performance dos experimentos. O tempo de exposição ficou fixado em 1 s, uma vez que se tratavam de medições pontuais que tinham por finalidade fornecer os espectros de XRF e espalhamento Compton. Tais espectros foram convoluídos utilizando um *script* interno desenvolvido para automatizar o processo de ajuste de curva, e executados pelo *software* Matlab[®]. Um exemplo de geometria usada nas simulações é mostrada na Figura 20.

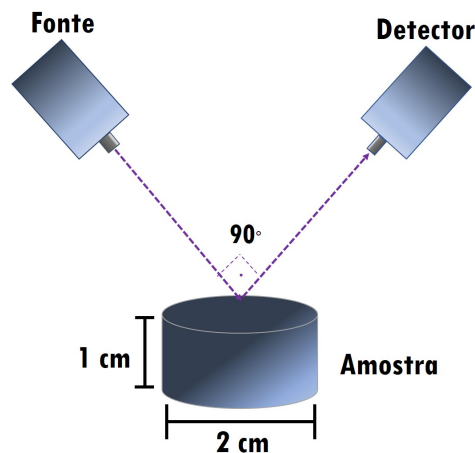


Figura 20: Exemplos de uma geometria utilizada nas simulações.

4.2 AMOSTRAS

A utilização de tecidos mamários caninos foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (CEUA - UTFPR), sob o protocolo 2017-028/2017 (Anexo A). Um total de 20 amostras foram fornecidas pelo Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Paraná - Campus Agrárias, juntamente com seus laudos histopatológicos. Este material era residual, de tecidos retirados em procedimentos cirúrgicos realizados em cães da espécie *Canis lupus familiaris*. As amostras estavam armazenadas em formalina (solução de formol tamponado a 10%) e posteriormente, preparadas de acordo com as necessidades de cada experimento.

Amostras utilizadas para as medições com tubo de raios X (IFGW)

Treze amostras foram selecionadas para as medições de quantificação dos elementos-traço (Fe, Cu e Zn) e densidade eletrônica. Destas, quatro correspondiam a tecidos normais (adiposo e fibroso), quatro benignos (adenoma) e cinco malignos (carcinoma e adenocarcinoma). Elas foram cortadas com aproximadamente 4 mm de espessura, e mantidas na formalina até o momento das medições. Com o auxílio de um papel absorvente, o excesso de formalina foi removido e as amostras posicionadas em um porta-amostras cilíndrico, de biopolímero ácido poliláctico (PLA), com 4 mm de altura e 21 mm de diâmetro interno (Figura 21), e cobertas com papel filme, de forma a deixar suas superfícies regulares e homogêneas.

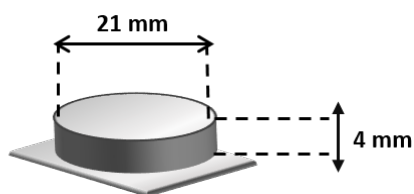


Figura 21: Esquema do porta-amostras utilizado nas medições feitas no IFGW.

Amostras utilizadas para medições com radiação síncrotron (LNLS)

Sete amostras foram utilizadas nos experimentos de mapeamento das distribuições de elementos-traço e medições das densidades eletrônicas. Destas, duas correspondiam a tecidos normais (adiposo e fibroso), duas eram de tecidos benignos (adenoma) e três malignos (carcinoma e adenocarcinoma). Uma vez que estes experimentos foram realizados separadamente, a preparação das amostras seguiu protocolos distintos. Para o mapeamento com a μ -XRF, as amostras foram retiradas do formol, emblocadas em parafina, e cortadas em um micrótomo com

uma espessura de aproximadamente $50\ \mu\text{m}$. Após o corte, elas foram fixadas em filme Mylar[®], e no momento dos experimentos esse filme foi posicionado em um porta-amostras de acrílico, conforme esquematizado pela Figura 22. Lâminas histológicas foram geradas a partir desses cortes, coradas com Hematoxilina e Eosina, e posteriormente utilizadas para identificação das regiões normais e tumorais nas amostras, facilitando a escolha da área a ser analisada. O procedimento de preparo das amostras foi realizado por um laboratório externo, e está descrito por completo no Anexo B deste trabalho.

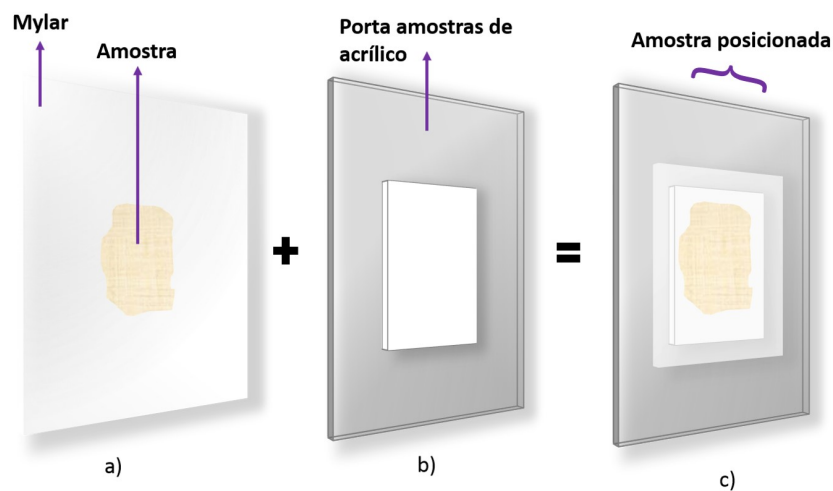


Figura 22: Esquematização do posicionamento das amostras para os experimentos de μ -XRF. Em a), tem-se a amostra fixada no filme Mylar[®]. Em b), tem-se o modelo do porta-amostras de acrílico utilizado nos experimentos e em c), a amostra aparece posicionada para realização das medições.

Para os experimentos de espalhamento Compton, foram utilizados os cortes remanescentes das amostras em parafina, cujo excesso foi removido através do derretimento dos blocos. Esses cortes tinham aproximadamente 2,0 mm de espessura, e foram posicionados no porta-amostras de acrílico (exemplificado pela Figura 22), como o auxílio de papel filme. A Figura 23 mostra uma amostra antes e depois da remoção da parafina.

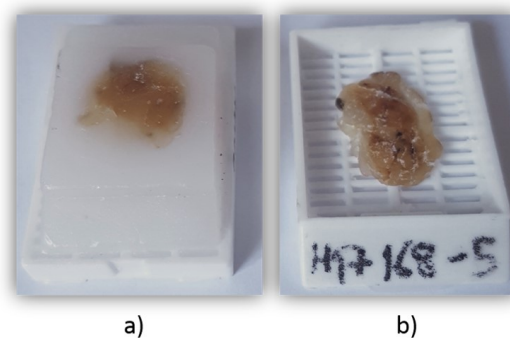


Figura 23: Exemplo de uma amostra emblocada em parafina em a) e, em b), a porção remanescente da amostra, cuja parafina foi derretida.

4.3 ARRANJO EXPERIMENTAL

4.3.1 MEDIÇÕES COM TUBO DE RAIOS X

Nas medições de utilizando um tubo de raios X, dados de XRF e espalhamento Compton foram coletados simultaneamente por meio da técnica de ED-XRF, no Laboratório de Ensino em Física Médica (LEP/LF-46) do Instituto de Física Gleb Wataghin (IFGW/UNICAMP). O equipamento consistia em um tubo de raios X da marca Amptek[®], modelo Mini-X, com um alvo de prata ($K_{\alpha} = 22,07$ keV e $K_{\beta} = 24,91$ keV). Este tubo opera com uma tensão que varia de 10 a 50 kV, e uma corrente de 5 a 200 μ A. O detector é um *Silicon Drift Detector* (SDD), modelo XR-100SDD, com resolução em energia de 125 eV-135 eV a 5,9 keV, uma área ativa de 25 mm² e colimação de 2 mm. Um esquema do arranjo utilizado é mostrado na Figura 24.

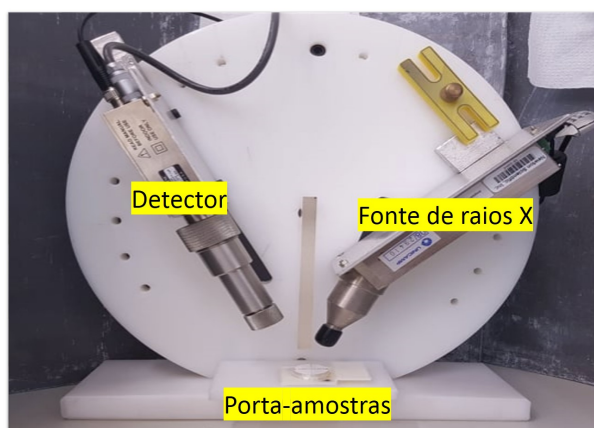


Figura 24: Arranjo experimental utilizado nas medições realizadas no IFGW.

Para as medições, o valor de tensão selecionado foi de 30 kV e a corrente de 50 μ A. O tubo de raios X e o detector foram posicionados a 60° entre si, o que proporcionou um ângulo de espalhamento (θ) de 120°, correspondendo a um valor de momento transferido $x = 1,50 \text{ \AA}^{-1}$. As amostras foram posicionadas a uma distância de $31,4 \pm 1$ mm com relação ao tubo e $55,1 \pm 1$ mm do detector, e expostas por aproximadamente 1200 s cada uma. Os espectros de fluorescência e espalhamento adquiridos foram processados e normalizados utilizando o *software* DppMCA.

4.3.2 MEDIÇÕES COM RADIAÇÃO SÍNCROTON

A Figura 25 mostra a configuração experimental utilizada para as medições com radiação síncrotron, realizadas na Linha de Luz XRF do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas (PÉREZ *et al.*, 1999).

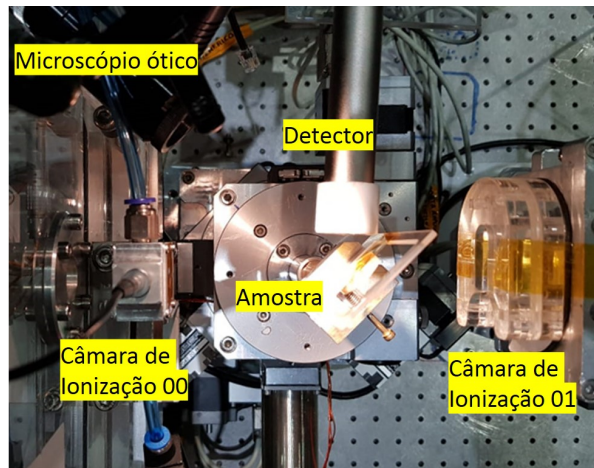


Figura 25: Arranjo experimental utilizado nas medidas realizadas no LNLS.

Os parâmetros selecionados para cada experimento serão descritos a seguir.

Microfluorescência de raios X (μ -XRF)

Neste experimento foi utilizado feixe branco (polienergético), colimado com $30\ \mu\text{m}$ de diâmetro interno por um sistema de capilares. As amostras foram posicionadas a 45° em relação ao feixe incidente (em geometria de reflexão), em uma mesa XYZ, permitindo o posicionamento independente da amostra nessas direções. Além disso, um microscópio ótico com *zoom* motorizado auxiliava o posicionamento das amostras, que era controlado remotamente. O laboratório também contava com um estereomicroscópio externo padrão, da marca Leica®, modelo S6D, no qual as amostras e suas respectivas lâminas histológicas foram posicionadas e fotografadas antes de serem mapeadas. Essas imagens foram utilizadas para a escolha das regiões de interesse. A Figura 26 mostra um exemplo dessas fotos, bem como a seleção das áreas a serem escaneadas.

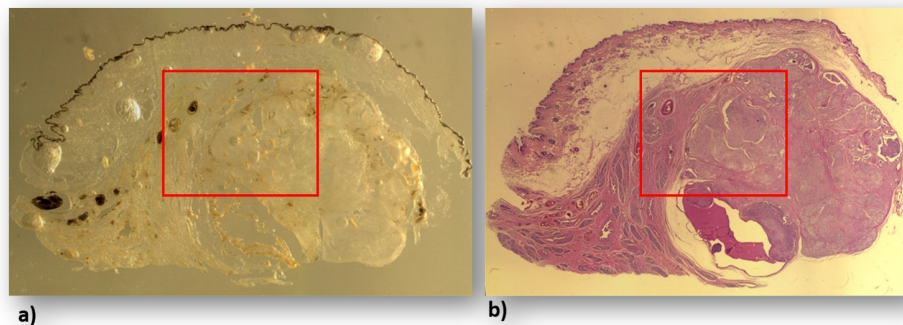


Figura 26: Exemplo das imagens obtidas com o estereomicroscópio. Em a), tem-se a imagem da amostra, com demarcação da região de interesse a ser escaneada. Em b), tem-se a lâmina histológica correspondente a essa amostra, também com a região de interesse demarcada.

As amostras foram escaneadas com passos de 0,04 mm nas direções z e y, perpendiculares ao plano de incidência do feixe (x), e o tempo de aquisição dos espectros para cada amostra variou entre 200 ms e 400 ms. Como a intensidade do feixe decaía com o tempo, este foi monitorado através de uma câmara de ionização, e o espectro adquirido em cada ponto foi normalizado pela leitura desta câmara. Os espectros de fluorescência foram adquiridos por um detector *Silicon drift*, modelo AXAS-A, com resolução energética de 139 eV a 5,9 keV.

Espalhamento Compton

Para as medições de espalhamento Compton, o arranjo experimental foi modificado com adição de um monocromador de duplo cristal Si (111), usado para selecionar uma energia de 12 keV ($\lambda = 1,03 \text{ \AA}$). O feixe incidia na amostra a 45° (em geometria de reflexão), fornecendo um ângulo de espalhamento de 90° e um momento transferido $x = 0,68 \text{ \AA}^{-1}$. A distância entre a fonte e a amostra era de $53,94 \pm 1 \text{ mm}$ e entre o detector e amostra, de $15,44 \pm \text{ mm}$. Utilizando os mapas gerados pela μ -XRF como referência, foram selecionados de 4 a 6 pontos para as medidas, por amostra, incluindo tecido sadio e neoplásico. Cada ponto foi medido 5 vezes, durante um tempo de exposição de 200 s. Câmaras de ionização monitoravam o feixe para correção dos dados pelo decaimento da corrente no anel síncrotron, e registravam os valores de feixe incidente e transmitido.

4.4 MÉTODO DE ANÁLISE

4.4.1 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES E MAPAS DE DISTRIBUIÇÃO DOS ELEMENTOS-TRAÇO

Quantificação das concentrações nas medidas com tubo de raios X

Para quantificação das concentrações dos elementos-traço é necessário que o sistema esteja apto a detectar os elementos a serem analisados, ou seja, esteja calibrado para estes elementos (COZER, 2016). Esta calibração utiliza padrões com concentrações conhecidas e que possuam uma matriz semelhante à das amostras analisadas (TERTIAN;CLAISSE, 1982 *apud* SILVA, 2011). Neste trabalho, o método adotado foi o do padrão externo, o qual compara os valores de concentração de elementos-traço contidos em padrões, com o uso de curvas de calibração (intensidade fluorescente *versus* concentração). A metodologia de confecção dos padrões foi a mesma adotada por Cozer (2016), que prepararam soluções contendo água destilada (para simular a matriz dos tecidos) e sais ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), a fim de quantificar as concentrações de Fe, Cu e Zn, respectivamente.

Neste trabalho foram preparadas 5 soluções multi-elementares, ou seja, contendo os sais de Fe, Cu e Zn em 5 diferentes concentrações, para construção das curvas de calibração. O intervalo de concentração dos elementos foi escolhido com base em estudos com mamas humanas (GERAKI *et al.*, 2002; AL-EBRAHEEM *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2013), e esses valores estão dispostos na Tabela 4.

Tabela 4: Concentrações dos sais nos padrões utilizados para confecção das curvas de calibração nos experimentos de ED-XRF

	Concentração do elemento em ppm (mg/kg)		
	FeCl ₃ .6H ₂ O	Cu(NO ₃) ₂ .3H ₂ O	ZnSO ₄ .7H ₂ O
Padrão 1	20	10	100
Padrão 2	10	5	50
Padrão 3	8	4	40
Padrão 4	4	2	20
Padrão 5	2	1	10

Os padrões foram irradiados sob as mesmas condições das amostras, utilizando o porta-amostras mostrado na Figura 21, com um tempo de exposição de aproximadamente 2000 s. Os espectros obtidos foram analisados com o *software* DppMCA, selecionando as áreas dos picos de fluorescência dos elementos de interesse, e correlacionando com a concentração de cada padrão medido para confecção das curvas de calibração. As áreas dos fotopicos foram calculadas utilizando o mesmo *software*, que permite selecionar um valor de ROI (região de interesse) para cada elemento, e remove a contribuição do *background*.

Os dados experimentais foram plotados com o *software* OriginPro 9.0[®], e verificou-se que a distribuição dos pontos segue uma equação do primeiro grau $y = a + bx$, na qual y representa o valor da área do fotopico, os parâmetros a e b são fornecidos pelo ajuste de curva, e x é a concentração do elemento-traço. Essa curva foi utilizada para os cálculos das concentrações dos elementos nas amostras de tecido mamário canino. Os limites de detecção para a concentração dos elementos-traço em estudo foram determinadas por

$$LD = 3C_i \frac{\sqrt{N_{BG}}}{N_i} \quad (11)$$

onde C_i representa a concentração do elemento i , N_{BG} o número de contagens por segundo do *background* em relação ao elemento i e N_i o número de contagens por segundo do pico fluorescente do elemento i (AIGINGER; WOBRAUSCHEK, 1985 *apud* SILVA, 2007). O cálculo desse limite permite a verificação do valor mínimo de concentração que o equipamento de XRF consegue detectar.

Geração dos mapas de μ -XRF nas medidas com radiação síncrotron

O software PyMca 4.4.0 (SOLÉ *et al.*, 2007) foi utilizado para a análise dos espectros obtidos em cada ponto escaneado das amostras, fornecendo os mapas com as distribuições dos elementos-traço de interesse (Fe, Cu e Zn). Para isso, foi utilizada uma ferramenta chamada RGB *Correlator*, na qual ajustes de intensidade podiam ser realizados. Os mapas de μ -XRF foram então comparados com as imagens das lâminas histológicas, previamente analisadas por um patologista veterinário para identificação das regiões saudáveis e neoplásicas. Um exemplo de um mapa de μ -XRF gerado para o elemento zinco, e a respectiva lâmina histológica, são mostrados na Figura 27.

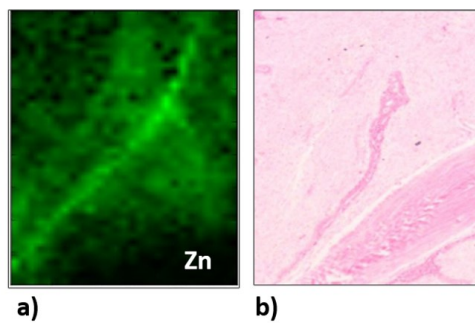


Figura 27: Exemplo de um mapa de μ -XRF do elemento Zn (a), com a respectiva lâmina histológica (b), correspondente à região escaneada.

Fonte: Adaptado de Silva *et al.* (2013)

4.4.2 DETERMINAÇÃO DAS DENSIDADES ELETRÔNICAS

Para o cálculo das densidades eletrônicas foi utilizada a metodologia desenvolvida por Antoniassi (2009). Tal método se baseia no fato de que o número de fótons espalhados em um determinado ângulo está relacionado ao número de unidades espalhadoras por unidade de volume do material (densidade eletrônica).

A relação entre o número de fótons espalhados inelasticamente pela amostra, que são detectados por um detector posicionado em um ângulo θ de espalhamento é apresentada na seguinte equação (ANTONIASSI, 2009):

$$N(\theta) = N_0 \rho_e \left(\frac{S}{Z} \right)_{ef} \overline{\left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right)}_{KN} \Delta\Omega_{det} \varepsilon V A \quad (12)$$

onde:

N_0 = número de fótons incidentes por unidade de área;

ρ_e = densidade eletrônica do material;

$\left(\frac{S}{Z}\right)_{ef}$ é a função de espalhamento incoerente que depende do momento transferido x ;

$\overline{\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)}_{KN}$ = é a média da secção de choque diferencial de Klein-Nishina para a faixa de ângulo de espalhamento considerado;

$\Delta \Omega_{det}$ = intervalo de ângulo sólido compreendido pelo detector com origem no elemento espalhador;

ε = é a eficiência de detecção do detector;

V = volume sensível;

A = fator de atenuação da radiação na amostra.

Da Equação 12 deriva a equação utilizada para os cálculos de densidade eletrônica nas medidas realizadas no IFGW e no LNLS, que serão abordados separadamente nas seções a seguir. O procedimento de simplificação desta equação está descrito no trabalho de Antoniassi (2009), e neste trabalho ela foi utilizada diretamente para os cálculos.

Medidas com tubo de raios X

Para determinação das densidades eletrônicas nas medidas com tubo de raios X, isolou-se o termo ρ_e na Equação 13, e as constantes N_0 , $\overline{\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)}_{KN}$, ε , $\Delta \Omega_{det}$ e V foram agrupadas na constante k (ANTONIASSI, 2009):

$$N(\theta) = k\rho_e \left(\frac{S}{Z}\right)_{ef} A \quad (13)$$

Nesta equação, $N(\theta)$ corresponde ao número de fótons espalhados inelasticamente, cujos valores foram obtidos utilizando o *software* DppMCA, a partir da determinação das áreas das curvas de espalhamento Compton dos espectros experimentais. A razão $\left(\frac{S}{Z}\right)_{ef}$ é obtida a partir das concentrações elementares médias de cada grupo de tecido, e A é o fator de atenuação, dado por

$$A = \frac{1}{\mu L_0} (1 - e^{-\mu L_0}) \quad (14)$$

onde L_0 é caminho realizado pelo feixe quando este incide na amostra e μ é o coeficiente de atenuação linear.

Logo, a Equação 13 pode ser escrita como

$$N(\theta) = k\rho_e \left(\frac{S}{Z}\right)_{ef} \frac{1}{\mu L_0} (1 - e^{-\mu L_0}). \quad (15)$$

Sendo assim, a determinação das densidades eletrônicas dos tecidos se restringe ao cálculo dos parâmetros experimentais k e L_0 . Segundo Antoniassi (2009), a Equação 13, pode ser reescrita de forma a fornecer um modelo de ajuste não linear da curva Y versus μ

$$Y = \frac{k}{L_0} \frac{(1 - e^{-\mu L_0})}{\mu} \quad (16)$$

onde Y é dado por:

$$Y = \frac{N}{\rho_e} \left(\frac{S}{Z}\right)_{ef}^{-1}. \quad (17)$$

Esse ajuste é feito a partir da utilização de materiais de referência, com propriedades de atenuação e espalhamento semelhantes às dos tecidos utilizados neste trabalho (POLETTI *et al.*, 2001). Os materiais empregados nesse trabalho estão dispostos na Tabela 5.

Tabela 5: Composições químicas, densidades físicas (ρ) e eletrônicas (ρ_e) dos materiais de referência

Materiais	Fórmula química	ρ (g/cm ³)	ρ_e (x10 ²³ e/cm ³)
Água	H ₂ O	1,00	3,34
Glicerina	C ₃ H ₈ O ₃	1,26	4,12
Isopropanol	C ₃ H ₈ O	0,78	2,64
Acrílico	C ₅ O ₂ H ₈	1,18	3,83
Nylon	C ₁₂ H ₂₂ O ₃ N ₂	1,13	3,80
Polipropileno	C ₃ H ₆	0,89	3,12

Os valores de coeficiente de atenuação linear (μ) dos materiais de referência foram obtidos com o programa XCOM (BERGER, 2010), e os respectivos valores de Y foram calculados a partir da Equação 17. Uma vez obtidos, a curva de calibração Y versus μ foi gerada, utilizando o ajuste de curva não linear do *software* OriginPro 9.0[®]. A partir dessas curvas, os parâmetros k e L_0 foram obtidos. Para os tecidos, os coeficiente de atenuação linear (μ) foram obtidos através da relação

$$\mu_{tec} = \frac{\rho_{tec}}{\rho_{água}} \mu_{água} \quad (cm^{-1}) \quad (18)$$

onde ρ_{tec} corresponde ao valor de densidades físicas dos tecidos, $\rho_{\text{água}}$ é a densidade da água e $\mu_{\text{água}}$ é o valor de coeficiente de atenuação linear da água, obtido com o programa XCOM (BERGER, 2010), para o valor de energia correspondente ao usado no experimento.

Para o cálculo das densidades físicas dos tecidos, seguiu-se a metodologia proposta por Tomal (2007), que mediu as densidades utilizando o método de “pesagem hidrostática”, baseado no Princípio de Arquimedes. De acordo com esse princípio, em razão ao empuxo, a massa aparente de um corpo será diferente quando este se encontra submerso em um líquido ou gás.

Um arranjo experimental foi montado (Figura 28), utilizando uma balança analítica da marca Marte[®] modelo AY220 com sensibilidade de 0,1 mg, para as medições de massa real (m_{real}) e aparente das amostras (m_{ap}), quando estas estavam submersas em um béquer com água. Neste arranjo foi utilizado um suporte de madeira, que entrava em contato direto com a balança, e no qual as amostras eram posicionadas. O béquer com água era posicionado em um suporte móvel, de altura regulável, e não entrava em contato com a balança.

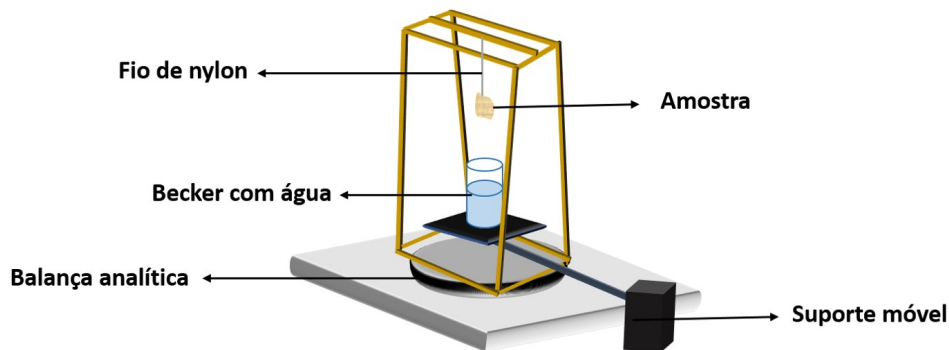


Figura 28: Arranjo experimental utilizado nas medições de massa real e aparente das amostras.

Uma vez que foram medidas as massas reais e aparentes das amostras, e sabendo o valor de densidade do líquido (ρ_{liq}) utilizado, a Equação 19 foi empregada no cálculo das densidades físicas.

$$\rho = \left(\frac{m_{\text{real}}}{m_{\text{real}} - m_{\text{ap}}} \right) \rho_{\text{liq}} \quad (\text{g/cm}^3) \quad (19)$$

Para validar o método experimental, realizaram-se 3 medições utilizando uma amostra de acrílico (PMMA), com 4 mm de espessura. A média dos valores de densidade para o PMMA ficou em torno de $1,19 \text{ g/cm}^3$, que comparada com o valor real de densidade ($1,18 \text{ g/cm}^3$), proporciona uma exatidão relativa de 0,84%.

Medidas utilizando radiação síncrotron

Para o processo de determinação das densidades eletrônicas nas medidas com radiação síncrotron, também se isolou o termo ρ_e na Equação 13. Os valores dos números de fótons espalhados inelasticamente $N(\theta)$ foram obtidos utilizando o *software* PeakFit[®], através do ajuste de curvas, selecionando uma gaussiana para o pico elástico (Rayleigh) e uma *Voigt* para o pico inelástico (Compton).

A partir das medidas de transmissão, fornecidas pelas câmaras de ionização, os coeficientes de atenuação linear (μ) dos tecidos foram calculado com a Equação 9. A Equação 14 foi utilizada no cálculo das atenuações do feixe, e a razão $(\frac{S}{Z})_{ef}$ foi calculada para o valor de momento transferido $x = 0,68 \text{ \AA}^{-1}$.

A constante k foi obtida por meio da utilização da água como material de referência para calibração. Para isso, foi utilizado um porta-amostras de espessura semelhante à dos tecidos ($\approx 2,0 \text{ mm}$). A Figura 29 mostra esse porta-amostras (feito de acrílico) com suas respectivas dimensões. Para as medições, esse porta-amostras era recoberto com filme Kapton[®], nos dois lados, para alojar o líquido.

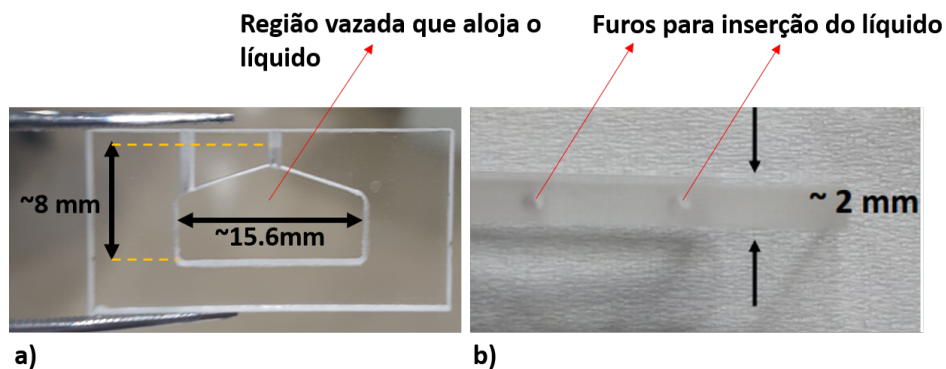


Figura 29: Porta-amostras utilizado para medições dos materiais de referência. Vista frontal em a) e vista transversal em b).

Utilizando o mesmo processo descrito acima para obtenção dos valores de (μ) , razão $(\frac{S}{Z})_{ef}^{-1}$ e atenuação do feixe A , e uma vez que o valor de densidade eletrônica da água é conhecido, isolou-se o fator k na Equação 13

$$k_{\text{água}} = \frac{N_{\text{água}}}{\rho_{e_{\text{água}}} (\frac{S}{Z})_{ef_{\text{água}}} A_{\text{água}}}. \quad (20)$$

Para verificar a exatidão deste método, realizaram-se medições com alguns materiais de referência presentes na Tabela 5, e suas densidades eletrônicas foram calculadas. Além de padrões líquidos, foram testados também materiais sólidos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS

Um exemplo de resultado obtido pelas simulações, em geometria de reflexão e com um feixe de 12 keV, é mostrado na Figura 30.

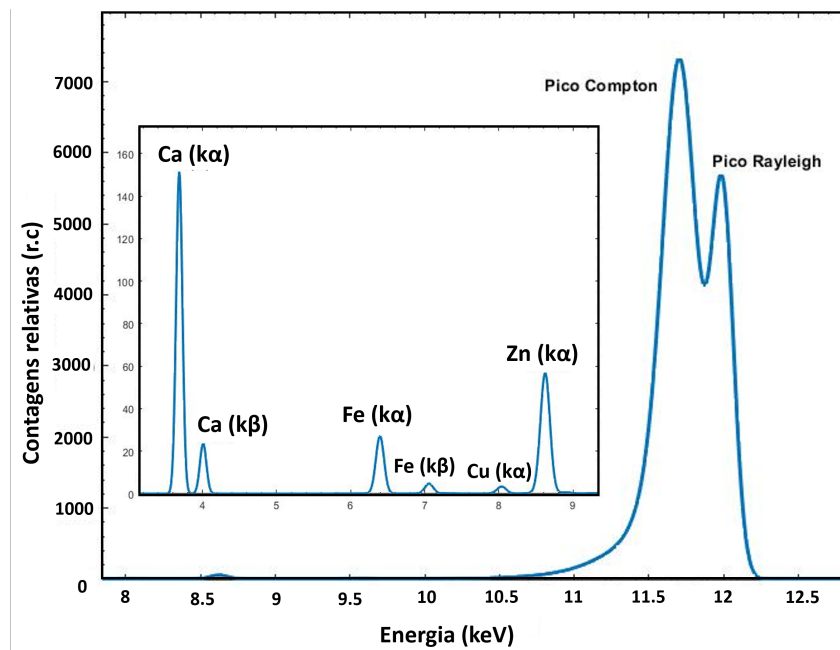


Figura 30: Exemplo de um resultado obtido com as simulações, utilizando energia de 12 keV. Observa-se que os picos de espalhamento Compton e Rayleigh apresentam separação adequada. Os picos de fluorescência também são visíveis.

Foi observado que, para os valores mais baixos de energia testados (10 keV e 11 keV), os picos de fluorescência apresentaram maiores contagens. Com o aumento dessa energia (13 keV a 25 keV), tais picos exibiram contagens menores. Para os picos de espalhamento Compton, baixas energias (10 keV e 11 keV) geraram pouca separação com relação ao pico Rayleigh, que melhorou com o aumento da energia (13 keV a 25 keV). Dessa forma, o valor de 12 keV se mostrou satisfatório para proporcionar boas contagens de fótons de XRF e uma distinção adequada entre os picos Compton e Rayleigh. Além disso, a geometria de reflexão também se mostrou apropriada para detecção dos picos, dentro das limitações experimentais. Dessa maneira, as simulações proporcionaram uma otimização do tempo de feixe disponível para as medições utilizando radiação síncrotron.

5.2 EXPERIMENTOS COM TUBO DE RAIOS X

5.2.1 CONCENTRAÇÃO DOS ELEMENTOS-TRAÇO

Curvas de calibração

Um exemplo de espectro obtido a partir da irradiação dos padrões para calibração do sistema é mostrado na Figura 31.

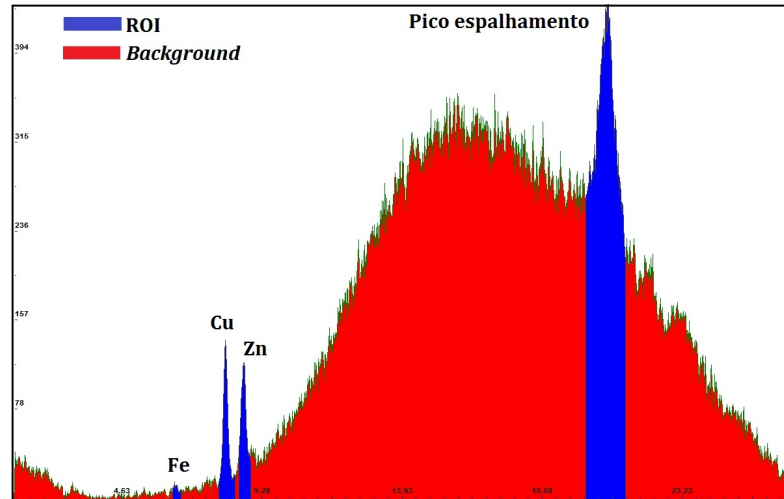


Figura 31: Exemplo de espectro obtido na irradiação de uma padrão para calibração do sistema

Os valores de limite de detecção encontrados para os elementos em estudo foram de 3,69 mg/kg para o Cu e 6,67 mg/kg para o Zn. Apesar dos padrões representarem o intervalo de concentração encontrada em tecidos mamários, tais valores não foram suficientes para gerar sinal significativo para o elemento Fe. As curvas de calibração obtidas para os elementos Cu e Zn são mostradas na Figura 32.

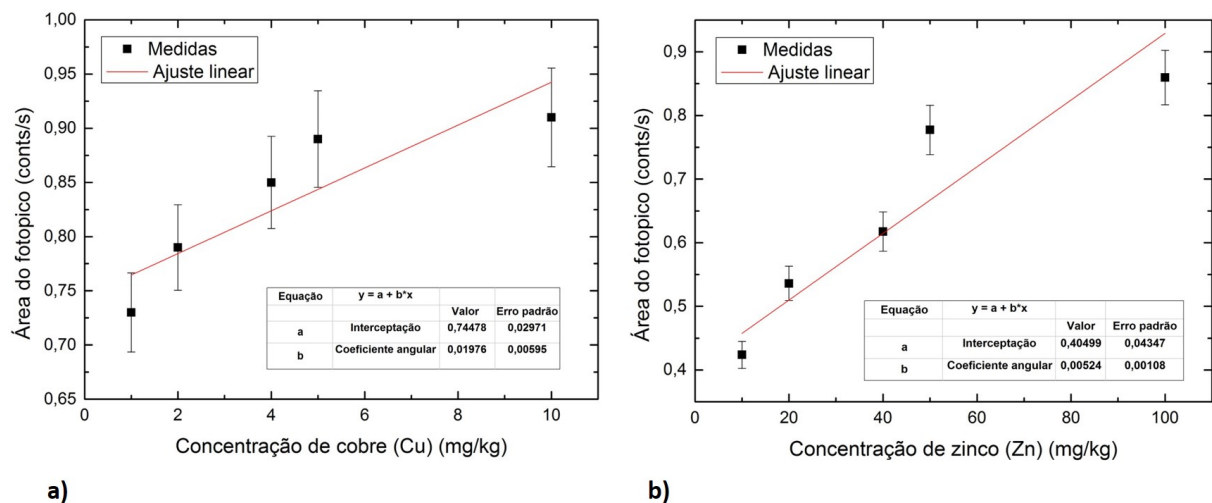


Figura 32: Curvas de calibração dos elementos Cu e Zn (a) e b), respectivamente).

Nota-se que para ambas as curvas, existem valores de erro associados, gerados automaticamente pelo *software* OriginPro. Além destes, as incertezas associadas às medidas das áreas dos padrões utilizados para confecção das curvas foram de aproximadamente 3,7% para o Cu e 5,5% para o Zn.

Valores de concentração

A Figura 33 mostra as distribuições dos valores de concentração dos elementos Cu e Zn obtidos a partir da técnica de ED-XRF. Esses valores estão apresentados no formato *boxplot* e os valores de limite de detecção demarcados pelas linhas pontilhadas.

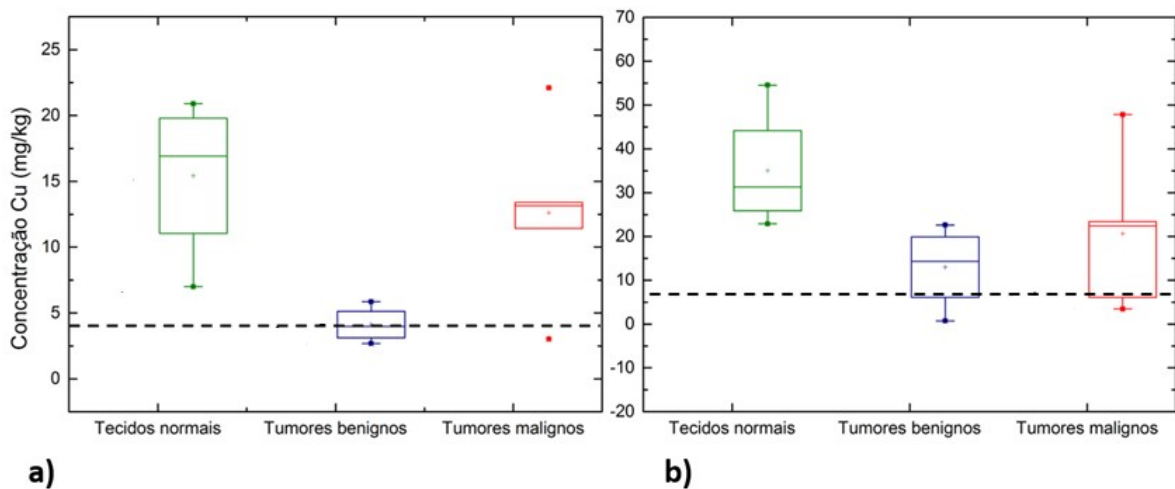


Figura 33: *Boxplot* com as concentrações dos elementos Cu (a) e Zn (b) nas amostras de tecidos normais e tecidos neoplásicos benignos e malignos. As linhas pontilhadas demarcam os limites de detecção.

Nota-se, para o elemento Cu, que os tecidos normais apresentaram valores mais altos de concentração (acima de 15,0 mg/kg) e uma maior variação com relação aos tecidos neoplásicos benignos e malignos. Estes, por sua vez, não apresentaram grandes oscilações, embora seja notável a presença de dois pontos discrepantes (*outliers*), indicando a presença de valores fora dos limites inferiores e superiores (3,02 mg/kg e 22,10 mg/kg, respectivamente). Além disso, as concentrações de Cu para os tecidos neoplásicos malignos foram maiores do que em tecidos neoplásicos benignos, além de haver sobreposição com os valores encontrados para tecidos normais. Para o Zn, há uma distribuição mais homogênea das concentrações entre os tumores benignos e malignos, ocorrendo sobreposição desses valores. Novamente, os tecidos normais apresentaram amostras com valores mais altos de concentração (entre 22,9 mg/kg e 54,54 mg/kg).

Em comparação com os trabalhos de Cozer (2016) e Sakamoto (2011), que conforme abordado no Capítulo 2, utilizaram a técnica de ED-XRF para análises de concentrações de

elementos-traço em tecidos mamários caninos, os resultados deste trabalho apresentam algumas discordâncias. Cozer (2016) encontraram maiores concentrações de Cu em tecidos neoplásicos com relação aos normais, e alta concentração de Zn em tecidos neoplásicos malignos com relação aos benignos. O trabalho de Sakamoto (2011) também apresentou maiores concentrações de Zn em tecidos neoplásicos malignos.

Da mesma forma, estudos com mamas humanas relataram aumentos nos níveis de Zn em tecidos neoplásicos, principalmente nos malignos (FARQUHARSON *et al.*, 2009; GARG *et al.*, 1994; GERAKEI *et al.*, 2002, 2003; AL-EBRAHEEM *et al.*, 2009). Sendo assim, este trabalho não apresentou concordância com os resultados obtidos nesses estudos. As razões para essas divergências podem estar associadas a diversos fatores experimentais, como baixo tempo de exposição das amostras e padrões (1200 s), que por sua vez não fornece um número de contagens adequado para redução da incerteza associada, e um cálculo satisfatório dos valores de concentração. Além disso, como parte do experimento envolvia a detecção de um espectro de espalhamento Compton, fez-se a utilização de um feixe mais colimado, o que pode ter afetado as medições de fluorescência. A média das incertezas associadas às medidas das amostras ficaram em torno de 37,3%.

Apesar das flutuações percentuais, causadas principalmente por limitações como baixa amostragem e de tempo disponível para as medições, este foi um estudo prévio, que serviu como base para se estimar as possíveis faixas de concentração dos elementos-traço para os posteriores experimentos de μ -XRF utilizando radiação síncrotron. Além disso, a utilização de um tubo de raios X convencional é uma opção mais barata e de fácil acesso, e a técnica de ED-XRF se apresenta como uma ferramenta simples e não destrutiva para análise de amostras biológicas, que não requer uma preparação prévia para realização das medições.

5.2.2 VALORES DE DENSIDADE ELETRÔNICA

Densidades físicas e coeficientes de atenuação linear das amostra

Os valores médios de densidades físicas das amostras, encontrados a partir da metodologia descrita na Sub-subseção 4.4.2 deste trabalho, e utilizando a Equação 19, estão apresentados na Tabela 6, bem como valores encontrados em outros trabalhos (POLETTI *et al.*, 2002), (TOMAL, 2007; JOHNS; YAFFE, 1987).

Nota-se que a densidade do tecido adiposo é menor que a dos outros tecidos, que apresentaram valores similares, e um pequeno aumento para os tipos de carcinoma investigados neste trabalho. A partir desses resultados, o coeficiente de atenuação linear μ foi calculado, utilizando a Equação 18. Os valores encontrados compreendiam uma faixa entre 0,63 cm⁻¹ a

Tabela 6: Valores de densidades físicas das amostras de tecido mamário canino, obtidas pelo método de pesagem hidrostática

	Valores de densidade (g/cm ³)			
	Adiposo	Fibroglandular	Adenoma	Carcinoma (diversos)
Este trabalho	0,99 ± 0,01	1,01 ± 0,02	1,01 ± 0,02	1,03 ± 0,03
Tomal (2007)	0,93 ± 0,02	1,03 ± 0,01	1,05 ± 0,01	1,04 ± 0,01
Poletti <i>et al.</i> (2002)	0,92 ± 0,02	1,04 ± 0,02	-	1,04 ± 0,02
Johns e Yaffe (1987)	0,928	1,013	1,042	1,044

0,7 cm⁻¹. Cabe salientar que esses valores foram estimados, utilizando a água como material de referência. Comparando-se com valores de μ encontrados por Tomal (2007) e Johns e Yaffe (1987), os quais calcularam os coeficientes de atenuação linear para tecidos mamários humanos, com exceção do tecido adiposo, os demais tecidos apresentam valores semelhantes.

Curvas de calibração

O gráfico da Figura 34 apresenta a curva de calibração plotada a partir das medições feitas com os materiais de referência da Tabela 5, e o resultado do ajuste de curva não linear realizado com o *software* Origin ProLab 9.0[®]. A partir desse ajuste foram obtidos os valores de $k = (4,011 \pm 1,61) \text{ cm}^3/e$ e $L_0 = (4,33 \pm 2,43) \text{ cm}$.

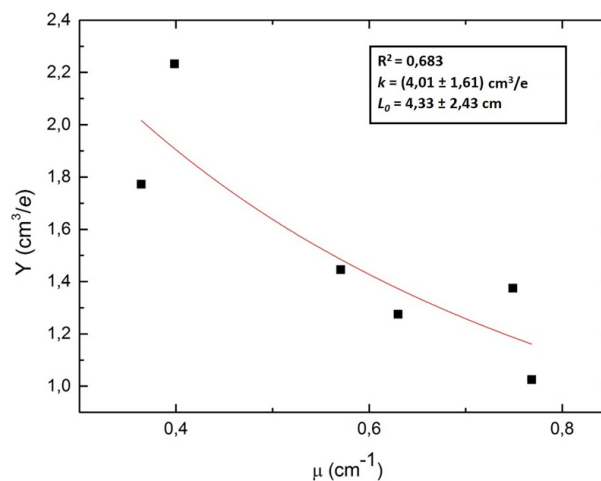


Figura 34: Curva Y x μ utilizada na determinação dos parâmetros k e L_0 .

As incertezas associadas à obtenção das áreas das curvas Compton (número de fótons espalhados inelasticamente) ficaram em torno de 5,6%.

Valores de densidade eletrônica

A distribuição dos valores de densidade eletrônica encontrados estão dispostos no gráfico *boxplot* da Figura 35.

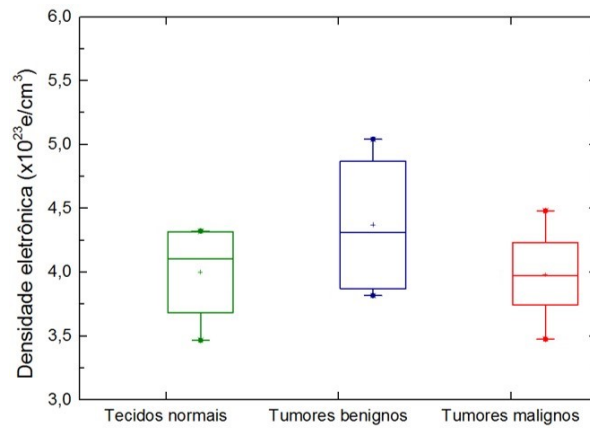


Figura 35: *Boxplot* com os valores de densidade eletrônica encontrados para os tecidos normais e neoplásicos (benignos e malignos).

Nota-se uma sobreposição dos valores de densidade eletrônica encontrados para os diferentes tipos de tecido analisados nesse trabalho. Nos tecidos normais, o valor correspondente ao limite inferior diz respeito a uma amostra majoritariamente adiposa. Nos tecidos neoplásicos benignos, as densidades eletrônicas apresentaram maior variação, além de estarem mais altas com relação aos tecidos malignos e normais. A fim de comparar os resultados obtidos com os encontrados em outros trabalhos, os valores médios de densidade eletrônica estão apresentados na Tabela 7, bem como valores encontrados por outros autores em estudos com tecidos mamários humanos (RYAN *et al.*, 2005; ANTONIASSI, 2009).

Tabela 7: Valores médios de densidade eletrônica encontradas neste trabalho e por Antoniassi (2009) e Ryan *et al.* (2005)

	$\rho_e \times 10^{23} \text{ (e/cm}^3\text{)}$			
	Adiposo	Normais	Benignos	Malignos
Este trabalho	3,46	4,31	4,36	3,98
Ryan <i>et al.</i> (2005)	3,24	-	3,31	3,53
Antoniassi (2009)	3,24	3,53	3,47	3,60

Observa-se que os valores de densidade eletrônica obtidos neste trabalho diferem dos estudos feitos por outros autores, com diferenças percentuais que variam entre 6,8% e 31,0%. Essas variações podem estar associadas ao tempo de exposição das amostras e materiais de referência, às incertezas associadas à sensibilidade da curva de calibração e às áreas relativas às curvas Compton (correspondente ao número de fótons espalhados inelasticamente). Para estas, a média dos valores de incerteza fornecidos pelo *software* DppMCA foi de aproximadamente 3,5%.

Para melhorar esses resultados, pode-se tentar utilizar um tempo de exposição maior, para se obter um número maior de contagens de fótons, testar outras geometrias para otimizar a detecção dos picos Compton, que também permitam a detecção de picos de XRF, e utilizar um número maior de amostras. Por fim, deve-se levar em conta que apesar das similaridades encontradas com os tecidos mamários humanos, é possível que essas variações estejam associadas às diferenças entre a composição da mama nas duas espécies. Sendo assim, seria interessante realizar tais medições com os tecidos caninos e humanos, a fim de testar de maneira mais precisa essas possíveis divergências.

5.3 EXPERIMENTOS REALIZADOS COM RADIAÇÃO SÍNCROTRON

5.3.0.1 TESTE DE EXATIDÃO PARA O CÁLCULO DAS DENSIDADES ELETRÔNICAS

Os resultados obtidos no teste de exatidão, para as medições com radiação síncrotron, estão dispostos no gráfico da Figura 36, com os valores de densidade eletrônicas experimentais e os valores reais, encontrados na literatura.

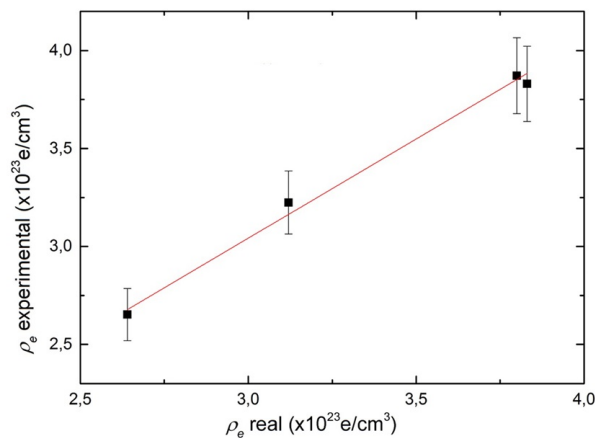


Figura 36: Densidade eletrônica experimental *versus* real para os materiais de referência utilizados neste trabalho.

As barras de erros correspondem aos valores de incertezas referentes ao processo de cálculo das densidades eletrônicas, levando em conta os fatores de atenuação (A) e das áreas das curvas Compton ($N(\theta)$), que ficaram em torno de 5%. O coeficiente de regressão linear apresentou um valor de $R^2 = 0,98923$. A comparação entre os valores experimentais encontrados neste trabalho e os reais (encontrados na literatura), está presente na Tabela 8. Nota-se que os valores estão em concordância com os reais, o que valida a metodologia utilizada para os cálculos das densidades eletrônicas.

Tabela 8: Densidades eletrônicas reais e experimentais, utilizadas para verificar a exatidão do processo experimental nas medidas de espalhamento Compton com radiação síncrotron

Materiais de referência	ρ_e ($\times 10^{23}$ e/cm ³) real	ρ_e ($\times 10^{23}$ e/cm ³) experimental	Exatidão relativa %
Isopropanol	2,64	2,65 \pm 0,14	0,47
Nylon	3,8	3,87 \pm 0,15	1,89
PMMA	3,83	3,83 \pm 0,15	0
Polipropileno	3,12	3,22 \pm 0,12	3,34

5.3.1 ANÁLISE DOS MAPAS DE μ -XRF E VALORES DE DENSIDADE ELETRÔNICA

Os resultados obtidos nos experimentos realizados no LNLS, para as sete amostras de tecido mamário canino, estão dispostos nas figuras a seguir, divididas de acordo com a classificação dos tecidos (normais e neoplásicos benignos e malignos). À esquerda das imagens, tem-se os mapas de μ -XRF com as distribuições dos elementos Fe, Cu e Zn, bem como uma correlação entre os três. No centro, observa-se a imagem das lâminas histológicas, coradas com hematoxilina e eosina (HE). Nelas, estão marcados os pontos medidos com o uso da técnica de espalhamento Compton, identificados com as letras **a), b), c)**, etc. A coloração dos pontos é referente à faixa de valor de densidade eletrônica calculada. As comparações com a literatura foram feitas exclusivamente com trabalhos dedicados a estudos com mamas humanas, uma vez que não foram encontrados trabalhos com investigações similares utilizando amostras de tecido mamário canino.

Tecidos normais

A Figura 37 diz respeito a uma amostra de tecido normal, majoritariamente fibroglandular em toda a região de interesse medida. Observa-se na lâmina histológica, alguns pontos com a coloração rosa mais evidente, que correspondem a vasos sanguíneos. Nos mapas de μ -XRF essas regiões estão destacadas pela alta concentração de Fe, uma vez que ele é o principal componente da hemoglobina (FARQUHARSON *et al.*, 2008). As distribuições de Cu e Zn aparecem homogêneas em toda a extensão da amostra, com uma pequena tendência de acúmulo nas regiões mais fibrosas (canto inferior direito da amostra).

Na imagem de correlação entre os três elementos, o Fe aparece com destaque, enquanto o Zn se mostra mais evidente com relação ao Cu. Sabe-se que o Zn é necessário para numerosos processos metabólicos que servem tanto ao papel estrutural como catalítico nas mamas, mas as causas para as variações na concentração desse elemento tanto em tumores quanto em tecidos normais, ainda não são amplamente entendidas (KELLEHER *et al.*, 2009).

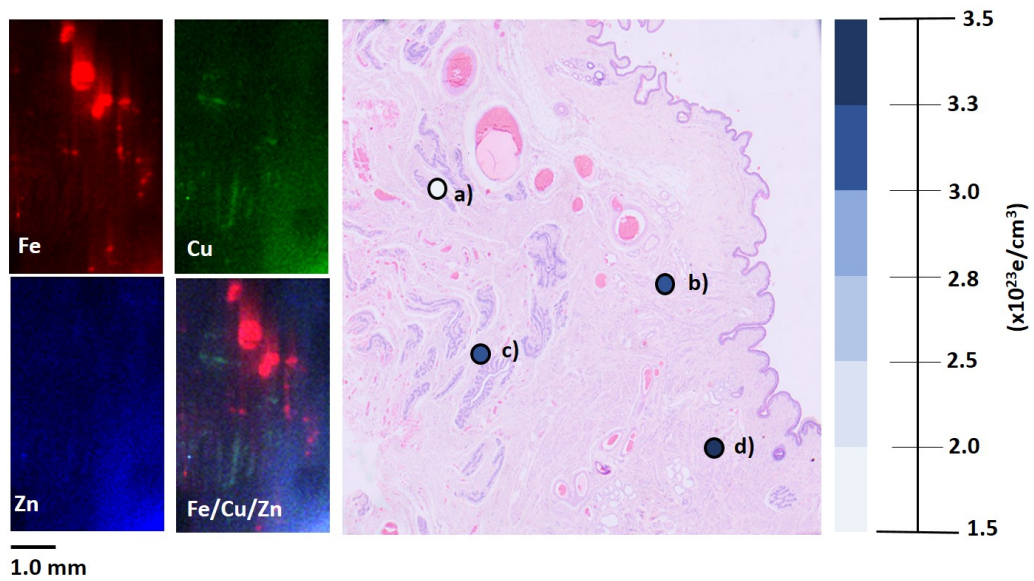


Figura 37: Amostra 1: Tecido normal (majoritariamente fibroglandular). Correlação entre os mapas de distribuição dos elementos Fe, Cu e Zn (esquerda), lâmina histológica (centro) e valores de densidade eletrônica calculados para as regiões marcadas com os pontos a), b), c) e d).

Quanto aos valores de densidade eletrônica, observa-se que o ponto **a)** apresentou um valor mais baixo com relação aos outros três, que exibiram valores semelhantes. Pela análise da lâmina histológica, é visível que o ponto **a)** está localizado em uma região que contém uma maior quantidade de tecido glandular, enquanto que os demais pontos, estão sobre regiões predominantemente fibrosas, o que explicaria a diferença entre os valores de densidade eletrônica encontrados.

A Figura 38 corresponde a uma amostra contendo tecido adiposo e fibroglandular.

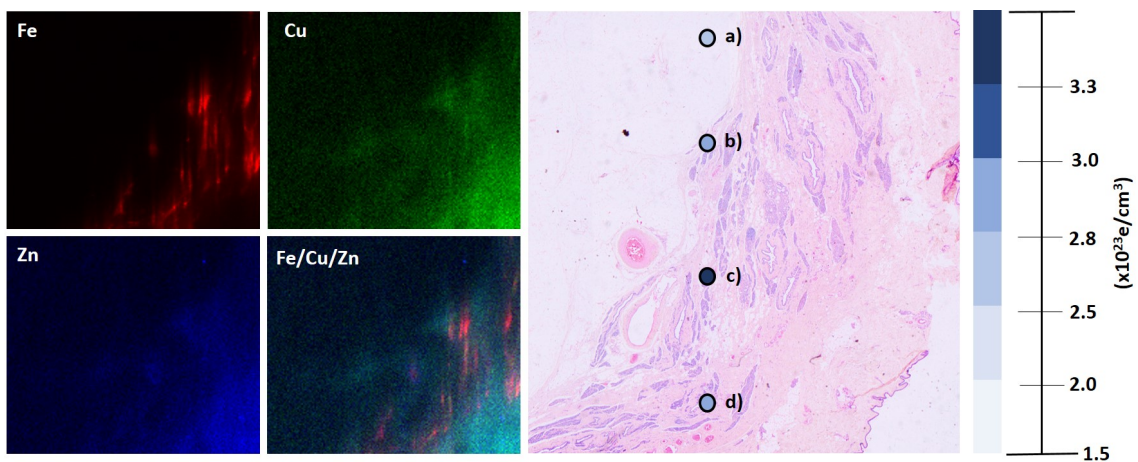


Figura 38: Amostra 2: Tecido normal (adiposo e fibrovascular). Correlação entre os mapas de distribuição dos elementos Fe, Cu e Zn (esquerda), lâmina histológica (centro) e valores de densidade eletrônica calculados para as regiões marcadas com os pontos a), b), c) e d).

O ponto **a**) corresponde a uma região de tecido adiposo, enquanto que os pontos **b**), **c**) e **d**), estão em regiões fibroglandulares. Observa-se, novamente, uma maior concentração de Fe nas regiões de vasos sanguíneos. As distribuições de Cu e Zn aparentam certa homogeneidade, estando presentes em maior concentração nas regiões de tecido fibroglandular. No mapa de correlação dos três elementos, a presença do Fe aparece com destaque, e há um equilíbrio nas distribuições de Zn e Cu, diferente do observado na amostra 1, na qual o Zn estava em evidência.

Quanto aos valores de densidade eletrônica, observa-se que o tecido adiposo (ponto **a**)) apresentou um valor baixo, enquanto os pontos localizados em regiões contendo fibras e vasos, exibiram valores maiores. Esse resultado está de acordo com os trabalhos de Ryan *et al.* (2005), Antoniassi *et al.* (2010, 2012), uma vez que os tecidos adiposos por eles estudados, apresentaram valores de densidade eletrônica menores em comparação aos demais tecidos (fibrosos, adenomas e carcinomas). Para as diferenças de valores entre os pontos **b**), **c**) e **d**), uma explicação seria a distribuição das fibras e glândulas, assim como na amostra 1. Nota-se que o ponto **b**) e o ponto **d**) estão localizados em regiões mais glandulares, enquanto que o ponto **c**), que apresentou maior densidade eletrônica, está em uma região de tecido conjuntivo fibroso.

Comparando-se as duas amostras, verifica-se um padrão na distribuição dos elementos-traço, uma vez que eles estão dispostos de maneira uniforme por toda extensão da amostra (com exceção do aumento de Fe em regiões de vasos sanguíneos). Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Silva (2011), que também observou distribuições regulares desses elementos nos mapas obtidos com μ -XRF para amostras de tecidos normais. Das densidades eletrônicas, notou-se semelhança nos valores obtidos para regiões de tecidos fibrosos em ambas as amostras. Dentre essas regiões, conforme já discutido, as variações de densidade eletrônica podem estar ligadas ao fato de que as glândulas apresentam valores mais baixos quando comparadas a tecidos fibrosos.

Tecidos neoplásicos benignos

A Figura 39 corresponde a uma amostra contendo tecido tumoral (adenoma simples), circundada por estroma (tecido conjuntivo), e uma porção de tecido adiposo. Os pontos **a**) e **b**) estão sobre regiões de estroma, **c**) e **d**) estão localizados na área neoplásica, e **e**) e **f**) estão em regiões de transição entre tecido adiposo e estroma. Dos mapas de μ -XRF, é notável o aumento na concentração de Cu sobre a região tumoral. Na literatura, não foram encontrados relatos do aumento de Cu em tecidos neoplásicos benignos, pois a maioria dos trabalhos foca no estudo de tumores malignos. Além disso, alguns estudos relatam dificuldade no mapeamento de Cu, devido às suas baixas concentrações nas amostras (FARQUHARSON *et al.*, 2007, 2008), o que

não foi observado neste trabalho, uma vez o Cu foi detectado na maioria dos tecidos.

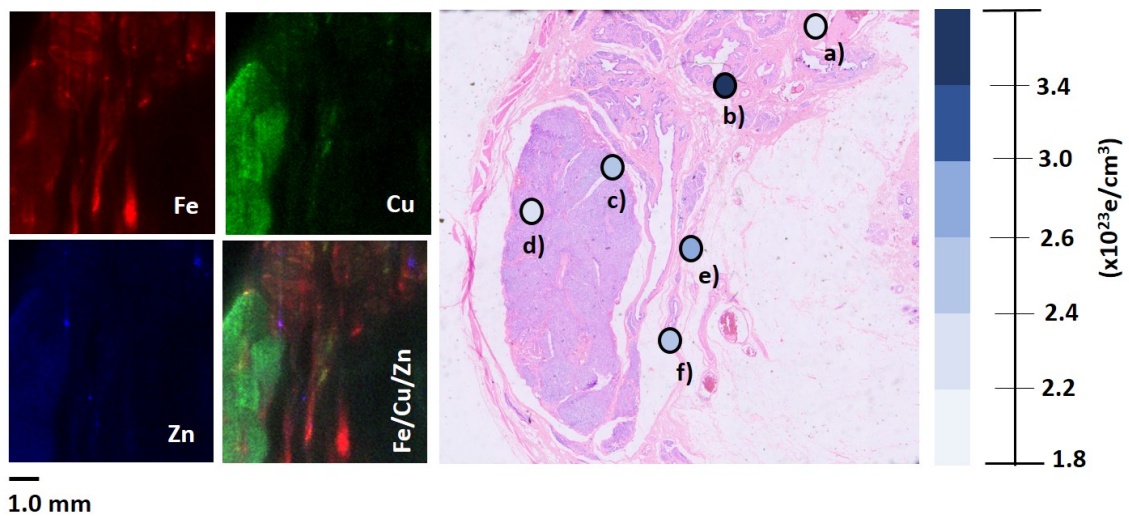


Figura 39: Amostra 3: Adenoma simples. Correlação entre os mapas de distribuição dos elementos Fe, Cu e Zn (esquerda), lâmina histológica (centro) e valores de densidade eletrônica calculados para as regiões marcadas com os pontos a), b), c), d), e) e f).

Uma razão para essa diferença na detecção do Cu, pode estar relacionada ao fato de que, neste trabalho, a secção completa de tecido foi mapeada, ou seja, a estrutura da amostra foi mantida. Já os trabalhos que fizeram uso da μ -XRF para mapear elementos-traço em tecidos mamários, em sua grande maioria, utilizaram os chamados TMAs (*tissue microarray*), nos quais apenas secções selecionadas das amostras são analisadas (JAWHAR, 2009). A concentração de Zn aparece discreta, e o Fe está bem distribuído por toda a amostra, com pontos de maior concentração em regiões de vasos sanguíneos. Silva *et al.* (2013), em seu estudo com mamas normais e neoplásicas, encontraram concentrações elevadas de Zn em amostras de fibroadenoma (um tipo similar de tumor benigno), porém essas concentrações estavam localizadas em regiões de proliferação ductal.

Com relação às densidades eletrônicas, os 2 pontos sobre a região neoplásica (**d**) e **c**) apresentaram valores mais baixos, o que destoa dos encontrados em outros trabalhos (ANTONIASSI *et al.*, 2010, 2012; RYAN *et al.*, 2005). Cabe ressaltar que tais estudos fizeram análises de amostras maiores, e os valores de densidade eletrônica encontrados são influenciados pelos diversos tecidos que as compõem. Uma vez que este trabalho fez o uso de um feixe micrométrico, há uma maior especificidade dos valores com relação às regiões estudadas. Os pontos **e**) e **f**), localizados na região de transição entre o estroma e tecido adiposo, apresentaram valores mais baixos de densidade eletrônica, bem como o ponto **a**). Já o ponto **b**) apresentou um valor elevado, acima dos encontrados para as regiões neoplásicas. É esperado que regiões de

estroma, por conterem fibras de sustentação e diversas outras estruturas, além de apresentarem certo acúmulo de colágeno, apresentem uma maior densidade eletrônica (RYAN *et al.*, 2005).

A Figura 40 também corresponde a um adenoma simples. Os pontos **a)** e **b)** estão localizados sobre a região neoplásica, enquanto que **c)** e **d)** estão localizados em regiões de tecido normal conjuntivo e vasos sanguíneos.

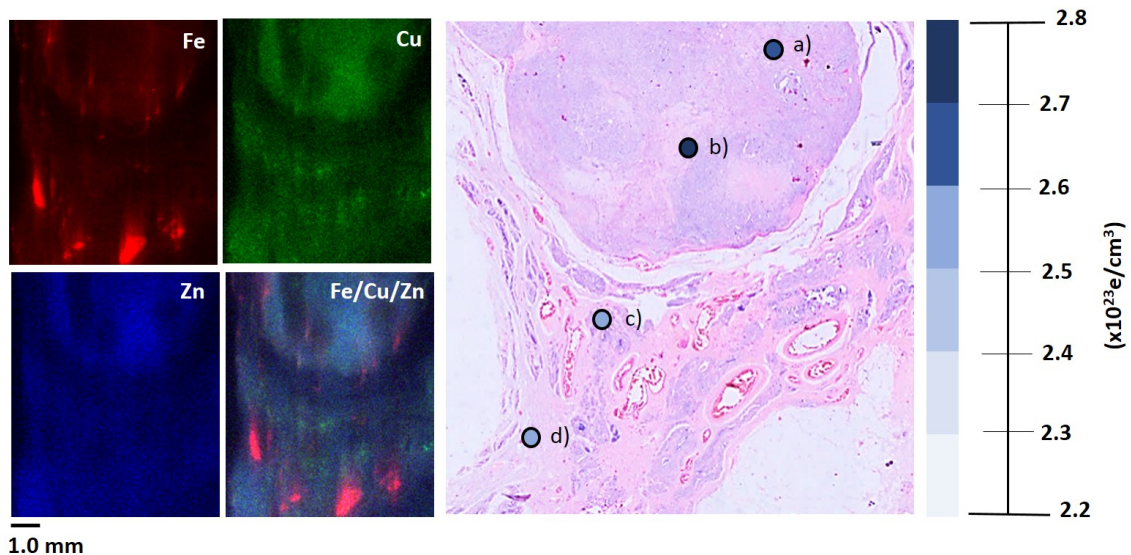


Figura 40: Amostra 4: Adenoma simples. Correlação entre os mapas de distribuição dos elementos Fe, Cu e Zn (esquerda), lâmina histológica (centro) e valores de densidade eletrônica calculados para as regiões marcadas com os pontos a), b), c) e d).

Nesta amostra, não se observa alta concentração de Cu na região tumoral, como na amostra 3, mas sim, uma homogeneidade deste elemento sobre a neoplasia e as demais regiões mapeadas. Novamente, a região dos vasos sanguíneos está destacada pela presença de Fe, e há um aumento do Zn, principalmente na região da neoplasia. Essa expressão mais alta de Zn em neoplasias benignas, também foi observada por Silva *et al.* (2013), e pode ser explicada pelo fato de que o Zn possui função catalisadora das enzimas conhecidas como metaloproteínas de matriz (MMPs). Em humanos, essas enzimas foram encontradas em valores elevados em tumores mamários benignos (SOLAI *et al.*, 2010), e parecem estar envolvidas no processo de propagação do câncer de mama (HOLANDA *et al.*, 2017). Das densidades eletrônicas, nota-se um valor elevado na região tumoral, que decresce levemente nos pontos localizados em regiões de tecido normal (**c)** e **d)**, o que está de acordo com os estudos de Antoniassi *et al.* (2010, 2012) e Ryan *et al.* (2005).

Comparando-se as duas amostras, percebe-se que, embora ambas correspondam a adenomas simples, a distribuição dos elementos-traço e as variações de densidade eletrônica não

apresentaram o mesmo comportamento, com exceção do elemento Fe, por sua presença elevada em regiões de vasos sanguíneos. Essas diferenças podem estar relacionadas aos fatores que levaram ao aparecimento da neoplasia, e como ela se desenvolveu no organismo de cada cadela, bem como variações hormonais, e questões relacionadas à idade, alimentação, entre outros.

Tecidos neoplásicos malignos

A Figura 41 corresponde a uma amostra classificada como carcinoma sólido. O ponto **a)** está posicionado sobre uma região de tecido adiposo, os pontos **b)** e **c)** correspondem a tecido normal conjuntivo (estroma), e os pontos **d)** e **e)** estão localizados sobre a neoplasia. Dos mapas de μ -XRF, verificam-se maiores concentrações dos elementos nos tecidos que circundam as regiões neoplásicas, ou seja, o estroma. Nota-se, também, a presença elevada de Fe nessas regiões, possivelmente pela alta irrigação sanguínea associada ao surgimento de neoplasias (SCHNEIDER; MILLER, 2005).

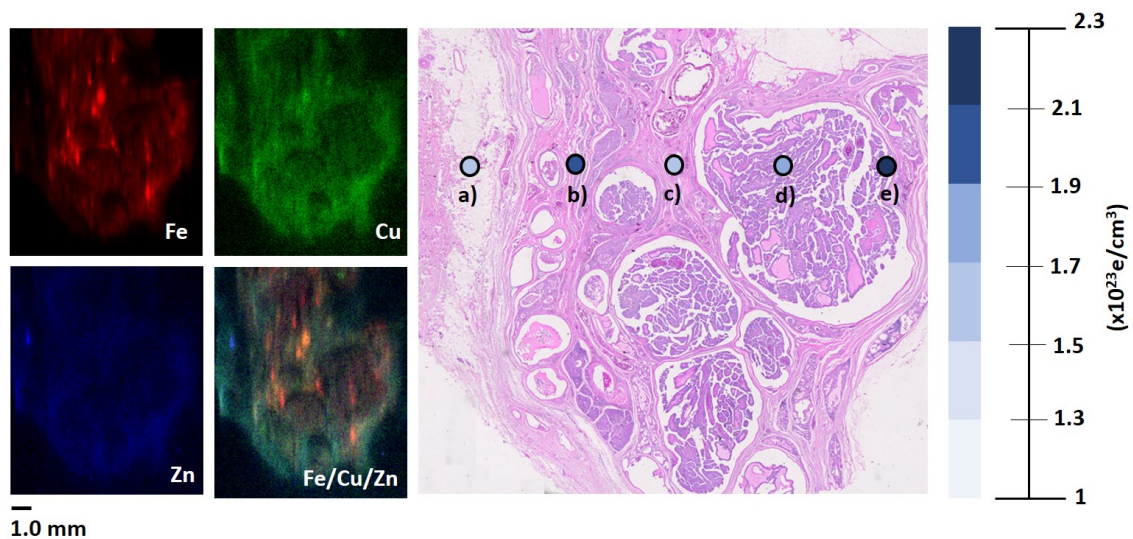


Figura 41: Amostra 5: Carcinoma sólido. Correlação entre os mapas de distribuição dos elementos Fe, Cu e Zn (esquerda), lâmina histológica (centro) e valores de densidade eletrônica calculados para as regiões marcadas com os pontos a), b), c), d) e e).

Os elementos Cu e Zn estão distribuídos de maneira similar por toda a amostra, com o elemento Cu aparecendo em maior concentração. Das densidades eletrônicas, nota-se que as regiões neoplásicas apresentaram valores elevados, apesar de um dos pontos localizado em uma região de tecido normal (**b)**), também estar elevado. No entanto, é notável que o ponto **b)**, apesar de estar localizado em uma região não tumoral, se encontra sobre uma área com a presença de muitas fibras. Além disso, o estroma tumoral é altamente vascularizado, e uma maior concentração de Fe nessa região pode também estar relacionada ao aumento da densidade

eletrônica.

A Figura 42 corresponde a uma amostra classificada como adenocarcinoma papilífero a complexo. Os pontos **a)** e **b)** correspondem a uma porção de tecido normal, com uma leve formação hiperplásica. Já os pontos **c)** e **d)**, correspondem à região neoplásica, composta também por uma quantidade significativa de estroma.

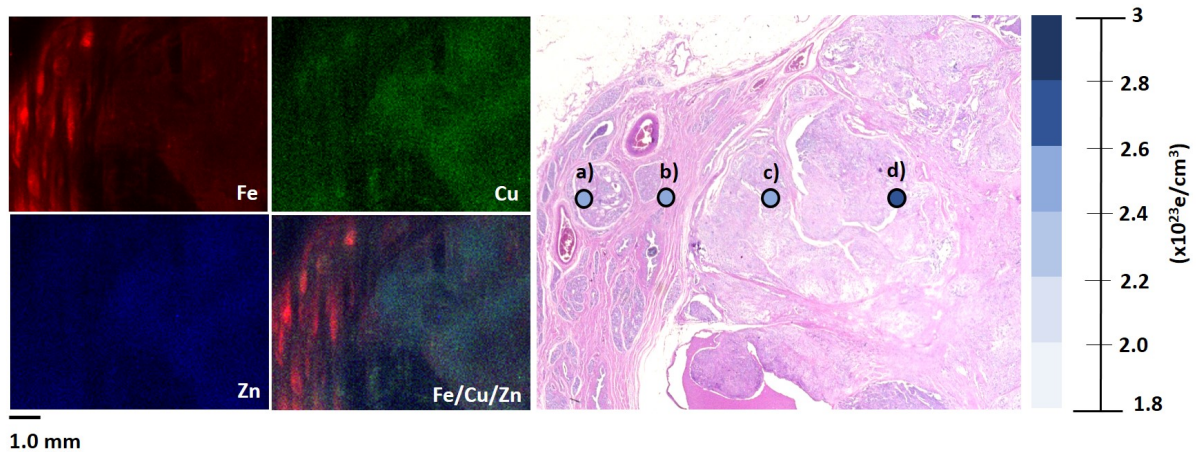


Figura 42: Amostra 6: Adenocarcinoma papilífero a complexo. Correlação entre os mapas de distribuição dos elementos Fe, Cu e Zn (esquerda), lâmina histológica (centro) e valores de densidade eletrônica calculados para as regiões marcadas com os pontos a), b), c) e d).

O Fe exibe o mesmo padrão de comportamento observado nas outras amostras, ou seja, alta concentração em vasos sanguíneos. Já os elementos Zn e Cu apresentaram distribuições discretas. Além disso, nota-se que em razão do baixo valor de concentração do elemento Cu nessa amostra, a imagem gerada apresenta um ruído elevado. Essa característica também foi observada por Farquharson *et al.* (2007), que relataram dificuldades no mapeamento de Cu devido às suas baixas concentrações nas amostras analisadas. Das densidades eletrônicas, percebe-se que os pontos **a)** e **b)**, localizados sobre regiões de tecido normal, estão na mesma faixa de valor encontrado para o ponto **c)**, localizado sobre a região neoplásica. Esse valor pode ser explicado pelo fato de que os adenocarcinomas possuem arranjos predominantemente glandulares (MISDORP *et al.*, 1972). Como também há a presença de tecidos fibrosos nessas neoplasias, é possível que o valor elevado encontrado para o ponto **d)** esteja relacionado a essa diferença na distribuição tecidual.

A Figura 43 corresponde a uma amostra de adenocarcinoma simples. O ponto **a)** está localizado sobre a região neoplásica, os pontos **b)** e **d)** correspondem a regiões de tecido normal, e o ponto **c)**, a um linfonodo. Nota-se uma maior concentração do elemento Cu na região tumoral, apresentando uma distribuição espaçada entre as estruturas da amostra, voltando a apre-

sentar um valor mais alto na porção inferior, composta basicamente por tecido fibroglandular. O Fe está presente em grande quantidade na região correspondente ao linfonodo, e outras regiões com a presença de vasos sanguíneos. O Zn está distribuído de maneira similar ao Cu por toda extensão da amostra, em concentrações menores. No entanto, houve um pequeno aumento na região do linfonodo, e não foi observado acúmulo na região tumoral.

Dos valores de densidade eletrônica, nota-se um valor elevado na região do linfonodo, cuja concentração de Fe também estava elevada. Conforme mencionado anteriormente, é possível que haja uma relação entre as altas concentrações de Fe e valores elevados de densidade eletrônica, uma vez que esse comportamento foi observado na amostra 5. Nos pontos de tecido normal, houve uma variação significativa nos valores, provavelmente pelas diferentes composições que caracterizam as estruturas que compõem esses tecidos. A região neoplásica (ponto a)) também apresentou um valor elevado de densidade eletrônica, similar ao encontrado para o ponto b). Conforme já foi abordado, o adenocarcinoma apresenta estruturas fibrosas e glandulares, por isso, esse valor de densidade eletrônica semelhante a uma região de tecido normal, é esperada.

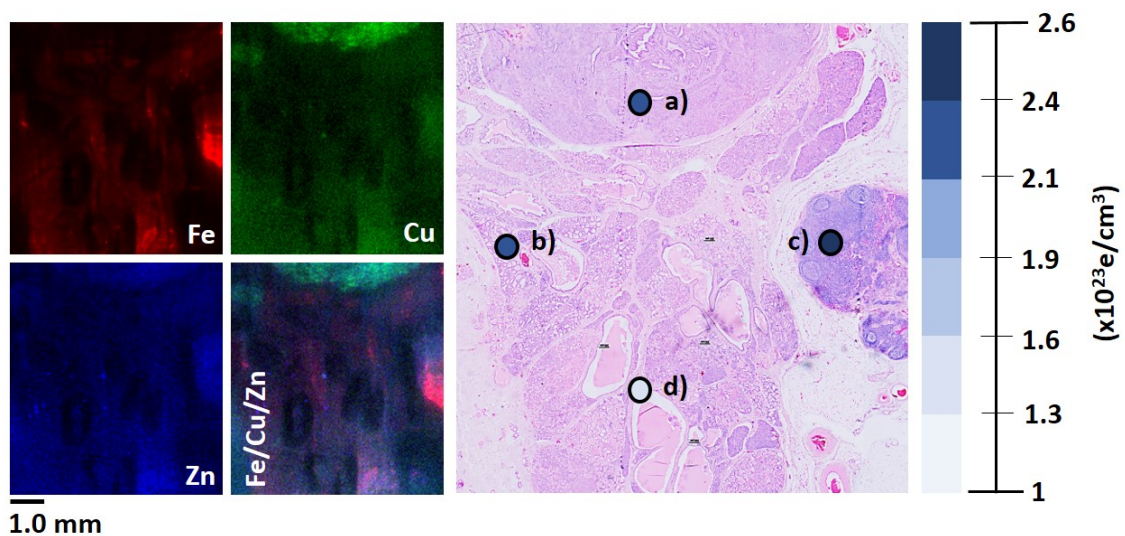


Figura 43: Amostra 7: Adenocarcinoma simples. Correlação entre os mapas de distribuição dos elementos Fe, Cu e Zn (esquerda), lâmina histológica (centro) e valores de densidade eletrônica calculados para as regiões marcadas com os pontos a), b), c) e d).

Comparando-se as três amostras, nota-se que o Fe apresentou baixa distribuição sobre as áreas tumorais, e uma concentração maior ao redor dessas regiões. Esse comportamento também foi observado pelos trabalhos de Farquharson *et al.* (2008) e Al-Ebraheem *et al.* (2009, 2014) em seus estudos com mamas humanas, utilizando a μ -XRF. Esse fato pode estar ligado à hipótese abordada por Silva *et al.* (2009), de que o Fe possivelmente esteja relacionado com o

aumento da atividade celular e com o suprimento sanguíneo para formação de neoplasias, fato que também se observa para o Cu, uma vez que ele foi relatado como cofator da angiogênese (mecanismo de crescimento de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes) (HUANG *et al.*, 1999). Das três amostras, apenas a 7 (Figura 43) teve um aumento de Cu na região tumoral. Embora os três tecidos analisados sejam variações de carcinoma, suas respectivas formações teciduais podem influenciar no acúmulo, ou não, desse elemento na região tumoral. Não foram observadas concentrações elevadas de Zn em regiões tumorais, conforme relatado no trabalho de Farquharson *et al.* (2009). Uma razão para essa divergência pode estar ligada à classificação histológica do tumor, ao estágio de desenvolvimento da patologia, e também às possíveis diferenças estruturais e químicas entre os tecidos humanos e caninos.

Quanto aos valores de densidade eletrônica, observa-se que para as três amostras, os resultados estão de acordo com os estudos de Antoniassi *et al.* (2010, 2012) e Ryan *et al.* (2005), uma vez que as regiões tumorais apresentaram valores maiores com relação aos demais tecidos. Conforme exposto nas discussões acima, esses estudos fizeram análises de amostras inteiras, ou seja, os valores de densidade eletrônica encontrados correspondem a uma média das densidades de todos os tecidos que as compõem. Uma vez que este trabalho utilizou feixe micrométrico, os resultados apresentam maior precisão quanto aos valores correspondentes às estruturas teciduais específicas. Por fim, foi possível notar uma relação entre os elevados níveis de Fe nos pontos **b)** e **c)** das amostras 5 e 7, respectivamente, e o aumento das densidades eletrônicas nesses pontos. Conforme abordado anteriormente, regiões tumorais são altamente vascularizadas, bem como os estromas desses tumores (compostos por vasos sanguíneos e tecido conjuntivo), que podem ter influência nos valores encontrados. Sendo assim, é interessante que futuros trabalhos analisem a possibilidade da alta concentração de Fe ser diretamente proporcional ao aumento da densidade eletrônica em tecidos mamários, tanto caninos quanto humanos, utilizando um número maior de amostras.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pelas simulações computacionais e experimentos realizados no IFGW e LNLS, observa-se que a combinação das técnicas de XRF e espalhamento Compton é uma forma eficaz de se obter informações complementares quanto à concentração de elementos-traço e valores de densidade eletrônica. No entanto, deve-se levar em conta as limitações envolvidas, especialmente na utilização de um tubo de raios X como fonte de radiação para realização dos experimentos. De maneira mais específica, algumas conclusões puderam ser extraídas, conforme apresentado a seguir.

Sobre as simulações computacionais

As simulações com o XRMC se mostraram eficazes na determinação dos parâmetros que otimizaram a realização de experimentos de μ -XRF e espalhamento Compton, utilizando radiação síncrotron. A partir dos resultados, foi escolhido um valor de energia adequado para detecção dos picos de fluorescência e espalhamento inelástico (12 keV), e a geometria de reflexão foi selecionada para performance dos experimentos. Embora os parâmetros analisados não tenham sido totalmente implementados, devido a limitações experimentais, as simulações proporcionaram também, otimização dos tempos de medida e uma base importante de conhecimento no que diz respeito à combinação das duas técnicas e suas limitações.

Sobre os experimentos com tubo de raios X

Para as medições utilizando um arranjo para ED-XRF, visando a detecção dos picos de XRF e dados de espalhamento Compton, os resultados não se apresentaram estatisticamente significativos. No entanto, o estudo serviu como base para se estimar as possíveis faixas de concentração dos elementos-traço e variações das densidades eletrônicas, para os posteriores experimentos com radiação síncrotron. Dentre os fatores que podem ter influenciado a baixa contagem dos fótons para fluorescência, estão o tempo de exposição das amostras e padrões de calibração, além da utilização de um feixe colimado para permitir a detecção dos picos de espalhamento Compton. Em futuros estudos, essas variáveis podem ser otimizadas para fornecer resultados mais confiáveis. Quanto aos valores de densidade eletrônica, embora tenham se apresentado muito mais altos em relação ao encontrado na literatura (acima de $3,6 \times 10^{23} \text{ e/cm}^3$), observou-se que o padrão de comportamento para tecido normal adiposo (densidade eletrônica menor, em torno de $3,46 \times 10^{23} \text{ e/cm}^3$), e neoplasias benignas e malignas (valores

mais altos, na faixa de $4,36 \times 10^{23} \text{ e/cm}^3$ e $3,98 \times 10^{23} \text{ e/cm}^3$, respectivamente), foi similar. Sendo assim, é necessário avaliar quais configurações podem ser modificadas para se obter os resultados esperados, uma vez que a utilização de um tubo de raios X convencional é uma opção mais barata e de fácil acesso.

Sobre os experimentos com radiação síncrotron

Os experimentos de μ -XRF forneceram mapas da distribuição dos elementos Fe, Cu e Zn, em amostras de tecido normal e neoplásicas benignas e malignas, que foram comparados com as respectivas lâminas histológicas das amostras. Nas duas amostras de tecidos normais, com exceção de regiões contendo vasos sanguíneos (que promovem um acúmulo de ferro), os elementos apresentaram um padrão de distribuição por toda a amostra, com menores concentrações em regiões adiposas. Com relação às duas amostras de neoplasias benignas, ambas correspondentes a adenomas simples, notou-se que houve uma concentração elevada de cobre em uma delas, e a outra apresentou um aumento em menores proporções. Essa diferença pode estar ligada ao estágio de desenvolvimento do tumor, bem como os fatores que desencadearam o aparecimento da neoplasia. Na literatura, essa alta concentração de cobre em neoplasias benignas de mama, não foi relatada, uma vez que a maioria delas se concentra em estudos com neoplasias malignas.

Para as três amostras malignas, observou-se maior concentração de ferro em regiões adjacentes aos tumores, e menores sobre as regiões tumorais propriamente ditas. Uma das amostras, correspondente a um adenocarcinoma simples (amostra 7), apresentou valor elevado de cobre na região tumoral, e acúmulo de ferro em uma região correspondente a um linfonodo (estrutura altamente vascularizada). Boa parte dos resultados se mostrou de acordo com os achados para mamas humanas. No entanto, deve-se levar em conta que nenhum estudo prévio utilizando a técnica de μ -XRF foi realizado com mamas caninas. Assim, apesar das semelhanças encontradas entre tecidos humanos e caninos, diferenças entre as estruturas teciduais nas duas espécies podem causar variações nos resultados.

Quanto à parte de espalhamento Compton, os resultados também se mostram satisfatórios. As incertezas relacionadas aos cálculos das densidades eletrônicas, levando em conta os fatores de atenuação, áreas e o fator k , ficaram em torno de 5,3%. Embora a literatura envolvendo a caracterização de tecidos mamários caninos ainda seja escassa, grande parte dos resultados esteve de acordo com os estudos com mamas humanas. Deve-se levar em conta, também, que os trabalhos utilizados para comparação, fizeram análises de amostras maiores, de regiões inteiras, logo, os valores de densidade eletrônica encontrados são influenciados pelos di-

versos tecidos que compõem as amostras. Este estudo utilizou um feixe micrométrico, portanto, há uma maior precisão dos valores encontrados para as diferentes regiões analisadas. Por fim, o teste de exatidão mostrou a eficácia do processo de cálculo das densidades, com flutuações de no máximo 3,34%.

6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS

Como trabalhos futuros, cita-se:

- Estudar e aprimorar as simulações com o XRMC, testando mudanças nas demais variáveis que o programa fornece, a fim de otimizar possíveis combinações entre técnicas espectroscópicas envolvendo XRF, espalhamento Compton e espalhamento Rayleigh.
- Analisar tecidos mamários caninos utilizando outras modalidades de XRF, já descritas para tecidos humanos, para poder comparar esses valores.
- Realizar as mesmas medidas, tanto de ED-XRF quanto de μ -XRF, utilizando uma quantidade maior de amostras, para facilitar as comparações com a literatura, e permitir uma margem de erro mais confiável para apresentação dos resultados.
- Combinar a técnica de espalhamento Compton e Rayleigh, para obtenção não apenas das densidades eletrônicas das amostras de tecido mamário canino, mas também do número atômico efetivo, como já aplicado em tecidos humanos (ANTONIASSI *et al.*, 2011; RYAN; FARQUHARSON, 2010)

REFERÊNCIAS

- ABDELMEGEED, S. M.; MOHAMMED, S. Canine mammary tumors as a model for human disease. **Oncology letters**, Spandidos Publications, v. 15, n. 6, p. 8195–8205, 2018.
- AIGINGER, H.; WOBRAUSCHEK, P. Total reflectance x-ray spectrometry. **Advances in X-ray analysis**, vol. 28, 1985.
- AL-BAHRI, J. S.; SPYROU, N. M. Electron density of normal and pathological breast tissues using a compton scattering technique. **Applied radiation and isotopes**, Elsevier, v. 49, n. 12, p. 1677–1684, 1998.
- AL-EBRAHEEM, A. *et al.* Emerging patterns in the distribution of trace elements in ovarian, invasive and in-situ breast cancer. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 499, n. 1, p. 012014, 2014.
- AL-EBRAHEEM, A.; FARQUHARSON, M.; RYAN, E. The evaluation of biologically important trace metals in liver, kidney and breast tissue. **Applied Radiation and Isotopes**, Elsevier, v. 67, n. 3, p. 470–474, 2009.
- AL-EBRAHEEM, A. *et al.* The determination of zinc, copper and iron oxidation state in invasive ductal carcinoma of breast tissue and normal surrounding tissue using xanes. **X-Ray Spectrometry**, Wiley Online Library, v. 39, n. 5, p. 332–337, 2010.
- ANTONIASSI, M. **Determinação das densidades eletrônicas de neoplasias mamárias utilizando o espalhamento Compton de raios X**. Dissertação (Mestrado) — Universidade de São Paulo, 2009.
- ANTONIASSI, M.; CONCEIÇÃO, A.; POLETTI, M. Characterization of breast tissues using compton scattering. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment**, Elsevier, v. 619, n. 1-3, p. 375–378, 2010.
- ANTONIASSI, M.; CONCEIÇÃO, A.; POLETTI, M. Study of effective atomic number of breast tissues determined using the elastic to inelastic scattering ratio. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment**, Elsevier, v. 652, n. 1, p. 739–743, 2011.
- ANTONIASSI, M.; CONCEIÇÃO, A.; POLETTI, M. Study of electron densities of normal and neoplastic human breast tissues by compton scattering using synchrotron radiation. **Applied Radiation and Isotopes**, Elsevier, v. 70, n. 7, p. 1351–1354, 2012.
- ANTONIASSI, M. *et al.* Characterization of breast tissues combining x-ray fluorescence and scattering spectroscopy: A monte carlo computational study. **Radiation Physics and Chemistry**, Elsevier, v. 155, p. 69–74, 2019.
- ASPINALL, V.; CAPPELLO, M. **Introduction to Veterinary Anatomy and Physiology Textbook-E-Book**. London: Elsevier Health Sciences, 2015.

- ATTIX, F. H. **Introduction to radiological physics and radiation physics**. New York: John Wiley & Sons, 1986.
- BANKS, W. J. *et al.* **Applied veterinary histology**. Philadelphia: Mosby-Year Book, Inc, 1993.
- BECKHOFF, B. *et al.* **Handbook of practical X-ray fluorescence analysis**. Berlin: Springer Science & Business Media, 2007.
- BERGER, M. **XCOM: photon cross sections database**. <http://www.nist.gov/pml/data/xcom/index.cfm>, 2010.
- 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.
- CAVALLO, F. *et al.* Zinc and copper in breast cancer. a joint study in northern italy and southern france. **Cancer**, Wiley Online Library, v. 67, n. 3, p. 738–745, 1991.
- CESAREO, R. **Nuclear Analytical Techniques in Medicine (Vol. 8 of Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry)**. Chap. 6, 7. New York: Elsevier, Amsterdam, 1988.
- CHAUHAN, R.; CHAUHAN, R. **Textbook of Veterinary Pathology: Quick Review and Self Assessment**. India: Ibdc Publishers, 2010.
- CONCEIÇÃO, A. L. C. **Caracterização estrutural de tecidos mamários normais e neoplásicos através de espalhamento de raios X**. Dissertação (Mestrado) — Universidade de São Paulo, 2009.
- CONKLIN, M. W.; KEELY, P. J. Why the stroma matters in breast cancer: insights into breast cancer patient outcomes through the examination of stromal biomarkers. **Cell adhesion & migration**, Taylor & Francis, v. 6, n. 3, p. 249–260, 2012.
- COZER, T. C. **Análise de elementos traço presentes em tecidos mamários canino através da técnica de fluorescência de raios X**. Dissertação (Mestrado) — Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2016.
- DELLMANN, H.-D.; EURELL, J. A. *et al.* **Textbook of veterinary histology**. Missouri: Williams & Wilkins., 1998.
- DUKE, P. **Synchrotron radiation: production and properties**. New York: Oxford University Press, 2000.
- DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Textbook of Veterinary Anatomy-E-Book**. St. Louis: Elsevier Health Sciences, 2009.
- EVANS, H. E.; LAHUNTA, A. D. **Miller's anatomy of the dog-E-Book**. St. Louis: Elsevier Health Sciences, 2012.
- FARQUHARSON, M. *et al.* The distribution of trace elements ca, fe, cu and zn and the determination of copper oxidation state in breast tumour tissue using μ srxrf and μ xanes. **Physics in Medicine & Biology**, IOP Publishing, v. 53, n. 11, p. 3023, 2008.

FARQUHARSON, M. *et al.* Zinc presence in invasive ductal carcinoma of the breast and its correlation with oestrogen receptor status. **Physics in Medicine & Biology**, IOP Publishing, v. 54, n. 13, p. 4213, 2009.

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

FILHO, V. F. N. **Técnicas analíticas nucleares de fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF) e por reflexão total (TXRF)**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1999.

GARG, A. *et al.* An elemental correlation study in cancerous and normal breast tissue with successive clinical stages by neutron activation analysis. **Biological Trace Element Research**, Springer, v. 46, n. 3, p. 185–202, 1994.

GERAKI, K.; FARQUHARSON, M.; BRADLEY, D. Concentrations of fe, cu and zn in breast tissue: a synchrotron xrf study. **Physics in Medicine & Biology**, IOP Publishing, v. 47, n. 13, p. 2327, 2002.

GERAKI, K.; FARQUHARSON, M.; BRADLEY, D. X-ray fluorescence and energy dispersive x-ray diffraction for the quantification of elemental concentrations in breast tissue. **Physics in Medicine & Biology**, IOP Publishing, v. 49, n. 1, p. 99, 2003.

GOLDSCHMIDT, M. *et al.* Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary pathology**, SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA, v. 48, n. 1, p. 117–131, 2011.

GOLOSIO, B. *et al.* Monte carlo simulation of x-ray imaging and spectroscopy experiments using quadric geometry and variance reduction techniques. **Computer Physics Communications**, Elsevier, v. 185, n. 3, p. 1044–1052, 2014.

GRAHAM, J. C.; MYERS, R. K. The prognostic significance of angiogenesis in canine mammary tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Wiley Online Library, v. 13, n. 5, p. 416–418, 1999.

GRIEKEN, R. V.; MARKOWICZ, A. **Handbook of X-ray Spectrometry**. New York: CRC press, 2001.

HOLANDA, A. O. d. N. *et al.* Zinc and metalloproteinases 2 and 9: What is their relation with breast cancer? **Revista da Associação Médica Brasileira**, SciELO Brasil, v. 63, n. 1, p. 78–84, 2017.

HOLLIDAY, R. Neoplastic transformation: the contrasting stability of human and mouse cells. **Cancer surveys**, v. 28, p. 103–115, 1996.

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

IANUCCI, J.; HOWERTON, L. **Dental Radiography Principles and Techniques**. North Carolina: Elsevier Saunders, 2012.

- JAWHAR, N. M. Tissue microarray: a rapidly evolving diagnostic and research tool. **Annals of Saudi medicine**, Wolters Kluwer–Medknow Publications, v. 29, n. 2, p. 123, 2009.
- JENNINGS, R.; PREMANANDAN, C. **Veterinary Histology**. Ohio: Ohio State University, 2017.
- 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.
- JONES, R. E.; LOPEZ, K. H. **Human reproductive biology**. San Diego: Academic Press, 2013.
- KABAT, G. C.; ROHAN, T. E. Does excess iron play a role in breast carcinogenesis? an unresolved hypothesis. **Cancer Causes & Control**, Springer, v. 18, n. 10, p. 1047–1053, 2007.
- KELLEHER, S. L.; SEO, Y. A.; LOPEZ, V. Mammary gland zinc metabolism: regulation and dysregulation. **Genes & nutrition**, v. 4, n. 2, p. 83, 2009.
- KLEIN, O.; NISHINA, Y. Über die streuung von strahlung durch freie elektronen nach der neuen relativistischen quantendynamik von dirac. **Zeitschrift für Physik**, Springer, v. 52, n. 11-12, p. 853–868, 1929.
- KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H.-G. **Veterinary anatomy of domestic mammals: textbook and colour atlas**. Stuttgart: Schattauer Verlag, 2013.
- KUBALA-KUKUŚ, A. *et al.* Analysis of elemental concentration censored distributions in breast malignant and breast benign neoplasm tissues. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Elsevier, v. 62, n. 6-7, p. 695–701, 2007.
- KUMAR, V. *et al.* **Robbins and Cotran pathologic basis of disease, professional edition e-book**. Philadelphia: elsevier health sciences, 2014.
- LANA, S. E.; RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J. Tumors of the mammary gland. In: **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology (Fourth Edition)**. St. Louis: Elsevier, 2007. p. 619–636.
- LIFSHIN, E. **X-ray Characterization of Materials**. Weinheim: Wiley-Vch, 1999.
- MAGALHAES, T. *et al.* Study of br, zn, cu and fe concentrations in healthy and cancer breast tissues by txrf. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Elsevier, v. 63, n. 12, p. 1473–1479, 2008.
- MAJEWSKA, U. *et al.* Trace element concentration distributions in breast, lung and colon tissues. **Physics in Medicine & Biology**, IOP Publishing, v. 52, n. 13, p. 3895, 2007.
- MAXIE, M. **Jubb, Kennedy & Palmer's pathology of domestic animals (Fifth Edition)**. Philadelphia (PA): WB Saunders, 2007.
- 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.

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. **Tumors in domestic animals**, Wiley Online Library, p. 575–606, 2002.

MISDORP, W. *et al.* Canine malignant mammary tumours ii. adenocarcinomas, solid carcinomas and spindle cell carcinomas. **Veterinary pathology**, SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA, v. 9, n. 6, p. 447–470, 1972.

MOBILIO, S.; BOSCHERINI, F.; MENEGHINI, C. **Synchrotron Radiation**. New Delhi, India: Springer, 2016.

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

MORRISON, W. B. **Cancer in dogs and cats: medical and surgical management**. Indiana: Teton NewMedia, 2002.

OLIVEIRA, L. O. d. *et al.* Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. **Acta scientiae veterinariae**. Porto Alegre, RS. Vol. 31, n. 2 (2003), p. 105-110, 2003.

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

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

PÉREZ, C. A. *et al.* Synchrotron radiation x-ray fluorescence at the Inls: beamline instrumentation and experiments. **X-Ray Spectrometry: An International Journal**, Wiley Online Library, v. 28, n. 5, p. 320–326, 1999.

POLETTI, M.; GONÇALVES, O.; MAZZARO, I. X-ray scattering from human breast tissues and breast-equivalent materials. **Physics in Medicine & Biology**, IOP Publishing, v. 47, n. 1, p. 47, 2001.

POLETTI, M.; GONÇALVES, O.; MAZZARO, I. Coherent and incoherent scattering of 17.44 and 6.93 keV x-ray photons scattered from biological and biological-equivalent samples: characterization of tissues. **X-Ray Spectrometry: An International Journal**, Wiley Online Library, v. 31, n. 1, p. 57–61, 2002.

POLETTI, M. *et al.* A preliminary study of the distribution of trace elements in healthy and neoplastic breast tissues with synchrotron radiation x-ray fluorescence. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 71, p. 975–976, 2004.

RICHARDS, H. *et al.* An epidemiological analysis of a canine-biopsies database compiled by a diagnostic histopathology service. **Preventive veterinary medicine**, Elsevier, v. 51, n. 1-2, p. 125–136, 2001.

RIZK, S. L.; SKY-PECK, H. H. Comparison between concentrations of trace elements in normal and neoplastic human breast tissue. **Cancer research**, v. 44, n. 11, p. 5390–5394, 1984.

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

RYAN, E. A.; FARQUHARSON, M. J. The differentiation between malignant and non-malignant breast tissues using elastic and inelastic scattering of synchrotron radiation. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment**, Elsevier, v. 619, n. 1-3, p. 379–384, 2010.

RYAN, E. A.; FARQUHARSON, M. J.; FLINTON, D. M. The use of compton scattering to differentiate between classifications of normal and diseased breast tissue. **Physics in Medicine & Biology**, IOP Publishing, v. 50, n. 14, p. 3337, 2005.

SAKAMOTO, S. S. **Identificação de elementos traço em tumores de mama de cadelas e sua correlação com histopatologia e prognóstico de vida**. Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2011.

SCHNEIDER, B. P.; MILLER, K. D. Angiogenesis of breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, American Society of Clinical Oncology, v. 23, n. 8, p. 1782–1790, 2005.

SCHNEIDER, R. Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer. **Cancer**, Wiley Online Library, v. 26, n. 2, p. 419–426, 1970.

SCHWARTZ, M. K. Role of trace elements in cancer. **Cancer research**, AACR, v. 35, n. 11 Part 2, p. 3481–3487, 1975.

SILVA, M. *et al.* Determination of ca, fe, cu and zn and their correlations in breast cancer and normal adjacent tissues. **X-Ray Spectrometry: An International Journal**, Wiley Online Library, v. 38, n. 2, p. 103–111, 2009.

SILVA, M. P. *et al.* Trace elements as tumor biomarkers and prognostic factors in breast cancer: a study through energy dispersive x-ray fluorescence. **BMC Research Notes**, BioMed Central, v. 5, n. 1, p. 194, 2012.

SILVA, M. P. d. **Papel dos elementos-traço em neoplasias mamárias: estudo através de técnicas espectroscópicas de fluorescência de raios X e análises imunohistoquímicas**. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2011.

SILVA, M. P. d. *et al.* Role of ca, fe, cu and zn in breast cancer: study by x-ray fluorescence techniques and immunohistochemical analysis. **X-Ray Spectrometry**, Wiley Online Library, v. 42, n. 4, p. 303–311, 2013.

SILVERA, S. A. N.; ROHAN, T. E. Trace elements and cancer risk: a review of the epidemiologic evidence. **Cancer Causes & Control**, Springer, v. 18, n. 1, p. 7–27, 2007.

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

SOLAI, F. *et al.* Comparison of plasma matrix metalloproteases 2, 3, 9 in breast carcinomas and fibroadenomas. **Il Giornale di chirurgia**, v. 31, n. 8-9, p. 365–367, 2010.

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

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.

SORENMO, K. U.; WORLEY, D. R.; GOLDSCHMIDT, M. H. Tumors of the mammary gland. In: **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology (Fifth Edition)**. Philadelphia: Elsevier, 2013. p. 538–556.

TERTIAN, R.; CLAISSE, F. **Principles of quantitative X-ray fluorescence analysis**. Heyden and Son Ltd, 1982.

TOMAL, A. **Medidas experimentais dos coeficientes de atenuação de tecidos mamários e sua influência no contraste e dose mamográfica**. Dissertação (Mestrado) — Universidade de São Paulo, 2007.

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

TURNER, J. E. **Atoms, radiation, and radiation protection**. New York: John Wiley & Sons, 2008.

UNDERWOOD, E. J. *et al.* **Trace elements in human and animal nutrition. Ed. 3**. New York: New York, USA, Academic Press, Inc., 1971.

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.

VALENTE, S. C. Q.; NOGIMA, H.; CARVALHO, W. de P. **Estrutura da Matéria II**. 2013.

VISAN, S. *et al.* In vitro comparative models for canine and human breast cancers. **Clujul Medical**, Universty of Medicine and Pharmacy of Cluj-Napoca, Romania, v. 89, n. 1, p. 38, 2016.

ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DA CEUA



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



PROJETO DE PESQUISA / AULA PRÁTICA

DADOS DO PROJETO		Protocolo nº 2017-028
Título: CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO E A VARIAÇÃO DA DENSIDADE ELETRÔNICA EM TUMORES MAMÁRIOS CANINOS.		
Pesquisador / Professor: ANDRÉ LUIZ COELHO CONCEIÇÃO		
Área temática: 3.130.000-6 – ENGENHARIA BIOMÉDICA		
Instituição: UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ – CAMPUS CURITIBA		
Financiamento: CAPES		
PARECER CONSUBSTANCIADO DA CEUA	Data da relatoria: 12/12/2017	
Apresentação do Projeto: Trata-se de projeto no qual os pesquisadores buscam avaliar aspectos físico-químicos de tumores mamários caninos em relação a tecido sadio. Para tanto, serão utilizadas oito amostras de tumores cedidas pelo Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Paraná nas quais serão analisados a presença de ferro, cobre e zinco e sua disposição nas amostras por meio de fluorescência de raios X. As amostras não serão coletadas para este projeto, elas já fazem parte do acervo do laboratório de patologia e após uso serão devolvidas ao laboratório.		

Objetivo: Segundo o projeto de pesquisa apresentado o estudo tem como objetivo: "Identificar as principais alterações químicas e morfológicas nas amostras de tecido mamário canino acometido por patologias iniciais, além de informações metabólicas e biológicas envolvidas no processo carcinogênico."	
Avaliação dos Riscos e Benefícios: O projeto apresenta como potencial benefício a determinação de parâmetros físico-químicos de tumores mamários caninos e suas possíveis aplicações em futuros métodos de diagnóstico e tratamento. O projeto parece não apresentar riscos aos pesquisadores, ao meio ambiente e, considerando que as amostras são provenientes de arquivo de peças cirúrgicas, não haverá riscos para animais.	
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa / Aula prática: O objetivo da pesquisa apresenta mérito científico. Considerando que as amostras são provenientes de arquivo de peças cirúrgicas o projeto não representará risco à saúde animal.	
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Foram apresentados: 1) Requerimento de análise do projeto pelo CEUA. 2) Formulário unificado para submissão de projeto. 3) Projeto de pesquisa. 4) Declaração de não início do projeto. 5) Declaração assinada e contendo nº do CRMV do médico veterinário responsável. 6) Declaração de anuência da diretoria competente no modelo do CEUA-UTFPR.	
Vigência do projeto:	05/02/2018 a 04/02/2019
Espécie/linhagem:	<i>Canis lupus familiares</i>
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica

Espécie/linhagem:	<i>Canis lupus familiares</i>
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Número de animais:	4 animais (8 amostras)
Peso/Idade:	Pequeno e médio porte
Sexo:	Fêmeas
Origem:	Amostras do acervo de peças cirúrgicas do Laboratório de Patologia Veterinária da UFPR.
Considerações Finais a Critério da CEUA: Todos os procedimentos devem seguir a lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008.	

13/12/20

PR - 0131694 - Parecer

https://sei.utfpr.edu.br/sei/controlador.php?acao=documento_i

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Não há.
Situação do Parecer: Aprovado.

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO E A VARIAÇÃO DA DENSIDADE ELETRÔNICA EM TUMORES MAMÁRIOS CANINOS.", protocolo nº 2017/28, 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 12/12/2017.

Dois Vizinhos, 13 de dezembro de 2017.

Assinado por:

Nédia de Castilhos Ghisi

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



Documento assinado eletronicamente por **NÉDIA DE CASTILHOS GHISI, PRESIDENTE DE COMISSÃO**, em 13/12/2017, às 17:20, 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_acesso_externo=0, informando o código verificador **0131694** e o código CRC **1D9B0DCA**.

ANEXO B – PROTOCOLO DE PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Projeto realizado pela empresa CTHC - Centro Técnico Histopatológico de Curitiba – CNPJ: 19950477/0001-66.

Representante legal Daniel Matias Neto.

TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

1 - Fixador:

Formalina a 10%.

2 - Tempo de fixação:

24 – 48 horas.

3 - Processamento:

Processamento automatizado dos tecidos, ocorrendo desidratação (08 horas), clareamento (02 horas) e infiltração da parafina fundida a 65 C (04 horas), totalizando um período de 14 horas.

4 – Inclusão:

As amostras foram incluídas com parafina fundida a 65 C em molde metálico e cassete plástico, gerando blocos permanente dos tecidos ao solidificar.

5- Microtomia:

1ª etapa:

Foram obtidos cortes em 04 micrometros de espessura, previamente desbastados e refrigerados, colhido fitas em parafina e esticadas em banho-histológico a 50 C em laminas de vidro, para posterior desparafinização e coloração de hematoxilina e eosina.

2ª etapa:

Foram obtidos cortes em 50 micrometros de espessura, desbastados e refrigerados, colhido fitas em parafina e esticadas em banho-histológico a 50 C em laminas de vidro cobertas por papel filme Mylar. Nessa etapa os tecidos não foram desparafinizados e nem corados.