UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FFCLRP - DEPARTAMENTO DE FÍSICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA APLICADA À MEDICINA E BIOLOGIA

ALEX MALEZAN

**Estudo da distribuição de elementos-traço em
neoplasias mamárias através de micro-fluorescência de
raios X induzida por radiação síncrotron**

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Doutor em Ciências, Área: Física Aplicada à
Medicina e Biologia.

Ribeirão Preto - SP

2018

ALEX MALEZAN

**Estudo da distribuição de elementos-traço em
neoplasias mamárias através de micro-fluorescência
de raios X induzida por radiação síncrotron**

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Área de Concentração:

Física Aplicada à Medicina e Biologia.

Orientador:

Martin Eduardo Poletti.

Versão original

Disponível na FFCLRP - USP

Ribeirão Preto - SP

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Malezan, Alex

Estudo da distribuição de elementos-traço em neoplasias mamárias através de micro-fluorescência de raios X induzida por radiação síncrotron / Alex Malezan; orientador: Martin Eduardo Poletti. Ribeirão Preto - SP, 2018.

120 f.:il.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2018.

1. Radiação síncrotron. 2. Elementos-traço. 3. Câncer de mama. 4. Micro-fluorescência de raios X

Nome: MALEZAN, Alex

Título: Estudo da distribuição de elementos-traço em neoplasias mamárias através
de micro-fluorescência de raios X induzida por radiação síncrotron

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Doutor
em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Para minha amada, que de alguma forma conseguiu suportar a distância por 6 anos, me confortar nos momentos de angústia e vislumbrar um futuro no qual estaríamos lado a lado.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Martin, pela compreensão, dedicação e valiosa orientação em todas as etapas deste trabalho;

Ao Prof. Alfredo Ribeiro Silva, por disponibilizar sua infra-estrutura e conhecimento, imprescindíveis na elaboração deste trabalho;

Às técnicas de laboratório Laura Midori Kawasse e Márcia Ap. Ferreira Oliva pelo suporte oferecido durante o preparo de de amostras;

Ao Dr. Carlos Alberto Pérez, pelo suporte técnico na linha de luz síncrotron;

Ao Prof. Roberto Daniel Pérez, pela acolhida em Córdoba;

A Ândrea, meu grande amor, por toda atenção e carinho dedicados a nossa relação e por servir de fortaleza nos momentos mais obscuros;

A minha mãe, Alcione, mulher amorosa e sensível que faz crescer uma bela árvore de algo que parecia nada além de um galho seco e morto;

A minha irmã, amiga e companheira desde junho de 1986, por sempre cuidar e zelar pelo bem de todos ao seu redor;

Ao meu sobrinho Bernardo, que tão pequeno enche nossos corações de alegria;

Aos meus sogros, Fátima e João, por me acolherem no seio da família como um dos seus;

Ao casal Gileade e Helena, pelo sorriso completo, amizade inestimável, pedaladas de domingo e pelo sofá-cama confortável;

Ao amigo Leonardo Soares, que esteve comigo em muitas coletas de amostras, almoços e cafés-da-tarde, sempre disposto a ajudar, escutar compartilhar ideias;

Aos amigos do grupo de Física Radiológica e Dosimetria: Júlio, Michel, Daniel, Jéssica, Beatriz e Alessandra, pelos incontáveis cafés;

Aos professores do curso de pós-graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia, do Departamento de Física e Matemática da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, que contribuíram para minha formação;

Às secretárias do Departamento Física, em especial à Nilza, secretária do programa de pós-graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia por todo suporte durante o período de pós-graduação;

Aos meus queridos amigos de república: Thays, Carol, Rodrigo, Amanda e Marcelo por todos os momentos felizes;

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, por disponibilizar a linha de luz utilizada neste trabalho;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos que permitiu a realização deste trabalho;

A Universidade de São Paulo, pela oportunidade.

"Época triste a nossa, em que é mais fácil
quebrar um átomo do que um preconceito."

Albert Einstein

RESUMO

MALEZAN, A. **Estudo da distribuição de elementos-traço em neoplasias mamárias através de micro-fluorescência de raios X induzida por radiação síncrotron.** 2018. 120 f. Tese (Doutorado - Programa de Pós-graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP, 2018.

Neste trabalho foram avaliadas a distribuição dos elementos-traço, Ca, Fe, Cu e Zn em tecidos mamários normais e neoplásicos através da técnica de micro-fluorescência de raios X induzida por radiação síncrotron. Para tal estabelecemos uma metodologia de reconstrução espectral capaz de aferir, de maneira indireta, a composição do espectro de excitação de uma fonte de radiação síncrotron diretamente no plano da amostra. Este conhecimento é fundamental para a quantificação de elementos-traço a partir do modelo de parâmetros fundamentais, utilizado neste trabalho. Outro aspecto importante deste modelo é a composição da matriz biológica. Foram comparadas duas metodologias de preparação de amostras de tecido mamário para medidas de micro fluorescência de raios X, e suas influências sobre a matriz tecidual. A primeira metodologia utilizando amostras in natura crio-seccionadas e a segunda utilizando amostras incluídas em parafina. Os resultados mostraram que a inclusão de amostras em parafina é uma técnica viável para o estudo da distribuição de elementos-traço em tecidos mamários.

Foram avaliados os aspectos histológicos da distribuição dos elementos-traço através da comparação entre os mapas de micro-fluorescência de raios X e lâminas histológicas. Os resultados mostraram que em tecidos normais, regiões glandulares possuem concentrações mais elevadas dos elementos Ca, Fe e Zn quando comparadas ao estroma conjuntivo, ao passo que o tecido tumoral apresenta maior concentração destes elementos em regiões de proliferação de células epiteliais. O elemento Cu apresenta uma distribuição mais uniforme que os demais elementos em ambos os tipos de tecido, não sendo possível distinguir tais regiões a partir de sua distribuição. Além disso, sua baixa concentração gera mapas com elevados níveis de ruído, que dificultam ou mesmo impossibilitam sua avaliação. Cores primárias foram utilizadas para avaliar a correlação espacial entre os elementos-traço. Os resultados apontam forte correlação entre os elementos Ca e Zn e uma menor correlação entre estes e o elemento Fe. O elemento Cu não mostra correlação espacial com os demais. Resultados macroscópicos mostraram correlação estatisticamente significativa entre Ca-Zn para tecidos normais, apontando para a presença regular de metaloproteinases

de matriz (MMPs) nestes tecidos. Já tecidos tumorais mostraram correlação estatisticamente significativa entre os elementos Ca-Cu e Cu-Zn, apontando para a elevação do processo angiogênico e invasão tumoral.

Palavras-chave: 1. Radiação síncrotron. 2. Elementos-traço. 3. Câncer de mama. 4. Micro-fluorescência de raios X

ABSTRACT

MALEZAN, A. **Study on spacial distribution of trace elements in breast neoplastic tissues using micro synchrotron radiation induced X-ray emission.** 2018. 120 f. Thesis (Ph.D. - Postgraduate program in Physics Applied to Medicine and Biology) - Faculty of Philosophy, Sciences and Literature, University of São Paulo, Ribeirão Preto - SP, 2018.

The distribution of the trace elements, Ca, Fe, Cu and Zn in normal and neoplastic mammary tissues was evaluated through the X-ray microfluorescence induced by synchrotron radiation. To this end, we created a methodology capable of indirectly measuring the composition of the excitation spectrum of a synchrotron radiation source directly in the sample plane. This knowledge is critical for the quantification of trace elements using the fundamental parameters model employed in this work. Another important aspect of this model is the composition of the biological matrix. Two sample preparation methodologies for X-ray microfluorescence measurements and their influence on the tissue matrix were compared. The first methodology used fresh samples cryo-sectioned, and the second used paraffin embedded samples. The results showed that paraffin embedded samples are feasible for the study of trace elements distribution in mammary tissues.

The histological aspects of the trace element distribution were evaluated through the comparison between X-ray microfluorescence maps and histological slides. The results showed that in normal tissues, glandular regions have higher concentrations of the elements Ca, Fe and Zn than stromal tissue, whereas a higher concentration of these elements was observed in regions of proliferation of epithelial cells. Cu has a more uniform distribution than the other elements in both tissue types, and it is not possible to distinguish such regions from the Cu distribution. In addition, its low concentration generates maps with high noise levels making evaluation difficult or even impossible. Primary colors were used to evaluate the spatial correlation between trace elements. The results indicate a strong correlation between Ca and Zn and a lower correlation between these and Fe. Cu does not show spatial correlation with the others. Macroscopic results showed a statistically significant correlation between Ca-Zn for normal tissues, pointing to the regular presence of matrix metalloproteinases (MMPs) in these tissues. Tumor tissues showed a statistically significant correlation between the Ca-Cu and Cu-Zn elements, pointing to the elevation of the angiogenic process and tumor invasion.

Key-words: 1. Synchrotron radiation. 2. Trace elements. 3. Breast cancer. 4. X-ray microfluorescence

LISTA DE FIGURAS

2.1	Tabela periódica com destaque para os elementos essenciais ou possivelmente essenciais para os seres humanos.	8
2.2	Esquema contendo os principais componentes de uma fonte de Luz Síncrotron.	20
2.3	Esquema de focalização utilizando espelhos de Kirkpatrick-Baez, onde um feixe de raios X emitidos por uma fonte F é focalizado sobre uma amostra A.	21
2.4	Esquema de focalização utilizando espelhos de Kirkpatrick-Baez, onde um objeto posicionado sobre o ponto focal F_1 é focalizado sobre o ponto focal F_2	22
2.5	Representação pictórica do espalhamento Compton.	24
2.6	Seção de choque de Klein-Nishina diferencial em ângulo.	26
2.7	Ilustração esquemática do efeito fotoelétrico.	27
2.8	Linhas espectrais quanticamente permitidas pelas regras de seleção. .	28
2.9	Principais componentes dos detectores de radiação. A formação de pares elétron-buraco na zona de depleção está ilustrada com sinal + para buracos e - para elétrons.	29
2.10	Espectro de fluorescência obtido a partir de uma amostra de tecido mamário tumoral.	31

3.1	Esquema contendo os principais componentes de um sistema de $\mu - XRF$, com sistema de focalização, amostra montada sobre uma mesa com movimentos em XYZ e detector.	37
3.2	Modelo geométrico utilizado por Hanson (1986b) para o cálculo das seções de choque sobre aberturas circulares.	40
3.3	Seções de choque de espalhamento coerente, normalizadas pelo fator de forma atômico, para ângulo de espalhamento de 90° , integradas sobre o ângulo sólido de uma pequena abertura circular (detector). . .	44
3.4	Seções de choque de espalhamento incoerente, normalizadas pelo fator de forma atômico, para fótons de 15 KeV, espalhados em ângulo de 90° , integradas sobre o ângulo sólido de uma pequena abertura circular (detector).	45
3.5	Esquema das componentes utilizadas no cálculo da fluorescência primária.	47
4.1	Comparação entre o espectro aferido por meio do espalhamento em uma amostra pura de PMMA e o espectro reconstruído através da metodologia proposta neste trabalho.	55
4.2	Comparação entre o espectro aferido por meio de fotodiodo e o espectro reconstruído através da metodologia proposta neste trabalho. . .	57
4.3	Sensibilidade e limite de detecção para os elementos Ca, Fe, Cu e Zn em uma amostra de tecido mamário <i>in natura</i> crio-seccionada.	60
4.4	Distribuição dos elementos Ca, Fe, Cu e Zn em um amostras de tecido mamário tumoral e normal. As amostras foram medidas na forma <i>in natura</i> e crio-seccionada.	61

4.5	Comparação entre os espectros obtidos para duas amostras pareadas em parafina e <i>in natura</i> . As linhas verticais referenciam as energias de emissão de cada elemento.	63
4.6	Mapas 2D da distribuição dos elementos-traço Ca, Fe, Cu e Zn. Ambos os mapas correspondem à mesma amostra. As imagens à direita foram obtidas a partir do protocolo de inclusão em parafina e as amostras à esquerda foram obtidas a partir da metodologia de crio-seccionamento.	64
4.7	Comparação entre os valores médios da intensidade de fluorescência para os elementos selecionados em cada protocolo de preparação de amostras.	65
4.8	Matriz de dispersão de pontos utilizada no cálculo das correlações da Amostra 2 (Tabela??). Acima da diagonal principal temos o tecido <i>in natura</i> crio-seccionado e abaixo temos o tecido incluído em parafina.	68
4.9	Aspectos morfológicos da distribuição dos elementos-traço para amostras <i>in natura</i> crio-seccionada (superior) e incluídas em parafina (inferior).	69
4.10	Distribuição dos valores médios da intensidade de fluorescência para os elementos selecionados em amostras de tecido tumoral ($n = 34$) e normal ($n = 28$).	70
4.11	Comparação entre lâmina HE de uma amostra de tecido mamário normal e mapas de fluorescência para cada elemento. A correlação entre os elementos Ca, Fe e Zn está representada na figura "Corr". . .	75
4.12	Comparação entre lâmina HE de uma amostra de tecido mamário normal e mapas de fluorescência para cada elemento. A correlação entre os elementos Ca, Fe e Zn está representada na figura "Corr". . .	76

4.13	Comparação entre lâmina H&E de uma amostra de tecido mamário tumoral e mapas de fluorescência para cada elemento. A correlação entre os elementos Ca, Fe e Zn está representada na figura "Corr". . .	77
4.14	Comparação entre lâmina H&E de uma amostra de tecido mamário tumoral e mapas de fluorescência para cada elemento. A correlação entre os elementos Ca, Fe e Zn está representada na figura "Corr". . .	77
4.15	Mapas de correlação entre os elementos-traço em uma amostra de tecido mamário normal.	78
4.16	Mapas de correlação entre os elementos-traço em uma amostra de tecido mamário tumoral.	79
4.17	Mapas de correlação entre os elementos-traço em uma amostra de tecido mamário tumoral.	80

LISTA DE TABELAS

4.1	Comparação entre as concentrações de elementos (ppm) em material de referência de sangue bovino (IAEA A-13) obtidas neste trabalho e valores certificados.	58
4.2	Comparação entre as concentrações de elementos (ppm) em material de referência de fígado bovino (NIST 1577b) obtidas neste trabalho e valores certificados.	59
4.3	Comparação entre as concentrações de elementos (ppm) em material de referência de feno (IAEA V-10) obtidas neste trabalho e valores certificados.	59
4.4	Comparação entre as correlações dos elementos-traço para amostras <i>in natura</i> (acima da diagonal principal) e em parafina (abaixo da diagonal principal).	67
4.5	Comparação dos resultados obtidos neste trabalho com a literatura. .	72
4.6	Comparação entre as correlações de elementos-traço em tecidos normais e tumorais.	79

SUMÁRIO

Lista de Figuras	xiv
Lista de Tabelas	xviii
1 Introdução	1
2 Fundamentação Teórica	5
2.1 Câncer de mama	5
2.1.1 Carcinoma <i>in situ</i>	6
2.1.2 Carcinoma invasivo	6
2.1.3 Câncer de mama metastático	7
2.2 Elementos-traço	7
2.2.1 Cálcio	9
2.2.2 Ferro	10
2.2.3 Cobre	13
2.2.4 Zinco	15
2.3 Detecção de elementos-traço em tecidos mamários utilizando XRF . .	17
2.4 Luz Síncrotron	18
2.4.1 Fonte de Luz Síncrotron	18
2.4.2 Propriedades da Luz Síncrotron	20
2.4.3 Conjunto focalizador de Kirkpatrick-Baez	21
2.5 Interações da radiação com a matéria	23

2.5.1	Espalhamento	23
2.5.1.1	Espalhamento coerente	23
2.5.1.2	Espalhamento incoerente	23
2.5.2	Absorção	25
2.5.2.1	Efeito fotoelétrico	25
2.5.3	Desexcitação	27
2.5.3.1	Fluorescência	27
2.6	Detectores semicondutores	28
2.7	Composição do espectro de Fluorescência	30
2.7.1	Pico - Emissão de raios X característicos	30
2.7.2	Background - Espalhamento	32
2.8	Relação entre a área do pico e a concentração	32
2.8.1	Grossa	32
2.8.2	Delgada	33
2.8.3	Intermediária	33
3	Materiais e Métodos	34
3.1	Casuística	34
3.2	Preparo de Amostras	35
3.2.1	Inclusão de tecido em parafina	35
3.2.2	Tecido <i>in natura</i> <i>crio-seccionado</i>	36
3.2.3	Amostras Padrão	36
3.3	Arranjo Experimental	36
3.3.1	Tecido Mamário	37
3.3.2	Amostras Padrão	38
3.4	Determinação do espectro de excitação por espalhamento	38

3.4.1	Reconstrução do espectro incidente a partir da radiação espalhada	38
3.4.2	Utilização da radiação polarizada em XRF	39
3.4.2.1	Implementação do algoritmo de reconstrução das seções de choque polarizadas	44
3.4.3	Validação do Espectro de Excitação	46
3.5	Aspectos quantitativos	46
3.5.1	Efeitos de matriz	46
3.5.2	Relação entre a intensidade de fluorescência e a concentração do elemento fluorescente	47
3.5.2.1	Descrição do modelo de Parâmetros Fundamentais	47
3.5.2.1.1	Amostras grossas	50
3.5.2.1.2	Amostras delgadas	51
3.5.2.1.3	Amostas intermediárias	52
3.5.3	Limites de Detecção	53
3.5.4	Correlação entre elementos-traço em tecidos mamários	53
3.6	Aspectos qualitativos	54
3.6.1	Comparação entre os protocolos de preparo de amostra	54
3.6.2	Aspectos histológicos da distribuição de elementos-traço	54
4	Resultados e Discussões	55
4.1	Determinação do espectro de excitação	55
4.2	Aspectos Quantitativos	56
4.2.1	Parâmetros fundamentais aplicados a amostras biológicas	56
4.2.1.1	Quantificação de elementos-traço em padrões homogêneos	57

4.2.1.2	Quantificação de elementos-traço em tecidos mamários <i>in natura</i>	59
4.2.1.2.1	Sensibilidade e Limites de Detecção	59
4.2.2	Quantificação da distribuição dos elementos-traço em amostra de tecido mamário <i>in natura</i>	60
4.3	Aspectos qualitativos	62
4.3.1	Comparação entre os protocolos de preparo de amostra	62
4.3.1.1	Correlação entre elementos-traço em amostras <i>in natura</i> e amostras em parafina	66
4.3.1.1.1	Aspectos morfológicos dos mapas de fluorescência	68
4.3.2	Distribuição dos elementos-traço em amostras normais e tumoriais	70
4.3.2.1	Cálcio	71
4.3.2.2	Ferro	71
4.3.2.3	Cobre	73
4.3.2.4	Zinco	73
4.3.3	Aspectos histológicos da distribuição dos elementos-traço	74
4.3.3.1	Mapas de amostras parafina X histológico	74
4.3.3.1.1	Tecido normal	74
4.3.3.1.2	Tecido tumoral	75
4.3.3.2	Mapas de correlação entre elementos-traço	75
4.3.3.2.1	Tecido normal	76
4.3.3.2.2	Tecido tumoral	76
4.3.3.2.3	Correlação entre elementos-traço em tecido mamário em nível macroscópico	78

5	Conclusões e perspectivas	82
5.1	Determinação do espectro de excitação	82
5.2	Distribuição e correlação dos elementos-traço	83
5.3	Metodologias de preparação de amostras	83
	Referências Bibliográficas	85

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o tipo mais frequente entre as mulheres. Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) a estimativa para 2018 é de 59700 novos casos e 14388 óbitos em decorrência da doença. O câncer de mama também acomete homens, que representam cerca de 1% dos novos casos.

O desenvolvimento do câncer está relacionado à diversos fatores de risco externos ou ambientais, como exposição à radiação ionizante (natural, médica ou ocupacional), hábitos alimentares (alta ingestão de alimentos industrializados), exposição à poluentes do ar em grandes cidades, tabagismo (El-Bayoumy, 1992), entre outros, bem como a fatores de risco internos, como mutações genéticas, envelhecimento, índice de massa corporal, ganho de peso e interações hormonais (Antoniou et al., 2008; Austoker, 2003), ou a combinação entre ambos. Entretanto estes fatores não são capazes de explicar por completo a epidemiologia do câncer de mama, fazendo-se necessária a pesquisa em novas áreas a fim de compreender a etiologia desta doença. Neste sentido, a pesquisa com elementos-traço vem ganhando espaço nos últimos anos. Elementos-traço são uma designação que compreende elementos em concentração inferior a 1000 partes por milhão (ppm). Estes elementos possuem papel central na regulação e homeostase corporais, porém quando em concentrações alteradas podem estar relacionados a uma série de desordens e

doenças, entre elas, o câncer de mama. Existem diversas técnicas e ferramentas disponíveis para a detecção e quantificação de elementos-traço em tecidos humanos. Garg et al. (1994) e Ng et al. (1997) utilizaram análise por ativação neutrônica para estudar a concentração de elementos-traço em tecido de mama, enquanto Raju et al. (2006) utilizaram a técnica de emissão de raios X induzida por partículas (PIXE) para o mesmo propósito e Kuo et al. (2002) utilizaram a técnica de espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP-AES) para quantificar elementos-traço no soro sanguíneo de pacientes com câncer de mama. Técnicas baseadas em fluorescência de raios X (XRF) são capazes de fornecer resultados com baixos limites de detecção ao mesmo tempo em que preservam a amostra do dano causado por feixes de partículas carregadas, possibilitando análise posterior da mesma amostra por uma técnica diversa (Lankosz et al., 2004). Os principais desafios das técnicas de análise baseadas em XRF estão relacionados à distribuição espectral do feixe de excitação e a composição da amostra: O modelo de parâmetros fundamentais, utilizado como ferramenta quantitativa deste trabalho, relaciona a intensidade de um pico de fluorescência com a concentração do elemento fluorescente na amostra, através da solução de um modelo analítico de interações entre a radiação e a matéria. Para tal, precisamos fornecer uma descrição precisa tanto do feixe de excitação, quanto da composição da matriz amostral (Van Grieken and Markowicz, 2002). Em μ -XRF, a determinação do feixe de excitação não pode ser feita realizada de maneira direta (por exemplo através de um detector dispersivo em energia), pois o alto fluxo de fótons inviabiliza as medidas, além de significar risco de dano ao equipamento. Já a composição da matriz, quando tratamos de amostras biológicas, apresenta grande variabilidade natural, dificultando sua determinação.

Esta pesquisa possui quatro metas centrais:

- i Desenvolver e testar um método indireto de obtenção da distribuição espectral da fonte de radiação para μ -XRF;

- ii Mapear e quantificar os elementos-traço Ca, Fe, Cu, e Zn em amostras padrão e tecidos biológicos;
- iii Estabelecer o melhor protocolo de preparo de amostras para μ -XRF em tecido mamário;
- iv Analisar a correlação entre os elementos-traço de interesse em tecidos mamários normais, benignos e malignos;

O trabalho está dividido da seguinte forma:

No capítulo 2 é apresentada a fundamentação teórica sobre a qual se sustenta este trabalho. O capítulo se inicia com a descrição dos principais processos envolvidos na gênese e etiologia do câncer de mama, com destaque ao papel dos elementos-traço nestes processos. Na sequência, a fluorescência de raios X é mostrada como uma forma de detecção destes elementos-traço, e os aspectos específicos da técnica utilizada neste trabalho, como a descrição das fontes de radiação síncrotron, conjunto focalizador de raios X, interações da radiação com a matéria, detectores semicondutores, composição do espectro de fluorescência e relação entre a área do pico e a concentração dos elementos-traço fluorescentes são apresentadas.

No capítulo 3 são descritas as amostras de tecido mamário utilizadas neste trabalho, bem como as metodologias de preparo utilizadas. São descritas também as amostras-padrão, e suas formas de preparo, bem como a metodologia empregada na determinação do espectro de excitação e sua aplicação levando em consideração um feixe de radiação polarizada. Na sequência é apresentado o modelo de parâmetros fundamentais a como ferramenta de análise quantitativa, a metodologia envolvida no cálculo dos limites de detecção e os aspectos qualitativos analisados.

O capítulo 4 foi reservado para a apresentação e discussão dos resultados obtidos neste trabalho. Este capítulo se inicia a determinação do espectro de

excitação, seguida pelos aspectos quantitativos e qualitativos obtidos através dos experimentos de $\mu - XRF$.

O capítulo 5 é reservado para as conclusões obtidas e perspectivas futuras deste trabalho.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Câncer de mama

O câncer de mama é um conjunto de doenças que afetam a glândula mamária, composto por um micro ambiente altamente complexo, formado de células tumorais, fibroblastos, adipócitos, células imunológicas e endoteliais (Jezierska-Drutel et al., 2013). Diversos fatores de risco estão associados ao câncer de mama. Entre 5% e 10% dos casos de câncer de mama são causados por mutações genéticas hereditárias, dentre as quais se destacam as mutações no gene BRCA1 e BRCA2 (Veronesi et al., 2005). Certas lesões não proliferativas da mama, como fibrose, adenose e mastites (Hartmann et al., 2005) e algumas lesões proliferativas, como papiloma intraductal, hiperplasia ductal e adenose esclerosante também elevam o risco de câncer de mama (Kamińska et al., 2015). No entanto, cerca de 85% dos casos da doença estão associados a fatores de risco pessoais e do estilo de vida, dentre os quais se destacam o uso prolongado de contraceptivos, terapia de reposição hormonal, consumo excessivo de álcool, obesidade e sedentarismo (Kamińska et al., 2015). De maneira geral, a incorporação de hábitos saudáveis ao estilo de vida pode representar uma redução no risco de desenvolvimento do câncer (McTiernan et al., 1998), entretanto não existe uma ferramenta preventiva totalmente eficaz. Neste sentido, o diagnóstico precoce

é considerado uma das formas mais relevantes de combate ao câncer.

Os tumores de mama podem estar presentes nas diferentes regiões da glândula mamária, como dutos, lóbulos ou estroma conjuntivo, sendo classificados em dois grupos de acordo com o tipo de célula da qual se iniciou: carcinoma ou sarcoma. Os carcinomas são tumores que surgem a partir de células do epitélio mamário que revestem os dutos e os lóbulos mamários. Os sarcomas são tumores com incidência mais rara (menos de 1% dos casos), que surgem a partir dos miofibroblastos e células dos vasos sanguíneos, pertencentes ao estroma mamário Feng et al. (2018). Os carcinomas mamários podem ser divididos em 3 subgrupos: *in situ* (ou não invasivos), invasivos (ou infiltrantes) e metastático.

2.1.1 Carcinoma *in situ*

São caracterizadas por células de crescimento lento, que se desenvolvem nos dutos (carcinoma ductal *in situ*) e nos lóbulos (carcinoma lobular *in situ*) mamários (Polyak, 2007). Se não forem diagnosticados e tratados adequadamente, carcinomas *in situ* podem se tornar invasivos.

2.1.2 Carcinoma invasivo

Os carcinomas invasivos são caracterizados por células de crescimento acelerado, que atravessam as paredes dos dutos (carcinoma ductal invasivo) ou dos lóbulos (carcinoma lobular invasivo), se espalhando pelo estroma mamário. Quando não são tratados de maneira adequada, os carcinomas invasivos podem atingir outros sítios do corpo, como os linfonodos, ou mesmo órgãos distantes, alcançando a classificação de câncer de mama metastático Feng et al. (2018).

2.1.3 Câncer de mama metastático

O câncer de mama metastático, também conhecido como câncer de estágio 4 ou avançado, é um tipo de tumor que se espalhou para outros órgãos. Pode ser diagnosticado já na sua forma metastática ou ter se originado a partir de células remanescentes de um tumor primário tratado meses ou anos antes. Trata-se de uma forma comum da doença, que acomete cerca de 30% das pacientes diagnosticadas na fase inicial do câncer de mama (Kamińska et al., 2015).

2.2 Elementos-traço

Elementos-traço ocorrem naturalmente no organismo em concentrações muito baixas, na ordem de dezenas ou centenas de ppm (partes por milhão). Em concentrações normais são responsáveis por uma ampla variedade de processos biológicos como ativação ou inibição de reações enzimáticas (Huang et al., 1999), geração e supressão de radicais livres (Halliwell and Cross, 1994), regulação do crescimento celular e angiogênese (Finney et al., 2009; Weinberg, 1994) entre outros. Quando encontrados em concentrações alteradas estes elementos têm sido relacionados ao processo carcinogênico (Al-Ebraheem et al., 2014; Leitão et al., 2014; Basu et al., 2013; Silva et al., 2009; Pasha et al., 2008; Carvalho et al., 2007; Yaman, 2006), entretanto o mecanismo de ação destes elementos nos tecidos neoplásicos ainda não é completamente conhecido e sua análise vem ganhando espaço nos últimos anos nas pesquisas sobre o câncer de forma geral (Kohzadi et al., 2017; Ceko et al., 2015; Wandzilak et al., 2015; Leitão et al., 2014; Mulware, 2013; Basu et al., 2013; Pasha et al., 2008; Gurusamy and Davidson, 2007; Navarro Silvera and Rohan, 2007; Carvalho et al., 2007; Cunzhi et al., 2003; Zowczak et al., 2001; Von Czarnowski et al., 1997; Margalioth et al., 1983).

<div><div></div>Essencial para humanos</div> <div><div></div>Possivelmente essencial para humanos</div> <div><div></div>Não essencial para humanos</div>																	
1																	18
1 H	2											13	14	15	16	17	2
3 Li	4 Be											5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne
11 Na	12 Mg	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar
19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr
37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe
55 Cs	56 Ba	57 La	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn
87 Fr	88 Ra	89 Ac	104 Rf	105 Db	106 Sg	107 Bh	108 Hs	109 Mt	110 Ds	111 Rg	Uub	Uut	Uuq	Uup			

Figura 2.1: Tabela periódica com destaque para os elementos essenciais ou possivelmente essenciais para os seres humanos.

A Figura 2.1 mostra a tabela periódica dos elementos com destaque para os elementos sabidamente essenciais para os seres humanos e elementos possivelmente essenciais. Elegemos 4 elementos (Ca, Fe, Cu e Zn) dentre os destacados na Figura 2.1 como objetos deste trabalho, devido ao protagonismo que exercem na homeostase humana de forma geral, e no câncer de mama, de forma específica (Kunitake et al., 2018; Mendes et al., 2017; Hassan et al., 2017; Hashemi et al., 2017; Ding et al., 2015; Babaknejad et al., 2014; Al-Ebraheem et al., 2014; Silva et al., 2012; da Silva et al., 2012; Grattan and Freake, 2012; Al-Ebraheem et al., 2010, 2009; Kelleher et al., 2009; Silva et al., 2009; Farquharson et al., 2009; Sisman et al., 2009; Farquharson et al., 2008, 2007; Kabat and Rohan, 2007; Majewska et al., 2007; Cui et al., 2007; Ebrahim et al., 2007; Kubala-Kukuś et al., 2007; Hashemi et al., 2007; Siddiqui et al., 2006; Yaman, 2006; Geraki et al., 2004b; Farquharson and Geraki, 2004; Kuo et al., 2002; Geraki et al., 2002; Morgan et al., 2001; Huang et al., 1999; Ng et al., 1997; Garg et al., 1994; Gupta et al., 1991).

2.2.1 Cálcio

Cálcio é um elemento essencial para os seres humanos, necessário à manutenção das funções e estruturas de todas as células vivas (Epstein et al., 1986). Em pessoas adultas, 99% do cálcio é encontrado nos tecidos mineralizados (ossos e dentes), o restante está distribuído no sangue, fluido extracelular e demais tecidos. Pode ser ingerido através de alimentos diários ricos em cálcio, como leite e derivados, ou através de suplementação alimentar. O cálcio exerce um importante papel no processo carcinogênico, pois participa na regulação, proliferação e diferenciação celular, bem como na apoptose (Mathiasen et al., 2002; Whitfield et al., 1979).

Experimentos com ratos mostraram que a manutenção dos níveis de cálcio intracelular reduz a proliferação de células mamárias epiteliais induzida por gordura (Jacobson et al., 1989). Além disto, o cálcio é metabolicamente relacionado à Vitamina D, sendo encontrados nas mesmas fontes alimentares. Estudos mostram que o cálcio exerce efeito anticarcinogênico através da vitamina D (Mathiasen et al., 2002). A vitamina D, por sua vez tem apresentado evidências experimentais e epidemiológicas de propriedades anticarcinogênicas. Estudos mostraram que a exposição à luz solar diminui a incidência e a mortalidade por câncer de mama (Mondul et al., 2017; Studzinski and Moore, 1995; Gorham et al., 1990; Garland et al., 1990).

O cálcio está associado à presença de microcalcificações no tecido mamário. O termo calcificação se refere à presença de materiais mineralizados em diversos tecidos no corpo. Em tecido mamário estas calcificações são formadas por oxalato de cálcio ($CaC_2O_4 \cdot 2H_2O$), chamadas de calcificação do Tipo I, e hidroxiapatita ($Ca_{10}(PO_4)_6H_2O$), chamadas de calcificação Tipo II (Frappart et al., 1984). Microcalcificações constituem um dos principais biomarcadores para lesões mamárias, tanto benignas, quanto malignas, estando presentes em aproximadamente

40% dos casos de carcinoma mamário (Castronovo and Bellahcene, 1998). Embora o valor diagnóstico da presença de calcificações esteja bem estabelecido tanto do ponto de vista histológico, quanto radiológico, não há consenso formado sobre sua gênese, podendo esta ser o resultado da calcificação de detritos celulares oriundos da lise ou apoptose (Büsing et al., 1981), ou de um processo secretório ativo das células tumorais (Ahmed, 1975), já que o epitélio mamário é capaz de concentrar íons de cálcio, essenciais na composição do leite. Estudos *in vitro* mostraram que a presença de cristais de hidroxiapatita em meio tumoral causa a mitogênese destas células (Morgan et al., 2001), e sua biodisponibilidade no meio intracelular é essencial neste processo (Cooke et al., 2003). De modo mais específico, a hidroxiapatita eleva a expressão de uma série de metaloproteinases de matriz (MMPs), dentre elas as MMPs 2, 9 e 13, reconhecidas por seu papel na degradação da matriz extracelular, permitindo o crescimento da massa tumoral, o escape de células para tecidos vizinhos e, eventualmente, tecidos distantes, formando metástases.

2.2.2 Ferro

Ferro é um elemento essencial para os seres humanos. Embora abundante no meio ambiente, sua baixa solubilidade em água limita suas funções em organismos vivos. A massa total de ferro em seres humanos adultos varia de 3-5 g, das quais, 75% é encontrada no sangue e o restante está distribuída entre fígado, medula óssea e músculos (Chitturi et al., 2015). O ferro se apresenta na dieta em duas formas: ferro heme, obtido principalmente nas carnes e seus derivados é a forma de maior biodisponibilidade, e o ferro não heme, encontrado em alimentos de origem vegetal. O ferro heme é constituinte da hemoglobina e da mioglobina (Kozlowski et al., 2009). A hemoglobina é encontrada nas hemácias do sangue sendo responsável pelo transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos, enquanto a mioglobina, presente

nos músculos é responsável por manter o suprimento local de oxigênio. Além do transporte de oxigênio, o ferro se destaca por seu papel no transporte de elétrons, produção de energia e síntese de DNA (Kabat and Rohan, 2007).

A deficiência de ferro causa desordens severas, dentre elas a anemia, que pode levar a parada cardíaca e consequentemente, à morte. O excesso de ferro, por sua vez, pode causar falência hepática, diabetes, atrofia testicular, neuropatias, cardiomiopatia e artrite (Andrews, 2000).

O ferro possui um papel central na gênese e etiologia tumoral. Por ser um metal de transição, o ferro tem a capacidade de doar elétrons sendo um dos principais catalisadores das reações de transferência de elétrons que geram espécies reativas de oxigênio (ROS), elevando o stress oxidativo.

O stress oxidativo é resultado do desbalanço entre espécies reativas (ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila, espécies reativas de nitrogênio) e agentes antioxidantes. O aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) pode gerar cadeias de eventos que levam, por exemplo, à diferenciação de fibroblastos normais em miofibroblastos, que por sua vez, são capazes de gerar grandes quantidades de peróxido de hidrogênio, realimentando o stress oxidativo (Comito et al., 2012; Taddei et al., 2012). Além disso, miofibroblastos secretam colágeno do tipo I que aumenta a densidade mamária e favorece a gênese tumoral bem como a metástase (Jezierska-Drutel et al., 2013).

Radicais livres contendo ROS são compostos químicos que contêm um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital mais externo. Entre os radicais mais comuns, destaca-se o ânion superóxido (O_2^-), um subproduto natural do consumo de O_2 pelas mitocôndrias. Outras ROS de destaque são o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila altamente reativo (*OH) (Yaman, 2006). As reações relacionadas à formação de ROS devidas à liberação de elétrons pelas mitocôndrias

são:

O peróxido de hidrogênio é ainda produzido espontaneamente através da reação entre o ânion superóxido e o cátion hidrogênio:

O peróxido de hidrogênio possui alta capacidade de se difundir pela membrana celular e embora não seja um radical propriamente dito (não possui nenhum elétron desemparelhado em seu último orbital), é categorizado como ROS pois se quebra facilmente em radicais hidroxila, especialmente na presença de íons catalisadores de Fe^{+2} , na chamada reação de Harber-Weiss catalisada pelo ferro:

Os radicais hidroxila por sua vez, são as espécies mais reativas de oxigênio produzidas por células de mamíferos e os íons de Fe^{+2} , catalisadores de sua produção via reação de Harber-Weiss, são gerados através da redução do Fe^{+3} na reação de Fenton:

Além do stress oxidativo, o ferro possui um papel significativo no processo angiogênico. A angiogênese é um importante processo na progressão e metástase tumoral, necessária ao crescimento do tumor para além de um certo limite. Este processo é regulado pela combinação de uma série de fatores pró-angiogênicos (como

fator de crescimento vascular endotelial [VEGF] e fator de crescimento fibroblástico [FGF]) e anti-angiogênicos (trombospondina-1) (Huang, 2008). Estes fatores são produzidos tanto pelas células tumorais, quanto pelo estroma do entorno. A medida que a massa tumoral cresce, as células localizadas na região central desta massa passam a sofrer com a baixa disponibilidade de nutrientes e oxigênio, como resultado da pequena disponibilidade de vasos sanguíneos para transportá-los. Isto leva a uma cascata hipóxica de eventos na qual o fator indutor de hipóxia $1-\alpha$ (HIF-1- α) é liberado, sinalizando a formação de nova vascularização que penetra o núcleo tumoral. Em mulheres na fase pré-menopausa, o decréscimo nos níveis de ferro devido a menstruação reduz a expressão do HIF-1- α , pois o ferro é um conhecido cofator de sua síntese (Masson and Ratcliffe, 2003). Isto eleva a expressão do VEGF como forma de compensação. A baixa concentração de ferro também pode levar a uma situação de hipóxia na região tumoral devido à baixa disponibilidade de hemoglobina nos glóbulos vermelhos (Huang, 2008). De modo inverso, níveis de ferro elevados devido à cessação do ciclo menstrual podem contribuir para a formação de tumores de mama através da elevação do stress oxidativo (Jian et al., 2011; Pinnix et al., 2010).

2.2.3 Cobre

O cobre é um elemento essencial para todos os seres vivos, indispensável no controle da atividade de diversas enzimas como oxidase e oxigenase, bem como na transferência de elétrons (Kozlowski et al., 2009). Sua massa total em seres humanos é da ordem de 100 mg distribuídos principalmente entre fígado, cérebro e rins (Chitturi et al., 2015). Pode ser obtido através da ingestão de fígado, ostras, frutas secas, leite e derivados, sementes de girassol e tomates. Sua absorção ocorre no estômago e duodeno, sendo prejudicada pela alta ingestão de ferro e zinco. No

sangue, o cobre é distribuído principalmente entre plasma e glóbulos vermelhos. Mais de 90% do cobre presente no plasma sanguíneo estão associados à ceruloplasmina. Em glóbulos vermelhos, 60% do cobre encontrado estão associados à CuZnSOD, enquanto os demais 40% estão distribuídos entre outras proteínas e aminoácidos (Walravens, 1980). O cobre possui importantes papéis na síntese da hemoglobina, além de ser catalisador da síntese de triptofano, e atuar no desenvolvimento dos ossos e metabolismo do tecido conjuntivo (Chitturi et al., 2015). A ceruloplasmina também auxilia no transporte de ferro para as células (Turnlund, 1998).

Íons de cobre podem alimentar o stress oxidativo, agindo como catalisadores das reações de Fenton e Harber-Weiss da seguinte forma:

Os íons Cu^+ são muito mais reativos com H_2O_2 do que os íons Cu^{+2} . Os efeitos danosos tanto das formas do superóxido e do peróxido de hidrogênio podem ser suprimidas com a ausência destes metais catalisadores. Por outro lado, enzimas protetoras baseadas em cobre, como CuZnSOD, também podem moderar os efeitos das ROS (Bal and Kasprzak, 2002).

Para além de seu papel na geração e supressão de ROS, o cobre atua no processo angiogênico de diversas formas, sendo objeto de estudos desde 1980, quando McAuslan e Rielly descobriram que sais de cobre estimulavam o a vascularização de células tumorais *in vitro* (McAuslan and Reilly, 1980). Modelos *in vitro* mostraram que o cobre é capaz de estimular a proliferação e migração de células endoteliais (Hu, 1998). Em tumores de mama, o cobre está ainda associado à secreção de diversos fatores angiogênicos como VEGF, FGF, IL-1a (interleucina), IL-8 e IL-6 (Pan et al.,

2002). O FGF é uma importante proteína de ligação de cobre, que quando ativada pela presença de Cu^{2+} , pode gerar um agregado multiproteína capaz de produzir fortes sinais angiogênicos (Lowndes and Harris, 2005). Além disso, o cobre possui afinidade de ligação à proteína angiogenina, outra importante molécula angiogênica, que uma vez ativada, possui grande afinidade por receptores endoteliais (Soncin et al., 1997). O fato de todos estes fatores se ligarem ao cobre sugere que este é um cofator essencial no processo angiogênico. Desta forma, o cobre pode estar associado tanto à gênese tumoral, por seu papel na formação de ROS, quanto a sua etiologia.

2.2.4 Zinco

Zinco é um elemento-traço fundamental para o funcionamento celular, atuando de forma estruturante, sinalizadora, catalítica e regulatória de processos biológicos (Grattan and Freake, 2012). A massa total de zinco em adultos varia entre 2-3 g, sendo que destes, 99% encontram-se no meio intracelular e o restante no plasma (Chitturi et al., 2015). O zinco está envolvido no funcionamento de mais de 300 enzimas, sendo o único metal que pode ser encontrado em todas as seis classes de enzimas da IUPAC (Vallee and Falchuk, 1993). É fundamental na estabilização dos domínios proteicos chamados dedo de zinco, facilitadores da ligação e transcrição do DNA (Klug, 1999). O zinco também está associado ao controle do metabolismo de proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e lipídeos bem como ao crescimento, desenvolvimento e diferenciação celular (Vallee and Falchuk, 1993).

Desarranjos nas concentrações de zinco levam a uma série de patologias graves, que se iniciam em nível celular. Os sintomas da deficiência de zinco incluem metabolismo lento, intoxicação alcoólica, acidose metabólica, bloqueio na síntese de proteínas, entre outros (Chitturi et al., 2015). De maneira geral, células do tecido intestinal, dermatológico e gonadal possuem altas taxas de proliferação, sendo mais

sensíveis às consequências da baixa disponibilidade de zinco (Vallee and Falchuk, 1993).

A elevação dos níveis de zinco em lesões mamárias vêm sendo reportada na literatura como parte do processo de liberação de metaloproteinases de matriz (MMPs) pelas células tumorais. O tecido mamário está sujeito à diversas mudanças morfológicas e estruturais. As metaloproteinases de matriz (MMP) possuem um papel chave neste processo, pois atuam principalmente na degradação da matriz extra celular, facilitando a remodelação do tecido (Kelleher et al., 2011, 2009; Westermarck and Kähäri, 1999). As MMPs são proteínas zinco-dependentes essenciais à evolução e manutenção dos sistemas biológicos, entretanto quando expressa em níveis desregulados podem protagonizar funções-chave no desenvolvimento do câncer, como a liberação de fatores de vascularização contidos na matriz extra celular, que levam ao processo de angiogênese necessário ao crescimento tumoral, e a facilitação do processo de invasão tumoral e metástase (Gialeli et al., 2011; Deryugina and Quigley, 2006; Fingleton, 2006). Todas as MMPs possuem domínios catalíticos que são ativados por íons de zinco (Duffy et al., 2000; Duffy and McCarthy, 1998; Chambers and Matrisian, 1997), fazendo deste elemento-traço um componente essencial de sua estrutura e uma possível assinatura de sua presença.

A redução nos níveis de zinco também pode levar ao aumento do stress oxidativo através da redução de antioxidantes, em especial a CuZnSOD (Taylor et al., 1988). Redução nos níveis de zinco vem sendo associada à formação de tumores em tecidos específicos como fígado (Gurusamy and Davidson, 2007), bexiga (Gupta et al., 2005), próstata (Henshall et al., 2003; Zaichick et al., 1997) e pulmão (Díez et al., 1989). Por outro lado, estudos mostram que o tecido mamário canceroso possui concentrações de zinco mais elevadas que o tecido saudável (Cui et al., 2007; Chakravarty et al., 1986; Margalioth et al., 1983). Esta tendência se mantém

em nível celular (Margalioth et al., 1983) sugerindo que neste tipo de tecido, o mecanismo de ação do zinco é único, e está relacionado à malignidade da lesão.

2.3 Detecção de elementos-traço em tecidos mamários utilizando XRF

A técnica de fluorescência de raios X por reflexão total (TRXRF) foi utilizada por Majewska et al. (2007) para comparar as concentrações dos elementos-traço K, Ca, Fe, Cu, Zn, Se e Rb em amostras malignas e benignas de tecido mamário, mostrando aumento na concentração de todos estes elementos em tecidos malignos quando comparadas com benignos. Kubala-Kukuś et al. (2007) encontraram resultados similares, com exceção do Cu, que teve sua concentração reduzida em tecidos malignos.

A técnica de micro-fluorescência de raios X (μ -XRF) produz um feixe de raios X altamente focalizado, com resolução espacial suficiente para diferenciar pequenas estruturas na amostra (Silva et al., 2013, 2012). Esta vantagem pôde ser vista em um trabalho de Farquharson et al. (2008), onde foi verificado que a concentração média (macroscópica) de ferro crescia em tecidos malignos. Quando a amostra foi mapeada por μ -XRF, os resultados mostraram que a concentração de ferro era menor nas regiões tumorais, quando comparadas ao tecido normal adjacente à lesão. Outra vantagem desta técnica reside na possibilidade de estudo dos contornos tumorais no intuito de compreender o papel dos elementos-traço em seu crescimento. Finney et al. (2009) mostrou cobre sendo translocado pela membrana celular em áreas de expansão vascular. As técnicas baseadas em μ -XRF utilizam radiação síncrotron como fonte de excitação. Este tipo de radiação possui um conjunto de características únicas e desejáveis como ferramenta analítica, que

serão descritas a seguir.

2.4 Luz Síncrotron

Fato conhecido pela comunidade científica desde o fim do século XIX, a aceleração de partículas carregadas resulta na produção de radiação eletromagnética (Liénard, 1898). Uma partícula que oscila com frequência ν está em movimento acelerado, e portanto emite radiação. Esta emissão se dá em um contínuo de frequências, cujo pico coincide com a frequência de oscilação ν . Desta forma, o pico de emissão de radiação produzido por íons oscilantes se dá na região infravermelho, pois sua massa elevada limita sua frequência de oscilação, ao passo que elétrons oscilantes são capazes de produzir radiação na faixa do visível, ultravioleta e raios X. As altas frequências de oscilação necessárias para a produção de raios X são alcançadas devido à combinação de efeitos relativísticos, em especial o efeito Doppler e a mudança de referencial entre o elétron acelerado e o laboratório (Margaritondo et al., 2003).

2.4.1 Fonte de Luz Síncrotron

Uma fonte de Luz Síncrotron é uma estrutura de grande porte, projetada para produção de luz síncrotron a partir de um feixe de elétrons viajando a velocidades próximas à da luz, onde se observam efeitos relativísticos, em uma trajetória circular fechada (Van Grieken and Markowicz, 2002).

O processo de aceleração dos elétrons composto por algumas etapas básicas. Os elétrons são inicialmente produzidos em um canhão de elétrons, onde um cátodo é aquecido sob vácuo, emitindo elétrons através do efeito termoiônico. Os elétrons liberados são então acelerados por campos eletrostáticos na direção de um ânodo, adquirindo energias na ordem de dezenas de keV. A seguir, os elétrons são injetados em

um acelerador linear (*LINAC*) onde continuam a ser acelerados, através de cavidades de radiofrequência, até energias da ordem de uma centena de MeV. Ao final do acelerador linear, os elétrons são conduzidos ao acelerador injetor (*Booster*), através de uma linha de transporte composta por eletroímãs. O *Booster* é um acelerador circular que confere ao feixe de elétrons sua energia final, na ordem de GeV, utilizando cavidades de radiofrequência para acelerá-los a cada volta completada. Como a energia dos elétrons aumenta a cada volta, os campos magnéticos que mantêm sua trajetória devem ser ajustáveis. Ao atingirem sua energia máxima os elétrons são injetados, através de uma segunda linha de transporte, no anel de armazenamento (Van Grieken and Markowicz, 2002).

Um conjunto de ímãs, conhecido como superperíodo, é responsável pela correta deflexão do feixe de elétrons no anel de armazenamento, a fim de manter sua órbita circular (dipolo magnético), bem como sua focalização (quadripolo magnético) além de corrigir aberrações cromáticas (sextupolo magnético). A radiação síncrotron é emitida na passagem do feixe de elétrons pelo dipolo magnético. A mudança na trajetória dos elétrons, induzida pelos dipolos magnéticos, produz uma grande quantidade de Luz Síncrotron. Fontes de Luz Síncrotron baseadas na emissão causada pelos dipolos magnéticos são conhecidas como síncrotrons de segunda geração. As modernas fontes de luz síncrotron contam ainda com dispositivos de inserção instalados ao longo dos segmentos retos do anel, chamados onduladores e *wigglers*. Trata-se de arranjos de ímãs periódicos projetados para produzirem oscilações extras no feixe de elétrons, fazendo com que estes emitam uma quantidade ainda maior de radiação. A diferença básica entre os dispositivos de inserção reside na amplitude de seus períodos: nos onduladores os períodos são longos e, como consequência disto, temos um espectro de frequências com banda estreita. Já nos *wigglers* os períodos são curtos, e o espectro de frequências da radiação emitida é largo (Margaritondo et al., 2003). Em fontes de Luz Síncrotron de terceira e

quarta geração, a radiação é obtida principalmente destes dispositivos. A Figura 2.2 mostra um esquema contendo alguns dos principais componentes de uma fonte de Luz Síncrotron.

Figura 2.2: Esquema contendo os principais componentes de uma fonte de Luz Síncrotron.

2.4.2 Propriedades da Luz Síncrotron

A radiação síncrotron possui uma série de propriedades que a tornam a melhor fonte para experimentos de $\mu - XRF$. Seu alto brilho proporciona um número adequado de fótons para que seja possível varrer amostras em um tempo curto (na ordem de algumas horas). A distribuição contínua em energia permite a monocromatização do feixe em uma ampla gama de energias, quando necessário. Os fótons possuem alto grau de polarização na direção do plano orbital dos elétrons, reduzindo o background das medidas e consequentemente, melhorando os limites de detecção (Hanson, 1990). A focalização do feixe é possível pois por um lado efeitos relativísticos tornam o feixe de fótons extremamente colimado na direção vertical,

por outro temos o tamanho finito da fonte. A combinação destes aspectos com elementos ópticos de focalização, torna exequível a produção de feixes intensos e de pequena área (Van Grieken and Markowicz, 2002).

2.4.3 Conjunto focalizador de Kirkpatrick-Baez

Existem diversos sistemas de focalização de feixes de raios X tais como placas de zona de Fresnel (Yun et al., 1999), lentes de Bragg-Fresnel (Yasa et al., 2004), capilares (Bilderback, 2003) e espelhos de Kirkpatrick-Baez (Liu et al., 2005). Sistemas baseados na geometria de Kirkpatrick-Baez (Kirkpatrick and Baez, 1948) possuem a vantagem de permitirem a passagem de uma ampla faixa de energias, tornando o ajuste da energia de excitação possível, além de possuir uma estrutura inerentemente não-dispersiva (Liu et al., 2005), propícia à focalização. O conjunto focalizador de Kirkpatrick-Baez é composto por um par de espelhos côncavos de formato elíptico, parabólico ou hiperbólico. Estes formatos são escolhidos por minimizarem as aberrações causadas por espelhos esféricos (Ice and Sparks, 1984). A Figura 2.3 mostra um esquema que utiliza a geometria proposta por Kirkpatrick-Baez. O feixe de raios X emitido por uma fonte F incide no primeiro espelho M_1 , que o focaliza verticalmente sobre o segundo espelho M_2 . Este, por sua vez, realiza o foco horizontal do feixe, sobre a amostra posicionada em A .

Figura 2.3: Esquema de focalização utilizando espelhos de Kirkpatrick-Baez, onde um feixe de raios X emitidos por uma fonte F é focalizado sobre uma amostra A .

A Figura 2.4 mostra o esquema de uma geometria que utiliza espelhos

elípticos. Um objeto posicionado sobre o ponto focal F_1 é focalizado sobre o ponto focal F_2 e a demagnificação é dada por a/b onde a é a distância "espelho-imagem" e b é a distância "fonte-espelho" (Suzuki et al., 1989). Quando espelhos elípticos de formato cilíndrico são utilizados, uma fonte pontual é focalizada sobre uma imagem linear. Um segundo espelho é utilizado para focalizar esta imagem linear em uma imagem pontual o eixo do plano focal. Outros exemplos de geometrias podem ser encontradas em (Hudec, 2011).

Figura 2.4: Esquema de focalização utilizando espelhos de Kirkpatrick-Baez, onde um objeto posicionado sobre o ponto focal F_1 é focalizado sobre o ponto focal F_2 .

2.5 Interações da radiação com a matéria

2.5.1 Espalhamento

2.5.1.1 Espalhamento coerente

O espalhamento coerente, também chamado de espalhamento Rayleigh, é o resultado da interação de fótons com elétrons firmemente ligados, onde os fótons são defletidos sem perdas de energia. Como não há transferência de energia dos fótons para o átomo espalhador, este processo não é capaz de ionizar ou excitar o átomo. A seção de choque diferencial para espalhamento coerente por elétron é dada por:

$$\frac{d\sigma_R}{d\Omega} = \frac{1}{2}r_0^2(1 + \cos^2 \theta) \quad (2.3)$$

Pela forma funcional da Eq. 2.3, é fácil verificar que o espalhamento coerente, assim como o espalhamento incoerente, é minimizado para o ângulo de 90° .

2.5.1.2 Espalhamento incoerente

O espalhamento incoerente é o resultado da interação elástica entre um fóton e um elétron livre, ou fracamente ligado, pertencente às camadas mais externas do átomo e, inicialmente, em repouso .

A Fig. 2.5 mostra a cinemática da colisão entre duas partículas para o espalhamento Compton. Um fóton de energia $E = h\nu$ atinge um elétron inicialmente em repouso. O fóton incidente é espalhado na direção θ . Neste processo o fóton perde parte de sua energia para o elétron de recuo. Sua energia e frequência após a colisão são $E' = h\nu'$ e $h\nu'$ respectivamente. O elétron de recuo, por sua vez, emerge na direção ϕ com energia cinética $E_k = h(\nu - \nu')$.

Figura 2.5: Representação pictórica do espalhamento Compton.

O princípio da conservação da energia nos diz que:

$$h\nu = h\nu' + E_k \quad (2.4)$$

enquanto da conservação do momento nas direções paralela e perpendicular à direção de propagação do fóton incidente, respectivamente temos:

$$\frac{h\nu}{c} = p \cos \phi + \frac{h\nu'}{c} \cos \theta \quad (2.5)$$

$$\frac{h\nu'}{c} \sin \theta = p \sin \phi \quad (2.6)$$

onde E_k e p representam a energia cinética e o momento do elétron após a colisão. Sabendo que a relação entre a energia e o momento para o elétron relativístico é dada por:

$$E^2 = p^2 c^2 + m_0^2 c^4 = (E_k + m_0 c^2)^2 \quad (2.7)$$

onde m_0 é a massa de repouso do elétron, podemos eliminar o momento e o ângulos

ϕ nas Eqs. 2.4 - 2.6, chegando em:

$$h\nu' = \frac{h\nu}{1 + \alpha(1 - \cos\theta)} \quad (2.8)$$

onde $\alpha = \frac{h\nu}{m_0c^2}$.

A distribuição angular dos fótons espalhados é dada pela seção de choque de Klein-Nishina, e representa a probabilidade por elétron de que um fóton com energia inicial $h\nu$ seja espalhado por um elétron com ângulos entre θ e $\theta + d\theta$. O número de elétrons disponíveis para espalhamento no alvo espalhador cresce linearmente com o número atômico Z deste material, portanto temos:

$$\left(\frac{d\sigma_C}{d\Omega}\right)_{K-N} = Z \frac{r_0^2}{2} (1 + \cos^2\theta) \left[\frac{1}{1 + \alpha(1 - \cos\theta)} \right]^2 \left\{ 1 + \frac{\alpha^2(1 - \cos\theta)^2}{(1 + \cos^2\theta)[1 + \alpha(1 - \cos\theta)]} \right\} \quad (2.9)$$

A Figura 2.6 mostra a distribuição angular dos fótons espalhados para as energias de 10, 15 e 20 keV. É possível notar que para esta faixa de energia, a probabilidade de espalhamento é minimizada em 90° . Portanto podemos otimizar a geometria de detecção posicionando o detector neste ângulo, reduzindo assim o background gerado pelo espalhamento incoerente.

2.5.2 Absorção

2.5.2.1 Efeito fotoelétrico

O fenômeno é conhecido como efeito fotoelétrico ocorre quando a ionização das camadas mais internas do átomo é resultado da interação deste com a radiação eletromagnética. O efeito fotoelétrico é a principal interação entre fótons de baixa energia e matéria de forma geral em geral. De modo mais específico, é a principal interação entre fótons com até 20 KeV e átomos com número atômico Z entre 20 e 30,

Figura 2.6: Seção de choque de Klein-Nishina diferencial em ângulo.

que são os principais objetos deste estudo (Ca, Fe, Cu e Zn) (Attix, 2004). Considere a interação entre um fóton incidente de energia $h\nu$ com um elétron orbital da camada K, com energia de ligação E_k . Quando $h\nu > E_k$, a interação pode ocorrer por meio do efeito fotoelétrico. Neste caso, toda a energia do fóton incidente é absorvida pelo átomo. O fóton deixa de existir e o elétron orbital é ejetado do átomo com energia cinética T dada por:

$$T = h\nu - E_b \quad (2.10)$$

A Figura 2.7 ilustra esquematicamente o processo.

Figura 2.7: Ilustração esquemática do efeito fotoelétrico.

2.5.3 Desexcitação

2.5.3.1 Fluorescência

Após absorver toda a energia do fóton incidente, o átomo excitado tende a retornar ao seu estado de energia fundamental. Inicia-se então um processo de desexcitação onde um elétron de uma camada mais externa deve preencher a vacância deixada na camada K. Se tal vacância for ocupada por um elétron da camada L, o átomo emite um fóton de raio X característico cuja energia é igual à diferença de energia entre as camadas K e L. Esta linha espectral é conhecida como K_α . Por outro lado, se o átomo possui elétrons suficientes, a vacância deixada na camada K pode ser ocupada por elétrons oriundos da camada M, dando origem aos fótons da linha espectral K_β . As camadas L ou M, por sua vez, acabam ficando com uma vacância, que será preenchida por elétrons ainda mais externos dando origem às demais linhas espectrais. A Figura 2.8 mostra as transições quanticamente permitidas entre os níveis de energia, conhecidas como séries espectrais.

A frequência dos raios X característicos gerados no processo de interação entre a radiação incidente e os átomos da matéria é dada pela lei de Moseley:

$$\nu = k(Z - \sigma)^2 \quad (2.11)$$

Figura 2.8: Linhas espectrais quanticamente permitidas pelas regras de seleção.

onde k é uma constante que depende da linha espectral emitida e σ é uma constante que corrige a blindagem repulsiva gerada por outros elétrons do átomo. As regras quânticas de seleção envolvidas neste processo podem ser encontradas em Van Grieken and Markowicz (2002).

2.6 Detectores semicondutores

Detectores semicondutores de radiação são formados por uma junção P-N (positivo-negativo) em um diodo. A junção P-N dá origem a um campo elétrico natural no interior do cristal, em uma região denominada zona de depleção. Ao atravessar a zona de depleção, a radiação interage com os átomos do cristal através de um dos processos descritos na seção 2.5. A energia cedida pelos fótons aos átomos do cristal nestas interações leva à criação de pares elétron-buraco que são separados pelo campo elétrico existente na zona de depleção. A coleção destas cargas pelos eletrodos gera um pulso de corrente que, em condições ideais, é proporcional à

energia depositada pelo fóton no cristal (Knoll, 2011).

Esta configuração, embora possível não se mostra eficiente, pois a extensão limitada da zona de depleção gerada naturalmente pela junção P-N, restringe o volume sensível do detector, além de gerar problemas de ruído na entrada do amplificador, devido à alta capacitância do cristal. Estes inconvenientes podem ser contornados aplicando uma tensão de polarização reversa entre as extremidades do cristal. Esta tensão amplia a extensão da zona de depleção, aumentando o volume sensível do detector ao passo que diminui sua capacitância. A Figura 2.9 mostra o esquema com os principais componentes de um cristal semiconductor tipicamente utilizado na detecção de radiação.

Figura 2.9: Principais componentes dos detectores de radiação. A formação de pares elétron-buraco na zona de depleção está ilustrada com sinal + para buracos e - para elétrons.

Em detectores ideais, todo fóton incidente gera um pulso de corrente

proporcional à sua energia, entretanto em detectores reais um termo de eficiência deve ser ajustado a fim de modelar as possíveis interações onde o fóton incidente não deposita toda sua energia no volume sensível do cristal, ou parte desta energia depositada escapa na forma de um fóton fluorescente ou ainda o armadilhamento dos portadores de carga (elétrons ou buracos) devido a imperfeições do cristal (Knoll, 2011). Detectores semicondutores dispersivos em energia são capazes de detectar uma ampla gama de elementos, de maneira simultânea, em intervalos de tempo reativamente curtos e com grande acurácia (Yao et al., 2015).

2.7 Composição do espectro de Fluorescência

O espectro de fluorescência emitido por uma amostra é composto por picos que se elevam a partir de um background. O processo de quantificação consiste na conversão precisa da área destes picos em concentração do elemento fluorescente. A Figura 2.10 mostra o gráfico de um espectro de fluorescência obtido a partir de um tecido mamário tumoral, onde estão assinaladas as energias de emissão dos elementos Ca, Fe, Cu e Zn, além do Ar e do Si. É possível notar que estes picos se elevam a partir de um background formado pela radiação do feixe incidente espalhada pela amostra.

2.7.1 Pico - Emissão de raios X característicos

A produção de raios X característicos envolve transições dos elétrons orbitais dos átomos que compõe a amostra irradiada. Tais transições ocorrem apenas entre orbitas permitidas, ou estados de energia determinados, e estão associadas à interação entre a radiação incidente e as camadas mais internas do átomo. Os fótons de raios X característicos recebem este nome, pois a diferença de energia entre as camadas dos átomos é única para cada elemento. Quando um elétron é ejetado da

Figura 2.10: Espectro de fluorescência obtido a partir de uma amostra de tecido mamário tumoral.

camada K de um átomo, seja pela absorção total da energia de um fóton incidente, ou pela interação com outras formas de radiação, o átomo torna-se ionizado, passando para um estado de energia excitado. O excesso de energia que o átomo excitado possui em relação ao seu estado fundamental é igual à energia de ligação $E - E_k$ necessária para remover o elétron da camada K do átomo para um estado livre e em repouso (sem energia cinética). A vacância deixada pelo elétron ejetado poderá ser preenchida por elétrons de camadas mais externas, dando origem à emissão de um fóton fluorescente. Se a vacância foi originada na camada K, ela pode ser preenchida por elétrons da camada L, emitindo um fóton fluorescente conhecido por K_α . Se o átomo contem elétrons suficientes, esta vacância pode ser preenchida por elétrons da camada M, dando origem a um fóton fluorescente conhecido por K_β , sendo estas as principais linhas de emissão de interesse quantitativo.

2.7.2 Background - Espalhamento

Os picos observados em um espectro típico de fluorescência necessariamente se elevam a partir de um background. Este, por sua vez, tem origem numa série de fatores dentre os quais se destacam o espalhamento dos fótons do feixe incidente, causado pela amostra (Borkhodoev, 2014). Trata-se de um contínuo em energia formado principalmente por duas componentes: a primeira proveniente do espalhamento coerente da radiação primária, também conhecido por espalhamento Rayleigh, e a segunda proveniente do espalhamento incoerente, conhecida por espalhamento Compton (Knoll, 2011).

2.8 Relação entre a área do pico e a concentração

Uma descrição detalhada do modelo de parâmetros fundamentais, que relaciona o número de fótons emitidos por um elemento fluorescente em uma amostra homogênea, é apresentada na seção 3.5.2.1. De maneira geral, o número de fótons fluorescentes P_i , emitidos pelo elemento i em uma amostra homogênea de densidade ρ e espessura h , onde efeitos secundários de supressão e realce podem ser negligenciados, é obtido em termos da espessura da amostra da seguinte forma:

2.8.1 Grossa

A partir de um certo valor crítico de saturação, não é observado nenhum aumento na fluorescência emitida por uma amostra, ao aumentar sua espessura. Esta condição é denominada amostra grossa, e o número de fótons fluorescentes, emitidos pelo elemento i , é dado por:

$$P_i = T_i C_i \quad (2.12)$$

onde, T_i é uma constante que depende do elemento i , das condições experimentais e da composição da amostra.

2.8.2 Delgada

Quando a massa total por unidade de área de uma amostra figura abaixo de um determinado valor crítico, a composição da matriz se torna irrelevante. Esta condição é denominada amostra delgada, onde o número de fótons fluorescentes emitidos pelo elemento analisado, é dado por:

$$P_i = G_i \rho h C_i \quad (2.13)$$

onde G_i é uma constante que depende apenas do elemento fluorescente e de condições experimentais, mas não da amostra.

2.8.3 Intermediária

O número de fótons fluorescentes P_i , emitidos pelo elemento i , em uma amostra de espessura intermediária, é dado por:

$$P_i = S_i C_i \quad (2.14)$$

onde, S_i é uma constante que depende do elemento i , das condições experimentais e da composição da amostra.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

As amostras foram obtidas a partir de fragmentos de tecidos removidos de peças cirúrgicas de mastectomia e mastoplastia, recebidas no Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (SERPAT/HCFMRP-USP), previamente fixadas em formol tamponado a 10%. Esta coleta foi autorizada pelos Comitês de Ética em Pesquisa da FFCLRP (CAAE n° 37886714.1.0000.5407) e do HC-RP (CAAE n° 37886714.1.3001.5440). Após a coleta, os fragmentos foram conservados a temperatura ambiente em frascos coletores universais esterilizados contendo formol tamponado a 10%.

Neste trabalho foram coletados um total de 100 amostras. Destas, 22 foram desprezadas para efeitos de estudo por não cumprirem satisfatoriamente as etapas do processo de preparo e microtomização às quais foram submetidas. Dentre as 78 restantes, 42 amostras foram classificadas como tumores malignos e 36 como tecidos normais. Esta classificação foi realizada por profissionais habilitados do SERPAT, e revisadas por um médico especialista em patologias mamárias.

3.2 Preparo de Amostras

3.2.1 Inclusão de tecido em parafina

As amostras foram posicionadas sobre os cassetes de processamento devidamente rotulados e preparadas para microtomia através da inclusão em parafina. Como a parafina não é miscível em água, as amostras foram submetidas a um protocolo de desidratação em álcool etílico. Ao final na desidratação as amostras foram submetidas à diafanização, que substitui o álcool por xilol, pois este é um solvente miscível em álcool e parafina ao mesmo tempo. Após a diafanização as amostras estavam prontas para a impregnação em parafina fundida a 60°C e inclusão em blocos. Cada bloco de parafina foi seccionado com o auxílio de um micrótomo em cortes de 3 μm . A partir deste corte foi produzida uma lâmina histológica corada com hematoxilina e eosina (HE). Esta lâmina foi submetida a análise que permitiu a identificação de regiões de interesse, normais e tumorais. Cada uma destas regiões de interesse foi removida dos blocos de parafina originais com auxílio de uma agulha de biópsia com 2 mm de diâmetro. O material foi então depositado em um segundo bloco de parafina perfurado, chamado *Tissue Micro Array* (TMA). Cada orifício do bloco foi preenchido por uma amostra. A partir dos blocos TMA foram realizados 2 cortes adjacentes, o primeiro com 3 μm e o segundo com 30 μm de espessura. O primeiro corte foi corado com HE e serviu como referência histológica para os mapas de $\mu\text{-XRF}$. O segundo corte foi submetido a um processo de desparafinização em xilol e fixado sobre um filme Kapton de 4 μm . Este filme foi posicionado em um porta amostra de acrílico e submetido à análise por $\mu\text{-XRF}$.

3.2.2 Tecido *in natura* crio-seccionado

As amostras foram retiradas do formol e lavadas em água destilada. Após a limpeza, foram devidamente rotuladas e seccionadas em criostato à temperatura de -20°C e espessura de $30\text{ }\mu\text{m}$. Um segundo corte adjacente de $5\text{ }\mu\text{m}$ de espessura foi realizado e, a partir dele foram confeccionadas lâminas histológicas coradas por HE, que serviu como referência para determinação da região de interesse a ser analisada por $\mu\text{-XRF}$. Após o corte, as amostras foram mantidas sob refrigeração. Cinco minutos antes da análise, as amostras foram hidratadas em água destilada e posicionadas sobre o filme Kapton no porta-amostras.

3.2.3 Amostras Padrão

Neste trabalho foram utilizadas amostras padrão de referência de sangue bovino, distribuída pela *International Atomic Energy Agency* sob o código IAEA-A-13, fígado bovino, distribuída pelo *National Institute of Standards and Technology* sob o código NIST 1577b e alfafa distribuída pela última sob o código IAEA-V-10. A massa total de cada amostra foi 0,1 g. As amostras foram secas em estufa a 60° por 12 horas. Após a secagem, as amostras foram cobertas por filme plástico e prensadas em pastilhas numa prensa de 3 toneladas por 2 minutos. As espessuras alcançadas para as amostras padrão foram de $72\pm 2\text{ }\mu\text{m}$ para IAEA-A-13, $68\pm 2\text{ }\mu\text{m}$ para NIST 1577b e $71\pm 2\text{ }\mu\text{m}$ para IAEA-V-10.

3.3 Arranjo Experimental

A aquisição dos dados experimentais deste trabalho foram realizadas na linha de fluorescência de raios X do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas -SP (Pérez et al., 1999). As amostras foram irradiadas por um feixe

branco de raios X, garantindo tempo de medida reduzido e estatística adequada. O feixe foi focalizado com auxílio de um conjunto de espelhos de Kirkpatrick-Baez em um ponto com aproximadamente $24\ \mu\text{m}$ de diâmetro no plano da amostra. As amostras foram posicionadas a 45° com relação ao feixe incidente, sobre uma mesa com três graus de liberdade (x, y e z). A Figura 3.1 mostra o esquema do arranjo experimental utilizado neste trabalho.

Figura 3.1: Esquema contendo os principais componentes de um sistema de $\mu - \text{XRF}$, com sistema de focalização, amostra montada sobre uma mesa com movimentos em XYZ e detector.

3.3.1 Tecido Mamário

O escaneamento das amostras de tecido mamário foi realizado em modo zig-zag, utilizando passo de $30\ \mu\text{m}$. Os espectros de fluorescência foram adquiridos por um detector de Si, posicionado a 90° com relação ao feixe incidente. O tempo de aquisição em cada ponto foi de 10 s. Como a intensidade do feixe pode variar com o tempo, este foi monitorado através de uma câmara de ionização. O espectro adquirido em cada ponto foi normalizado pela leitura da câmara de ionização.

3.3.2 Amostras Padrão

As amostras padrão foram irradiadas na mesma geometria utilizada para as amostras de tecido mamário, com tempo de 45 s por ponto, a fim de se obter desvios estatísticos menores que 3,1%.

3.4 Determinação do espectro de excitação por espalhamento

O background observado nas medidas de fluorescência se deve principalmente ao espalhamento dos fótons do feixe primário pela amostra. Quando feixes brancos de excitação são utilizados, estes fótons espalhados na direção do detector são somados aos picos de fluorescência, reduzindo a qualidade do sinal analítico. Mesmo quando fontes monocromáticas de excitação são utilizadas, a radiação espalhada pela amostra adiciona um background contínuo no detector, próxima à energia de excitação. Esta radiação espalhada contribui ainda com outras fontes de ruído, como a fluorescência gerada nos colimadores, e nos eletrodos dos detectores, além do sinal de baixa energia devido à energia cinética residual dos elétrons quando são espalhadas novamente no detector, por espalhamento incoerente. Isto torna a radiação espalhada um fator limitante no alcance de menores limites mínimos de detecção.

3.4.1 Reconstrução do espectro incidente a partir da radiação espalhada

Neste trabalho expandimos a derivação realizada por Tertian and Claisse (1982), originalmente considerando amostras de espessura infinita, para amostras de

espessura intermediária. Considerando que a energia do fóton espalhado de forma incoerente é muito próxima à sua energia inicial, a distribuição da radiação espalhada ($I_{S,E}$) é dada por:

$$I_{S,E} = D\epsilon \frac{I_E \sum \frac{\omega_i}{A_i} (\sigma_R + \sigma_C)_{pol}}{\mu_{s,E}} [1 - \exp(-2\mu\rho x / \sin(\psi))] \quad (3.1)$$

onde D é uma constante de proporcionalidade; ω_i e A_i são a fração de massa e a massa atômica do elemento i , respectivamente; e $(\sigma_R + \sigma_C)_{pol}$ é a soma das seções de choque coerente e incoerente da amostra para radiação polarizada (Hanson, 1986a). Desta forma, com auxílio uma amostra espalhadora de composição conhecida, é possível reconstruir o espectro incidente I_E aplicando a Equação 3.1 em cada canal do detector.

3.4.2 Utilização da radiação polarizada em XRF

Os fatores apresentados na Seção 3.3.2 não podem ser completamente removidos experimentalmente, entretanto podem ser minimizados pelo uso de uma fonte de radiação polarizada, como a luz síncrotron (utilizada neste trabalho), tubos de raios X com anodos finos (Howell and Pickles, 1974), ou cristais de difração por efeito Bormann (Staudenmann et al., 1985).

As seções de choque integradas para o espalhamento da radiação polarizada foram calculadas por Hanson para diversas situações específicas (Hanson, 1990, 1988, 1986a,b). Neste trabalho utilizamos a descrição publicada em 1988, que calcula as seções de choque para radiação polarizada espalhada em 90° sobre uma pequena abertura circular, que serão descritas a seguir. Detalhes sobre a geometria, integração analítica para o espalhamento coerente e expansões utilizadas para o espalhamento incoerente podem ser encontradas em (Hanson, 1986b).

A Figura 3.2 mostra a geometria utilizada no cálculo das seções de choque.

Figura 3.2: Modelo geométrico utilizado por Hanson (1986b) para o cálculo das seções de choque sobre aberturas circulares.

Os vetores $\vec{k}_0$ e $\vec{e}_0$ são os vetores propagação e campo elétrico do fóton incidente, enquanto $\vec{k}$ e $\vec{e}$ são os mesmos vetores, para o fóton espalhado. O ângulo de espalhamento θ' é o ângulo compreendido entre os vetores $\vec{k}_0$ e $\vec{k}$, enquanto α é o ângulo entre os vetores $\vec{e}_0$ e $\vec{e}$. O fóton incidente se propaga sobre o eixo Y ($\vec{k}_0 = -K_0\hat{y}$), em direção à amostra posicionada na origem do sistema de coordenadas, enquanto o fóton espalhado se propaga na direção do eixo Z' ($\vec{k} = K\hat{z}'$). O detector está posicionado sobre o eixo Z. Desta forma, abertura do detector é definida pela integração de ϕ desde 0 até 2π e θ desde 0 até $t = \arctan(r/R)$, onde r é o raio de abertura do detector e R é a distância desta abertura à origem. Como $\vec{k} = K\hat{z}'$ é paralelo ao eixo Z', duas rotações são suficientes para descrevê-lo em termos de XYZ. A primeira rotação é realizada sobre o eixo Z em um ângulo ϕ . Isto traz os eixos X e Y para as posições x_1 e y_1 , respectivamente. A segunda rotação é realizada em torno do eixo y_1 em um ângulo θ , trazendo os eixos Z e x_1 para as posições Z' e x_2 , respectivamente. Como o vetor campo elétrico $\vec{e}$ é perpendicular ao vetor propagação $\vec{k}$, uma terceira rotação, de um ângulo ψ em torno de Z', se faz

necessária para sua localização. Esta rotação traz os eixos x_2 e y_2 para as posições X' e Y' . A radiação com polarização paralela, é definida quando $\vec{e}_0 = E_0 \hat{z}$ ao passo que a radiação com polarização perpendicular é definida quando $\vec{e}_0 = E_0 \hat{x}$. Desta forma, os vetores e ângulos de interesse são:

$$\vec{k}_0 = -K_0 \hat{y}$$

$$\vec{k} = K[(\sin \theta)(\cos \phi) \hat{x} + (\sin \theta)(\sin \phi) \hat{y} + (\cos \theta) \hat{z}]$$

$$\vec{e}_{0\perp} = E_0 \hat{x}$$

$$\vec{e}_{0\parallel} = E_0 \hat{z}$$

$$\begin{aligned} \vec{e} = E \{ & [(\cos \theta)(\cos \phi)(\cos \psi) - (\sin \phi)(\sin \psi)] \hat{x} \\ & + [(\cos \theta)(\sin \phi)(\cos \psi) + (\cos \phi)(\sin \psi)] \hat{y} \\ & - [(\sin \theta)(\cos \psi) \hat{z}] \} \end{aligned}$$

Os ângulos θ' e α são:

$$\cos \theta' = -\sin \theta \cos \phi$$

$$\cos \alpha_{\parallel} = -\sin \theta \cos \psi$$

$$\cos \alpha_{\perp} = -\sin \theta \cos \psi$$

Temos então as seções de choque diferenciais dadas por:

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{R_{\parallel}} = r_0^2 f^2 [(\sin \theta)(\cos \psi)]^2 \quad (3.2)$$

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{R_{\perp}} = r_0^2 f^2 [(\cos \theta)(\cos \phi)(\cos \psi) - (\sin \phi)(\sin \psi)]^2 \quad (3.3)$$

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{C_{\parallel}} = \frac{r_0^2}{4} S \left(\frac{K}{K_0}\right)^2 \left(\frac{K}{K_0} + \frac{K_0}{K} + 4 \sin^2 \theta \cos^2 \psi - 2\right) \quad (3.4)$$

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{C_{\perp}} = \frac{r_0^2}{4} S \left(\frac{K}{K_0}\right)^2 \left(\frac{K}{K_0} + \frac{K_0}{K} + 4[(\cos \theta)(\cos \phi)(\cos \psi) - (\sin \phi)(\sin \psi)]^2 - 2\right) \quad (3.5)$$

onde $\frac{K}{K_0}$ é a razão entre a energia do fóton espalhado e incidente, dada por $\frac{1}{1 + E_0/m_0 c^2 (1 - \cos \theta)}$. As nomenclaturas definidas a seguir se referem à projeção do vetor campo elétrico final ($\vec{e}$) sobre os eixos X (subscrito 0) e Y (subscrito 90), respectivamente. As seções de choque para espalhamento coerente, integradas no ângulo sólido definido pela abertura e distância do colimador até a amostra, são dadas por:

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{R_{\parallel}} = \pi r_0^2 f^2 \left(\frac{2}{3} + \frac{\cos^3 t}{3} - \cos t\right) \quad (3.6)$$

A componente paralela para a seção de choque de espalhamento coerente é isotrópica sobre o eixo Z.

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{R_{\perp,0}} = \frac{\pi}{4} r_0^2 f^2 (5 - \cos^3 t - \cos^2 t - 3 \cos t) \quad (3.7)$$

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{R_{\perp,90}} = \frac{\pi}{4} r_0^2 f^2 \left(\frac{1}{3} - \frac{\cos^3 t}{3} + \cos^2 t - 3 \cos t\right) \quad (3.8)$$

A integração das seções de choque para o espalhamento incoerente é apresentada

em função dos termos definidos a seguir:

$$\begin{aligned} \gamma &= E_0/511 & c &= \gamma^2 - a^2 & y &= a^2 - \gamma^2 \sin^2 t \\ a &= 1 + \gamma & x &= \gamma^2/a^2 & z &= c/y + 1 \end{aligned}$$

Desta forma, temos:

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right)_{C_{\parallel,0}} = \frac{\pi}{4} r_0^2 S(I_1 + I_2 + I_3 + I_6 - \frac{4aI_3}{\gamma^2} - \frac{8}{\gamma^2}(1 - \cos t)) \quad (3.9)$$

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right)_{C_{\parallel,90}} = \frac{\pi}{4} r_0^2 S(I_1 + I_2 + I_3 + I_6 - \frac{2a^2 I_6}{\gamma^2} - \frac{8aI_3}{\gamma^2} + \frac{8}{\gamma^2}(1 - \cos t)) \quad (3.10)$$

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right)_{C_{\perp,0}} = \frac{\pi}{4} r_0^2 S(I_1 + I_2 + I_3 + I_6 + I_7) \quad (3.11)$$

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right)_{C_{\perp,90}} = \frac{\pi}{4} r_0^2 S(I_1 + I_2 + I_3 + I_6 + I_8) \quad (3.12)$$

Os termos $I_1, I_2 \dots I_8$ representam integrais cujos resultados são mostrados a seguir:

$$I_1 = \frac{2a^2}{\gamma c^2} \left[\frac{z^{3/2} - x^{3/2}}{3} - (z^{1/2} - x^{1/2}) \right] \quad (3.13)$$

$$I_2 = \frac{a^2}{3c^2} \left[\frac{z^{1/2}}{y} - \frac{x^{1/2}}{a^2} \right] + \frac{a^2 - 3\gamma^2}{3\gamma c^2} (z^{1/2} - x^{1/2}) \quad (3.14)$$

$$I_3 = \frac{1}{\gamma} \ln \left[\left(\frac{z^{1/2} - 1}{z^{1/2} + 1} \right) \left(\frac{x^{1/2} + 1}{x^{1/2} - 1} \right) \right] \quad (3.15)$$

$$I_6 = \frac{4a}{\gamma c} (z^{1/2} - x^{1/2}) \quad (3.16)$$

$$\begin{aligned} I_7 &= \frac{8t^2}{2!a^2} + \frac{t^4}{4!a^4} (72\gamma^2 - 32a^2) + \frac{t^6}{6!a^6} (1800\gamma^4 - 1080\gamma^2 a^2 + 218a^4) + \\ &\frac{t^8}{8!a^8} (88200\gamma^6 - 75600\gamma^4 a^2 + 17262\gamma^2 a^4 - 1772a^6) \end{aligned} \quad (3.17)$$

$$I_8 = \frac{30t^6}{6!a^2} + \frac{t^8}{8!a^4} (1890\gamma^2 - 420a^2) \quad (3.18)$$

3.4.2.1 Implementação do algoritmo de reconstrução das seções de choque polarizadas

As integrações das seções de choque de espalhamento diferenciais foram realizadas sobre o ângulo sólido de uma pequena abertura circular, seguindo a descrição realizada por Hanson (1988).

A Figura 3.3 mostra as seções de choque de espalhamento coerente, normalizadas pelo fator de forma atômico ($f = 1$), integradas sobre o ângulo sólido de uma pequena abertura circular (detector) posicionada em um ângulo de espalhamento de 90° . As seções de choque foram plotadas em função da razão entre o raio de abertura do detector (r) e a distância até a amostra (R). As seções de choque de espalhamento coerente são independentes da energia.

Figura 3.3: Seções de choque de espalhamento coerente, normalizadas pelo fator de forma atômico, para ângulo de espalhamento de 90° , integradas sobre o ângulo sólido de uma pequena abertura circular (detector).

A Figura 3.4 mostra gráficos semelhantes à anterior, considerando o

espalhamento incoerente. As seções de choque foram normalizadas pela função de espalhamento incoerente ($S = 1$), e integradas da mesma forma. As seções de choque de espalhamento incoerente mostradas na Figura 3.4 consideram fótons de 15 keV.

Figura 3.4: Seções de choque de espalhamento incoerente, normalizadas pelo fator de forma atômico, para fótons de 15 KeV, espalhados em ângulo de 90° , integradas sobre o ângulo sólido de uma pequena abertura circular (detector).

As componentes paralelas do vetor campo elétrico do fóton espalhado, tanto coerente como incoerentemente, são isotrópicas, por isto não foram decompostas. As componentes perpendiculares destes vetores foram decompostas em relação aos eixos x (subscrito 0) e y (subscrito 90). É possível notar que o espalhamento das componentes paralelas (tanto coerente quanto incoerente) é várias ordens de grandeza menor do que o espalhamento das componentes perpendiculares. Isto demonstra que é desejável um feixe de fótons com a maior polarização possível na direção paralela, pois desta forma minimiza-se o espalhamento do feixe pela amostra

e, conseqüentemente, o background medido no detector, alcançando menores limites de detecção. O feixe de raios X utilizado neste trabalho possuía 98% de polarização na componente paralela e 2% de polarização na componente perpendicular.

3.4.3 Validação do Espectro de Excitação

A validação do espectro de excitação foi realizada através da comparação entre o espectro reconstruído utilizando a metodologia proposta e um espectro aferido experimentalmente, respeitando as mesmas condições experimentais, com auxílio de um fotodiodo do tipo avalanche. A energia do feixe foi selecionada através de um cristal duplo monocromador Si(111), Si(220) com resolução em energia $\Delta E/E = 10^{-4}$. A distribuição espectral do feixe foi medida entre as energias de 6 e 14 keV, com passo de 0.5 keV.

3.5 Aspectos quantitativos

3.5.1 Efeitos de matriz

Uma dos procedimentos mais complexos envolvendo o modelo de parâmetros fundamentais está relacionado à estimativa dos efeitos de matriz. Em amostras biológicas, a predominância de elementos leves (H, C, N e O) torna impossível a estimativa de sua composição aplicando apenas a fluorescência de raios X, uma vez que estes elementos não podem ser detectados por esta técnica. Somam-se a isto a alta variabilidade na composição das matrizes biológicas, e sua heterogeneidade natural. A composição das matrizes biológicas foi obtida com base na glandularidade das amostras. Os valores desta composição, para os elementos leves, foram determinados por Hammerstein et al. (1979).

3.5.2 Relação entre a intensidade de fluorescência e a concentração do elemento fluorescente

3.5.2.1 Descrição do modelo de Parâmetros Fundamentais

Considere uma amostra homogênea s com espessura h que contenha o elemento fluorescente i em uma concentração relativa C_i . Um feixe primário de composição espectral conhecida I_E , assumidamente paralelo incide sobre a amostra em um ângulo ψ_1 ; a radiação fluorescente é medida por um detector posicionado a um ângulo ψ_2 . A Figura 3.5 mostra o esquema das componentes utilizadas no cálculo da fluorescência primária.

Figura 3.5: Esquema das componentes utilizadas no cálculo da fluorescência primária.

Seja P_i a intensidade total da radiação fluorescente emitida pelo elemento i , a contribuição $P_i(E, x)$ da banda espectral de energia entre E e $E + dE$ e o elemento de volume entre x e $x + dx$, depende dos seguintes fatores:

1. A intensidade de radiação a , que atinge o elemento de volume citado, é dada pela radiação incidente $I_E dE$ após ser atenuada pelo comprimento do caminho $(x / \sin \psi_1)$ que esta realiza no interior da amostra:

$$a = I_E dE \exp \left(-\mu_{(s,E)} \rho \frac{x}{\sin \psi_1} \right) \quad (3.19)$$

onde $\mu_{s,E}$ é o coeficiente de atenuação de massa da amostra para a energia E e ρ é sua densidade.

2. a fração da radiação primária absorvida no elemento de volume é

$$\mu_{(s,E)}\rho\frac{x}{\sin\psi_1}$$

mas apenas a fração $C_i\mu_{i,E}/\mu_{s,E}$ é absorvida pelo elemento fluorescente i de coeficiente de absorção de massa $\mu_{i,E}$. Desta forma, a radiação absorvida pelo elemento i no elemento de volume é dada por:

$$C_i\mu_{(i,E)}\rho\frac{dx}{\sin\psi_1} \quad (3.20)$$

3. A emissão K_α é dada pelo produto do número de fótons absorvidos pelo elemento fluorescente i e seu fator de excitação F_i dado por:

$$F_i = \frac{r_k - 1}{r_k} \omega_K g_{K_\alpha} \quad (3.21)$$

A equação 3.21 é o produto de três probabilidades:

- $r_k - 1/r_k$ é a probabilidade de uma excitação ocorrer na camada K ;
 - g_{K_α} é a probabilidade de emissão de uma linha K_α sobre outras linhas K ;
 - ω_K é a de que o fóton K_α emitido escape do átomo.
4. A emissão da radiação fluorescente se dá de maneira isotrópica. Desta forma a fração da radiação fluorescente que adentra pelo colimador de um detector é dada por:

$$c = \frac{d\Omega}{4\pi} \quad (3.22)$$

onde $d\Omega$ é o ângulo sólido definido pelo colimador.

5. A radiação fluorescente E_i emitida na direção do colimador é, por sua vez, atenuada pela distância percorrida no interior da amostra $x/\sin \psi_2$ e sua fração transmitida é dada por:

$$d = \exp \left(-\mu_{(s,E_i)} \rho \frac{x}{\sin \psi_2} \right) \quad (3.23)$$

6. Um fator adicional deve ser empregado para que possamos ajustar a área do feixe emergente para uma seção unitária.

$$e = \frac{\sin \psi_1}{\sin \psi_2} \quad (3.24)$$

Obtemos então a intensidade da radiação fluorescente $dP_i(E, x)$ como o produto dos fatores a, b, c, d, e e F_i . Podemos definir um fator puramente geométrico:

$$q = \frac{\sin \psi_1}{\sin \psi_2} \times \frac{d\Omega}{4\pi} \quad (3.25)$$

Desta forma, rearranjando os termos, temos:

$$dP_i(E, x) = q F_i C_i \frac{\rho}{\sin \psi_1} \mu_{(i,E)} I_E dE \exp \left[-\rho x \left(\frac{\mu_{(s,E)}}{\sin \psi_1} + \frac{\mu_{(s,E_i)}}{\sin \psi_2} \right) \right] dx \quad (3.26)$$

Integrando a eq. 3.26 de $x = 0$ até $x = h$ a intensidade de fluorescência do elemento i em função da energia incidente E é dada por:

$$P_i(E) = q F_i C_i \frac{\mu_{(i,E)} I_E dE}{\mu_{(s,E)} + \frac{\sin \psi_1}{\sin \psi_2} \mu_{(s,E_i)}} \left\{ 1 - \exp \left[-\rho h \left(\frac{\mu_{(s,E)}}{\sin \psi_1} + \frac{\mu_{(s,E_i)}}{\sin \psi_2} \right) \right] \right\} \quad (3.27)$$

Integrando a equação 3.27 sobre o range de energias úteis para excitação do elemento i (desde $E_{abs,i}$ até E_{max}), considerando um espectro de excitação polienergético,

temos:

$$P_i = qF_iC_i \int_{E_{abs,i}}^{E_{max}} \frac{\mu_{(i,E)}}{\mu_{(s,E)} + \frac{\sin \psi_1}{\sin \psi_2} \mu_{(s,E_i)}} \left\{ 1 - \exp \left[-\rho h \left(\frac{\mu_{(s,E)}}{\sin \psi_1} + \frac{\mu_{(s,E_i)}}{\sin \psi_2} \right) \right] \right\} I_E dE \quad (3.28)$$

A eq. 3.28 mostra que a intensidade dos raios X característicos é alterada pelos efeitos da absorção primária $\mu_{(s,E)}$ e secundária $\mu_{(s,E_i)}$ causadas pela amostra. Esta é a principal fonte dos efeitos de matriz em experimentos de fluorescência de raio X.

Esta equação é a forma geral do modelo de parâmetros fundamentais para amostras de espessura h . Dois casos limites devem ser considerados.

3.5.2.1.1 Amostras grossas

O termo amostras grossas se refere às amostras cuja massa total por unidade de área $m = \rho h$ é maior que um valor crítico de saturação acima do qual não se observa aumento na intensidade da radiação característica emitida pela amostra ao aumentar sua espessura. Se a massa total por unidade de área de uma amostra for suficientemente grande, o termo exponencial da eq. 3.28 se aproxima de 1. Desta forma, temos:

$$P_i = qF_iC_i \int_{E_{abs,i}}^{E_{max}} \frac{\mu_{(i,E)} I_E dE}{\mu_{(s,E)} + A \mu_{(s,E_i)}} \quad (3.29)$$

onde $A = \frac{\sin \psi_1}{\sin \psi_2}$. Esta forma pode ser utilizada com erro relativo inferior a 1% quando a massa total por unidade de área satisfaz a equação (Van Grieken and Markowicz, 2002)

$$m_{grossa} \leq \frac{4.61}{\mu_{(s,E)} \sin \psi_1 + \mu_{(s,E_i)} \sin \psi_2} \quad (3.30)$$

Definindo

$$T_i = qF_i \int_{E_{abs,i}}^{E_{max}} \frac{\mu_{(i,E)} I_E dE}{\mu_{(s,E)} + A\mu_{(s,E_i)}}$$

, como uma constante que depende do elemento a ser analisado, das condições experimentais e da amostra, então a eq. 3.29 se reduz a:

$$P_i = T_i C_i \quad (3.31)$$

3.5.2.1.2 Amostras delgadas

Quando a massa total por unidade de área é muito pequeno, as chaves da eq. 3.28 adquirem a forma $1 - \exp(-\epsilon) = \epsilon$. Neste caso a intensidade da radiação fluorescente é dada por:

$$P_i = \frac{qF_i}{\sin \psi_1} \rho h C_i \int_{E_{abs,i}}^{E_{max}} \mu_{(i,E)} I_E dE \quad (3.32)$$

Esta formulação pode ser aplicada com erros relativos inferiores a 5% quando a massa total por unidade de área satisfaz a equação (Van Grieken and Markowicz, 2002):

$$m_{delg} \leq \frac{0.1}{\mu_{(s,E)} \sin \psi_1 + \mu_{(s,E_i)} \sin \psi_2} \quad (3.33)$$

A massa do elemento fluorescente i por unidade área da amostra é dada por:

$$m_i = \rho h C_i$$

Definindo

$$G_i = \frac{qF_i}{\sin \psi_1} \int_{E_{abs,i}}^{E_{max}} \mu_{(i,E)} I_E dE$$

como uma constante que depende apenas do elemento fluorescente e de condições

experimentais, mas não da amostra, a equação 3.32 pode ser reduzida a

$$P_i = G_i m_i \quad (3.34)$$

Esta relação mostra que experimentos realizados com amostras delgadas são especialmente interessantes pois a equação 3.34 não apresenta nenhum termo dependente da matriz, ou seja, efeitos de matriz podem ser negligenciados. Desta forma, obtemos uma relação direta entre a concentração do elemento e sua intensidade. Entretanto isto só é verdadeiro para amostras na ordem de algumas centenas de Å.

3.5.2.1.3 Amostas intermediárias

Na prática, este trabalho utiliza amostras de espessura intermediária que devem ser analisadas sob a forma geral de parâmetros fundamentais, equação 3.28. Definindo

$$S_i = qF_i \int_{E_{abs,i}}^{E_{max}} \frac{\mu_{(i,E)}}{\mu_{(s,E)} + \frac{\sin \psi_1}{\sin \psi_2} \mu_{(s,E_i)}} \left\{ 1 - \exp \left[-\rho h \left(\frac{\mu_{(s,E)}}{\sin \psi_1} + \frac{\mu_{(s,E_i)}}{\sin \psi_2} \right) \right] \right\} I_E dE \quad (3.35)$$

como uma constante de sensibilidade que depende do elemento a ser analisado, das condições experimentais e da amostra, então a eq. 3.28 se reduz a:

$$P_i = S_i C_i \quad (3.36)$$

Isto implica em uma relação linear entre a intensidade de fluorescência e a concentração do elemento i . Esta relação deve ser aplicada apenas para elementos-traço, onde efeitos secundários de fluorescência, como supressão e realce, podem ser ignorados. Como S_i depende da composição da amostra, devemos

conhecer esta composição de maneira adequada para que possamos quantificar corretamente os elementos-traço de interesse Szalóki et al. (2006).

3.5.3 Limites de Detecção

Limite de detecção é a menor concentração de um analito que pode ser detectada por determinado procedimento de análise de uma substância ou material, para um nível de confiança específico (Nič et al., 2009). Na sua forma mais geral, a equação para o cálculo do limite de detecção é dada por (Borkhodoev, 2014)

$$c_{min} = k s_b \frac{1}{S} \quad (3.37)$$

onde k é uma constante que depende do nível de confiança (e.g. $k = 3$ para $P = 0,99$), s_b é desvio padrão das contagens aferidas no background, dado por $s_b = \sqrt{N_B}$ em que N_B é o número de contagens no background, e S é a sensibilidade da técnica utilizada, que pode ser obtida através da Equação 3.36.

3.5.4 Correlação entre elementos-traço em tecidos mamários

A existência de correlação entre os possíveis pares de elementos foi avaliada através do teste de correlação não paramétrica de Spearmann (Altman, 1990). Foram ainda gerados mapas de cores primárias e, a partir de sua sobreposição, foi possível avaliar localmente a correlação entre os elementos.

3.6 Aspectos qualitativos

3.6.1 Comparação entre os protocolos de preparo de amostra

Foram avaliados duas metodologias de preparação de amostras. A primeira consiste na forma descrita na Seção 3.2.1 e a segunda na seção 3.2.2. As amostras envolvidas nesta etapa eram pareadas, ou seja, eram seções adjacentes de uma mesma amostra inicial. Os efeitos de cada metodologia sobre a composição da amostra foram avaliados a partir da variação da concentração dos elementos-traço.

3.6.2 Aspectos histológicos da distribuição de elementos-traço

Os aspectos histológicos da distribuição dos elementos-traço foram avaliados a partir da comparação entre os mapas de fluorescência e suas respectivas lâminas histológicas.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Determinação do espectro de excitação

A Figura 4.1 compara distribuição espectral do feixe incidente (reconstruído) com o espectro espalhado pela amostra de PMMA, para ângulo de 90°

Figura 4.1: Comparação entre o espectro aferido por meio do espalhamento em uma amostra pura de PMMA e o espectro reconstruído através da metodologia proposta neste trabalho.

É possível verificar ausência de picos de fluorescência no espectro espalhado, indicando pureza da amostra espalhadora, a qual se mostra livre de quantidades significativas de elementos-traço.

A diferença entre o espectro reconstruído e medido se deve ao processo de atenuação sofrido pelo feixe incidente ao penetrar a amostra espalhadora. Este processo remove, principalmente, fótons de baixa energia, fazendo com que a distribuição espectral da radiação espalhada se desloque para uma região mais energética. O aumento observado no número de fótons nas regiões mais energéticas do espectro aferido por espalhamento, quando comparado ao espectro incidente reconstruído, é meramente aparente, consequência do processo de normalização das curvas, uma vez que inexistente fenômeno de interação que confira energia ao fóton incidente.

A Figura 4.2 compara o espectro incidente reconstruído através da metodologia proposta neste trabalho com o espectro obtido experimentalmente com auxílio de um fotodiodo. Os desvios relativos observados entre o espectro medido e reconstruído são menores que 7%, indicando boa acurácia do modelo proposto.

4.2 Aspectos Quantitativos

4.2.1 Parâmetros fundamentais aplicados a amostras biológicas

O modelo de parâmetros fundamentais, empregado para o cálculo das concentrações de elementos-traço neste trabalho, necessita de duas entradas principais: o espectro de excitação e a composição da matriz. Não é possível acessar a composição da matriz em tecidos biológicos por meio de técnicas de XRF, pois estas matrizes são formadas primordialmente por elementos leves (H, C, N, O) que, por sua

Figura 4.2: Comparação entre o espectro aferido por meio de fotodiodo e o espectro reconstruído através da metodologia proposta neste trabalho.

vez, não produzem picos de fluorescência suficientemente intensos para que sejam quantificados. Entretanto seus efeitos de absorção influenciam significativamente na intensidade aferida dos picos de fluorescência dos elementos mais pesados (Szczerbowska-Boruchowska, 2012). Desta forma, a quantificação dos elementos de interesse deste trabalho foi realizada utilizando primeiramente amostras padrão certificadas, cuja composição é conhecida e, posteriormente, amostras de tecido mamário *in natura*, cuja matriz pode ser encontrada na literatura (Hammerstein et al., 1979).

4.2.1.1 Quantificação de elementos-traço em padrões homogêneos

A quantificação dos elementos-traço foi realizada com auxílio do software PyMCA 5.3.1 (Solé et al., 2007), desenvolvido e distribuído livremente pela ESRF (European Synchrotron Radiation Facility). Foram utilizados padrões certificados

Tabela 4.1: Comparação entre as concentrações de elementos (ppm) em material de referência de sangue bovino (IAEA A-13) obtidas neste trabalho e valores certificados.

	Ca	Fe	Cu	Zn
A1	302	2362	5,9	18
A2	325	2512	6,3	18,6
A3	303	2370	6,2	18,5
A4	318	2513	6,04	18,5
A5	302	2367	6,2	18,2
A6	326	2512	6,2	18,6
Média	313 ± 11	2440 ± 80	6,2 ± 0,2	18,4 ± 0,3
Valor certificado	286 ± 53	2400 ± 150	4,3 ± 0,5	13 ± 1

de amostras biológicas. As frações de massa dos elementos leves (H, C, N, O) constituintes de suas matrizes foram obtidas através dos respectivos certificados. As Tabelas 4.1, 4.2 e 4.3 mostram os resultados obtidos para padrões certificados de sangue bovino, fígado bovino e feno, respectivamente, aferidos em seis áreas distintas (A1 - A6) para cada amostra. Os valores médios são apresentados seguidos por seus respectivos desvios-padrão.

De forma geral, foi possível quantificar as amostra-padrão com acurácia relativa menor que 8%. É possível observar na Tabela 4.3 que os elementos Fe e Zn apresentam acurácia mais pobre, na ordem de 24%, entretanto as medidas apresentaram alta variabilidade para estes elementos. O mesmo foi observado para o elemento Fe na Tabela 4.2. Análises envolvendo $\mu - XRF$ possuem caráter microscópico, ao passo que a quantificação dos padrões certificados se dá, pelos seus fabricantes, através do uso de técnicas macroscópicas. Desta forma, a heterogeneidade da amostra pode não ser um grande obstáculo para a emissão dos certificados, entretanto amostras que apresentam acurácia mais pobre para determinados elementos obtida encontra-se dentro dos limites estabelecidos pelo

Tabela 4.2: Comparação entre as concentrações de elementos (ppm) em material de referência de fígado bovino (NIST 1577b) obtidas neste trabalho e valores certificados.

	Ca	Fe	Cu	Zn
A1	115	153	148,2	133,9
A2	114	150	167,7	135,5
A3	107	137	156	135,2
A4	117	144	159	139,9
A5	105	131	146	127,9
A6	114	132	150	125,5
Média	112,5 ± 4,7	141 ± 9,2	154 ± 8,1	133 ± 5,3
Valor certificado	116 ± 4	184 ± 15	160 ± 8	127 ± 16

Tabela 4.3: Comparação entre as concentrações de elementos (ppm) em material de referência de feno (IAEA V-10) obtidas neste trabalho e valores certificados.

	Ca	Fe	Cu	Zn
A1	20225	119	9,6	27
A2	20211	118	9,5	28
A3	20192	117	9,3	28
A4	21360	163	10,9	34
A5	21363	163	10,5	34
A6	21368	165	10,9	34
Média	20787 ± 632	141 ± 25	10,1 ± 0,7	31 ± 3,6
Valor certificado	21600 ± 600	186 ± 4	9,4 ± 0,3	24 ± 1

desvio padrão das medidas.

4.2.1.2 Quantificação de elementos-traço em tecidos mamários *in natura*

4.2.1.2.1 Sensibilidade e Limites de Detecção

A Figura 4.3 mostra as curvas de sensibilidade normalizada e os limites de detecção para a técnica utilizada neste trabalho, em função do número atômico do

elemento-traço de interesse (cálcio $Z=20$, ferro $Z=26$, cobre $Z=29$ e zinco $Z=30$).

Figura 4.3: Sensibilidade e limite de detecção para os elementos Ca, Fe, Cu e Zn em uma amostra de tecido mamário *in natura* crio-seccionada.

Os limites de detecção, bem como as sensibilidades, foram aferidos a partir de uma amostra de tecido mamário tumoral *in natura*. Os limites de detecção se mostraram adequados para a produção de resultados analíticos para todos os elementos, com exceção do Cu que apresentou concentrações abaixo do limite de detecção em diversos pontos, produzindo mapas de distribuição com excesso de ruídos.

4.2.2 Quantificação da distribuição dos elementos-traço em amostra de tecido mamário *in natura*

Foram quantificadas as concentrações de elementos-traço em 16 amostras de tecido mamário *in natura* crio-seccionadas, sendo 8 de tecido normal e 8 de tecido

tumoral. A Figura 4.4 mostra os valores médios da concentração dos elementos-traço (em partes por milhão).

Figura 4.4: Distribuição dos elementos *Ca*, *Fe*, *Cu* e *Zn* em um amostras de tecido mamário tumoral e normal. As amostras foram medidas na forma *in natura* e *crio-seccionada*.

As concentrações dos elementos-traço mostram distribuição positiva, e grande amplitude interquartil, conforme o esperado para tecidos biológicos (Dawson and Trapp, 2004). É possível observar a tendência de aumento na concentração dos elementos-traço em amostras de tecido tumoral, quando comparadas às amostras de tecido normal, concordando com tendencias reportados na literatura Al-Ebraheem et al. (2014); Silva et al. (2009); Farquharson and Geraki (2004); Geraki et al. (2004a, 2002). A significância estatística dos resultados foi avaliada através do teste de Mann-Whitney para amostras não-pareadas. Este teste revelou diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$) para a concentração dos elementos *Ca* ($p = 0.0146$) e *Cu* ($p = 0.0414$). Os valores absolutos das concentrações apresentam

alta variabilidade, conforme esperado para amostras biológicas uma vez que fatores como idade, genética, dieta e estágio da doença podem influenciar os valores obtidos (Silva et al., 2012). A comparação de resultados quantitativos com a literatura deve atentar para as características metodológicas envolvidas na preparação da amostra e técnica analítica utilizada (Yaman, 2006). Uma comparação mais adequada, baseada na variação da concentração de elementos-traço em amostras normais e tumorais, é apresentada na seção 4.3.2.

4.3 Aspectos qualitativos

4.3.1 Comparação entre os protocolos de preparo de amostra

A Figura 4.5 compara a média dos espectros aferidos em duas amostras pareadas. O espectro em preto mostra valores de uma amostra incluída em parafina e o espectro em vermelho mostra os valores de uma amostra *in natura* crio-seccionada. As linhas verticais referenciam os valores de emissão de cada elemento.

É possível verificar que todos os elementos selecionados neste estudo apresentam maior intensidade de emissão para as amostras incluídas em parafina. Espectros similares a este, obtidos em cada ponto das amostras foram ajustados utilizando a ferramenta *Batch Fitting* do pacote PyMCA Application versão 5.3.1. Uma segunda ferramenta chamada *RGB Correlator* foi utilizada na geração dos mapas da distribuição dos elementos-traço. A Figura 4.6 mostra os mapas da distribuição de elemento-traço de duas amostras pareadas, representativas do conjunto trabalhado, submetidas à metodologia de inclusão em parafina (esquerda) e crio-seccionamento (direita).

É possível observar que as amostras submetidas ao protocolo de inclusão em parafina apresentam picos de fluorescência mais intensas. O valor médio das áreas

Figura 4.5: Comparação entre os espectros obtidos para duas amostras pareadas em parafina e in natura. As linhas verticais referenciam as energias de emissão de cada elemento.

dos picos de fluorescência e suas respectivas incertezas, calculadas para o intervalo de confiança de 95%, são mostradas na Figura 4.7.

Existe significância estatística deste aumento comprovada através do teste de Wilcoxon para amostras pareadas ($p < 0.05$). É fato conhecido que o protocolo de inclusão em parafina degrada a matriz tecidual, especialmente sua componente adiposa (Chwiej et al., 2005). Esta alteração da matriz pode contribuir para a elevação de um determinado pico de fluorescência sob dois aspectos: 1) reduzindo o coeficiente de atenuação da amostra, e 2) reduzindo o background espalhado sob o pico. Os valores médios do incremento para o cálcio, ferro, cobre e zinco foram de 5,2, 1,75, 1,5 e 2,5 respectivamente. Com exceção do zinco, o incremento na intensidade dos elementos aumenta enquanto seu número atômico diminui. Este dado corrobora a hipótese anterior, já que os elementos mais leves são os mais sensíveis a variação

Figura 4.6: Mapas 2D da distribuição dos elementos-traço Ca, Fe, Cu e Zn. Ambos os mapas correspondem à mesma amostra. As imagens à direita foram obtidas a partir do protocolo de inclusão em parafina e as amostras à esquerda foram obtidas a partir da metodologia de crio-seccionamento.

do coeficiente de atenuação. Estudos anteriores (Al-Ebraheem et al., 2015; Perrin et al., 2015; James et al., 2011; Chwiej et al., 2005) apontam para uma relação oposta entre a intensidade de fluorescência e os protocolos de preparação de amostras, indicando que quanto menos processada a amostra é, maior a intensidade de sua fluorescência. Entretanto tais estudos foram realizados com tecido nervoso (Perrin et al., 2015; James et al., 2011; Chwiej et al., 2005) ou tecido epitelial (Al-Ebraheem et al., 2015) de cobaias, onde os efeitos da degradação da matriz tecidual não devem ser comparados ao tecido mamário humano. Para além destas considerações, o incremento observado no elemento zinco possui características que não são explicadas pelas hipóteses acima. Chwiej et al. (2005) encontrou resultados similares para o elemento zinco quando comparou amostras de tecido nervoso crio-seccionadas e incluídas em parafina, estabelecendo que tal incremento advém de contaminação exógena por zinco dos materiais utilizados. Cabe salientar que todos os materiais utilizados neste estudo possuem grau analítico e, portanto, devem ser livres de contaminação. Entretanto a alta sensibilidade da técnica de XRF é capaz de

Figura 4.7: Comparação entre os valores médios da intensidade de fluorescência para os elementos seleccionados em cada protocolo de preparação de amostras.

detectar pequenas contaminações. Estudos futuros devem analisar a presença de elementos-traço em cada material envolvido no processamento das amostras a fim de detectar as possíveis fontes de contaminação.

As variações observadas nesta etapa sugerem que amostras de mama incluídas em parafina produzem picos de fluorescência mais intensos. Isto impacta positivamente na detecção dos elementos-traço de forma geral e, em particular, elementos-traço em baixas concentrações, próximos ao limite de detecção. Embora indícios de contaminação tenham sido verificados para o elemento zinco, isto não impede que as amostras submetidas a este protocolo sejam avaliadas, desde que todas as amostras tenham sido tratadas de maneira idêntica durante seu preparo. Amostras submetidas a protocolos de preparação diferentes devem ser analisadas cuidadosamente, e as conclusões sobre a concentração e distribuição destes elementos

devem levar em consideração a metodologia de preparo e seus impactos sobre a distribuição dos mesmos e sobre os efeitos de matriz.

4.3.1.1 Correlação entre elementos-traço em amostras *in natura* e amostras em parafina

O nível de correlação não paramétrica entre os elementos-traço selecionados foi aferido através do coeficiente r de Sperman. A Tabela ?? mostra as matrizes dos coeficientes de correlação entre os elementos-traço para tecido *in natura* crio-seccionado (acima da diagonal principal) e incluído em parafina (abaixo da diagonal principal), para cada uma das amostras selecionadas nesta etapa. O grande número de pontos avaliados em cada amostra conferiu significância estatística a todos os resultados apresentados.

De maneira geral, é possível observar o aumento na correlação entre os elementos-traço nos tecidos incluídos em parafina. A Figura 4.8 mostra a matriz de dispersão dos pontos que geraram a correlação da Amostra 2. Acima da diagonal principal temos o tecido *in natura* crio-seccionado e abaixo temos o tecido incluído em parafina.

A hipótese sustentada neste trabalho é a de que os solventes utilizados no preparo das amostras incluídas em parafina podem remover formas iônicas livres, ou fracamente ligadas de alguns elementos-traço, como Ca, Fe (Bonta et al., 2017; Chwiej et al., 2005) e Zn (Riesop et al., 2015). Esta hipótese foi verificada por Bonta et al. (2017) e Chwiej et al. (2005) para os elementos Ca e Fe em estudos semelhantes sobre protocolos de preparação de amostras envolvendo tecidos diversos. Ao terem suas formas livres removidas, sobram na amostra apenas as espécies fortemente ligadas às proteínas ou outras moléculas, com sítios bem definidos, elevando o grau de sua correlação espacial com os demais elementos presentes nestes mesmos sítios. Já o elemento Cu é tóxico ao organismo quando encontrado em sua forma livre. Isto

Tabela 4.4: Comparação entre as correlações dos elementos-traço para amostras *in natura* (acima da diagonal principal) e em parafina (abaixo da diagonal principal).

	Ca	Fe	Cu	Zn
Ca	1	0.56	0.17	0.43
Fe	0.77	1	0.24	0.47
Cu	0.56	0.48	1	0.47
Zn	0.79	0.72	0.68	1
<i>Amostra 1</i>				
	Ca	Fe	Cu	Zn
Ca	1	0.86	0.32	0.80
Fe	0.94	1	0.40	0.82
Cu	0.86	0.83	1	0.54
Zn	0.98	0.92	0.86	1
<i>Amostra 2</i>				
	Ca	Fe	Cu	Zn
Ca	1	0.86	0.32	0.80
Fe	0.66	1	0.40	0.82
Cu	0.27	0.27	1	0.54
Zn	0.72	0.69	0.43	1
<i>Amostra 3</i>				
	Ca	Fe	Cu	Zn
Ca	1	0.74	0.45	0.77
Fe	0.82	1	0.47	0.94
Cu	0.72	0.69	1	0.56
Zn	0.86	0.75	0.79	1
<i>Amostra 4</i>				

faz com que a quase totalidade deste elemento esteja disponível na forma de quelatos complexos ligados a proteínas e outras macromoléculas (Brewer, 2008), tornando sua distribuição pouco suscetível à mudanças oriundas de sua interação com solventes aquosos.

As amostras *in natura* crio-seccionadas devem ser mais representativas sobre a distribuição destes elementos na condição *in vivo*, pois estão sujeitas a um número menor de etapas de processamento. Entretanto, a grande disponibilidade de amostras incluídas em parafina, que não raras vezes são a única forma disponível, conferem a esta técnica grande interesse. Os resultados apresentados nesta sessão mostram que ambas as formas de preparo são efetivas na pesquisa sobre elementos-traço em tecidos mamários humanos, já que guardam correlação com os

Figura 4.8: Matriz de dispersão de pontos utilizada no cálculo das correlações da Amostra 2 (Tabela??). Acima da diagonal principal temos o tecido *in natura* crio-seccionado e abaixo temos o tecido incluído em parafina.

aspectos morfológicos das amostras. Entretanto amostras incluídas em parafina podem alterar a quantidade total de determinados elementos-traço, através da remoção de íons livres ou fracamente ligados. Desta forma, a comparação entre amostras análogas deve ser feita assumindo que as mesmas foram tratadas de maneira idêntica. Os resultados mostram ainda um incremento no sinal fluorescente de amostras incluídas em parafina, conferindo vantagem a esta forma de preparo, já que podem ser escaneadas em um intervalo de tempo menor.

4.3.1.1.1 Aspectos morfológicos dos mapas de fluorescência

A Figura 4.9 mostra os mapas da distribuição dos elementos-traço em uma amostra *in natura* crio-seccionada (superior) e uma amostra incluída em parafina

(inferior), bem como suas respectivas matrizes morfológicas.

Figura 4.9: Aspectos morfológicos da distribuição dos elementos-traço para amostras *in natura* crio-seccionada (superior) e incluídas em parafina (inferior).

Aspectos morfológicos como formato similar entre os mapas de $\mu - XRF$ e suas matrizes podem ser verificados. Além disso, é possível identificar a presença de subestruturas macroscópicas nestes mapas. As escalas de cores foram ajustadas de modo a evidenciar estes aspectos em cada amostra e, neste caso, não devem ser comparadas entre si. A distribuição dos elementos-traço se mostra razoavelmente uniforme em ambas as amostras, com alguns pontos de concentração espalhados sobre suas superfícies. Não foram observadas alterações na distribuição destes elementos que prejudicassem a representação morfológica das estruturas teciduais em nenhum dos protocolos de preparo. Resultados similares a este foram observados por Bonta et al. (2017) para metais de transição. A exceção neste caso é o cobre, cujas baixas concentrações em diversos pontos das imagens prejudicam a interpretação de seus mapas, como observado por Farquharson et al. (2007).

4.3.2 Distribuição dos elementos-traço em amostras normais e tumorais

Os níveis relativos dos elementos Ca, Fe, Cu e Zn foram estabelecidos a partir de 34 amostras de tecido tumoral (carcinoma) e comparadas com o tecido normal de outras 28 amostras não pareadas. A Figura 4.10 mostra o diagrama de caixas das médias de cada elemento. Os valores representam a área do pico de fluorescência do referido elemento normalizada pela área do pico do argônio presente no ar.

Figura 4.10: Distribuição dos valores médios da intensidade de fluorescência para os elementos selecionados em amostras de tecido tumoral ($n = 34$) e normal ($n = 28$).

A Figura 4.10 revela um aumento nos níveis dos elementos-traço em amostras de tecido tumoral, quando comparadas com amostras de tecido normal. Este aumento foi testado estatisticamente através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney para amostras não pareadas (Altman, 1990), revelando ser

significativo ($P < 0.05$) para os elementos Ca, Cu e Zn.

A Tabela 4.5 mostra a razão entre as médias dos Ca, Fe, Cu e Zn em tecidos mamários tumorais e normais obtidas neste trabalho, com seus respectivos erros propagados, e compara com os dados publicados na literatura. Magalhães et al. (2006) utilizou as técnicas de fluorescência de raios X dispersiva em energia (EDXRF) e fluorescência de raios X por reflexão total para estudar os elementos Fe, Cu e Zn em amostras não-pareadas de tecido mamário tumoral e normal. As técnicas de fluorescência de raios X induzidas por radiação síncrotron (SRXRF) foram utilizadas pelos demais autores, incluindo este trabalho, para estudar amostras tumorais e normais de tecido mamários não pareadas (este trabalho), ou pareadas Al-Ebraheem et al. (2014); Silva et al. (2009); Farquharson and Geraki (2004); Geraki et al. (2004a, 2002). O elemento Ca foi estudado por este trabalho, além de Al-Ebraheem et al. (2014) e Silva et al. (2009).

4.3.2.1 Cálcio

O aumento nos níveis de cálcio encontrado neste trabalho é da ordem de 1.74, dado corroborado por Al-Ebraheem et al. (2014) que descreve uma elevação de 1.97 para o mesmo elemento, enquanto Silva et al. (2009) encontra um aumento mais expressivo, de 3.3. Todos os trabalhos reportam significância estatística nesta elevação.

4.3.2.2 Ferro

No presente estudo não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de Fe em tecidos mamários tumorais e normais. O mesmo resultado foi observado por Al-Ebraheem et al. (2014), enquanto os demais trabalhos citados mostram elevação nos níveis de Fe com significância estatística em tecidos mamários tumorais, quando comparados com tecidos mamários normais. É

Tabela 4.5: Comparação dos resultados obtidos neste trabalho com a literatura.

Elemento	Trabalho	Técnica	Amostras Pareadas	Razão Tumor/Normal
Ca	Este Trabalho	SRXRF	N	1.74
	Magalhães et. al. 2006	TRXF	N	–
		EDXRF	N	–
	Geraki et. al. 2004	SRXRF	S	–
	Geraki 2002 et. al.	SRXRF	S	–
	Farquharson et. al. 2004		S	–
	Al-Ebraheem 2014 et. al.	SRXRF	S	1.97
	Silva et. al. 2009	SRXRF	S	3.3
Fe	Este Trabalho		N	1.74*
	Magalhães et. al. 2006	TRXF	N	19.6
		EDXRF	N	4.59
	Geraki et. al. 2004	SRXRF	S	1.53
	Gerakiet. al. 2002	SRXRF	S	1.62
	Farquharson et. al. 2004	SRXRF	S	2*
	Al-Ebraheem 2014 et. al.	SRXRF	S	1.08
	Silva et. al. 2009	SRXRF	S	2.81
Cu	Este Trabalho		N	1.38
	Magalhães et. al. 2006	TRXF	N	7
		EDXRF	N	0.77
	Geraki et. al. 2004	SRXRF	S	2.9
	Geraki et. al. 2002	SRXRF	S	3.06
	Farquharson et. al. 2004	SRXRF	S	3.5
	Al-Ebraheem et. al. 2014	SRXRF	S	1.34
	Silva et. al. 2009	SRXRF	S	3
Zn	Este Trabalho	SRXRF	N	1.89
	Magalhães et. al. 2006	TRXF	N	6.5
		EDXRF	N	2.06
	Geraki et. al. 2004	SRXRF	S	2.37
	Geraki et. al. 2002	SRXRF	S	2.43
	Farquharson et. al. 2004	SRXRF	S	3
	Al-Ebraheem et. al. 2014	SRXRF	S	2.58
	Silva et. al. 2009	SRXRF	S	3.81

* Valor sem significância estatística

interessante notar que os aumentos reportados por Silva et al. (2009); Farquharson and Geraki (2004) e Geraki et al. (2004a, 2002) são comparáveis entre si, enquanto os resultados publicados por Magalhães et al. (2006) são várias vezes maiores.

4.3.2.3 Cobre

O aumento nos níveis de cobre observados neste trabalho para tecidos mamários tumorais em relação aos normais foi de 1.38. Este resultado é comparável ao obtido por Al-Ebraheem et al. (2014) que encontrou a razão de 1.34 para o mesmo elemento. Silva et al. (2009); Farquharson and Geraki (2004) e Geraki et al. (2004a, 2002) encontraram elevação nos níveis de cobre da ordem de 3 vezes para tecidos tumorais em relação aos tecidos normais. É interessante notar que Magalhães et al. (2006) observou um aumento nos níveis de cobre em tecidos tumorais da ordem de 7 vezes quando utilizou a técnica TRXRF, ao passo que, no mesmo trabalho reportou a diminuição deste elemento (razão 0.77) em tecidos mamários tumorais em relação aos normais ao utilizar a técnica EDXRF.

4.3.2.4 Zinco

A concentração do elemento zinco se mostra maior em tecidos mamários tumorais quando comparados com tecidos mamários normais, apresentando neste trabalho razão de 1.89. Esta razão é comparável aos demais trabalhos listados na Tabela 4.5, exceto pelos dados apresentados por Magalhães et al. (2006) para a técnica de TRXRF que mostra um aumento de 6.5 vezes. Todos os aumentos reportados apresentam significância estatística.

De maneira geral, a principal tese sustentada pelos autores citados na Tabela 4.5 é a de que o fato dos tecidos tumorais possuírem maior atividade metabólica, além de divisão celular acelerada, implica na demanda elevada por elementos-traço que intermedeiam as reações biológica (Geraki et al., 2002). Esta tese encontra

ressonância nos resultados obtidos neste trabalho. Somando estes resultados ao papel biológico destes elementos-traço discutidos nesta seção, vemos que estes elementos possuem grande potencial como biomarcadores para tumores mamários, como sugerido por trabalhos anteriores publicados por este grupo (Silva et al., 2013, 2012).

4.3.3 Aspectos histológicos da distribuição dos elementos-traço

Os aspectos histológicos dos mapas de $\mu - XRF$ foram avaliados a partir de sua comparação com lâminas histológicas produzidas a partir de um corte adjacente da mesma matriz tecidual, coradas com hematoxilina e eosina (H&E). Foram utilizadas cores primárias para produção dos mapas de $\mu - XRF$ dos elementos Ca (vermelho), Fe (verde) e Zn (azul), enquanto o Cu está representado em uma escala de cores do tipo "cobre".

4.3.3.1 Mapas de amostras parafina X histológico

4.3.3.1.1 Tecido normal

As Figuras 4.11 e 4.12 mostram os mapas da distribuição de elementos-traço em amostras de tecido mamário normal, em regiões lobulares.

A análise das figuras mostra que o tecido lobular possui maior concentração dos elementos Ca, Fe e Zn, quando comparado ao estroma ao seu redor. Já o elemento Cu encontra-se distribuído de maneira mais homogênea entre o tecido lobular e o estroma conjuntivo, sendo difícil a diferenciação destes tecidos a partir deste elemento, concordando com dados reportados na literatura (Riesop et al., 2015). Os baixos níveis do elemento Cu produzem imagens com excesso de ruído, como demonstrado por Farquharson et al. (2007).

Figura 4.11: Comparação entre lâmina HE de uma amostra de tecido mamário normal e mapas de fluorescência para cada elemento. A correlação entre os elementos Ca, Fe e Zn está representada na figura "Corr".

4.3.3.1.2 Tecido tumoral

As Figuras 4.13 e 4.14 mostram os mapas da distribuição de elementos-traço em duas amostras de tecido mamário tumoral independentes.

A Figura 4.13 mostra que os elementos Ca e Zn são distribuídos de forma relativamente homogênea ao longo da amostra, formando um padrão semelhante com maior intensidade em regiões com maior proliferação de células tumorais. Já o elemento Fe mostra a tendência de se concentrar com maior intensidade nas proximidades de regiões ductais.

4.3.3.2 Mapas de correlação entre elementos-traço

A ação dos elementos-traço em tecidos mamários ocorre de forma complexa, muitas vezes combinada com outros elementos-traço. Estabelecer as correlações entre estes elementos nos diferentes tipos de tecidos pode ajudar a compreender melhor seu mecanismo de ação. Desta forma, foram estabelecidos os mapas de correlação entre os pares de elementos investigados neste trabalho, para cada tipo

Figura 4.12: Comparação entre lâmina HE de uma amostra de tecido mamário normal e mapas de fluorescência para cada elemento. A correlação entre os elementos Ca, Fe e Zn está representada na figura "Corr".

de tecido.

4.3.3.2.1 Tecido normal

As Figuras 4.15 e ?? mostra os mapas de correlação dos elementos-traço, tomados em pares para uma amostra de tecido mamário normal.

4.3.3.2.2 Tecido tumoral

As Figuras 4.16 e 4.16 mostram os mapas de correlação dos elementos-traço, tomados em pares para amostras de tecido mamário tumoral.

As imagens permitem a avaliação qualitativa da correlação espacial entre os pares de elementos. De maneira geral, os elementos Ca e Zn apresentam maior grau de correlação espacial, estando distribuídos de maneira homogênea pelas amostras, tanto normal quanto tumoral, estando estes resultados de acordo com o reportado

Figura 4.13: Comparação entre lâmina H&E de uma amostra de tecido mamário tumoral e mapas de fluorescência para cada elemento. A correlação entre os elementos Ca, Fe e Zn está representada na figura "Corr".

Figura 4.14: Comparação entre lâmina H&E de uma amostra de tecido mamário tumoral e mapas de fluorescência para cada elemento. A correlação entre os elementos Ca, Fe e Zn está representada na figura "Corr".

por da Silva et al. (2012); Silva et al. (2009). Estes elementos apresentam um nível mais baixo de correlação com o Fe, que mostra tendência em se acumular mais fortemente em regiões ductais e vasculares, como mostra a Figura 4.16. Padrões semelhantes a estes foram reportados por González de Vega et al. (2017) em um trabalho recente que mapeou elementos-traço em tecidos mamários utilizando a técnica de LA-ICP-MS. O cobre encontra-se em concentrações extremamente baixas,

Figura 4.15: Mapas de correlação entre os elementos-traço em uma amostra de tecido mamário normal.

distribuído de maneira mais homogênea no tecido, apresentando pouca correlação espacial tanto com a imagem histológica quanto com os demais elementos.

4.3.3.2.3 Correlação entre elementos-traço em tecido mamário em nível macroscópico

Poucos trabalhos na literatura quantificam a correlação espacial microscópica destes elementos em tecidos mamários (Silva et al., 2013; da Silva et al., 2012). Portanto, visando a obtenção parâmetros que possam ser comparados com a literatura de maneira mais ampla, foram traçadas as correlações a partir dos valores médios da distribuição de cada elemento. As Tabelas 4.6 mostram a correlação não-paramétrica de Spearman entre os elementos-traço em tecidos tumorais e normais. Valores sinalizados com asterisco apresentam significância estatística.

Figura 4.16: Mapas de correlação entre os elementos-traço em uma amostra de tecido mamário tumoral.

Tabela 4.6: Comparação entre as correlações de elementos-traço em tecidos normais e tumorais.

Tecido tumoral					Tecido normal				
	Ca	Fe	Cu	Zn		Ca	Fe	Cu	Zn
Ca	1				Ca	1			
Fe	0.36	1			Fe	0.30	1		
Cu	0.62*	0.35	1		Cu	0.39	0.16	1	
Zn	0.31	-0.34	0.57*	1	Zn	0.81*	-0.04	0.30	1

*Valor estatisticamente significativo

Os resultados mostraram forte correlação, com significância estatística, entre os elementos Ca-Zn em tecido normal. Este resultado concorda com os reportados por da Silva et al. (2012); Silva et al. (2009).Silva et al. (2013) mostrou a presença destes elementos em ensaios imunoistoquimicos de tecidos mamários com marcação

Figura 4.17: Mapas de correlação entre os elementos-traço em uma amostra de tecido mamário tumoral.

positiva para MMPs e TIMPs, podendo esta correlação ser causa ou consequência da expressão destas proteínas.

Correlações moderadas, estatisticamente significativas, foram observadas para os elementos Ca-Cu e Cu-Zn em tecidos tumorais. O cobre é encontrado em todas as células vivas (Raju et al., 2006), e sua capacidade de formar íons Cu^+ e Cu^{2+} tornam este elemento um poderoso catalisador das reações de Fenton e Harber-Weiss, conforme discutido na seção 2.2.3. As espécies reativas de oxigênio geradas nestas reações podem contribuir na gênese e etiologia tumoral. Somam-se a isso, diversas evidências de que o cobre estimula a vascularização do tecido (Lowndes and Harris, 2005; McAuslan and Reilly, 1980), bem como a proliferação e invasão de células tumorais (Hu, 1998).

A presença do cálcio no tecido mamário está fortemente associada às microcalcificações, tipo I (oxalato de cálcio) e II (hidroxiapatita). Estas microcalcificações podem estimular a proliferação de células tumorais, além de estarem associadas à expressão das MMPs 2, 9 e 13, que degradam a matriz extracelular num processo que facilita o crescimento tumoral (Cooke et al., 2003; Morgan et al., 2001). Estas MMPs por sua vez, são proteínas zinco-dependentes que

possuem este elemento como ativador de seus domínios catalíticos, conforme descrito na seção 2.2.4. Desta forma, a correlação entre os elementos Ca-Cu e Cu-Zn pode estar relacionada à elevação do processo angiogênico combinada com uma maior expressão de MMPs, apontando para processos de crescimento e invasão tumoral.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

5.1 Determinação do espectro de excitação

Neste trabalho foi apresentada uma metodologia para a determinação do espectro de excitação baseada no espalhamento gerado por uma amostra-padrão de PMMA com matriz conhecida. Esta metodologia é capaz de reconstruir o espectro incidente sobre a superfície de entrada da amostra a ser medida. Isto se mostra como uma vantagem do ponto de vista experimental, já que não são necessários procedimentos de correção por distância ou atenuação no ar comuns à determinação espectral baseada em espectros teóricos. Outra vantagem a ser ressaltada é a possibilidade de obtenção da distribuição espectral sobre todos os canais de detecção, fato que não pode ser igualado por um fotodiodo. Ainda com relação ao fotodiodo, a determinação do espectro de excitação a partir deste equipamento exige a monocromatização do feixe através de um cristal. Este procedimento não se faz necessário quando aplicamos a metodologia descrita neste trabalho, convertendo-se na prática em economia de tempo da linha de luz.

5.2 Distribuição e correlação dos elementos-traço

A distribuição dos elementos-traço foi analisada de maneira qualitativa para amostras incluídas em parafina e de maneira quantitativa para amostras *in natura* crio-seccionadas. Foi possível observar a elevação de todos os elementos de interesse deste trabalho em tecidos tumorais, indicando um aumento da atividade biológica destes tecidos. Entretanto para amostras *in natura* crio-seccionadas esta elevação não se mostrou significativa estatisticamente, para o Fe e o Zn, devido ao baixo número de amostras disponíveis.

As correlações entre os elementos-traço foram analisadas de maneira qualitativa e quantitativa. Os resultados mostram que as concentrações dos elementos Ca-Zn são fortemente correlacionados em tecido mamário normal. Foram observadas correlações moderadas entre os elementos Ca-Cu e Cu-Zn em tecido tumorais. Estas correlações podem indicar a elevação do processo angiogênico e de invasão tumoral, devido ao papel-chave que estes elementos possuem nestes processos.

Os resultados obtidos indicam que a distribuição dos elementos-traço está diretamente relacionada à atividade tumoral. Estudos futuros, utilizando fontes de radiação síncrotron com maior resolução espacial, como o Sirius, poderão mapear a distribuição destes elementos em nível celular, jogando nova luz sobre o papel dos elementos-traço no câncer de mama.

5.3 Metodologias de preparação de amostras

Foram avaliados duas metodologias de preparação de amostras de tecido mamário. Ambas as metodologias são efetivas em na produção de imagens da distribuição dos elementos Ca, Fe, Cu e Zn. No entanto elas fornecem resultados

distintos em relação à distribuição espacial dos elementos-traço em níveis absolutos, uma vez que os solventes utilizados no processo de inclusão em parafina degradam a componente adiposa da matriz tecidual. Isto pode ser vantajoso do ponto de vista analítico, especialmente para a análise do elemento Cu, pois o sinal fluorescente é menos afetado pelos efeitos de matriz, no entanto a metodologia baseada em crio-seccionamento produz amostras mais representativas da condição *in vivo*.

Foram encontrados indícios de contaminação das amostras incluídas em parafina. Novos experimentos devem ser realizados a fim de determinar a origem desta contaminação, no entanto ela não impede a avaliação qualitativa da distribuição de elementos-traço, desde que todas as amostras sejam submetidas a um processo idêntico. Desta forma, comparações entre a distribuição destes elementos em amostras submetidas a processos distintos de preparação, devem ser realizadas com cautela.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, A. (1975). Calcification in human breast carcinomas: Ultrastructural observations. *The Journal of Pathology*, 117(4):247–251.
- Al-Ebraheem, A., Dao, E., Desouza, E., Li, C., Wainman, B. C., McNeill, F. E., and Farquharson, M. J. (2015). Effect of sample preparation techniques on the concentrations and distributions of elements in biological tissues using μ -SRXRF: a comparative study. *Physiological Measurement*, 36(3):N51–N60.
- Al-Ebraheem, a., Dao, E., Geraki, K., and Farquharson, M. J. (2014). Emerging Patterns in the Distribution of Trace Elements in Ovarian, Invasive and In-Situ Breast Cancer. *Journal of Physics: Conference Series*, 499(1):012014.
- Al-Ebraheem, a., Farquharson, M. J., and Ryan, E. (2009). The evaluation of biologically important trace metals in liver, kidney and breast tissue. *Applied Radiation and Isotopes*, 67(3):470–474.
- Al-Ebraheem, a., Goettlicher, J., Geraki, K., Ralph, S., and Farquharson, M. J. (2010). 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*, 39(5):332–337.
- Altman, D. G. (1990). *Practical Statistics for Medical Research (Chapman & Hall/CRC Texts in Statistical Science)*. Chapman and Hall/CRC.
- Andrews, N. C. (2000). Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. *Nature Reviews Genetics*, 1(3):208–217.
- Antoniou, A. C., Antoniou, A. C., Spurdle, A. B., Spurdle, A. B., Sinilnikova, O. M., Sinilnikova, O. M., Healey, S., Healey, S., Pooley, K. a., Pooley, K. a., Schmutzler, R. K., Schmutzler, R. K., Versmold, B., Versmold, B., Engel, C., Engel, C., Meindl, A., Meindl, A., Arnold, N., Arnold, N., Hofmann, W., and Hofmann, W. (2008). Common Breast Cancer-Predisposition Alleles Are Associated with Breast Cancer Risk in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *American Journal of Human Genetics*, The, 82(April):937–948.
- Attix, F. H. (2004). *Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry*. Wiley-VCH Verlag GmbH.

- Austoker, J. (2003). Breast self examination. *BMJ (Clinical research ed.)*, 326(7379):1–2.
- Babaknejad, N., Sayehmiri, F., Sayehmiri, K., Rahimifar, P., Bahrami, S., Delpesheh, A., Hemati, F., and Alizadeh, S. (2014). The Relationship Between Selenium Levels and Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biological Trace Element Research*, 159(1-3):1–7.
- Bal, W. and Kasprzak, K. S. (2002). Induction of oxidative DNA damage by carcinogenic metals. *Toxicology Letters*, 127(1-3):55–62.
- Basu, S., Singh, M. K., Singh, T. B., Bhartiya, S. K., Singh, S. P., and Shukla, V. K. (2013). Heavy and trace metals in carcinoma of the gallbladder. *World journal of surgery*, 37(11):2641–6.
- Bilderback, D. H. (2003). Review of capillary x-ray optics from the 2nd International Capillary Optics Meeting. *X-Ray Spectrometry*, 32(3):195–207.
- Bonta, M., Török, S., Hegedus, B., Döme, B., and Limbeck, A. (2017). A comparison of sample preparation strategies for biological tissues and subsequent trace element analysis using LA-ICP-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(7):1805–1814.
- Borkhodoev, V. Y. (2014). About the limit of detection in X-ray fluorescence analysis. *Journal of Analytical Chemistry*, 69(11):1041–1046.
- Brewer, G. J. (2008). The risks of free copper in the body and the development of useful anticopper drugs. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 11(6):727–732.
- Büsing, C. M., Keppler, U., and Menges, V. (1981). Differences in microcalcification in breast tumors. *Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histology*, 393(3):307–313.
- Carvalho, M., Magalhães, T., Becker, M., and von Bohlen, A. (2007). Trace elements in human cancerous and healthy tissues: A comparative study by EDXRF, TXRF, synchrotron radiation and PIXE. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 62(9):1004–1011.
- Castronovo, V. and Bellahcene, A. (1998). Evidence that breast cancer associated microcalcifications are mineralized malignant cells. *International journal of oncology*, 12(2):305–8.
- Ceko, M. J., Hummitzsch, K., Hatzirodos, N., Rodgers, R. J., and Harris, H. H. (2015). Quantitative elemental analysis of bovine ovarian follicles using X-ray fluorescence imaging. *Metallomics : integrated biometal science*, 7(5):828–36.

- Chakravarty, P. K., Ghosh, A., and Chowdhury, J. R. (1986). Zinc in human malignancies. *Neoplasma*, 33(1):85–90.
- Chambers, A. F. and Matrisian, L. M. (1997). Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 89(17):1260–1270.
- Chitturi, R., Baddam, V. R., Prasad, L., Prashanth, L., and Kattapagari, K. (2015). A review on role of essential trace elements in health and disease. *Journal of Dr. NTR University of Health Sciences*, 4(2):75.
- Chwiej, J., Szczerbowska-Boruchowska, M., Lankosz, M., Wojcik, S., Falkenberg, G., Stegowski, Z., and Setkowicz, Z. (2005). Preparation of tissue samples for X-ray fluorescence microscopy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 60(12):1531–1537.
- Comito, G., Giannoni, E., Di Gennaro, P., Segura, C. P., Gerlini, G., and Chiarugi, P. (2012). Stromal fibroblasts synergize with hypoxic oxidative stress to enhance melanoma aggressiveness. *Cancer letters*, 324(1):31–41.
- Cooke, M. M., McCarthy, G. M., Sallis, J. D., and Morgan, M. P. (2003). Phosphocitrate Inhibits Calcium Hydroxyapatite Induced Mitogenesis and Upregulation of Matrix Metalloproteinase-1, Interleukin-1 β and Cyclooxygenase-2 mRNA in Human Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer Research and Treatment*, 79(2):253–263.
- Cui, Y., Vogt, S., Olson, N., Glass, A. G., and Rohan, T. E. (2007). Levels of Zinc, Selenium, Calcium, and Iron in Benign Breast Tissue and Risk of Subsequent Breast Cancer. *Cancer Epidemiol Bio-markers Prev*, 16(8):1682–5.
- Cunzhi, H., Jiexian, J., Xianwen, Z., Jingang, G., Shumin, Z., and Lili, D. (2003). Serum and tissue levels of six trace elements and copper/zinc ratio in patients with cervical cancer and uterine myoma. *Biological trace element research*, 94(2):113–122.
- da Silva, M. P., da Silva, D. M., Ribeiro-Silva, A., and Poletti, M. E. (2012). Correlations of trace elements in breast human tissues: Evaluation of spatial distribution using μ -XRF. In *X-RAY OPTICS AND MICROANALYSIS: Proceedings of the 21st International Congress*, volume 1437, pages 45–49. AIP Publishing.
- Dawson, B. and Trapp, R. G. (2004). *Basic & Clinical Biostatistics (LANGE Basic Science)*. Lange Medical Books / McGraw-Hill.
- Deryugina, E. I. and Quigley, J. P. (2006). Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 25(1):9–34.

- Díez, M., Arroyo, M., Cerdán, F. J., Muñoz, M., Martín, M. A., and Balibrea, J. L. (1989). Serum and tissue trace metal levels in lung cancer. *Oncology*, 46(4):230–4.
- Ding, X., Jiang, M., Jing, H., Sheng, W., Wang, X., Han, J., and Wang, L. (2015). Analysis of serum levels of 15 trace elements in breast cancer patients in Shandong, China. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(10):7930–7935.
- Duffy, M. J., Maguire, T. M., Hill, A., McDermott, E., and O'Higgins, N. (2000). Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast cancer research : BCR*, 2(4):252–7.
- Duffy, M. J. and McCarthy, K. (1998). Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and targets for therapy (review). *International Journal of Oncology*, 12(6):1343–1351.
- Ebrahim, A. M., Eltayeb, M. a. H., Shaat, M. K., Mohamed, N. M. a., Eltayeb, E. a., and Ahmed, A. Y. (2007). Study of selected trace elements in cancerous and non-cancerous human breast tissues from Sudanese subjects using instrumental neutron activation analysis. *The Science of the total environment*, 383(1-3):52–58.
- El-Bayoumy, K. (1992). Environmental carcinogens that may be involved in human breast cancer etiology. *Chemical Research in Toxicology*, 5(5):585–590.
- Epstein, F. H., Epstein, F. H., and Rasmussen, H. (1986). The Calcium Messenger System. *New England Journal of Medicine*, 314(17):1094–1101.
- Farquharson, M. J., Al-Ebraheem, A., Falkenberg, G., Leek, R., Harris, A. L., and Bradley, D. A. (2008). 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 and biology*, 53(11):3023–37.
- Farquharson, M. J., Al-Ebraheem, A., Geraki, K., Leek, R., Jubb, A., and Harris, A. L. (2009). Zinc presence in invasive ductal carcinoma of the breast and its correlation with oestrogen receptor status. *Physics in medicine and biology*, 54(13):4213–4223.
- Farquharson, M. J. and Geraki, K. (2004). The use of combined trace element XRF and EDXRD data as a histopathology tool using a multivariate analysis approach in characterizing breast tissue. *X-Ray Spectrometry*, 33(4):240–245.
- Farquharson, M. J., Geraki, K., Falkenberg, G., Leek, R., and Harris, a. (2007). The localisation and micro-mapping of copper and other trace elements in breast tumours using a synchrotron micro-XRF system. *Applied Radiation and Isotopes*, 65(2):183–188.
- Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., Liu, B., Lei, Y., Du, S., Vuppapapati, A., Luu, H. H., Haydon, R. C., He, T.-C., and Ren, G. (2018). Breast cancer development and

- progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & Diseases*, 5(2):77–106.
- Fingleton, B. (2006). Matrix metalloproteinases: roles in cancer and metastasis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 11:479–491.
- Finney, L., Vogt, S., Fukai, T., and Glesne, D. (2009). Copper and angiogenesis: Unravelling a relationship key to cancer progression. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 36(1):88–94.
- Frappart, L., Boudeulle, M., Boumendil, J., Lin, H. C., Martinon, I., Palayer, C., Mallet-Guy, Y., Raudrant, D., Bremond, A., and Rochet, Y. (1984). Structure and composition of microcalcifications in benign and malignant lesions of the breast: study by light microscopy, transmission and scanning electron microscopy, microprobe analysis, and X-ray diffraction. *Human pathology*, 15(9):880–9.
- Garg, A. N., Singh, V., Weginwar, R. G., and Sagdeo, V. N. (1994). An elemental correlation study in cancerous and normal breast tissue with successive clinical stages by neutron activation analysis. *Biological trace element research*, 46(3):185–202.
- Garland, F. C., Garland, C. F., Gorham, E. D., and Young, J. F. (1990). Geographic variation in breast cancer mortality in the United States: a hypothesis involving exposure to solar radiation. *Preventive medicine*, 19(6):614–22.
- Geraki, K., Farquharson, M. J., and Bradley, D. A. (2002). Concentrations of Fe, Cu and Zn in breast tissue: a synchrotron XRF study. *Physics in medicine and biology*, 47(13):2327–2339.
- Geraki, K., Farquharson, M. J., and Bradley, D. A. (2004a). X-ray fluorescence and energy dispersive x-ray diffraction for the quantification of elemental concentrations in breast tissue. *Physics in Medicine and Biology*, 49(1):99–110.
- Geraki, K., Farquharson, M. J., Bradley, D. a., and Hugtenburg, R. P. (2004b). A synchrotron XRF study on trace elements and potassium in breast tissue. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 213:564–568.
- Gialeli, C., Theocharis, A. D., and Karamanos, N. K. (2011). Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS Journal*, 278(1):16–27.
- González de Vega, R., Fernández-Sánchez, M. L., Pisonero, J., Eiró, N., Vizoso, F. J., and Sanz-Medel, A. (2017). Quantitative bioimaging of Ca, Fe, Cu and Zn in breast cancer tissues by LA-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 32(3):671–677.

- Gorham, E. D., Garland, F. C., and Garland, C. F. (1990). Sunlight and breast cancer incidence in the USSR. *International journal of epidemiology*, 19(4):820–4.
- Grattan, B. J. and Freake, H. C. (2012). Zinc and cancer: implications for LIV-1 in breast cancer. *Nutrients*, 4(7):648–75.
- Gupta, S., Singh, S., and Shukla, V. (2005). Copper, zinc, and Cu/Zn ratio in carcinoma of the gallbladder. *Journal of Surgical Oncology*, 91(3):204–208.
- Gupta, S. K., Shukla, V. K., Vaidya, M. P., Roy, S. K., and Gupta, S. (1991). Serum trace elements and Cu/Zn ratio in breast cancer patients. *Journal of surgical oncology*, 46(3):178–81.
- Gurusamy, K. and Davidson, B. R. (2007). Trace element concentration in metastatic liver disease - A systematic review. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 21(3):169–177.
- Halliwell, B. and Cross, C. E. (1994). Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environmental health perspectives*, 102 Suppl:5–12.
- Hammerstein, G. R., Miller, D. W., White, D. R., Masterson, M. E., Woodard, H. Q., and Laughlin, J. S. (1979). Absorbed radiation dose in mammography. *Radiology*, 130(2):485–91.
- Hanson, A. (1986a). The calculation of scattering cross sections for polarized X-rays. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 243(2-3):583–598.
- Hanson, A. (1986b). The polarization of X-rays scattered into 90° . *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 249(2-3):515–521.
- Hanson, A. L. (1988). AN EASY AND ACCURATE APPROXIMATION CIRCULAR APERTURE. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, 264:484–487.
- Hanson, A. L. (1990). X-RAYS INTEGRATED OVER A SMALL DISTRIBUTED SOURCE. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, 90:167–171.
- Hartmann, L. C., Sellers, T. A., Frost, M. H., Lingle, W. L., Degnim, A. C., Ghosh, K., Vierkant, R. A., Maloney, S. D., Pankratz, V. S., Hillman, D. W., Suman, V. J., Johnson, J., Blake, C., Tlsty, T., Vachon, C. M., Melton, L. J., and Visscher, D. W. (2005). Benign Breast Disease and the Risk of Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 353(3):229–237.
- Hashemi, M., Ghavami, S., Eshraghi, M., Booy, E. P., and Los, M. (2007). Cytotoxic effects of intra and extracellular zinc chelation on human breast cancer cells. *European Journal of Pharmacology*, 557(1):9–19.

- Hashemi, S.-M., Sadeghi, M., Tabas, A. V., Bouya, S., Danesh, H. A., Khazaei, A., and Allahyari, A. (2017). Serum Levels of Selenium and Zinc in Patients with Breast Cancer: A Case-Control Study. *Int J Cancer Manag. In Press*.
- Hassan, T., Qureshi, W., Bhat, S. A., Majid, S., Mir, M. R., and Shrivastava, P. (2017). Study of Serum Levels of Trace Elements (Selenium, Copper, Zinc, and Iron) in Breast Cancer Patients. *International Journal of Clinical Oncology and Cancer Research*, 2(4):82.
- Henshall, S. M., Afar, D. E. H., Rasiah, K. K., Horvath, L. G., Gish, K., Caras, I., Ramakrishnan, V., Wong, M., Jeffry, U., Kench, J. G., Quinn, D. I., Turner, J. J., Delprado, W., Lee, C.-S., Golovsky, D., Brenner, P. C., O'Neill, G. F., Kooner, R., Stricker, P. D., Grygiel, J. J., Mack, D. H., and Sutherland, R. L. (2003). Expression of the zinc transporter ZnT4 is decreased in the progression from early prostate disease to invasive prostate cancer. *Oncogene*, 22(38):6005–6012.
- Howell, R. and Pickles, W. (1974). Possible sources of polarized X-rays for X-ray fluorescence spectra with reduced backgrounds. *Nuclear Instruments and Methods*, 120(1):187–188.
- Hu, G.-f. (1998). Copper stimulates proliferation of human endothelial cells under culture. *Journal of Cellular Biochemistry*, 69(3):326–335.
- Huang, X. (2008). Does iron have a role in breast cancer? *The Lancet. Oncology*, 9(8):803–7.
- Huang, Y.-L. L., Sheu, J.-Y. Y., and Lin, T.-H. H. (1999). Association between oxidative stress and changes of trace elements in patients with breast cancer. *Clinical Biochemistry*, 32(2):131–136.
- Hudec, R. (2011). Kirkpatrick-Baez x-ray optics: a review. *Proceedings of SPIE*, 8076:807607.
- Ice, G. and Sparks, C. (1984). Focusing optics for a synchrotron x-radiation microprobe. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, 222(1-2):121–127.
- Jacobson, E. A., James, K. A., Newmark, H. L., and Carroll, K. K. (1989). Effects of dietary fat, calcium, and vitamin D on growth and mammary tumorigenesis induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in female Sprague-Dawley rats. *Cancer research*, 49(22):6300–3.
- James, S. A., Myers, D. E., de Jonge, M. D., Vogt, S., Ryan, C. G., Sexton, B. A., Hoobin, P., Paterson, D., Howard, D. L., Mayo, S. C., Altissimo, M., Moorhead, G. F., and Wilkins, S. W. (2011). Quantitative comparison of preparation methodologies for x-ray fluorescence microscopy of brain tissue. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(3):853–864.

- Jeziarska-Drutel, A., Rosenzweig, S. A., and Neumann, C. A. (2013). Role of Oxidative Stress and the Microenvironment in Breast Cancer Development and Progression. *Advances in Cancer Research*, 119:107–125.
- Jian, J., Yang, Q., Dai, J., Eckard, J., Axelrod, D., Smith, J., and Huang, X. (2011). Effects of iron deficiency and iron overload on angiogenesis and oxidative stress - a potential dual role for iron in breast cancer. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(7):841–847.
- Kabat, G. C. and Rohan, T. E. (2007). Does excess iron play a role in breast carcinogenesis? An unresolved hypothesis. *Cancer causes & control : CCC*, 18(10):1047–53.
- Kamińska, M., Ciszewski, T., Łopacka-Szatan, K., Miotła, P., and Starosławska, E. (2015). Breast cancer risk factors. *Menopausal Review*, 3(3):196–202.
- Kelleher, S. L., McCormick, N. H., Velasquez, V., and Lopez, V. (2011). Zinc in specialized secretory tissues: roles in the pancreas, prostate, and mammary gland. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, 2(2):101–11.
- Kelleher, S. L., Seo, Y. A., and Lopez, V. (2009). Mammary gland zinc metabolism: regulation and dysregulation. *Genes & nutrition*, 4(2):83–94.
- Kirkpatrick, P. and Baez, A. V. (1948). Formation of Optical Images by X-Rays. *Journal of the Optical Society of America*, 38(9):766.
- Klug, A. (1999). Zinc finger peptides for the regulation of gene expression. *Journal of Molecular Biology*, 293(2):215–218.
- Knoll, G. F. (2011). *Radiation Detection and Measurement*. Wiley.
- Kohzadi, S., Sheikhesmaili, F., Rahehagh, R., Parhizkar, B., Ghaderi, E., Loqmani, H., Shahmoradi, B., Mohammadi, E., and Maleki, A. (2017). Evaluation of trace element concentration in cancerous and non-cancerous tissues of human stomach. *Chemosphere*, 184:747–752.
- Kozłowski, H., Janicka-Kłos, A., Brasun, J., Gaggelli, E., Valensin, D., and Valensin, G. (2009). Copper, iron, and zinc ions homeostasis and their role in neurodegenerative disorders (metal uptake, transport, distribution and regulation). *Coordination Chemistry Reviews*, 253(21-22):2665–2685.
- Kubala-Kukuś, A., Banaś, D., Braziewicz, J., Gózdź, S., Majewska, U., and Pajek, M. (2007). Analysis of elemental concentration censored distributions in breast malignant and breast benign neoplasm tissues. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 62(6-7):695–701.

- Kunitake, J. A., Choi, S., Nguyen, K. X., Lee, M. M., He, F., Sudilovsky, D., Morris, P. G., Jochelson, M. S., Hudis, C. A., Muller, D. A., Fratzl, P., Fischbach, C., Masic, A., and Estroff, L. A. (2018). Correlative imaging reveals physiochemical heterogeneity of microcalcifications in human breast carcinomas. *Journal of Structural Biology*, 202(1):25–34.
- Kuo, H. W., Chen, S. F., Wu, C. C., Chen, D. R., and Lee, J. H. (2002). Serum and tissue trace elements in patients with breast cancer in Taiwan. *Biological trace element research*, 89(1):1–11.
- Lankosz, M., Szczerbowska-Boruchowska, M., Chwiej, J., Ostachowicz, J., Simionovici, A., and Bohic, S. (2004). Research in quantitative microscopic X-ray fluorescence analysis. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 59(10-11):1517–1521.
- Leitão, R., Palumbo, A., Souza, P., Pereira, G., Canellas, C., Anjos, M., Nasciutti, L., and Lopes, R. (2014). Elemental concentration analysis in prostate tissues using total reflection X-ray fluorescence. *Radiation Physics and Chemistry*, 95:62–64.
- Liénard, A. (1898). Champ électrique et magnétique produit par une charge électrique concentrée en un point et animée d'un mouvement quelconque. *L'éclairage électrique*, 16:5–14.
- Liu, W., Ice, G. E., Tischler, J. Z., Khounsary, A., Liu, C., Assoufid, L., and Macrander, A. T. (2005). Short focal length Kirkpatrick-Baez mirrors for a hard x-ray nanoprobe. *Review of Scientific Instruments*, 76(11):113701.
- Lowndes, S. A. and Harris, A. L. (2005). The role of copper in tumour angiogenesis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 10(4):299–310.
- Magalhães, T., von Bohlen, A., Carvalho, M., and Becker, M. (2006). Trace elements in human cancerous and healthy tissues from the same individual: A comparative study by TXRF and EDXRF. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 61(10-11):1185–1193.
- Majewska, U., Banaś, D., Braziewicz, J., Gózdź, S., Kubala-Kukuś, A., and Kucharczyński, M. (2007). Trace element concentration distributions in breast, lung and colon tissues. *Physics in medicine and biology*, 52(13):3895–3911.
- Margalioth, E. J., Schenker, J. G., and Chevion, M. (1983). Copper and Zinc levels in normal and malignant tissues. *Cancer*, 52(5):868–872.
- Margaritondo, G., Hwu, Y., and Tromba, G. (2003). Synchrotron light: From basics to coherence and coherence-related applications. Technical report.

- Masson, N. and Ratcliffe, P. J. (2003). HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O_2 levels. *Journal of Cell Science*, 116(15):3041–3049.
- Mathiasen, I. S., Sergeev, I. N., Bastholm, L., Elling, F., Norman, A. W., and Jäättelä, M. (2002). Calcium and calpain as key mediators of apoptosis-like death induced by vitamin D compounds in breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, 277(34):30738–45.
- McAuslan, B. and Reilly, W. (1980). Endothelial cell phagokinesis in response to specific metal ions. *Experimental Cell Research*, 130(1):147–157.
- McTiernan, A., Ulrich, C., Slate, S., and Potter, J. (1998). Physical activity and cancer etiology: Associations and mechanisms. *Cancer Causes and Control*, 9(5):487–509.
- Mendes, P. M. V., Bezerra, D. L. C., dos Santos, L. R., de Oliveira Santos, R., de Sousa Melo, S. R., Morais, J. B. S., Severo, J. S., Vieira, S. C., and do Nascimento Marreiro, D. (2017). Magnesium in Breast Cancer: What Is Its Influence on the Progression of This Disease? *Biological Trace Element Research*, pages 1–6.
- Mondul, A. M., Weinstein, S. J., Layne, T. M., and Albanes, D. (2017). Vitamin D and Cancer Risk and Mortality: State of the Science, Gaps, and Challenges. *Epidemiologic Reviews*, 39(1):28–48.
- Morgan, M. P., Cooke, M. M., Christopherson, P. A., Westfall, P. R., and McCarthy, G. M. (2001). Calcium hydroxyapatite promotes mitogenesis and matrix metalloproteinase expression in human breast cancer cell lines. *Molecular carcinogenesis*, 32(3):111–7.
- Mulware, S. J. (2013). Trace elements and carcinogenicity: a subject in review. *3 Biotech*, 3(2):85–96.
- Navarro Silvera, S. a. and Rohan, T. E. (2007). Trace elements and cancer risk: a review of the epidemiologic evidence. *Cancer causes & control : CCC*, 18(1):7–27.
- Ng, K. H., Bradley, D. A., and Looi, L. M. (1997). Elevated trace element concentrations in malignant breast tissues. *The British journal of radiology*, 70(832):375–82.
- Nič, M., Jirát, J., Košata, B., Jenkins, A., and McNaught, A., editors (2009). *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. IUPAC, Research Triangle Park, NC.
- Pan, Q., Kleer, C. G., van Golen, K. L., Irani, J., Bottema, K. M., Bias, C., De Carvalho, M., Mesri, E. A., Robins, D. M., Dick, R. D., Brewer, G. J., and Merajver, S. D. (2002). Copper deficiency induced by tetrathiomolybdate suppresses tumor growth and angiogenesis. *Cancer research*, 62(17):4854–9.

- Pasha, Q., Malik, S. A., Iqbal, J., Shaheen, N., and Shah, M. H. (2008). Comparative evaluation of trace metal distribution and correlation in human malignant and benign breast tissues. *Biological Trace Element Research*, 125(1):30–40.
- Pérez, C. A., Radtke, M., Sánchez, H. J., Tolentino, H., Neuenschwander, R. T., Barg, W., Rubio, M., Bueno, M. I. S., Raimundo, I. M., and Rohwedder, J. J. R. (1999). Synchrotron radiation X-Ray fluorescence at the LNLS: beamline instrumentation and experiments. *X-Ray Spectrometry*, 28(5):320–326.
- Perrin, L., Carmona, A., Roudeau, S., and Ortega, R. (2015). Evaluation of sample preparation methods for single cell quantitative elemental imaging using proton or synchrotron radiation focused beams. *J. Anal. At. Spectrom.*, 30:2525–2532.
- Pinnix, Z. K., Miller, L. D., Wang, W., D’Agostino, R., Kute, T., Willingham, M. C., Hatcher, H., Tesfay, L., Sui, G., Di, X., Torti, S. V., and Torti, F. M. (2010). Ferroportin and iron regulation in breast cancer progression and prognosis. *Science translational medicine*, 2(43):43ra56.
- Polyak, K. (2007). Breast cancer: origins and evolution. *The Journal of clinical investigation*, 117(11):3155–63.
- Raju, G. N., Sarita, P., Kumar, M. R., Murty, G. R., Reddy, B. S., Lakshminarayana, S., Vijayan, V., Lakshmi, P. R., Gavarasana, S., and Reddy, S. B. (2006). Trace elemental correlation study in malignant and normal breast tissue by PIXE technique. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 247(2):361–367.
- Riesop, D., Hirner, A. V., Rusch, P., and Bankfalvi, A. (2015). Zinc distribution within breast cancer tissue: A possible marker for histological grading? *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 141(7):1321–1331.
- Siddiqui, M. K. J., Jyoti, Singh, S., Mehrotra, P. K., Singh, K., and Sarangi, R. (2006). Comparison of some trace elements concentration in blood, tumor free breast and tumor tissues of women with benign and malignant breast lesions: An Indian study. *Environment International*, 32(5):630–637.
- Silva, M. P., Silva, D. M., Conceição, A. L. C., Ribeiro-Silva, A., and Poletti, M. E. (2013). Role of Ca, Fe, Cu and Zn in breast cancer: study by X-ray fluorescence techniques and immunohistochemical analysis. *X-Ray Spectrometry*, 42(4):303–311.
- Silva, M. P., Soave, D. F., Ribeiro-Silva, A., and Poletti, M. E. (2012). Trace elements as tumor biomarkers and prognostic factors in breast cancer: a study through energy dispersive x-ray fluorescence.
- Silva, M. P., Tomal, A., Pérez, C. A., Ribeiro-Silva, A., and Poletti, M. E. (2009). Determination of Ca, Fe, Cu and Zn and their correlations in breast cancer and normal adjacent tissues. *X-Ray Spectrometry*, 38(2):103–111.

- Sisman, A. R., Sis, B., Canda, T., and Onvural, B. (2009). Electrolytes and trace elements in human breast cyst fluid. *Biological trace element research*, 128(1):18–30.
- Solé, V., Papillon, E., Cotte, M., Walter, P., and Susini, J. (2007). A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 62(1):63–68.
- Soncin, F., Guitton, J.-D., Cartwright, T., and Badet, J. (1997). Interaction of Human Angiogenin with Copper Modulates Angiogenin Binding to Endothelial Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236(3):604–610.
- Staudenmann, J.-L., Chapman, L. D., Murphy, W. J., Horning, R. D., and Liedl, G. L. (1985). Determination of Beam Polarization from Integrated Borrmann Intensities. *J. Appl. Cryst.*, 18:519–527.
- Studzinski, G. P. and Moore, D. C. (1995). Sunlight—can it prevent as well as cause cancer? *Cancer research*, 55(18):4014–22.
- Suzuki, Y., Uchida, F., and Hirai, Y. (1989). X-Ray Microprobe with a Pair of Elliptical Mirrors. *Japanese Journal of Applied Physics*, 28(Part 2, No. 9):L1660–L1662.
- Szalóki, I., Osán, J. J., Van Grieken, R. E., Szaloki, I., Szalóki, I., Osán, J. J., and Van Grieken, R. E. (2006). X-ray spectrometry. *Analytical chemistry*, 78(12):4069–96.
- Szczerbowska-Boruchowska, M. (2012). Sample thickness considerations for quantitative X-ray fluorescence analysis of the soft and skeletal tissues of the human body - theoretical evaluation and experimental validation. *X-Ray Spectrometry*, 41(5):328–337.
- Taddei, M., Giannoni, E., Fiaschi, T., and Chiarugi, P. (2012). Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases. *The Journal of Pathology*, 226(2):380–393.
- Taylor, C. G., Bettger, W. J., and Bray, T. M. (1988). Effect of Dietary Zinc or Copper Deficiency on the Primary Free Radical Defense System in Rats. *The Journal of Nutrition*, 118(5):613–621.
- Tertian, R. and Claisse, F. (1982). Principles of quantitative X-ray fluorescence analysis. *Analysis*, 12(1):385.
- Turnlund, J. R. (1998). Human whole-body copper metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 67(5):960S–964S.
- Vallee, B. L. and Falchuk, K. H. (1993). The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological reviews*, 73(1):79–118.

- Van Grieken, R. E. and Markowicz, A. A. (2002). *Handbook of X-ray spectrometry. Second edition*. CRC Press Book.
- Veronesi, U., Boyle, P., Goldhirsch, A., Orecchia, R., and Viale, G. (2005). Breast cancer. *The Lancet*, 365(9472):1727–1741.
- Von Czarnowski, D., Denkhaus, E., and Lemke, K. (1997). Determination of trace element distribution in cancerous and normal human tissues by total reflection X-ray fluorescence analysis. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 52(7):1047–1052.
- Walravens, P. A. (1980). Nutritional importance of copper and zinc in neonates and infants. *Clinical Chemistry*, 26(2).
- Wandzilak, A., Czyzycki, M., Radwanska, E., Adamek, D., Geraki, K., and Lankosz, M. (2015). X-ray fluorescence study of the concentration of selected trace and minor elements in human brain tumours. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 114:52–57.
- Weinberg, E. D. (1994). Association of iron with colorectal cancer. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 7(3):211–6.
- Westermarck, J. and Kähäri, V. M. (1999). Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13(8):781–92.
- Whitfield, J. F., Boynton, A. L., MacManus, J. P., Sikorska, M., and Tsang, B. K. (1979). The regulation of cell proliferation by calcium and cyclic AMP. *Molecular and cellular biochemistry*, 27(3):155–79.
- Yaman, M. (2006). Comprehensive comparison of trace metal concentrations in cancerous and non-cancerous human tissues. *Current medicinal chemistry*, 13(21):2513–2525.
- Yao, M., Wang, D., and Zhao, M. (2015). Element Analysis Based on Energy-Dispersive X-Ray Fluorescence. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2015:1–7.
- Yasa, M., Li, Y., Mammen, C. B., Als-Nielsen, J., Hoszowska, J., Mocuta, C., and Freund, A. (2004). Double focusing of hard x rays using combined multilayer and Bragg-Fresnel optics. *Applied Physics Letters*, 84(23):4744–4746.
- Yun, W., Lai, B., Cai, Z., Maser, J., Legnini, D., Gluskin, E., Chen, Z., Krasnoperova, A. A., Vladimirovsky, Y., Cerrina, F., Fabrizio, E. D., and Gentili, M. (1999). Nanometer focusing of hard x rays by phase zone plates. *Review of Scientific Instruments*, 70(5):2238.

- Zaichick, V. Y., Sviridova, T. V., and Zaichick, S. V. (1997). Zinc in the human prostate gland: Normal, hyperplastic and cancerous. *International Urology and Nephrology*, 29(5):565–574.
- Zowczak, M., Iskra, M., Torliński, L., and Cofta, S. (2001). Analysis of serum copper and zinc concentrations in cancer patients. *Biological trace element research*, 82(1-3):1–8.