Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Física

Marina Piacenti da Silva

PAPEL DOS ELEMENTOS-TRAÇO EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS: ESTUDO ATRAVÉS DE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X E ANÁLISES IMUNOHISTOQUÍMICAS

Versão corrigida

Ribeirão Preto

2011

MARINA PIACENTI DA SILVA

Papel dos elementos-traço em neoplasias mamárias: Estudo através de técnicas espectroscópicas de fluorescência de raios X e análises imunohistoquímicas

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada à Medicina e Biologia Orientador: Prof. Dr. Martin Eduardo Poletti

Versão corrigida

Ribeirão Preto

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Marina Piacenti da

Papel dos elementos-traço em neoplasias mamárias: Estudo através de técnicas espectroscópicas de fluorescência de raios X e análises imunohistoquímicas, 2011.

108p.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Física Aplicada à Medicina e Biologia.

Orientador: Poletti, Martin Eduardo.

Dedico este trabalho

aos meus pais Maria José e Geraldo

e ao meu marido Luiz Carlos.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por sempre ter dado a mim e aos que eu amo saúde.

Ao **Prof. Dr. Martin Eduardo Poletti** pela orientação e amizade durante os anos de mestrado e doutorado.

Aos meus pais **Maria José e Geraldo**, pela educação e formação que me proporcionaram, sempre me apoiando e incentivando.

Ao meu marido **Luiz Carlos** que é tudo para mim, que sempre vou amar muito, por todos os dias da minha vida.

À minha irmã **Carolina** e às amigas **Alessandra Tomal** e **Ana Paula Ramos** pela ajuda na revisão do texto.

Aos meus familiares **Tia Mara**, **Tio César**, **Tati**, **Bruna**, **Tia Aninha**, **Tio Elias**, **Gabriel**, **Maria Luiza**, **Tio Binho**, **Tia Adriana**, **Letícia** e **Lucas**, por tornarem os momentos em família tão agradáveis (e com tanto barulho).

Aos meus avós **Geraldo**, **Maria**, **Carlos** e **Lourdes** que me guiam, mesmo não estando mais conosco.

Às Anas (Paula, Carla e Maria) e à Fer por sempre me receberem com tanta hospitalidade.

A todos meus amigos, por sermos tão legais (não vou citar nomes porque são muitos).

À **Profa. Dra. Orghêda Luiza Araújo Domingues Zucchi** pelo auxílio na preparação de amostras e medidas de TXRF.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) por disponibilizar a linha de fluorescência de raios X para as medidas de TXRF e μ-XRF, em especial ao **Dr. Carlos Alberto Pérez** pela atenção e construtivas discussões acerca dos resultados.

Ao **Prof. Dr. Alfredo Ribeiro da Silva**, por disponibilizar seu laboratório para a execução da técnica de imunohistoquímica, por auxiliar na avaliação dos resultados e pelos esclarecimentos e discussões sobre as características histopatológicas das doenças de mama.

Aos colegas do laboratório de Física das Radiações e Dosimetria.

À técnica **Deisy Mara da Silva**, pela execução da técnica de imunohistoquímica, pelo auxílio na preparação das amostras para µ-XRF e ao **Danilo F. Soave** por me auxiliar na coleta de dados dos prontuários médicos e pelas discussões acerca dos resultados.

Ao Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto / USP, por fornecer os tecidos mamários analisados neste trabalho.

Aos funcionários do serviço de arquivo do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pela eficiência em separar as lâminas e os blocos de parafina dos tecidos.

Aos professores do curso de pós-graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia, do Departamento de Física da FFCLRP – USP, que contribuíram para minha formação.

Aos funcionários do Departamento de Física, em especial ao técnico **Eldereis** e à secretária da pós-graduação **Nilza**, pela amizade, auxílio e atenção.

A todos que contribuíram direta e indiretamente, para a realização deste trabalho.

A CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

RESUMO

SILVA, M.P. Papel dos elementos-traço em neoplasias mamárias: Estudo através de técnicas espectroscópicas de fluorescência de raios X e análises imunohistoquímicas.
2011. 108p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Neste trabalho foi avaliado o papel de elementos-traço em tecidos mamários neoplásicos e seu potencial como marcadores tumorais e fatores prognósticos. As concentrações dos elementos cálcio, ferro, cobre e zinco em tecidos normais e neoplásicos foram determinadas através de técnicas de fluorescência de raios X por dispersão por energia e por reflexão total. Modelos diagnósticos (análise de discriminante e curvas ROC - Receiver Operating Characteristic) baseados na análise estatística das distribuições de concentrações dos elementos mostraram que é possível classificar os diversos tipos de tecidos mamários (normais, benignos e malignos). Foi possível ainda avaliar a expressão dos elementos-traço e correlacioná-la com dados clinicopatológicos de importância prognóstica e com a sobrevida global de pacientes com câncer de mama. Os resultados mostraram que a expressão dos elementos-traço pode ser utilizada como marcador tumoral e fator prognóstico.

Através da técnica de micro fluorescência de raios X, as distribuições espaciais dos elementos-traço foram avaliadas e comparadas com a expressão imunohistoquímica de metaloproteinases de matriz (MMPs), seus inibidores (TIMPs) e com o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). Os resultados mostraram que os elementos Fe, Cu e a expressão do VEGF estão correlacionados, sugerindo que o acúmulo destes elementos pode estar associado ao processo angiogênico em neoplasias mamárias. Foram observadas ainda correlações entre as distribuições de Ca, Zn e a expressão de MMPs e TIMPs, possivelmente devido à presença destes metais nestas proteínas.

Palavras-chave: Elementos-traço, Fluorescência de Raios X, Câncer de mama, Marcadores tumorais, Imunohistoquímica.

ABSTRACT

SILVA, M.P. Role of trace elements in breast cancer: Study by X-Ray Fluorescence spectroscopy techniques and Immunohistochemical analysis. 2011. 108p. Thesis – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

In this work the role of trace elements in neoplastic breast tissues were evaluated to be applied as tumoral biomarkers and prognostic factors. Concentrations of trace elements like calcium, iron, copper, and zinc in normal and neoplastic tissues have been determinate by X-Ray Fluorescence (XRF) spectroscopic techniques. Diagnostic models (discriminant analysis and ROC curves) based on statistics analysis of trace elements concentrations distributions reveal that it is possible to classify different breast tissues (normal, benign and malignant). Also, it was possible to evaluate trace elements expression and correlate them with clinic-pathological data that are important in prognostic and the overall survival of breast cancer patients. The results presented have shown that trace elements expression can be used as tumoral biomarkers and prognostic factors.

The spatial distributions of trace elements were evaluated by micro-XRF and the results were compared to immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs), as well as with vascular endothelial growth factor (VEGF). The results reveal that elements Fe, Cu and VEGF expression are correlated, indicating that the higher levels of these elements are associated with angiogenic process in breast cancer. Also, correlations between Ca, Zn and MMPs and TIMPs expression have been observed, possibly due those metals are present in these proteins.

Keywords: Trace elements, X-Ray Fluorescence, Breast Cancer, Tumoral biomarkers, Immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da anatomia da mama. Adaptado de [48]6
Figura 2: Lâmina histológica de um tecido normal de mama. Adaptado de [49]7
Figura 3: Lâmina histológica de um fibroadenoma de mama
Figura 4: Lâminas histológicas de neoplasias malignas de mama. (a) Carcinoma ductal in situ
(b) Carcinoma ductal invasivo
Figura 5: Configuração típica de um equipamento de fluorescência de raios X 18
Figura 6: Configuração típica de um equipamento de TXRF. Adaptado de [103]19
Figura 7: (a) Configuração típica de μ -XRF (b) Processo de formação do mapa de μ -XRF.
Adaptados de [44] e [103]21
Figura 8: Esquema de marcação pelo método da imunoperoxidase indireta
Figura 9: Curva ROC típica
Figura 10: (a) Espectros típicos de tecidos mamários neoplásicos obtidos através de EDXRF e
TXRF. (b) Valores de sensibilidade normalizada e (c) limites de detecção em função do
número atômico (Zi) para ambas as técnicas
Figura 11: Distribuições das concentrações dos elementos Ca, Fe, Cu e Zn em diferentes
tecidos mamários, obtidas através das técnicas de EDXRF e TXRF
Figura 12: Curvas ROC obtidas para cada elemento em diferentes tipos de tecidos
Figura 13: Distribuições das concentrações dos elementos-traço com as linhas pontilhadas
representando os valores de ponto de corte. (a) Distribuições de cálcio em diferentes tipos de
tecidos, onde linha horizontal contínua representa um ponto de corte de 212,6 mg/kg e a linha
horizontal pontilhada representa um ponto de corte de 794,6 mg/kg; Distribuições dos
elementos Fe, Cu e Zn em (b) tecidos normais adjacentes e malignos (amostras pareadas); (c)
normais e malignos; (d) normais e benignos
Figura 14: Curvas de sobrevida global em função da expressão dos elementos-traço

Figura 15: Distribuições de concentração do cálcio nos diferentes tipos de neoplasias64
Figura 16: Correlações entre as expressões de ferro e (a) tipo de tecido (b) idade (c)
menopausa e (d) menopausa e expressão de VEGF 65
Figura 17: Correlação entre a expressão de cobre e VEGF67
Figura 18: Expressão do zinco em tecidos positivos para MMP-1,-2,-3 e TIMP-1,-268
Figura 19: Correlações entre os elementos-traço em tecidos mamários normais e neoplasias
malignas
Figura 20: (a) Lâmina histológica de um tecido normal (aumento x20); mapa de µ-XRF para
os elementos (b) cobre, (c) cálcio e (d) correlação entre Ca e Cu. O tamanho de cada pixel era
de 0,03mm, de forma que o tamanho real da área mapeada era de 0,63 x 0,54 mm
Figura 21: (a) Lâmina histológica de um tecido com carcinoma ductal de grau III (aumento
x20); mapa de µ-XRF para os elementos (b) cálcio, (c) zinco, (d) correlação entre Ca e Zn, (e)
ferro, (f) cobre e (g) correlação entre Fe e Cu. O tamanho de cada pixel era de 0,03mm, de
forma que o tamanho real da área mapeada era de 0,72 x 0,81 mm73
Figura 22: (a) Lâmina histológica de um tecido com carcinoma ductal de grau I
(imunohistoquímica, positiva para VEGF, aumento x20); mapa de μ -XRF para os elementos
(b) ferro e (c) cobre. O tamanho de cada pixel era de 0,03mm, de forma que o tamanho real da
área mapeada era de 0,60 x 0,81 mm75
Figura 23: (a) Lâmina histológica de um tecido com fibroadenoma (aumento x4); mapa de µ-
XRF para os elementos (b) cálcio, (c) zinco e (d) correlação entre ambos. Lâminas
histológicas de (e) células positivas para MMP1 (imunohistoquímica, marcação
citoplasmática, x20) e (f) células positivas para TIMP2 (imunohistoquímica, marcação
citoplasmática, x20). O tamanho de cada pixel era de 0,03mm, de forma que o tamanho real
da área mapeada era de 1,23 x 0,81 mm

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tipos de análises às quais as amostras foram submetidas. N: Tecidos normais, T:
Neoplasias malignas, NP: Tecidos normais periféricos, FA: Neoplasias benignas
Tabela 2: Relação dos anticorpos utilizados
Tabela 3: Dados clinicopatológicos das pacientes
Tabela 4: Resultados obtidos para a validação das análises de EDXRF e TXRF 45
Tabela 5: Resultados dos testes de Mann-Whitney e Wilcoxon. (S): diferenças significativas e
(NS): diferenças não significativas
Tabela 6: Razão entre as medianas das concentrações dos elementos-traço em diferentes tipos
de tecidos
Tabela 7: Resultados do teste de Wilcoxon. $*p < 0.05$ indica que os 2 grupos são
significativamente diferentes
Tabela 8: Resultados da classificação por análise de discriminante
Tabela 9: Parâmetros das curvas ROC obtidas para os elementos-traço presentes em diferentes
tecidos. Os valores 0 e 1 representam o tecido normal e o tecido com presença de neoplasia,
respectivamente
Tabela 10: Relação entre a expressão dos elementos-traço (-) negativa ou (+) positiva com
dados clínicos de importância prognóstica. Os valores de p $< 0,05$ estão destacados em
negrito. Os valores entre parênteses representam a porcentagem da expressão dentro de cada
parâmetro

SUMÁRIO

1.	Introdução	1
2.	Objetivos	4
3.	Aspectos teóricos	6
	3.1. Aspectos anatômicos e histológicos da mama	6
	3.1.1. Tecido normal	6
	3.1.2. Neoplasias benignas	7
	3.1.3. Neoplasias malignas	8
	3.2. Marcadores tumorais	. 10
	3.3. Fatores prognósticos	11
	3.4. Elementos-traço em tecidos mamários	12
	3.4.1. Cálcio	13
	3.4.2. Ferro	14
	3.4.3. Cobre	15
	3.4.4. Zinco	15
	3.5. Fluorescência de Raios X	16
	3.5.1. Fluorescência de Raios X por Dispersão por Energia	17
	3.5.2. Fluorescência de Raios X por Reflexão Total	. 18
	3.5.3. Micro Fluorescência de Raios X	20
	3.6. Imunohistoquímica	21
	3.6.1. Método da imunoperoxidase utilizando o tetracloreto de diaminobenzidina	22
	3.7. Análises Estatísticas – Modelos de Diagnóstico	23
	3.7.1. Análise de discriminante	25
	3.7.2. Curvas ROC (Receiver Operating Characteristic)	25
4.	Metodologia	28
	4.1. Aspectos Éticos	28
	4.2. Casuística	28
	4.3. Fluorescência de Raios X por Dispersão por Energia	30
	4.3.1. Amostras	30
	4.3.2. Arranjo Experimental	30
	4.3.3. Método de análise	31
	4.4. Fluorescência de Raios X por Reflexão Total	32
	4.4.1. Amostras	32
	4.4.2. Arranjo Experimental	33
	4.4.3. Método de análise	33
	4.5. Análise das intensidades dos espectros obtidos	34

4.6. Validação dos métodos de quantificação	34
4.7. Micro Fluorescência de Raios X	35
4.7.1. Amostras	35
4.7.2. Arranjo Experimental	36
4.7.3. Método de análise	36
4.8. Imunohistoquímica	37
4.9. Análises estatísticas	38
4.9.1. Diferenças entre as distribuições de concentrações de elementos-traço	38
4.9.2. Comparação entre as técnicas de EDXRF e TXRF	38
4.9.3. Análise de Discriminante	39
4.9.4. Curvas ROC	40
4.9.5. Correlação entre as expressões dos elementos-traço e fatores prognósticos	40
4.9.6. Curvas de sobrevida	40
4.9.7. Correlações entre as distribuições de concentrações de elementos-traço	41
5. Resultados e Discussão	42
5.1. Casuística	42
5.2. Espectros, sensibilidade, limites de detecção e acurácia das técnicas de EDXRF e TXRF	43
5.3. Concentração dos elementos-traço em tecidos mamários	46
5.3.1. Distribuições de concentrações	46
5.3.2. Magnitude de elevação das concentrações e comparação com a literatura	49
5.3.3. Comparação entre os resultados das técnicas de EDXRF e TXRF	51
5.4. Elementos-traço como marcadores tumorais	53
5.4.1. Modelo preditivo – Análise de discriminante	53
5.4.2. Modelo preditivo – Curvas ROC	55
5.5. Elementos-traço como fator prognóstico	59
5.5.1. Correlação da expressão dos elementos-traço com fatores prognósticos	59
5.5.2. Curvas de sobrevida global	61
5.6. Alteração das concentrações dos elementos-traço em tecidos	63
5.6.1. Cálcio	63
5.6.2. Ferro	64
5.6.3. Cobre	66
5.6.4. Zinco	67
5.7. Correlações entre os elementos-traço e aspectos histológicos	69
5.7.1. Correlações entre as concentrações dos elementos-traço	69
5.7.2. Correlação espacial – medidas de µ-XRF e expressão imunohistoquímica	71
6. Conclusões	78

6.1. Determinação da concentração de elementos-traço através de EDXRF e TXRF	78
6.2. Elementos-traço como marcadores tumorais	78
6.3. Elementos-traço como fator prognóstico	79
6.4. Funções e correlações entre elementos-traço em tecidos	79
7. Contribuições deste trabalho para a área de conhecimento	80
ANEXO I	81
ANEXO II	82
ANEXO III	83
Referências	85

1. Introdução

Os carcinomas mamários são o segundo tipo mais comum de câncer, e são responsáveis por uma alta taxa de mortalidade em todo o mundo. Estimativas divulgadas pelo Instituto Nacional do Câncer para os anos de 2010/2011 apontaram a ocorrência de 489.270 novos casos de câncer no Brasil e dentre estes, 49.240 casos de câncer de mama [1]. A prevenção do câncer de mama ainda não é bem estabelecida devido aos vários fatores de risco e às características genéticas que estão envolvidas na sua etiologia, além do diagnóstico ser muitas vezes instituído em uma fase tardia da doença, resultado de uma política ineficaz de controle e rastreamento [1].

A mamografia atualmente é a técnica diagnóstica mais aplicada para a detecção precoce do câncer de mama, porém em muitos casos esta técnica não fornece critérios definitivos que permitam diferenciar os tipos de tecidos, pois uma de suas maiores limitações é a pequena diferença de atenuação entre os tecidos mamários normais e neoplásicos [2, 3], levando à técnica uma sensibilidade de 75 a 78% na diferenciação entre tecidos normais, neoplasias benignas e malignas, sendo que esta sensibilidade ainda pode diminuir de acordo com a densidade da mama [4, 5]. Além da mamografia, outras técnicas são utilizadas, tais como o auto-exame, o exame clínico, biópsia, ultrassom e a ressonância magnética [5, 6].

Atualmente a conduta terapêutica para o câncer de mama é baseada em fatores prognósticos e preditivos bem-estabelecidos para a evolução da doença, tais como idade, tamanho do tumor, status linfonodal, estadiamento e a expressão de receptores hormonais. O desenvolvimento de estratégias individuais de acordo com tais perfis de risco tem se tornado importante não apenas por gerar o máximo benefício terapêutico ao paciente, mas também por uma vantagem econômica [7, 8].

O conhecimento biológico do tumor permite a obtenção de dados científicos mais específicos sobre o comportamento das células tumorais e das etapas do processo de desenvolvimento e progressão do câncer, de forma que o estudo de genes específicos, como o HER2 [9], o p53 [10] e o BCRA1 [11], é de extrema importância, uma vez que estes podem ser utilizados como novos marcadores tumorais ou fatores prognósticos e preditivos do carcinoma de mama [12-14].

Sob este aspecto, as concentrações de elementos-traço naturalmente presentes em tecidos mamários vêm sendo estudadas como uma nova ferramenta de prevenção, diagnóstico e tratamento, uma vez que são responsáveis por um grande número de processos metabólicos e biológicos, e podem aparecer em diferentes concentrações em tecidos normais e neoplásicos, devido a alterações biológicas geradas pela doença [15, 16]. O papel dos elementos-traço no câncer de mama ainda não é bem delineado, de forma que estudos epidemiológicos, analíticos e biológicos combinados são necessários para investigar a importância destes elementos na promoção e/ou manutenção da neoplasia. Em vista disso, é necessária a aplicação de técnicas apropriadas que sejam capazes de mensurar os níveis dos elementos-traço em um grande número de amostras [17-26].

A fluorescência de raios X (X-Ray Fluorescence – XRF) se tornou nos últimos anos uma técnica de análise multielementar representativa para o estudo de elementos-traço [17, 19, 24, 25, 27-34]. Esta técnica é baseada na excitação dos átomos de um material através da aplicação de um feixe de raios X com energia apropriada e posterior detecção da radiação característica emitida, que por sua vez é proporcional à concentração dos átomos dos elementos constituintes do material [35]. A XRF apresenta inúmeras vantagens, como um procedimento simples e rápido de análise e tratamento de resultados, alta sensibilidade e baixos limites de detecção, permitindo a determinação de concentrações em níveis traço e ultra-traço [36, 37]. Esta técnica vem sendo empregada nos últimos anos por diversos grupos para a análise dos níveis de elementos-traço em tecidos mamários, que reportam que os níveis de vários elementos-traço (como, entre outros, o Ca, Cr, Mn, Fe, Cu, Zn e Br) aumentam significativamente em tecidos mamários neoplásicos quando comparados a tecidos normais [19, 22, 24, 25, 28, 38-42].

As alterações nos níveis dos elementos-traço decorrentes de mudanças bioquímicas nas neoplasias podem também estar associadas a mudanças nas estruturas dos tecidos, de forma que é interessante investigar a distribuição espacial dos elementos-traço e correlacionálas com os aspectos histológicos em diferentes tipos de tecidos mamários. Sob este aspecto, a técnica de microfluorescência de raios X pode ser utilizada para se obter um mapeamento espacial dos elementos-traço nos tecidos, de forma a compreender os processos de acumulação de metais a nível celular e a função destes metais no processo carcinogênico [33, 43, 44]. Estes mecanismos podem de certa forma estar correlacionados, tendo em vista que as alterações do microambiente ocasionadas pelos tumores são complexas e até hoje não completamente compreendidas [45].

A avaliação do fenótipo dos tumores, assim como sua resposta imunológica podem ser avaliadas por técnicas atualmente bem estabelecidas, como a imunohistoquímica, que fornece informações complementares para a avaliação dos tecidos. O uso da imunohistoquímica no estudo de marcadores celulares específicos tem proporcionado à área médica importantes informações diagnósticas, prognósticas e preditivas tanto do estagio da doença quanto de sua biologia [46].

A combinação das concentrações dos elementos-traço obtidas através de técnicas de XRF com outros parâmetros de natureza prognóstica, avaliados clinicamente ou através de técnicas imunohistoquímicas, pode permitir um maior entendimento metabólico e celular dos elementos-traço em neoplasias, além de possibilitar a diferenciação dos tecidos patológicos baseada exclusivamente nas concentrações dos elementos-traço. Neste cenário, estratégias de estudos que considerem todos estes aspectos são necessárias e imprescindíveis no propósito de buscar novas ferramentas de prevenção, diagnóstico e tratamento de neoplasias mamárias.

Desta forma o presente trabalho pretende avaliar o papel dos elementos-traço em neoplasias mamárias, assim como sua associação com fatores prognósticos e preditivos.

2. Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram:

- Determinar as concentrações dos elementos-traço em diferentes tipos de tecidos mamários (normais e neoplásicos), através de técnicas espectroscópicas de fluorescência de raios X (EDXRF e TRXRF).
- Avaliar as concentrações dos elementos-traço com ferramentas estatísticas apropriadas, visando obter modelos diagnósticos e explorar o potencial dos elementostraço como marcadores tumorais.
- Obter informações de relevância prognóstica a partir dos prontuários das pacientes e correlacioná-las com a expressão dos elementos-traço, visando avaliar os elementostraço como fatores prognósticos;
- 4. Determinar através da técnica de microfluorescência de raios X (μ-XRF), a distribuição espacial dos elementos-traço e correlacionar estes resultados com a expressão imunohistoquímica de fatores envolvidos com a proliferação do tumor em tecidos mamários, visando um entendimento metabólico e celular das neoplasias.

O trabalho está organizado da seguinte forma:

O capítulo 3 descreve os aspectos teóricos envolvidos no trabalho. O capítulo inicia com a descrição dos aspectos anatômicos e histológicos dos tecidos mamários e define os conceitos de marcadores tumorais e fatores prognósticos. São descritos também os elementos-traço que serão abordados no estudo e os conceitos físicos envolvidos nas diferentes técnicas de fluorescência de raios X. Na sequência é realizada uma descrição da técnica de imunohistoquímica, apresentando o método utilizado neste trabalho (método da imunoperoxidase revelada com DAB). Por fim, são descritas as análises estatísticas utilizadas como modelos de diagnóstico.

No capítulo 4 são descritos os tecidos analisados, os arranjos experimentais e os métodos de análises quantitativas utilizados para cada técnica de fluorescência de raios X. São também descritos o método de preparação e realização da técnica de imunohistoquímica, e os testes estatísticos realizados.

O capítulo 5 apresenta os resultados obtidos neste trabalho. Primeiramente são apresentados os resultados das concentrações dos elementos-traço determinadas através das técnicas de EDXRF e TXRF, e os modelos diagnósticos desenvolvidos. Posteriormente, são comparados e discutidos os resultados das análises por µ-XRF e imunohistoquímica.

Finalmente no capítulo 6 são apresentadas as conclusões deste trabalho, e a contribuição do trabalho para a área.

3. Aspectos teóricos

3.1. Aspectos anatômicos e histológicos da mama

3.1.1. Tecido normal

A figura 1 representa esquematicamente a anatomia da mama. A glândula mamária é composta basicamente por tecidos glandulares, fibrosos e adiposos. O tecido glandular é formado por 15 a 20 lóbulos, que por sua vez são formados por ácinos, que são as glândulas produtoras de leite. Cada lóbulo possui um respectivo ducto lactífero, que conduz o leite até um ducto maior chamado sino lactífero, onde o leite é armazenado. O tecido fibroso é rico em fibras e colágeno, componentes do estroma, que proporcionam a sustentação dos lóbulos e ductos mamários, e são responsáveis ainda pela sua reserva nutricional. O tecido adiposo é formado por uma camada de cerca de 2 cm de células adiposas que envolve a glândula mamária e pode também ser encontrado misturado ao estroma [47].



Figura 1: Representação esquemática da anatomia da mama. Adaptado de [48].

Na figura 2 é apresentada uma lâmina histológica de uma mama adulta normal. É possível observar a presença dos lóbulos e ductos, além da dupla camada epitelial que reveste os canais principais. Uma membrana basal acompanha fielmente o contorno dos ductos, e o

tecido intralobular e periductal exibe um aspecto frouxo, diferentemente do estroma interlobular, que é mais denso [47].



Figura 2: Lâmina histológica de um tecido normal de mama. Adaptado de [49]

3.1.2. Neoplasias benignas

As neoplasias mamárias benignas estão geralmente associadas a mudanças decorrentes de alterações hormonais e possuem como característica um crescimento lento, sem a ocorrência de invasão tecidual ou metástases. O fibroadenoma é a neoplasia mamária benigna mais comum, sendo caracterizado pela proliferação dos tecidos glandulares e fibrosos, e em geral cresce como um pequeno nódulo que costuma ser nitidamente circunscrito no tecido circundante [50]. Na figura 3, que mostra a lâmina histológica de um fibroadenoma, observase uma proliferação e compressão das células epiteliais glandulares, com as membranas basais bem definidas. Neste caso, os elementos epiteliais aparecem como fios ou cordões estreitos de epitélio localizados dentro de um estroma fibroso [47].



Figura 3: Lâmina histológica de um fibroadenoma de mama.

3.1.3. Neoplasias malignas

As neoplasias malignas podem ser basicamente divididas em dois grandes grupos: os carcinomas *in situ* e os carcinomas infiltrantes (ou invasores). Dentro do primeiro grupo estão os carcinomas *in situ* de ductos ou de lóbulos mamários (intraductais ou intralobulares), que representam de 3% a 9% de todos os tumores malignos de mama. O grupo de carcinomas infiltrantes, que representam de 65% a 85% dos tumores malignos, compreende tumores originários nos ductos terminais ou unidades lobulares, dando origem a carcinomas ductais invasivos ou carcinomas lobulares invasivos [51].

Todos os carcinomas invasivos (com exceção do medular) podem ser graduados. O sistema de graduação de Bloom-Richardson, que é o mais utilizado, é baseado nas características arquiteturais do tumor como a formação de túbulos, o tamanho, forma e núcleos celulares, além do nível de proliferação celular (grau mitótico). Cada um destes critérios recebe uma pontuação de acordo com seu estado e uma graduação, variando de I a III é estabelecida para cada caso: grau I (carcinoma bem diferenciado); grau II (moderadamente diferenciado); grau III (pouco diferenciado) [52]. Quanto menos diferenciado o tumor, pior será o prognóstico [53].

A figura 4 mostra lâminas histológicas de dois diferentes casos de neoplasias malignas. A figura 4.a apresenta um caso de carcinoma ductal *in situ* em que se pode observar

que as células neoplásicas se mantêm dentro das membranas basais obstruindo os ductos. À medida que a lesão progride, a neoplasia intraductal pode se estender através da membrana basal e o tumor acaba se transformando em um carcinoma ductal infiltrante ou invasivo (figura 4.b). O carcinoma ductal invasivo apresenta uma maior quantidade de estroma tecidual fibroso e denso, com células anaplásicas revestindo os ductos, e células disseminadas pelo estroma que variam em quantidade dependendo do tipo de tumor [47].



Figura 4: Lâminas histológicas de neoplasias malignas de mama. (a) Carcinoma ductal in situ (b) Carcinoma ductal invasivo

O estágio proliferativo do câncer de mama é caracterizado pela invasão de células tumorais através da membrana basal que separa as células epiteliais hiperplásicas do estroma. Estas células podem então aderir em tecidos vizinhos, causando até a formação de metástase a distância. A angiogênese, processo de formação de novos vasos sanguíneos, possui um papel fundamental tanto no crescimento local do tumor quanto na metástase do câncer de mama [54]. Para atingir um volume além de 2 a 3 mm³, o tumor requer um suprimento vascular que forneça nutrientes e oxigênio. Isso é alcançado através da secreção de fatores angiogênicos de crescimento como o fator de crescimento vascular endotelial (do inglês: vascular endothelial growth factor - VEGF), que se liga em receptores pré-existentes no endotélio, estimulando a

proliferação celular endotelial, que resulta na germinação vascular e formação de novos vasos sanguíneos dentro do tumor [55-57].

Outras proteínas como as metaloproteinases de matriz (MMPs) são também importantes para o crescimento e metástase do tumor. As MMPs pertencem a uma família de enzimas que degradam a membrana basal e a matriz extracelular, e sua expressão pode ser regulada por inibidores endógenos de metaloproteinases (do inglês: tissue inhibitors metalloproteinases -TIMP). Em condições fisiológicas normais, as MMPs e TIMPs coexistem em perfeito equilíbrio, que pode ser interrompido na ativação da angiogênese. A expressão das MMPs aumenta com a progressão do tumor e está associada com o aumento do grau histológico [54].

3.2. Marcadores tumorais

Um marcador tumoral (ou biomarcador) é qualquer tipo de elemento mensurável em nível celular ou subcelular, que demonstra a presença de malignidade ou malignidade em potencial, ou prevê o comportamento de um tumor, seu prognóstico ou resposta ao tratamento [58]. Muitos marcadores tumorais são associados a fatores prognósticos ou preditivos, dependendo da abordagem. A combinação de dois ou mais parâmetros para definir o prognóstico do tratamento é importante, uma vez que permite definir o risco, bem como indicar o potencial ou não de certo tratamento [13].

Um pequeno número de biomarcadores individuais tem sido usado durante vários anos para ajudar na decisão do tratamento para o câncer de mama, dentre eles os receptors de estrogênio e progesterona, e o receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), o Ki67, o p53 e uma infinidade de novos marcadores [59-66].

Uma melhor compreensão e aplicação de biomarcadores tumorais tradicionais e a identificação de novos marcadores é uma área emergente, pois permite melhorar a qualidade

10

de vida dos pacientes, muitas vezes poupando-os de tratamentos tóxicos, subestimados ou ineficazes, estabelecendo então um tratamento individualizado e apropriado para cada tipo de tumor, além de identificar indivíduos com alto risco de câncer de mama que podem se beneficiar de intervenções preventivas [13, 58].

3.3. Fatores prognósticos

Fatores prognósticos são parâmetros avaliados no diagnóstico que fornecem informações a respeito do curso clínico da doença na ausência de tratamento (ou ao menos um tratamento adjunto à cirurgia para retirada do tumor) [67]. Dependendo da abordagem, alguns fatores prognósticos podem ainda ser utilizados como fatores preditivos, quando identificam uma característica positiva ou negativa da doença, em decorrência de uma estratégia particular de tratamento [67]. A expressão fator prognóstico aplica-se ainda a todas as variáveis que podem estabelecer correlação com o tempo de sobrevida pós tratamento, uma vez que a sobrevida livre de doença e a sobrevida global são dados bastante objetivos para avaliar a eficácia de um tratamento [68].

De acordo com o ranking de categorias do Colégio Americano de Patologia, os fatores prognósticos para o câncer de mama se dividem em três categorias. Os fatores de categoria I, que incluem o tamanho do tumor, grau e tipo histológico, estadiamento TNM, status linfonodal e de receptores hormonais, comprovaram grande importância prognóstica e utilidade na gestão clínica das pacientes. Fatores prognósticos classificados como categoria II, que incluem a expressão do gene c-erbB-2 (Her2-neu), a densidade de microvasos, VEGF, invasão linfática e vascular, e a expressão do p53, são fatores que têm sido extensivamente estudados biológica e clinicamente, mas ainda precisam ser validados por estudos estatísticos mais robustos. Já fatores na categoria III, que incluem dentre outros, a análise da ploidia do DNA, ainda não são considerados suficientemente estudados para demonstrar seu valor

prognóstico [12, 14, 69, 70]. Além dos fatores descritos, outros fatores clínicos são também considerados importantes fatores prognósticos, como a idade e estado menstrual [53].

3.4. Elementos-traço em tecidos mamários

Os elementos-traço geralmente representam menos de um por cento (1%) da massa de um material e podem ser classificados como essenciais e não essenciais, dependendo da sua função no organismo [16]. Todos os tecidos humanos apresentam uma composição de elementos-traço semelhante, que varia de acordo com a função exercida pelo tecido ou órgão. Elementos essenciais para o metabolismo celular, como o Ca, Cu, Cl, F, I, Fe, Mg, Mn, Mo, N, P, K, Na, S e Zn, em níveis normais participam de um grande número de processos biológicos, desde a ativação ou inibição de reações enzimáticas até modificações na permeabilidade das membranas celulares [71]. É reconhecido também, que alguns elementostraço representam importantes fatores de risco quando em concentrações alteradas, uma vez que podem induzir desordens patológicas no organismo [16].

Nos últimos 30 anos, vários autores vêm estudando as concentrações dos elementostraço em tecidos mamários através de diversos tipos de técnicas analíticas, tais como a Emissão de Raios X Induzido por Partículas (Particle induced X-ray emission – PIXE) [72], Análise por Ativação Neutrônica Instrumental (Instrumental neutron activation analysis – INAA) [18, 73], Espectrometria de Massa com fonte de plasma indutivamente acoplado (Inductively coupled plasma mass spectrometry – ICP-MS) [21], Espectrometria de Absorção Atômica no Forno de Grafite e Forno de Chama (Graphite furnace and flame furnace atomic absorption spectrometry – respectively GFAAS and FFAAS) [23, 74] e Fluorescência de Raios X (X-Ray Fluorescence – XRF) [16, 18, 19, 21, 24, 25, 28, 38, 42, 72, 75-81]. No entanto, estes trabalhos dificilmente avaliam as razões para as alterações das concentrações dos elementos em tecidos neoplásicos. Neste trabalho foram abordados os elementos descritos a seguir.

3.4.1. Cálcio

O cálcio é um elemento funcional e estrutural, fundamental na manutenção de todas as células. No organismo humano, 99% do cálcio é encontrado em tecidos mineralizados (como ossos e dentes), nos quais está presente na forma de fosfato ou carbonato de cálcio, sendo o restante encontrado no sangue, fluidos extracelulares e vários tipos de tecidos [82]. A concentração de íons de cálcio no plasma é mantida dinamicamente dentro de um intervalo bem regulado através da absorção intestinal, excreção e reabsorção renal, e o armazenamento esquelético [82].

Em tecidos mamários neoplásicos, o cálcio geralmente está associado à presença de microcalcificações, tanto em lesões malignas quanto em benignas [83]. Vários estudos estruturais revelam duas formas distintas das microcalcificações em doenças de mama, de acordo com sua forma e composição química: as do Tipo I e Tipo II [83-87]. Microcalcificações do tipo I são geralmente encontradas em neoplasias benignas (e raramente em carcinomas lobulares), e estão associadas a uma forma particular do oxalato de cálcio $(CaC_2O_4 \cdot 2H_2O)$. Microcalcificações do tipo II são geralmente encontradas nos carcinomas invasivos e adenocarcinomas intraductais (embora outros estudos também associem este tipo a lesões benignas) e são compostas por fosfato de cálcio, cuja forma mais característica é a hidroxiapatita $(Ca_{10}(PO_4) \cdot 6H_2O)$ [84, 85].

Embora o valor diagnóstico das microcalcificações no câncer de mama seja de grande importância, um ponto importante é saber se sua presença é um sinal de degeneração ou de um processo ativo da célula. O esclarecimento dos efeitos das microcalcificações em câncer de mama é essencial para entender a patofisiologia desta doença, além de ajudar a esclarecer as associações prognósticas destas calcificações em lesões benignas e malignas, uma vez que a deposição de cálcio no câncer de mama pode representar uma característica biologicamente significativa do tumor [83].

3.4.2. Ferro

O ferro é um elemento traço essencial e o metal de transição mais abundante no corpo humano. Este elemento desempenha um importante papel em uma variedade de funções fisiológicas, incluindo o transporte de oxigênio, transporte de elétrons, produção de energia e a síntese do DNA. No organismo, grande parte do ferro está ligada a proteínas como a ferritina, que é capaz de armazenar até 4500 átomos de ferro em sua estrutura, e a transferrina, responsável por transportar o ferro no sangue [88, 89].

Entretanto, como um metal de transição, o ferro pode perder os elétrons fracamente ligados na sua camada externa, catalisando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), ou radicais livres, que podem reagir com o DNA e outras moléculas dentro da célula, resultando no stress oxidativo, mutações, rupturas das cadeias no DNA, e até ativação de oncogenes [88, 90].

O stress oxidativo é um distúrbio no equilíbrio entre a produção de ROS (espécies reativas de oxigênio) e as defesas antioxidantes, resultando num excesso relativo de ROS [88]. As ROS estão presentes nas células em condições fisiológicas normais, e seu estado de redução na célula é precisamente regulado. Quando a concentração de metais oxidantes como o ferro e o cobre aumenta, seus efeitos tóxicos aparecem e estes podem atuar como catalisadores na conversão de peróxido de hidrogênio em radicais livres, aumentando a taxa de geração de ROS e, conseqüentemente, causando danos em macromoléculas biológicas [20, 91-93].

3.4.3. Cobre

O cobre é outro elemento-traço essencial com muitas funções fisiológicas, podendo ser encontrado no organismo em seu estado oxidado (Cu^{2+}) ou reduzido (Cu^{+}). Este metal é cofator e/ou componente alostérico de muitas enzimas responsáveis, por exemplo, pela respiração celular, eliminação de radicais livres, síntese de melanina, formação de tecidos conectivos e ainda participa do metabolismo do ferro [57, 94].

Dentre as enzimas que dependem do cobre estão as SOD (Superoxide Dismutase), que protegem as células contra agentes que produzem radicais livres e substâncias que podem estar envolvidas na iniciação do processo neoplásico [95]. O cobre, juntamente com o zinco, é ainda reconhecido por ter um importante papel como co-fator da enzima Cu/ZnSOD, que contém um átomo de Cu²⁺ e um átomo de Zn²⁺ por unidade, atuando contra a formação das ROS [94].

3.4.4. Zinco

O zinco é um elemento-traço essencial no organismo, sendo componente funcional de mais de 200 enzimas e fatores de transcrição. Ele é fundamental em vários processos metabólicos incluindo a regulação de muitas proteínas envolvidas na replicação e transcrição do DNA e na divisão celular, atuando tanto nas funções estruturais quanto catalíticas através das proteínas 'dedo de zinco' [88, 96].

Uma importante classe de proteínas 'dedo de zinco' são as metaloproteinases de matriz (MMPs), que possuem no sítio ativo um átomo de zinco como grupo prostético, tendo como principal função degradar a matriz extracelular para facilitar o rompimento da membrana basal e/ou componentes do tecido conjuntivo da matriz para facilitar a multiplicação das células conforme elas se expandem [97-99]. Em vários casos, o estágio de progressão do tumor está positivamente correlacionado com a expressão das MMPs [98]. As

MMPs são classificadas em diferentes grupos (baseado nos seus substratos), incluindo as colagenases (MMPs 1, 8, 13), gelatinases (MMP 2, 9), stromielinas (MMP 3, 10, 11), entre outros [100]. Dentre elas, a MMP2 é considerada a mais relacionada à invasão e metástases em vários tipos de câncer. Supõe-se que a ativação da MMP2, possivelmente feita pela MMP1, é um passo chave para a invasão celular e metástase do câncer [101].

Os principais inibidores fisiológicos das MMPs são as proteínas inibidoras de metaloproteinases (tissue inhibitors of metalloproteinases – TIMPs). A família das TIMPs compreende 4 membros (TIMP-1, -2, -3 e -4), que representam um importante mecanismo de regulação das MMPs [100, 102].

3.5. Fluorescência de Raios X

A fluorescência de raios X baseia-se na emissão de raios X característicos pelos átomos que compõem um material, que ocorre quando este é submetido à excitação apropriada, seja na forma de partícula corpuscular ou de radiação eletromagnética. Se a energia incidente possuir valor igual ou maior à energia de ligação do elétron, este será ejetado do átomo formando uma vacância, que será posteriormente preenchida através da captura e/ou decaimento de outro elétron de uma camada mais externa. Essa transição eletrônica faz com que o átomo perca energia, emitindo um fóton de raios X característico, com energia correspondente à diferença de energia entre as camadas [36]. A vacância formada pelo elétron que preencheu a primeira vacância pode ser por sua vez preenchida por elétrons mais externos dando origem a outras linhas de emissão (menos energéticas, ou maior comprimento de onda). Em geral, cada série de raios X é seguida de uma letra grega que indica qual camada sofreu a transição. De forma geral, raios K_{α} correspondem à transição eletrônica da camada L para K, e raios K_{β} correspondem à transição de uma camada M para uma camada K [16].

16

Na faixa de energia da fluorescência de raios X, que vai de 1 keV a aproximadamente 100 keV, as interações predominantes são o efeito fotoelétrico, o espalhamento coerente e o espalhamento incoerente (efeito Compton). Devido ao efeito fotoelétrico e ao espalhamento Compton, os átomos da amostra irradiada emitem raios X característicos e as diferentes energias de fluorescência possibilitam a identificação dos elementos constituintes da amostra [36].

Nas próximas seções serão discutidos especificamente os aspectos das técnicas de Fluorescência de Raios X por Dispersão por Energia (do inglês: Energy Dispersive X-Ray Fluorescence – EDXRF), Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (do inglês: Total Reflection X-Ray Fluorescence – TXRF) e Microfluorescência de Raios X (do inglês: Micro X-Ray Fluorescence – μ-XRF), que foram utilizadas neste trabalho.

3.5.1. Fluorescência de Raios X por Dispersão por Energia

Um típico sistema de EDXRF é representado na figura 5. Este sistema consiste em uma fonte de excitação, um objeto de medida, um detector de radiação e um sistema de leitura. A excitação da amostra pode ser feita através de fontes polienergéticas ou monoenergéticas, utilizando radionuclídeos, tubo de raios X ou radiação síncrotron. Os feixes monoenergéticos permitem a escolha da energia incidente, com o objetivo de aumentar a eficiência de excitação dos elementos e reduzir o espalhamento.

Diferentes tipos de detectores podem ser empregados na espectroscopia de raios X e a escolha depende, entre outros fatores, do tipo de elemento a ser analisado e a sensibilidade desejada. Na técnica de EDXRF, os detectores semicondutores (tais como, Si(Li) e Ge) são hoje os mais empregados em análises multielementares, devido à sua sensibilidade e alta resolução energética [16].



Figura 5: Configuração típica de um equipamento de fluorescência de raios X

Após absorver os fótons fluorescentes, os detectores dispersivos em energia os convertem em pulsos eletrônicos com amplitudes proporcionais à energia do fóton (préamplificador). A eletrônica associada ao detector é composta de um amplificador e um analisador multicanal. Este último é responsável por organizar a seqüência de pulsos com amplitudes variáveis de forma a refletir a distribuição de fótons do espectro fluorescente e converter essa informação em um número digital, que é armazenado em um histograma disponível para posterior interpretação e análise [16].

3.5.2. Fluorescência de Raios X por Reflexão Total

A técnica de TXRF é considerada uma variante da EDXRF, sendo seu princípio baseado na excitação da superfície da amostra a ângulos muito rasos de forma a se obter reflexão total. Uma vez que o feixe incidente é refletido, ocorre pouca interação deste com a amostra e, consequentemente, uma diminuição do espalhamento da radiação na amostra e no material refletor.

O fenômeno da reflexão total ocorre quando um feixe de radiação deslocando-se em um meio com índice de refração n1 incide em uma interface com outro meio de índice de refração n2. Nessas condições podem ocorrer dois fenômenos: refração e reflexão. Se n2 for menor que *n1* e o ângulo incidente for menor que um ângulo crítico, ocorre a reflexão total do feixe incidente. Para energias na faixa dos raios X, o ângulo crítico ($\varphi_{crít}$) é descrito pela equação 1:

$$\varphi_{crit}[\text{mrad}] = \frac{28.8}{E \ [keV]} \sqrt{\frac{Z.\rho \ [g/cm^3]}{A}}$$
(1)

onde *E* é a energia do feixe incidente, *Z* é o número atômico do material refletor, *A* é a massa atômica do material refletor e ρ é a densidade do material [103].

Geralmente uma amostra líquida é depositada no centro do material refletor, e após um processo de secagem o líquido é evaporado e os elementos-traço permanecem na superfície do refletor, formando uma amostra fina, de forma que os efeitos de matriz podem ser desprezados.

Um típico sistema de TXRF está representado na figura 6. Essa geometria mostra o feixe incidente inclinado alguns mrads com relação ao material refletor, onde se encontra a amostra. O feixe incidente atinge então a amostra em ângulos abaixo do ângulo crítico para que ocorra a reflexão total de raios X.



Figura 6: Configuração típica de um equipamento de TXRF. Adaptado de [103]

Dentre as vantagens da TXRF pode-se citar a redução da radiação espalhada e do ruído (*background*), uma vez que praticamente 100% dos fótons incidentes são totalmente refletidos. Conseqüentemente, a razão sinal – ruído é alta e os limites de detecção são de algumas ordens de magnitude menores quando comparados com a EDXRF [103].

3.5.3. Micro Fluorescência de Raios X

A microfluorescência de raios X (μ -XRF) é uma técnica que apresenta a possibilidade de focalizar o feixe primário em tamanhos muito pequenos, permitindo sua aplicação em análises multielementares não destrutivas de pequenas áreas da amostra. A figura 7.a esquematiza uma configuração típica para a microfluorescência de raios X, que consiste em uma fonte de raios X, um dispositivo focalizador (capilar), um porta amostras e um sistema de detecção. Os primeiros dois componentes irão definir as propriedades espectrais do feixe primário e o porta amostras deve permitir um controle remoto e preciso da posição da amostra. Um microscópio convencional (ou uma câmera com um sistema de lentes) pode ainda ser utilizado para monitorar e identificar a parte da amostra a ser analisada [103]. O tamanho do feixe é definido pelo diâmetro interno do capilar, enquanto a posição do feixe pode facilmente ser estabelecida por um microscópio óptico comum.





(b)

Figura 7: (a) Configuração típica de μ-XRF (b) Processo de formação do mapa de μ-XRF. Adaptados de [44] e [103].

A figura 7.b ilustra o processo de formação dos mapas elementares a partir da fluorescência emitida pela amostra. Com a finalidade de se obter um mapeamento da composição da amostra, a área de interesse é dividida em pequenas áreas (seções), que são submetidas a uma varredura com o feixe incidente. Um espectro de fluorescência é adquirido a cada seção, e a intensidade dos picos é relacionada com a concentração dos elementos-traço na amostra. Esta intensidade pode ser convertida para uma escala de cores e a análise qualitativa destes mapas é suficiente para definir a homogeneidade ou não da distribuição dos elementos na amostra, bem como a associação entre elementos [103].

3.6. Imunohistoquímica

A técnica de imunohistoquímica (IHQ) envolve a utilização de um anticorpo específico a um antígeno, cuja interação pode ser identificada pela sua ligação a um marcador, que pode ser uma molécula fluorescente ou enzima, cuja atividade será utilizada para produzir um complexo colorido na presença de um cromógeno [104].

A IHQ pode ser realizada pelo método direto ou indireto. No método direto, o anticorpo marcado reage diretamente com o antígeno, sendo, portanto, um método muito

21

rápido, porém com pouca amplificação de sinal. O método indireto envolve a formação de um complexo no sítio antigênico constituído de anticorpos marcados diretamente com uma molécula fluorescente ou com um cromógeno revelado por meio de uma reação de peroxidase. Esse método é mais sensível, porque muitos anticorpos secundários podem reagir com diferentes sítios antigênicos no anticorpo primário, amplificando o sinal da reação [104]. Dentre os vários métodos diretos e indiretos de IHQ, aqui será descrito o método utilizado neste trabalho: o método da imunoperoxidase indireta utilizando o tetracloreto de diaminobenzidina (DAB) como cromógeno.

3.6.1. Método da imunoperoxidase utilizando o tetracloreto de diaminobenzidina

Na técnica de imunoperoxidase indireta, o tecido é exposto a um anticorpo primário específico para o antígeno a ser estudado e a seguir é incubado em um anticorpo secundário conjugado com a enzima peroxidase (figura 8). A enzima peroxidase é comumente usada para marcação do sítio de reação por diversas razões: seu tamanho reduzido não dificulta a ligação de anticorpos em seus sítios adjacentes; é bastante estável, permanecendo inalterada durante a aplicação; a atividade da peroxidase endógena inerente nos tecidos é facilmente bloqueada antes da aplicação do anticorpo primário; e existe uma grande variedade de substâncias cromógenas que sob a ação da peroxidase, formam um produto final colorido, que se precipitará no local em que se encontra o antígeno [46].


Figura 8: Esquema de marcação pelo método da imunoperoxidase indireta.

Posteriormente, com a adição do cromógeno tetracloreto de diaminobenzidina (DAB), a reação resultará em um produto oxidado e insolúvel sobre a região do antígeno, na cor marrom. Caso o tecido não contenha antígenos para o anticorpo primário, o anticorpo secundário não terá onde se ligar, não havendo, portanto a coloração do local do antígeno [46].

3.7. Análises Estatísticas – Modelos de Diagnóstico

A construção de modelos de diagnóstico baseados em técnicas estatísticas, que permita classificar corretamente diferentes tipos de tecidos mamários a partir das concentrações dos elementos-traço, é uma ferramenta em potencial no auxílio ao diagnóstico do câncer de mama [25, 38, 105-107].

Para aperfeiçoar a utilidade clínica, é importante quantificar a sensibilidade e a especificidade de novos modelos propostos. A sensibilidade (S) é a probabilidade de se obter um verdadeiro positivo, ou seja, detectar uma alteração quando ela realmente está presente [108, 109]. Sendo VP o número de verdadeiros positivos e FN o número de falsos negativos, a sensibilidade é calculada através da equação 2:

$$S = VP/(VP + FN) \tag{2}$$

A especificidade (E) é a probabilidade de se obter um resultado verdadeiro negativo dado que o paciente realmente não apresenta a anormalidade, ou seja, um resultado que não detecta uma anomalia [108]. Sendo VN o número de verdadeiros negativos e FP o número de falsos positivos, a especificidade é calculada através da equação 3:

$$E = VN/(VN + FP) \tag{3}$$

O verdadeiro estado do paciente (presença ou ausência de doença) é determinado por um teste de referência, o chamado padrão ouro, que pode ser baseado em análises clínicas ou histológicas previamente realizadas [108].

A acurácia no diagnóstico também é fundamental como critério de classificação do teste estatístico, pois se este fornece discriminação relevante, é interessante explorar a utilidade prática de seus resultados na decisão clínica de gestão do paciente [109]. A acurácia mede a habilidade do teste em discriminar diferentes estados de saúde do paciente como, por exemplo, distinguir entre doenças malignas e benignas, pacientes que respondem ou não a uma determinada terapia e até predizer casos que podem vir a desenvolver uma doença [109]. Neste trabalho, duas técnicas de análise estatística multivariada foram utilizadas para desenvolver um modelo diagnóstico a partir das concentrações dos elementos-traço: a análise de discriminante e a curva ROC (Receiver Operating Characteristic), que serão descritas a seguir.

3.7.1. Análise de discriminante

A análise de discriminante é um método estatístico multivariado, que consiste na obtenção de combinações lineares das variáveis originais que permitam maximizar a separação entre grupos. Estas combinações lineares são denominadas funções discriminantes de Fisher e seus coeficientes são baseados na variabilidade dentro dos grupos e entre os grupos [110].

Determinadas as funções discriminantes, o algoritmo escolhe automaticamente uma função que forneça uma separação máxima entre os grupos. Em seguida, é escolhida uma segunda função que ao mesmo tempo não é correlacionada com a primeira função e fornece também a máxima separação possível. O procedimento continua acrescentando funções desta forma até atingir o número máximo de funções, determinado pelo número de preditores e categorias da variável dependente [110]. Para a aplicação da análise de discriminante é necessário que os dados apresentem distribuição normal, homogeneidade entre as matrizes de covariância e linearidade entre pares de variáveis [111].

3.7.2. Curvas ROC (Receiver Operating Characteristic)

A curva ROC é outra ferramenta estatística que permite avaliar o desempenho de um modelo diagnóstico, através da variação dos valores de sensibilidade e especificidade para diferentes valores de *cut-off* (ou ponto de corte) de uma grandeza numérica obtida em um exame, de forma que se pode identificar um valor de *cut-off* que corresponda a um diagnóstico apropriado [109]. A curva ROC é criada a partir da representação gráfica dos valores de sensibilidade (ou a fração de verdadeiros positivos) e 1-especificidade (ou a fração de falsos positivos). Como essas coordenadas representam medidas de probabilidade, ambas variam entre zero e um [109].

A figura 9 apresenta uma curva ROC típica. A linha pontilhada diagonal na figura corresponde a um teste que é aleatoriamente positivo ou negativo, portanto não confere acurácia a um diagnóstico. Os pontos que se encontram mais próximos ao canto superior esquerdo evidenciam os valores para os quais existe maior otimização da sensibilidade em função da especificidade, uma vez que o índice de verdadeiros positivos é 1 e falsos positivos é zero [108]. A área sob a curva ROC resume o desempenho do teste, uma vez que considera os valores de sensibilidade e especificidade relativos a cada ponto de corte, equivalendo à probabilidade de que o teste classifique uma ocorrência escolhida aleatoriamente positiva, como sendo superior a uma escolhida aleatoriamente negativa, característica equivalente ao teste de postos de Wilcoxon para duas amostras. Quanto maior a capacidade discriminatória do teste, mais a área sob a curva se aproxima de 1 [112].



Figura 9: Curva ROC típica

Como os valores pareados de sensibilidade e especificidade fornecem um quadro completo da acurácia do teste, o limiar de decisão é variado ao longo do espectro de resultados possíveis, movendo-se em direções opostas, de forma que quando a sensibilidade aumenta a especificidade diminui [109]. Cada par sensibilidade/especificidade da curva ROC está associado a um ponto de corte, que pode se definido pelo avaliador entre os valores possíveis para a variável de decisão, acima do qual a variável é classificada como positiva e abaixo do qual é classificada como negativa [108, 113].

4. Metodologia

4.1. Aspectos Éticos

Este trabalho foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Experimentação Humana do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (Processo 4308/2009 - Anexo I).

4.2. Casuística

As amostras de tecido mamário foram fornecidas pelo Serviço de Patologia do Clínicas Faculdade Medicina Ribeirão Hospital das da de de Preto (SERPAT/HCFMRP/USP). O material coletado era residual de tecidos retirados em procedimentos cirúrgicos de mastoplastia, tumorectomia e mastectomia. Após a coleta os tecidos foram preservados em temperatura ambiente, dentro de um recipiente contendo formol tamponado (10%). A classificação histológica foi realizada por profissionais do SERPAT através da análise microscópica das lâminas arquivadas e coradas por hematoxilina e eosina, e posteriormente revisadas por um médico especialista em patologias mamárias.

Para este trabalho foi coletado um total de 161 amostras, 59 classificadas histologicamente como tecido normal (adiposo, adenose e glandular), 48 classificadas como tumores malignos (carcinomas ductais invasivos de grau I, II e III, intraductais e alguns casos de mucinosos), 41 amostras de tecido normal adjacente a neoplasias malignas e 13 amostras de tumores benignos (fibroadenomas). Todas as amostras eram provenientes de pacientes do sexo feminino. A tabela 1 relaciona o código da amostra e o tipo de análise às quais estas amostras foram submetidas.

Código					Código					Código				
da	EDXRF	TXRF	μ- VDF	IHQ	da	EDXRF	TXRF	μ- VDF	IHQ	da	EDXRF	TXRF	μ- VDE	IHQ
amostra			XKF	-	amostra			XKF		amostra			XKF	-
N1	х	х	х	х	T1	х	х	х	х	NP1	х	х		
N2	x	v	v		T2	v	v	v		NP2	v	v		
N3	x	x v	А		T2 T3	x	v	А		NP3	x	v		
NJ NJ	X	A V	v		13 T4	А	A V	v	v	ND4	А	A V		
IN4 N/5	х	х	х		14	-	х	х	х	NP4	-	х		
NS	х	х	х	х	15	х	х	х	х	NP5	х	х		
N6	-	х			T6	-	х	х	х	NP6	-	х		
N7	х	-			T7	х	х	х	х	NP7	х	х		
N8	х	х	х	х	T8	х	х	х		NP8	-	х		
N9	х	х			Т9	х	х			NP9	х	х		
N10	х	х			T10	-	х			NP10	-	х		
N11	х	х			T11	х	х			NP11	-	х		
N12	x	-			T12	-	x			NP12	-	x		
N13	v	v			T13		v	v	v	NP13	v	v		
N14	x	v			T14	v	N V	A V	A V	ND14	X	A V		
N14	X	X			114 T15	X	X	X	А	NF 14 ND 15	х	X		
N15	х	х			115	X	х	х		NP15	-	х		
N16	х	х	х	х	116	х	х			NP16	х	х		
N17	х	х			T17	х	х			NP17	х	х		
N18	х	х	х	х	T18	х	х	х	х	NP18	х	х		
N19	х	х			T19	х	х			NP19	-	х		
N20	-	х			T20	х	х			NP20	-	х		
N21	-	х			T21	х	х			NP21	х	х		
N22	-	х			T22	-	х	х	х	NP22	-	х		
N23	_	x			Т23	x	x			NP23	_	x		
N24	v	v			T24	-	v	v		NP24	v	v		
N25	л	v			T25		N V	А		ND25	X	A V		
N25	-	X			123	-	X		_	NF25	х	X		
N26	-	х			126	х	х	х	х	NP26	-	х		
N27	-	х			127	х	х	х	х	NP27	-	х		
N28	-	х			T28	-	х	х	х	NP28	х	х		
N29	х	х			T29	-	х			NP29	-	х		
N30	х	х			T30	х	х			NP30	х	х		
N31	-	х			T31	-	х			NP31	х	х		
N32	х	х			T32	х	х	х	х	NP32	х	х		
N33	х	х			T33	х	х	х	х	NP33	-	х		
N34	-	x			T34	x	x	x	x	NP34	x	x		
N35	v	v			T35	v	v	v	v	NP35	v	-		
N36	-	x v			T36	-	v	x v	v	NP36	x	_		
N37	- v	л v			T37	-	л v	л	л	ND37	A V	-		
N29	А	л Т			T 29	-	л 			ND29	х 	-		
1130	-	х			138	х	X		х	NP38	х	-		
N39	х	х			139	х	-		х	NP39	х	-		
N40	х	-			T40	х	-	х		NP40	х	-		
N41	х	-			T41	х	-	х	х	NP41	х	-		
N42	х	-			T42	х	-	х	х					
N43	х	-			T43	х	-	х	х	FA1	-	х		
N44	х	-			T44	х	-	х	х	FA2	-	х		
N45	х	-			T45	х	-			FA3	х	х		
N46	х	-			T46	х	-			FA4	х	х		
N47	x	_			T47	x	-	x	x	FA5	-	x		
N/8	v				T 19	v		v	v	EV6	v	v		
N40	X	-			140	А	-	л	л	EA7	X	A V		
N49	х	-									х	х		
N50	х	-								FA8	-	х	х	
N51	х	-								FA9	х	х	х	х
N52	Х	-								FA10	Х	х	х	х
N53	Х	-								FA11	-	х		
N54	х	-								FA12	х	-	х	х
N55	х	-								FA13	х	х	х	х
N56	х	-												
N57	v	_												
N58	л v	_												
N50	A V	-												
1139	Х	-												

Tabela 1: Tipos de análises às quais as amostras foram submetidas. N: Tecidos normais, T: Neoplasias malignas, NP: Tecidos normais periféricos, FA: Neoplasias benignas.

As informações de importância prognóstica foram coletadas a partir dos prontuários médicos das pacientes arquivados no Serviço de Arquivo Médico (SAME) do Hospital das

Clínicas de Ribeirão Preto (USP). O modelo de protocolo para obtenção destes dados é ilustrado no Anexo II.

4.3. Fluorescência de Raios X por Dispersão por Energia

4.3.1. Amostras

Os experimentos de EDXRF foram realizados no Laboratório de Física das Radiações e Dosimetria da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP. As amostras foram submetidas à análise sem pré-processamento, com o objetivo de preservar a estrutura dos tecidos mamários e evitar algumas desvantagens dos métodos de secagem, como a grande quantidade de amostra necessária e o elevado tempo de preparação. As amostras (tecidos e padrões) foram cortadas em aproximadamente 1 cm³, colocadas em um porta amostras de acrílico e cobertas com um filme plástico ultralene[®].

Como padrão externo foi utilizado um material de referência (IAEA-V-10) com concentrações certificadas de vários elementos-traço. Este material foi obtido da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA), e pode ser usado como controle de qualidade e validação de métodos analíticos em laboratórios [114].

4.3.2. Arranjo Experimental

A fonte de excitação utilizada foi um tubo de raios X com alvo de molibdênio (K_{α} = 17,5 keV e K_{β} = 19,6 keV), potência máxima de 4 kW e acoplado a um gerador de alta tensão. A tensão aplicada no tubo foi de 35 kV, com uma corrente de 40 mA. Um monocromador pirolítico de grafite altamente ordenado foi posicionado entre o tubo e a amostra, para obter um feixe monoenergético, de forma que a energia de excitação fosse de 17,44 keV. O tempo de cada medida foi fixado em 1000 s de forma a manter as incertezas estatísticas na determinação dos picos de interesse menores que 4%. O sistema de detecção era composto por um detector semicondutor de Si(Li), com resolução de 165 eV a 5,89 keV, janela de berílio de 12,7 μ m, e 30 mm² de área ativa, acoplado a um módulo amplificador e uma placa multicanal. Acoplado ao detector, foi posicionado um colimador com abertura de 3 mm de diâmetro, para definir o volume de detecção sobre a amostra. O porta amostras e o detector estavam posicionados a 45° e 90° respectivamente com relação ao feixe incidente, para diminuir a intensidade de fótons espalhados pela amostra [36].

4.3.3. Método de análise

Para a quantificação das concentrações dos elementos-traço na análise com EDXRF, foi utilizado o método de padrão externo associado ao método da intensidade espalhada [36]. Neste método, as intensidades fluorescentes e a radiação espalhada primária são afetadas proporcionalmente pela absorção da amostra, então sua taxa é praticamente independente da matriz [24]. Além disso, essa taxa pode ser independente de outras variáveis, como as condições de excitação, o tamanho das partículas e massa da amostra [36].

A partir do padrão certificado V10, foi calculada a sensibilidade (S_i) para cada elemento *i* a partir da equação 4 [36]:

$$S_{iP} = \frac{I_{iP} / I_{espP}}{C_{iP}} \tag{4}$$

onde I_{iP} é a intensidade fluorescente do elemento *i* no padrão V10, I_{espP} é a intensidade espalhada (coerente e incoerente) pelo padrão V10 e C_{iP} é a concentração do elemento *i* na amostra padrão V10.

Desta forma, as concentrações dos elementos-traço em todas as amostras foram obtidas através da equação 5 [36]:

$$C_i = \frac{I_i / I_{esp}}{S_{iP}} \tag{5}$$

onde C_i é a concentração do elemento *i* na amostra, I_i é a intensidade fluorescente do elemento *i* na amostra e I_{esp} é a intensidade espalhada (coerente e incoerente) pela amostra.

Os limites de detecção (LD) foram calculados de acordo com a equação 6 [36]:

$$LD = 3. \frac{C_{iP}}{I_{iP}} \sqrt{\frac{I_{BGi}}{t}}$$
(6)

onde I_{BGi} é a área sob o pico fluorescente de cada elemento *i* e *t* é o tempo de medida.

4.4. Fluorescência de Raios X por Reflexão Total

4.4.1. Amostras

Cerca de 250 mg de cada amostra de tecido mamário foi submetida a um processo de digestão aberta utilizando ácido nítrico (HNO₃) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) como catalisador [115-117]. Para cada amostra, o volume digerido foi diluído com água deionizada (Milli-Q[®]) para um volume final de 5 mL. Posteriormente, alíquotas de 1 mL de cada amostra foram padronizadas com 10 μ L de gálio (solução de 1000 mg/kg), utilizado como padrão interno. Embora outros elementos também pudessem ser utilizados como padrão interno [118-121], o gálio foi escolhido pois este elemento apresenta energia de emissão fluorescente K_a na faixa de energia de interesse, além de não ser observado em tecidos mamários [17, 19, 21, 24, 39, 42, 72, 73, 75, 122]. Finalmente, uma alíquota de 5 μ L das soluções finais de cada amostra e submetidas à secagem com uma lâmpada de infravermelho. Desta forma, as amostras formavam filmes finos e os efeitos de matriz puderam ser desconsiderados [103]. Todos os compostos utilizados na preparação das soluções possuíam grau analítico.

Soluções monoelementares de padrões certificados da Merck[®] adicionadas de gálio foram utilizadas para determinar as curvas de sensibilidade relativa e de limite de detecção. Estas soluções foram depositadas em placas de acrílico, seguindo o mesmo procedimento utilizado para as amostras de tecidos mamários.

4.4.2. Arranjo Experimental

O experimento foi realizado na linha de fluorescência de raios X do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, Brasil [123]. O feixe polienergético ($E_{max}=22$ keV) emitido do anel de aceleração (1,37 GeV e 100 mA) com largura de 0,1 mm e comprimento de 5,0 mm foi utilizado para irradiar as amostras. Este feixe foi colimado e direcionado à amostra a um ângulo de 1,0 mrad, assegurando as condições de reflexão total. Cada amostra foi irradiada por 150 s de forma a manter as incertezas estatísticas menores que 4%. A fluorescência emitida pelos elementos presentes na amostra foi detectada por um detector de Si(Li), com resolução energética de 165 eV a 5,9 keV, colocado a 90° do feixe incidente, e a 18 mm da amostra.

4.4.3. Método de análise

A partir dos padrões com concentrações conhecidas, foi calculada a sensibilidade relativa (S_i) para cada elemento *i* a partir da equação 7 [36]:

$$S_i^{'} = \frac{I_i \cdot C_{Ga}}{I_{Ga} \cdot C_i} \tag{7}$$

onde I_i é a intensidade fluorescente do elemento *i*, C_{Ga} é concentração de Ga, I_{Ga} é a intensidade fluorescente do Ga e C_i é a concentração do elemento *i*. Os limites de detecção (LD) foram calculados de acordo com a equação 6.

4.5. Análise das intensidades dos espectros obtidos

Para a determinação das áreas dos fotopicos das linhas características de emissão nos espectros foi utilizado o software AXIL (Analysis of X-ray spectra by Iterative Least-squares fitting) contido no pacote de análise quantitativa QXAS (Quantitative X-ray Analysis System), desenvolvido e distribuído livremente pela IAEA (Agência Internacional de Energia Atômica) [124]. A análise feita pelo AXIL é realizada através do ajuste de funções matemáticas aos espectros de fluorescência obtidos, considerando funções gaussianas para os picos fluorescentes e funções polinomiais para o fundo (*background*). O método utilizado é baseado na minimização do qui-quadrado, com otimização feita pelo algoritmo de Marquardt, no qual as iterações são interrompidas se a diferença percentual entre dois qui-quadrados consecutivos for menor que um determinado valor (neste caso menor que 0,1%), ou um número máximo de iterações for alcançado [125]. Neste trabalho foram considerados com qualidade os ajustes de qui-quadrado menor ou igual a 2 e resíduos menores que \pm 5. Para facilitar a análise foi criado no próprio programa, um modelo de análise que incluía condições específicas de calibração, região e elementos químicos de interesse, além dos parâmetros de *background*.

As áreas correspondentes à soma das intensidades dos espalhamentos coerente e incoerente foram calculadas utilizando também a função correspondente do software AXIL, definindo a mesma região de interesse (ROI) para todos os espectros.

As incertezas apresentadas nos valores de concentração estão relacionadas ao desvio padrão das áreas dos fotopicos, devido à contagem estatística.

4.6. Validação dos métodos de quantificação

A acurácia dos métodos foi testada através da análise de diferentes materiais – padrões certificados e materiais de referência secundários. Dentre os padrões certificados foi analisado

um padrão em pó (A153) [126] obtido da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) e padrões líquidos obtidos da Merck[®]. Como padrão secundário, foi analisada uma solução aquosa de uréia, álcool isopropílico e ácido fosfórico, com propriedades de atenuação similares à de tecidos normais adiposos, sugerida pela International Commission on Radiation Units and Measurements (ICRU) [127].

4.7. Micro Fluorescência de Raios X

4.7.1. Amostras

As amostras de tecidos mamários foram obtidas a partir dos blocos de parafina disponíveis para estudo e arquivados no SERPAT do HC-FMRP/USP. Através da análise das lâminas correspondentes a cada bloco foi marcada uma região que representava histologicamente a área de interesse e os tecidos foram retirados dos blocos de parafina correspondentes às lesões marcadas. Para retirar as áreas de interesse dos blocos foi utilizada uma agulha de biópsia, e o material então depositado em um bloco de parafina com vários orifícios (Tissue micro array - TMA), sendo então cada orifício preenchido por um caso diferente. A partir dos blocos de TMA preenchidos, foram feitos cortes histológicos de 3 µm (micrótomo Spencer, modelo 820, série 17797), que foram depositados em lâminas de vidro silanizadas a 8%. Uma destas lâminas foi corada com HE de forma que, através de um microscópio de luz convencional, as diferentes regiões dos tecidos pudessem ser identificadas e utilizadas como referência na comparação com os mapas produzidos por µ-XRF. As demais lâminas foram reservadas para serem posteriormente submetidas à imunohistoquímica.

Após a retirada dos cortes para a IHQ, os materiais residuais nos blocos de TMA foram retirados individualmente e submetidos a um processo de desparafinização (ANEXO III), cortados em fatias de aproximadamente 60 µm e colocados em um porta amostras de acrílico e cobertos com filme ultralene[®]. Os cortes submetidos à análise eram uniformes, de forma a minimizar diferenças de atenuação na superfície da amostra.

4.7.2. Arranjo Experimental

O experimento foi realizado na linha de fluorescência de raios X do LNLS em Campinas [123]. O feixe branco (polienergético) foi colimado por um microcapilar de 20 μm de diâmetro interno. As amostras foram posicionadas a 45° com relação ao feixe incidente, sobre uma mesa com 3 graus de liberdade (x, y e z), permitindo um posicionamento independente da amostra nestas duas direções. Um microscópio óptico posicionado na direção normal da amostra permitiu um correto posicionamento e escolha da área a ser escaneada. A escolha das áreas foi baseada nas imagens obtidas com um microscópio ótico padrão das lâminas histológicas coradas com HE. Foi realizada uma varredura na região selecionada da amostra, com passos de 0,03 mm em cada direção, sendo que a cada passo, um espectro era detectado. O tempo de aquisição de cada espectro foi de 10 s.

A fluorescência emitida pelos elementos presentes na amostra foi detectada por um detector de Si(Li), com resolução energética de 165 eV a 5.9 keV, posicionado a 90° com relação ao feixe incidente.

4.7.3. Método de análise

Os espectros de fluorescência obtidos de cada ponto da superfície da amostra foram processados pelo software PyMca 4.4.0 [128], que forneceu os mapas de distribuição espacial de cada elemento. Cada pixel da imagem era proporcional à emissão fluorescente do elemento-traço naquele ponto, normalizado pela intensidade do feixe incidente. O mapa de distribuição espacial de cada elemento foi comparado com a imagem de referência das lâminas coradas com HE dos cortes adjacentes às seções utilizadas para a obtenção das imagens de µ-XRF.

4.8. Imunohistoquímica

A preparação das lâminas submetidas à imunohistoquímica foi descrita na seção 4.7.1. As amostras foram submetidas à técnica de IHQ, utilizando o Kit Universal da Novocastra[®], seguindo protocolo desenvolvido pelo Laboratório de Patologia Ginecológica e Mamária do Departamento de Patologia da FMRP/USP (Anexo III). Após a reação, as lâminas foram cobertas por uma lamínula com auxílio de Permaunt[®]. Os anticorpos utilizados nas reações possuíam marcação citoplasmática e são listados na tabela 2. Para revelação das reações foi utilizado o diaminobenzidina (DAB). Para todos os marcadores, controles externos positivos e negativos foram processados juntamente com as amostras para assegurar a precisão dos resultados na coloração. Os controles negativos foram obtidos com a omissão do anticorpo primário.

Anticorpo	Clone	Marca	Diluição	Controle positivo
MMP 1	3B6	Novocastra	1:50	Mama
MMP2	8B4	Novocastra	1:50	Mama
MMP9	15W2	Novocastra	1:200	Cérebro e amídala
TIMP 1	6F6a	Novocastra	1:100	Mama
TIMP 2	3A4	Novocastra	1:50	Mama
VEGF	A20	Santa Cruz	1:50	Mama

Tabela 2: Relação dos anticorpos utilizados

As lâminas foram analisadas em microscópio de luz convencional, examinando todos os campos em pequeno aumento (4x) e grande aumento (20x) que continham tumor, sendo consideradas células positivas as lâminas com citoplasma corado de marrom escuro após as reações. As imunoexpressões das MMPs e TIMPs foram consideradas positivas quando 20% ou mais das células observadas em um campo de grande aumento apresentavam marcação citoplasmática [129]. A imunoexpressão para o VEGF foi considerada positiva quando mais de 1% das células neoplásicas eram marcadas [70].

4.9. Análises estatísticas

4.9.1. Diferenças entre as distribuições de concentrações de elementos-traço

Uma vez que a aplicação de testes paramétricos exige que os valores da variável estudada apresentem distribuição normal [110], o primeiro passo da análise estatística foi aplicar o teste Kolmogorov-Smirnov de aderência à curva normal. O resultado deste teste mostrou uma característica assimétrica das distribuições e, portanto, testes não paramétricos foram aplicados aos dados.

Para avaliar as diferenças entre as distribuições dos elementos-traço em tecidos normais, normais periféricos e neoplásicos foram utilizados o teste de Wilcoxon (no caso de amostras pareadas) e o teste de Mann-Whitney (no caso das amostras não pareadas). Para estes testes, que comparam as tendências centrais de duas amostras, foi escolhido o nível de significância de $\alpha = 0,05$, de forma que valores de p < 0,05 indicavam que os dois grupos possuíam diferenças estatisticamente significantes com relação ao parâmetro analisado [110].

4.9.2. Comparação entre as técnicas de EDXRF e TXRF

Alguns trabalhos que comparam diretamente os resultados de técnicas de EDXRF e TXRF consideram que os valores obtidos nas análises são equivalentes, com o mesmo padrão de aumento das concentrações em tecidos tumorais, apesar de nem sempre os resultados coincidirem e não realizarem nenhuma análise estatística para avaliar as diferenças entre os resultados [17, 81]. Portanto, para verificar se os resultados obtidos pelas duas técnicas eram iguais foi realizado o teste de Wilcoxon para comparar as tendências centrais das distribuições das concentrações de um mesmo elemento.

Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o software SPSS[®] 13.0.

4.9.3. Análise de Discriminante

Com o objetivo de avaliar a capacidade das distribuições de concentrações de elementos-traço em classificar diferentes tipos de tecidos, construindo um modelo preditivo baseado nas características observadas, foi aplicada a análise multivariada de função discriminante nos resultados [110].

Uma vez que as concentrações dos elementos-traço apresentavam distribuições assimétricas, todos os valores foram transformados para $x' = \log x$ (onde x representa a concentração do elemento-traço). Também foram realizados testes de normalidade, homocedasticidade e linearidade com as variáveis, para assegurar a eficácia da aplicação da análise de discriminante.

As funções discriminantes foram calculadas através do método direto, no qual foram utilizadas todas as variáveis do conjunto de dados, independentemente da capacidade discriminatória de cada uma na separação dos grupos. O critério de classificação das amostras em cada grupo foi baseada na distância de Mahalanobis, que determina o valor máximo de separação entre duas populações [111].

As análises foram realizadas considerando as diferenças entre dois tipos de tecidos de cada vez. Para isso, foi gerada uma função discriminante linear com base em combinações das variáveis originais, que pertencia a cada dois tipos distintos de tecidos, ou seja, entre tecidos normais e TNP (grupo 1), normais e neoplasias malignas (grupo 2), entre neoplasias malignas e TNP (grupo 3), entre normais e neoplasias benignas (grupo 4), e entre neoplasias benignas e malignas (grupo 5).

Para testar a eficiência do método em classificar corretamente novas amostras, foi adotado o procedimento de validação cruzada, no qual cada caso em análise é classificado pelas funções derivadas de todos os casos, exceto o caso em teste [130]. A taxa de erros de classificação de cada grupo é a proporção de casos não classificados no grupo.

4.9.4. Curvas ROC

Com o objetivo de definir um ponto de corte na concentração de cada elemento-traço, acima ou abaixo do qual um resultado diagnóstico pudesse ser estabelecido em relação a cada tipo de tecido, foram utilizadas as curvas ROC. O ponto de corte para os valores de concentração dos elementos-traço escolhido correspondia ao ponto no qual os valores de sensibilidade e especificidade eram simultaneamente maiores [113, 131]. A acurácia do teste foi considerada excelente quando o valor da área sob a curva foi igual ou maior que 0,8 [113, 122]. O padrão ouro baseou-se no resultado do diagnóstico histológico das lâminas, realizados por patologistas do SERPAT/HC-FMRP.

4.9.5. Correlação entre as expressões dos elementos-traço e fatores prognósticos

Para avaliar o papel dos elementos-traço como fatores prognósticos, as concentrações de cada elemento-traço foram transformadas em uma variável dicotômica a partir do valor de *cut-off*, indicando se a expressão (acúmulo) era positiva (1, valores maiores ao valor de corte) ou negativa (0, valores menores ao valor de corte). Essa variável dicotômica foi correlacionada com os dados clinicopatológicos através do teste exato de Fisher (para 2 variáveis) e do teste de qui-quadrado (para 3 ou mais variáveis).

Os fatores prognósticos avaliados foram: idade, estado menstrual, tamanho do tumor, grau histológico, estadiamento, acometimento linfonodal, receptores de estrógeno e progesterona, p53, Her-2, MMP1, MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2 e VEGF. As categorizações de cada fator prognóstico foram baseadas em trabalhos anteriormente descritos na literatura [69, 132].

4.9.6. Curvas de sobrevida

As curvas de sobrevida, estimadas pelo método de Kaplan-Meier foram utilizadas para estudar o efeito isolado das variáveis sobre o prognóstico e para descrever as proporções acumuladas de óbitos (sobrevida global), conforme o tempo de acompanhamento das pacientes [133].

Estas curvas foram construídas considerando a expressão dos elementos-traço como variáveis independentes e a sobrevida global como variável dependente. A data de início de seguimento foi considerada na ocasião do diagnóstico e o evento ou falha, a ocorrência do óbito. Neste trabalho, todos os casos de óbito foram decorrentes da presença da neoplasia mamária. Os casos que não obtiveram *follow-up* até o óbito foram censurados de acordo com o método de Kaplan-Meier [134]. Os resultados foram posteriormente comparados através do teste de log rank, de forma a verificar diferenças significativamente estatísticas entre as curvas obtidas. A significância estatística foi baseada em intervalos de confiança de 95%.

4.9.7. Correlações entre as distribuições de concentrações de elementos-traço

Para verificar a existência de correlações lineares inversas ou diretas entre as concentrações de elementos-traço em tecidos normais periféricos, normais e neoplásicos, o teste não paramétrico de Spearman foi realizado entre pares de elementos [110].

Para avaliar ainda as possíveis correlações entre os elementos-traço nas imagens obtidas por µ-XRF, os mapas dos elementos individuais foram combinados fornecendo mapas de correlação, sendo que quando dois elementos estavam presentes em um mesmo pixel da imagem, a cor do pixel resultante era a soma das cores primárias. Neste trabalho, as cores primárias utilizadas foram o vermelho e o verde, de forma que as regiões de maior intensidade amarela no pixel indicavam correlação entre os elementos-traço sob investigação [43]. Para avaliar a significância estatística das correlações entre as imagens, foi realizado o teste não paramétrico de Spearman.

5. Resultados e Discussão

5.1. Casuística

Os dados obtidos a partir dos prontuários das pacientes são apresentados na tabela 3. De um total de 84 prontuários avaliados, 33,7% das pacientes apresentavam tecido mamário normal, 50,5% foram diagnosticadas com tumores malignos e 15,7% com tumores benignos. Todas as pacientes eram mulheres, com idades entre 17 e 88 anos (média de 50 anos). O tamanho médio dos tumores foi de 3,6 cm (variação entre 0,5 e 15 cm).

Tabela 3: Dados clinicopatologicos das pacientes Taridas Narmais Narmasias Malianas							
	rectuos inormais	0/	neopiasias Mali	gnas	n° de projector n°		
	n° de pacientes	%	n' de pacientes	%	nº de pacientes	%	
Idade (anos)	4	10	0	0	-	26	
≤ 30	4	13	0	0	5	36	
30 - 50	20	67	17	38	5	36	
50 - 70	5	17	15	33	4	29	
≥ 70	1	3	13	29	0	0	
Estado Menstrual							
Pré menopausa	24	80	17	38	8	57	
Pós menopausa	6	20	28	62	6	43	
Tamanho do tumor (cm)							
< 2	-	-	6	14	2	14	
2 - 5	-	-	26	62	11	79	
> 5	-	-	10	24	1	7	
Craduccão Histológico [52]							
Graduação Histologica [52]			7	10			
GI	-	-	/	19	-	-	
G 2	-	-	19	53	-	-	
G 3	-	-	10	28	-	-	
Estadiamento Patológico							
Ι	-	-	0	0	-	-	
II	-	-	16	57	-	-	
III	-	-	11	39	-	-	
IV	-	-	1	4	-	-	
Condição linfonodal							
Negativo	-	-	19	45	-	-	
1-3	_	-	7	17	_	-	
≥ 3	-	-	16	38	-	-	
Óbito							
Sim	0	0	11	24	0	0	
Não	30	100	34	2 4 76	14	100	
Pacantor da astrógono							
Neceptor de estrogeno	0	0	10	15	2	100	
negativo	0	0	18	43	2	100	

Tabala 2. Dad tológi л • - - 4

Positivo	3	100	22	55	0	0
Receptor de Progesterona						
Negativo	2	100	18	45	2	100
Positivo	0	0	22	55	0	0
HER2						
0	2	100	15	38	1	100
1+	0	0	6	15	0	0
2+	0	0	10	26	0	0
3+	0	0	8	21	0	0

5.2. Espectros, sensibilidade, limites de detecção e acurácia das técnicas de EDXRF e TXRF

A Figura 10.a apresenta dois espectros sobrepostos para um mesmo tecido (neoplasia maligna), obtidos por EDXRF e TXRF. Pode-se observar no espectro de EDXRF a presença de vários elementos-traço, como Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn e Br. As setas em azul sem indicação de elementos correspondem às linhas L de emissão do alvo de tungstênio do tubo de raios X. No espectro de TXRF observa-se a presença de P, S, Ca, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu e Zn. Embora a presença de vários elementos-traço seja observada nos espectros, os valores de concentração obtidos para alguns elementos como P, S, Ti, V, Cr, Mn, Ni e Br, na maioria das amostras, estavam abaixo ou muito próximos dos limites de detecção e por este motivo foram excluídos da análise. Desta forma, apenas os elementos Ca, Fe, Cu e Zn presentes em todas as amostras foram avaliados neste trabalho.

Pode-se notar na figura 10.a que as intensidades dos picos fluorescentes são distintas devido à diferença de sensibilidade entre ambas as técnicas (figura 10.b), observando-se que a técnica de TXRF é mais sensível para elementos mais leves (de menor número atômico), enquanto a EDXRF é mais vantajosa para elementos mais pesados, como Cu e Zn. As regiões de menor *background* no espectro de EDXRF é justificada pelo uso de monocromador e um pequeno ângulo sólido no detector [17].

Observa-se ainda que o espectro de TXRF apresenta regiões de menor *background* pois, devido ao fenômeno da reflexão total, quase 100% dos fótons incidentes são refletidos, de forma que a radiação primária penetra muito pouco no material e consequentemente a intensidade da radiação espalhada é menor. Além disso, a intensidade fluorescente detectada é maior, pois a amostra é excitada com a radiação incidente e a refletida [17].



Figura 10: (a) Espectros típicos de tecidos mamários neoplásicos obtidos através de EDXRF e TXRF. (b) Valores de sensibilidade normalizada e (c) limites de detecção em função do número atômico (Zi) para ambas as técnicas

(c)

(b)

Os limites de detecção das duas técnicas mostram que, para a técnica de EDXRF, estes valores variam entre 0,2 mg/kg para elementos de maior numero atômico e 3,5 mg/kg para elementos mais leves, enquanto para a técnica de TXRF, os valores variam entre 0,02 mg/kg para elementos de maior numero atômico e 0,5 mg/kg para elementos mais leves (figura 10.c).

A tabela 4 apresenta os valores certificados e obtidos experimentalmente para as concentrações dos elementos-traço presentes nos padrões analisados para a validação dos métodos. Pode-se observar que as diferenças entre estes valores foram menores que 7% para todos os padrões analisados, validando os métodos de quantificação para as análises por EDXRF e TXRF.

EDXRF								
Flementos	Concentração Certificada	Concentração Obtida	Diferenças					
Liementos	(mg/kg)	(mg/kg)	(%)					
Ca (Padrão A153)	12870,0	12270,2 $(\pm 451,5)^{a}$	-4,7					
Zn (Padrão A153)	39,6	$41,9 (\pm 1,8)^{a}$	6,1					
Fe (Padrões Merck®)	1000,0	952,1 $(\pm 1,4)^{a}$	-4,8					
Cu (Padrões Merck®)	1000,0	$1026,6 (\pm 2,2)^{a}$	2,7					
Zn (Padrões Merck®)	1000,0	979,3 $(\pm 25,2)^{a}$	-2,1					
Ca (Padrão secundário)	1012,4	973,5 $(\pm 151,7)^{a}$	-3,8					
Fe (Padrão secundário)	32,8	$30,5 (\pm 7,9)^{a}$	-6,8					
Cu (Padrão secundário)	20,1	21,3 $(\pm 1,7)^{a}$	5,8					
Zn (Padrão secundário)	116,6	$110,1 (\pm 2,2)^{a}$	-5,6					
	TXRF							
Ca (Padrão secundário)	500,0	$525 (\pm 40)^{a}$	4,7					
Fe (Padrão secundário)	40,0	$42 (\pm 3)^{a}$	5,0					
Cu (Padrão secundário)	3,0	$3,1 (\pm 0,2)^{a}$	3,3					
Zn (Padrão secundário) 20,0		20,4 $(\pm 1,5)^{a}$	2,0					

Tabela 4: Resultados obtidos para a validação das análises de EDXRF e TXRF

^a (\pm desvio padrão, n=3).

5.3. Concentração dos elementos-traço em tecidos mamários

5.3.1. Distribuições de concentrações

A figura 11 mostra as distribuições das concentrações dos elementos-traço em diferentes tecidos, obtidas a partir das técnicas de EDXRF e TXRF. Estas distribuições são apresentadas no formato de *boxplot*, que apresenta os dados através de seus parâmetros descritivos como o *range* (amplitude), mediana, quartil inferior e quartil superior. É possível observar que a maioria das distribuições dos elementos-traço são positivas e largas, uma característica comum em parâmetros biológicos [135]. Essas grandes variações de concentrações podem ser justificadas por vários fatores, tais como as diferenças na alimentação, idade, genética e especialmente as alterações histopatológicas devido aos diferentes tipos de tecido e estágios da doença, como observado na tabela 3.





Figura 11: Distribuições das concentrações dos elementos Ca, Fe, Cu e Zn em diferentes tecidos mamários, obtidas através das técnicas de EDXRF e TXRF.

A partir da figura 11 é possível ainda observar que tecidos neoplásicos (malignos e benignos) indicam concentrações elevadas de elementos-traço, quando comparadas a tecidos normais. Para todos os elementos, com exceção do Fe, as concentrações em tumores benignos são maiores que em tumores malignos. Embora as distribuições de concentrações mostrem uma tendência de elevação dos elementos em tecidos neoplásicos é fundamental verificar se estas alterações apresentam diferenças significativas.

Os resultados dos testes de Wilcoxon (amostras pareadas) e o teste de Mann-Whitney (amostras não pareadas) apresentados na tabela 5 indicam que, com exceção do ferro e do cobre, todos os elementos estudados possuem uma distribuição de concentração com diferenças significativas quando comparados tecidos normais e neoplásicos (malignos ou benignos), indicando que os elementos-traço podem ser úteis na identificação da presença de neoplasias.

As diferenças significativas nas distribuições de Ca, Cu e Zn entre tecidos neoplásicos malignos e benignos indicam ainda que estes elementos possam ser úteis na diferenciação entre os tipos de neoplasias. Observa-se ainda na tabela 5, que o cálcio e o zinco são os elementos cujas distribuições de concentrações mais se diferenciam dependendo do tipo de tecido.

M	lann-Whitney U				
		Ca	Fe	Cu	Zn
Normaia a Malianas (não normados)	EDXRF	S	S	S	S
Normais e Mangnos (não pareados)	TXRF	S	NS	NS	S
Malianaa a Danianaa	EDXRF	S	NS	S	S
Mangnos e Benignos	TXRF	NS	NS	S	NS
NI	EDXRF	S	NS	NS	S
Normais e Normais perifericos	TXRF	NS	S	NS	S
Normaia a Danianas	EDXRF	S	NS	S	S
Normais e Benignos	TXRF	S	NS	S	S
Те	este de Wilcoxon				
		Ca	Fe	Cu	Zn
Normaia parifáriana a malianas (normadas)	EDXRF	S	S	S	S
Normais perifericos e mangnos (pareados)	TXRF	NS	S	S	NS

Tabela 5: Resultados dos testes de Mann-Whitney e Wilcoxon. (S): diferenças significativas e (NS): diferenças não significativas.

5.3.2. Magnitude de elevação das concentrações e comparação com a literatura.

Com o objetivo de quantificar a magnitude dessas elevações (ou diminuições), as razões entre as medianas das concentrações dos elementos-traço em diferentes tecidos são apresentadas na tabela 6, juntamente com os resultados obtidos para esses valores em outros estudos. A razão entre as medianas foi escolhida por dois motivos: primeiramente pelo fato de que os dados apresentam distribuição assimétrica e segundo, pelo fato de que quando são comparadas as razões entre medianas, os fatores étnicos que podem influenciar nos valores absolutos, são reduzidos [136, 137].

Elemento	Referência	Técnica	Maligno / Normal	Maligno / TNP	Benigno / Normal	Maligno / Benigno
	Este trabalho	EDXRF	3,9	3,1	11,6	0,4
	Este trabalho	TXRF	1,5	1,1	2,3	0,6
	Drake and SkyPeck (1989)	EDXRF	-	2,4	-	-
Ca	Ng et al. (1997)	INAA	-	6,4	-	-
	Majewska et al. (1997)	TXRF	-	-	-	2,9
	Raju et al. (2006)	PIXE	-	3,0	-	-
	Siddiqui et al. (2006)	AAS	2,3	4,3	1,7	1,3
	Magalhães et al. (2006)	EDXRF	-	1,6	-	-
	Magalhães et al. (2006)	TXRF	-	8,3	-	-
	Kubala-Kukus et al. (2007)	TXRF	-	-	-	1,9
	Silva et al. (2009)	EDXRF	-	2,1	-	-
	Este trabalho	EDXRF	1,7	2,0	1,1	1,5
	Este trabalho	TXRF	1,3	2,4	1,1	1,1
	Drake and SkyPeck (1989)	EDXRF	-	1,1	-	-
	Ng et al. (1997)	INAA	-	2,9	-	-
	Geraki et al. (2002)	EDXRF	3,3	2,2	-	-
Fe	Geraki et al.(2004)	EDXRF	6,07	2	-	-
	Raju et al. (2006)	PIXE	-	1,3	-	-
	Siddiqui et al. (2006)	AAS	0,9	0,7	1,6	0,6
	Magalhães et al. (2006)	EDXRF		4,6		
	Magalhães et al. (2006)	TXRF		19,6		
	Majewska et al. (1997/2007)	TXRF	-	-	-	1,7
	Kubala-Kukus et al. (2007)	TXRF	-	-	-	1,8
	Ebrahim et al.(2006)	INAA	-	1,6	-	-
	Silva <i>et al.</i> (2009)	EDXRF	-	3,2	-	-
	Este trabalho	EDXRF	1,5	1,7	3,5	0,4
	Este trabalho	TXRF	1,3	1,8	2,1	0,6
	Drake and SkyPeck (1989)	EDXRF	-	2,2	-	-
	Geraki et al. (2002)	EDXRF	4,2	3,0	-	-
Cu	Geraki et al.(2004)	EDXRF	4,5	3,2	-	-
	Raju et al. (2006)	PIXE	-	1,4	-	-
	Siddiqui et al. (2006)	AAS	1,5	1,7	2,1	0,7
	Magalhães et al. (2006)	EDXRF		0,8		
	Magalhães et al. (2006)	TXRF		7		
	Majewska et al. (1997/2007)	TXRF	-	-	-	0,8
	Kubala-Kukus et al. (2007)	TXRF	-	-	-	0,8

Tabela 6: Razão entre as medianas das concentrações dos elementos-traço em diferentes tipos de tecidos.

	Millos et al. (2008)	ICP	1,5	1,4	-	-
	Silva et al. (2009)	EDXRF	_	3,0	-	-
		EDVDE	1.2	2.4		0.4
	Este trabalho	EDXRF	4,2	2,4	9,8	0,4
	Este trabalho	TXRF	2,6	1,7	3,5	0,7
	Drake and SkyPeck (1989)	EDXRF	-	2,7	-	-
	Ng et al. (1997)	INAA	-	4,1	-	-
	Geraki et al. (2002)	EDXRF	5,1	2,3	-	-
Zn	Geraki et al.(2004)	EDXRF	4,9	4,2	-	-
	Raju et al. (2006)	PIXE	-	2,2	-	-
	Siddiqui et al. (2006)	AAS	1,1	1,8	1,1	0,9
	Majewska et al. (1997/2007)	TXRF	-	-	-	1,2
	Kubala-Kukus et al. (2007)	TXRF	-	-	-	1,1
	Ebrahim et al. (2006)	INAA	-	1,4	-	-
	Magalhães et al. (2006)	EDXRF		2,1		
	Magalhães et al. (2006)	TXRF		6,5		
	Millos et al. (2008)	ICP	4,3	4,4	-	-
	Silva et al. (2009)	EDXRF	-	3,8	-	-

A tabela 6 mostra que na grande maioria dos trabalhos, todos os elementos foram observados em concentrações mais elevadas em tecidos neoplásicos (tanto malignos quanto benignos), quando comparados a tecidos normais e normais adjacentes. Além disso, as razões entre neoplasias malignas e benignas são menores que 1 para todos os elementos, exceto para o ferro, que apresenta razão próximo a 1. Observa-se ainda na tabela 6 que para um mesmo elemento, apesar de possuírem um mesmo comportamento (elevação ou diminuição), notam-se pequenas diferenças nas razões quando comparados os resultados entre as técnicas de EDXRF e TXRF. Estas diferenças serão discutidas na seção 5.3.3.

Os resultados obtidos das razões entre <u>tecidos malignos e normais (amostras</u> <u>independentes)</u> e entre <u>malignos e tecidos normais periféricos (amostras pareadas)</u>, como mostrado na tabela 6, estão de acordo com a maioria dos estudos e podem estar relacionados ao fato de tecidos malignos necessitarem de maiores quantidades de elementos-traço devido a sua rápida divisão celular e ao seu metabolismo mais ativo e complexo [39].

As razões entre as concentrações dos elementos em <u>tecidos normais adjacentes e</u> <u>normais saudáveis</u> são maiores que 1 para todos os elementos, com exceção ao Fe. Essas diferenças podem estar associadas ao desenvolvimento do câncer de mama, uma vez que muitos tumores invasivos podem se desenvolver a partir de células epiteliais morfologicamente normais, pois algumas modificações genéticas encontradas em tumores também são encontradas no epitélio normal adjacente [138, 139]. Outra hipótese é que tecidos adjacentes normais a tecidos malignos possam estar induzindo a angiogênese, uma vez que esta ocorre antes de mudanças morfológicas identificáveis [138, 140].

A determinação de concentrações de elementos-traço em neoplasias benignas é pouco encontrada na literatura [20, 23, 75]. As razões das concentrações entre <u>neoplasias benignas e</u> <u>tecidos normais</u> pode ser feita apenas através do trabalho de Siddiqui *et al* [23]. Neste trabalho, as razões são maiores que 1 para todos os elementos, o que concorda com os resultados deste trabalho. Com relação às razões entre <u>neoplasias malignas e neoplasias benignas</u>, Majewska *et al* [20, 75] e Kubala-Kukus *et al* [40] encontraram para todos os elementos, exceto para Cu, altas concentrações em tecidos malignos quando comparados com benignos. No presente trabalho, estas razões concordam com Majewska *et al* [20, 75] e Kubala-Kukus *et al* [40] apenas para os elementos Fe e Cu. O oposto é observado para Ca e Zn, uma vez que estes elementos estão em concentrações mais elevadas em tecidos benignos quando comparados com malignos. As razões dessas alterações serão melhor discutidas na seção 5.6.

5.3.3. Comparação entre os resultados das técnicas de EDXRF e TXRF

Com relação à preparação das amostras, a análise por EDXRF é mais simples e rápida, uma vez que as amostras não necessitam ser digeridas, como no caso da TXRF. Além disso, a quantidade de material necessário para medidas de EDXRF é menor, comparada com a quantidade necessária para digestão, o que pode ser vantajoso, principalmente em situações em que grandes quantidades de amostra não são possíveis de serem obtidas. De todas as amostras analisadas, 47 foram avaliadas por ambas as técnicas, dentre elas 12 tecidos normais, 19 tumores malignos, 12 tecidos normais periféricos e 4 tumores benignos. Os resultados do teste de Wilcoxon são apresentados na tabela 7.

diferentes				
Elemento	Tecidos normais	TNP	Malignos	Benignos
Ca	0,005*	0,136	0,002*	0,068
Fe	0,034*	0,099	0,334	0,068
Cu	0,010*	0,530	0,091	0,715
Zn	0,099	0,010*	0,658	0,715

Tabela 7: Resultados do teste de Wilcoxon. *p < 0,05 indica que os 2 grupos são significativamente

Embora alguns elementos não apresentem diferença estatística nas concentrações obtidas por EDXRF e TXRF, pode-se observar na tabela 7 que as tendências centrais das distribuições de um elemento-traço podem ser estatisticamente diferentes de acordo com a técnica utilizada, principalmente na análise dos elementos-traço em tecidos normais, apesar das correções dos efeitos de matriz na análise dos espectros e das amostras analisadas terem sido as mesmas. Pode-se atribuir estas diferenças à não homogeneidade das amostras [81], bem como ao seu processo de preparação, uma vez que na técnica de EDXRF os tecidos são avaliados sem pré processamento e na técnica de TXRF as amostras são submetidas a um processo de digestão. As maiores diferenças, que podem ser observadas na figura 11, são para o elemento cálcio. A razão da diferença deste elemento pode estar relacionada à presença de microcalcificações no tecido, que podem aumentar significativamente os níveis observados deste elemento na análise por EDXRF. Já com o procedimento de digestão, estas microcalcificações são homogeneizadas, o que pode ter sido a razão da diminuição dos níveis deste elemento na análise por TXRF.

É importante abordar que devido às diferenças obtidas nas tendências centrais das distribuições de concentrações de alguns elementos-traço obtidas por EDXRF e TXRF, no

caso de se utilizar a técnica de fluorescência de raios X para uma eventual aplicação clínica, é necessário que sejam estabelecidos alguns padrões como: a) o procedimento de preparação das amostras; b) procedimento experimental e técnica de medida (EDXRF ou TXRF); c) metodologia da análise e determinação das concentrações. Uma vez estabelecidos estes fatores, a comparação entre os resultados obtidos por diferentes autores, bem como a utilização destes elementos para o diagnóstico do câncer de mama poderão ser amplamente discutidos e validados.

Com base nesta discussão, as demais análises dos dados serão levadas a termo somente com as concentrações dos elementos-traço obtidas através da técnica de EDXRF. A mesma análise com os dados obtidos por TXRF encontra-se discutida em Silva 2009 [25].

5.4. Elementos-traço como marcadores tumorais

5.4.1. Modelo preditivo – Análise de discriminante

A tabela 8 resume o grau de sucesso da classificação de cada grupo, onde o número de casos classificados e não classificados corretamente é exibido. Para cada grupo são apresentados dois resultados da classificação das amostras: o original e o de validação cruzada. Na versão original, cada amostra é classificada segundo uma função obtida com todos os casos. Com a validação cruzada, foi possível verificar a eficiência deste modelo para a classificação de novas amostras, uma vez que cada caso em análise é classificado pelas funções derivadas de todos os casos, exceto o caso em teste. A taxa de classificação incorreta de cada grupo é a proporção de casos não classificados no grupo.

Casos corretamente	Cuuno	Grupo Classificação		Total
classificados	Grupo	Classi	licaçao	Totai
	Grupo 1	Normal	TNP	
Original	Normal	33	11	44
71,2%	TNP	10	19	29
Cruzada	Normal	32	12	44
67,1%	TNP	12	17	29
	Grupo 2	Normal	Malignos	
Original	Normal	39	5	44
85,9%	Malignos	7	34	41
Cruzada	Normal	39	5	44
84,7%	Malignos	8	33	41
	Grupo 3	Malignos	TNP	
Original	Malignos	24	5	29
91,4%	TNP	0	29	29
Cruzada	Malignos	23	6	29
84,5%	TNP	3	26	29
	Grupo 4	Normal	Benignos	
Original	Normal	43	ĩ	44
98,1%	Benignos	0	9	9
Cruzada	Normal	43	1	44
96,2%	Benignos	1	8	9
	Grupo 5	Malignos	Benignos	
Original	Malignos	37	4	41
86,0%	Benignos	3	6	9
Cruzada	Malignos	36	5	41
80,0%	Benignos	5	4	9

Tabela 8: Resultados da classificação por análise de discriminante

A tabela 8 mostra que os melhores resultados de classificação foram obtidos na diferenciação entre tecidos normais e benignos (grupo 4). De forma geral, os resultados obtidos podem se considerados satisfatórios, uma vez que apenas quatro elementos foram utilizados para a obtenção das funções discriminantes. Desta forma, espera-se que a inclusão de mais elementos e uma casuística maior resultem em uma melhora gradual na acurácia da classificação [135]. De forma geral, os resultados da análise de discriminante mostraram que as concentrações dos elementos-traço podem ser utilizadas na classificação de diferentes tipos de tecidos.

5.4.2. Modelo preditivo – Curvas ROC

Com o objetivo de se obter um ponto de corte que transforme a distribuição dos elementos-traço em uma variável dicotômica, de forma que uma amostra com concentração igual ou maior que o ponto de corte é classificada como neoplásica e uma amostra com concentração menor que o ponto de corte é classificada como normal, as distribuições dos elementos-traço foram analisadas através do conceito de curvas ROC. A figura 12 ilustra as curvas ROC obtidas para todos os elementos em estudo neste trabalho, comparando diferentes tipos de tecidos. Os valores 0 e 1 utilizados na construção das curvas representam o tecido normal e o tecido neoplásico, respectivamente.

As áreas sob as curvas da figura 12 representam a probabilidade de que o teste classifique uma ocorrência escolhida aleatoriamente positiva, como sendo superior a uma escolhida aleatoriamente negativa. A significância assintótica (que representa o intervalo de confiança para a determinação da área baseado em uma distribuição não paramétrica) foi menor que 0,05 para a maioria dos elementos (todos os valores de p são descritos na tabela 9).





Figura 12: Curvas ROC obtidas para cada elemento em diferentes tipos de tecidos.

Apesar das áreas sob as curvas ROC forneceram uma medida de exatidão do teste, as coordenadas de sensibilidade e especificidade também são importantes uma vez que provêem informações para auxiliar na determinação do ponto de corte para determinar os resultados do ensaio. Como descrito na seção 4.9.4, o ponto de corte escolhido para os valores de concentração dos elementos-traço correspondia ao ponto no qual os valores de sensibilidade e especificidade eram simultaneamente maiores [113, 131]. A tabela 9 descreve os valores de

sensibilidade e especificidade, associados ao ponto de corte escolhido, assim como os valores

das áreas sob as curvas e a significância assintótica na determinação das áreas.

	Curva a: Tecidos normais (0) e malignos (1)								
Elemento	<i>Cut-off</i> (mg/kg)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Área sob a curva	р				
Ca	212,6	70,7	86,4	0,838	0,000				
Fe	12,6	78,0	63,6	0,743	0,000				
Cu	0,8	53,7	81,8	0,707	0,001				
Zn	3,4	75,6	86,4	0,874	0,000				
		Curva b: Normais perifé	éricos (0) e malignos (1)						
Ca	580,9	55,2	93,1	0,757	0,001				
Fe	19,3	69,0	93,1	0,837	0,000				
Cu	1,0	55,2	82,8	0,740	0,002				
Zn	4,0	72,4	82,8	0,824	0,000				
	Curva c: Tecid	los malignos (0) e benig	nos (1) / * malignos (1) e	benignos (0)					
Ca	794,6	77,8	80,5	0,816	0,003				
Fe *	20,7	48,7	88,8	0,675	0,103				
Cu	0,9	100,0	56,1	0,808	0,004				
Zn	4,4	100,0	46,3	0,759	0,016				
		Curva d: Tecidos norm	nais (0) e benignos (1)						
Ca	288,8	100,0	93,2	0,992	0,000				
Fe	12,8	66,7	63,6	0,616	0,276				
Cu	0,9	100,0	86,3	0,947	0,000				
Zn	4,4	100,0	93,1	0,985	0,000				
	Cur	va e: Tecidos normais (0) e normais periféricos (1)					
Ca	129,3	79,3	68,2	0,737	0,001				
Fe	6,7	86,2	27,3	0,487	0,857				
Cu	0,9	34,5	84,1	0,549	0,485				
Zn	1,1	93,1	54,5	0,712	0,002				

Tabela 9: Parâmetros das curvas ROC obtidas para os elementos-traço presentes em diferentes tecidos. Os valores 0 e 1 representam o tecido normal e o tecido com presença de neoplasia, respectivamente.

Através da tabela 9 observa-se que para cada teste, apenas alguns elementos apresentaram área sob a curva ROC maior que 0,8: Curva a: Ca e Zn; Curva b: Fe e Zn; Curva c: Ca e Cu; Curva d: Ca, Cu e Zn; Curva e: nenhum elemento foi considerado excelente para diferenciar os grupos. Com base nesses resultados, a partir do ponto de corte para cada um destes elementos, cada amostra foi assinada com o valor de 0 (negativo para o elemento-traço) ou 1 (positivo para o elemento-traço), transformando então a distribuição de concentrações dos elementos-traço através desta variável dicotômica.

A figura 13 apresenta as distribuições de concentrações dos elementos-traço nos diferentes tecidos estudados, onde se pode observar claramente o potencial destes elementos como marcadores tumorais. Observa-se nesta figura 13.a uma linha horizontal contínua, que

representa o ponto de corte de 212,6 mg/kg, que separa os tecidos normais dos outros tipos de tecidos, seja ele neoplásico ou normal adjacente à uma neoplasia maligna. Ainda na figura 13.a a linha horizontal pontilhada representa o ponto de corte de 794,6 mg/kg, que permite diferenciar neoplasias malignas de benignas. As figuras 13.b, 13.c e 13.d ilustram as distribuições de concentrações e seus respectivos pontos de corte para os demais elementos.



Figura 13: Distribuições das concentrações dos elementos-traço com as linhas pontilhadas representando os valores de ponto de corte. (a) Distribuições de cálcio em diferentes tipos de tecidos, onde linha horizontal contínua representa um ponto de corte de 212,6 mg/kg e a linha horizontal pontilhada representa um ponto de corte de 794,6 mg/kg; Distribuições dos elementos Fe, Cu e Zn em (b) tecidos normais adjacentes e malignos (amostras pareadas); (c) normais e malignos; (d) normais e benignos.

Os resultados obtidos a partir da análise de discriminante e da análise da curva ROC demonstraram que os elementos-traço podem ser considerados marcadores tumorais uma vez que: a) suas distribuições de concentrações podem ser utilizadas para classificação de
diferentes tipos de tecido; b) com um valor de ponto de corte é possível transformar as concentrações em uma variável dicotômica e classificar os tecidos como normais ou neoplásicos, incluindo diferentes tipos de neoplasias.

A presença de elementos-traço em concentrações elevadas em determinados tecidos pode além de refletir uma pior evolução da neoplasia, indicar que esta pertença a um grupo agressivo ou não, dependendo da sua concentração. Isso leva a testar a hipótese de que os elementos-traço possam ser considerados além de marcadores tumorais, também fatores prognósticos para o câncer da mama.

5.5. Elementos-traço como fator prognóstico

5.5.1. Correlação da expressão dos elementos-traço com fatores prognósticos

O valor assinado a cada variável (negativa,0; positiva,1), permitiu avaliar a expressão dos elementos-traço, e correlacioná-las com os dados clinicopatológicos através do teste exato de Fisher (para 2 variáveis) e do teste de qui-quadrado (para 3 ou mais variáveis). Os resultados obtidos são apresentados na tabela 10. São também apresentados nesta tabela os resultados obtidos através da análise imunohistoquímica com os marcadores de metaloproteinases de matriz (MMP1, MMP2 e MMP9), os inibidores de MMPs (TIMP1 e TIMP2) e o fator de crescimento vascular (VEGF).

Observa-se na tabela 10 que as expressões de todos os elementos-traço estão correlacionadas com o tipo de tecido. Estes resultados enfatizam a possibilidade destes elementos serem utilizados como marcadores tumorais. Observa-se ainda que a correlação entre os fatores prognósticos e a expressão dos elementos-traço foi significativamente estatística quando avaliados os fatores idade, estado menstrual e expressão imunohistoquímica do TIMP2 (cobre).

59

Tabela 10: Relação entre a expressão dos elementos-traço (-) negativa ou (+) positiva com dados clínicos de importância prognóstica. Os valores de p < 0.05 estão destacados em negrito. Os valores entre parênteses representam a porcentagem da expressão dentro de cada parâmetro.

	Expressão de Cálcio		Expressão de Ferro		Expressão de Cobre		Expressão de Zinco	
	-	+	-	+	-	+	-	+
Tipo de Tecido								
Normal	33 (87)	5 (13)	22 (58)	16 (42)	29 (76)	9 (24)	31 (82)	7 (18)
Maligno	7 (21)	27 (79)	6 (18)	28 (82)	17 (50)	17 (50)	7 (21)	27 (79)
Benigno	0	10 (100)	3 (30)	7 (70)	0	10 (100)	0	10 (100)
Normal Adjacente	11 (44)	14 (56)	13 (52)	12 (48)	16 (64)	9 (36)	17 (68)	8 (32)
р	0,	000	0,	003	0,0	000	0,0	000
Idade (anos)								
< 30	0	6 (100)	4 (67)	2 (33)	0	6 (100)	0	6 (100)
30 - 50	17 (52)	16 (48)	11 (33)	22 (67)	22 (67)	11 (33)	17 (52)	16 (48)
50 - 70	3 (25)	9 (75)	2 (17)	10 (83)	6 (50)	6 (50)	4 (33)	8 (67)
> 70	1 (11)	8 (89)	0	9 (100)	4 (44)	5 (56)	0	9 (100)
р	0,019		0,028		0,023		0,007	
Status Menstrual	,		,		,		,	
Pré menopausa	17 (44)	22 (56)	17 (44)	22 (56)	26 (67)	13 (33)	17 (44)	22 (56)
Pós menopausa	4 (19)	17 (81)	0	21 (100)	6 (29)	15 (71)	4 (19)	17 (81)
р	0	,05	0,	000	0,	005	0,	05
Tamanho do tumor			,		,		,	
(cm)								
≤ 2	1 (20)	4 (80)	1 (20)	4 (80)	2 (40)	3 (60)	1 (20)	4 (80)
2 - 5	5 (18)	22 (82)	5 (18)	22 (82)	10 (37)	17 (63)	5 (18)	22 (82)
≤ 5	1 (12)	7 (88)	2 (25)	6 (75)	4 (50)	4 (50)	1 (12)	7 (88)
р	0,	914	0,	922	0,8	806	0,9	914
Grau Histológico [52]								
Gl	1 (17)	5 (83)	1 (17)	5 (83)	5 (83)	1 (17)	2 (33)	4 (67)
G 2	1 (8)	11 (92)	0	12 (100)	5 (42)	7 (58)	1 (8)	11 (92)
G 3	3 (38)	5 (62)	2 (25)	6 (75)	5 (62)	3 (38)	4 (50)	4 (50)
р	0,264		0,208		0,228		0,111	
Estadiamento								
patológico								
Ι	4 (40)	6 (60)	1 (10)	9 (90)	3 (30)	7 (70)	4 (40)	6 (60)
II	3 (33)	6 (67)	2 (22)	7 (78)	3 (33)	6 (67)	2 (22)	7 (78)
III	0	1 (100)	0	1 (100)	0	1 (100)	1 (100)	0
р	0,	719	0	,69	0,7	788	0,2	271
Status Linfonodal								
Negativo	2 (18)	9 (82)	2 (18)	9 (82)	8 (73)	3 (27)	2 (18)	9 (82)
1 - 3	0	4 (100)	0	4 (100)	2 (50)	2 (50)	0	4 (100)
≥ 3	5 (33)	10 (67)	3 (20)	12 (80)	6 (40)	9 (60)	5 (33)	10 (67)
р	0	,33	0,	626	0,2	253	0,	33
Receptor de estrógeno								
Negativo	3 (25)	9 (75)	2 (17)	10 (83)	6 (50)	6 (50)	2 (17)	10 (83)
Positivo	5 (24)	16 (76)	3 (14)	18 (86)	12 (57)	9 (43)	6 (29)	15 (71)
р	0,	627	0,	612	0,4	486	0,3	373
Receptor de								
progesterona								
Negativo	2 (15)	11 (85)	2 (15)	11 (85)	7 (54)	6 (46)	2 (15)	11 (85)
Positivo	6 (30)	14 (70)	3 (15)	17 (85)	11 (55)	9 (45)	6 (30)	14 (70)
р	0,	299	0,	669	0,0	514	0,2	299
p53								
Negativo	3 (19)	13 (81)	3 (19)	13 (81)	8 (50)	8 (50)	3 (19)	13 (81)
Positivo	5 (29)	12 (71)	2 (12)	15 (88)	10 (59)	7 (41)	5 (29)	12 (71)
р	0,	381	0	,47	0,4	437	0,3	381
HER2								
score 0	3 (25)	9 (75)	3 (25)	9 (75)	10 (83)	2 (17)	5 (42)	7 (58)
score 1+	2 (29)	5 (71)	0	7 (100)	3 (43)	4 (57)	1 (14)	6 (86)
score 2+	1 (13)	7 (87)	0	8 (100)	2 (25)	6 (75)	1 (13)	7 (87)
score 3+	2 (33)	4 (67)	2 (33)	4 (67)	3 (50)	3 (50)	1 (17)	5 (83)

р	0,814		0,163		0,064		0,369	
MMP1								
negativo	7 (35)	13 (65)	6 (30)	14 (70)	11 (55)	9 (45)	7 (35)	13 (65)
positivo	2 (29)	5 (71)	1 (14)	6 (86)	5 (71)	2 (29)	2 (29)	5 (71)
р	0,571		0,393		0,383		0,571	
MMP2								
negativo	6 (32)	13 (68)	7 (37)	12 (63)	13 (68)	6 (32)	7 (37)	12 (63)
positivo	2 (33)	4 (67)	0	6 (100)	2 (33)	4 (67)	1 (17)	5 (83)
р	0,651		0,105		0,147		0,349	
MMP9								
negativo	8 (36)	14 (64)	6 (27)	16 (73)	12 (55)	10 (45)	8 (36)	14 (64)
positivo	1 (25)	3 (75)	1 (25)	3 (75)	3 (75)	1 (25)	1 (25)	3 (75)
р	0,569		0,713		0,426		0,569	
TIMP1								
negativo	6 (35)	11 (65)	5 (29)	12 (71)	10 (59)	7 (41)	6 (35)	11 (65)
positivo	3 (37)	5 (63)	1 (13)	7 (87)	4 (50)	4 (50)	2 (25)	6 (75)
р	0,626		0,349		0,504		0,487	
TIMP2								
negativo	4 (31)	9 (69)	5 (38)	8 (62)	10 (77)	3 (23)	4 (31)	9 (69)
positivo	3 (30)	7 (70)	1 (10)	9 (90)	3 (30)	7 (70)	2 (20)	8 (80)
р	0,663		0,144		0,033		0,463	
VEGF								
negativo	4 (67)	2 (33)	3 (50)	3 (50)	5 (83)	1 (17)	4 (67)	2 (33)
positivo	4 (21)	15 (79)	4 (21)	15 (79)	9 (47)	10 (53)	4 (21)	15 (79)
р	0,059		0,194		0,141		0,059	

A maioria das pacientes abaixo de 30 e acima de 70 anos apresentaram expressão positiva para todos os elementos-traço (tabela 8). Entretanto, na casuística deste trabalho, todas as pacientes com menos de 30 anos foram diagnosticadas com neoplasia benigna ou apresentavam quadro de tecido normal, de forma que a correlação da idade com a expressão dos elementos-traço deve ser avaliada sob este aspecto. Com relação ao estado menstrual das pacientes, os resultados indicam que a maioria das mulheres pós-menopausadas apresentam uma correlação positiva com a expressão dos elementos-traço.

Não foram observadas correlações significativamente estatísticas para os demais fatores avaliados, entretanto, o número de pacientes nos subgrupos de fatores prognósticos pode ter sido pequeno para se detectar uma correlação estatística.

5.5.2. Curvas de sobrevida global

As curvas de sobrevida estimadas pelo método de Kaplan-Meier, utilizadas para examinar a expressão dos elementos-traço em função da sobrevida global de pacientes diagnosticadas com tumores malignos, são apresentadas na figura 14. Os valores dos testes de *log-rank* são também apresentados nesta figura e indicam que a expressão do elemento cobre apresenta correlação significativa com relação ao tempo de sobrevida. De fato, estudos relatam que o cobre apresenta uma função crucial no mecanismo angiogênico, e tumores que se tornam angiogênicos exibem um elevado potencial metastático, uma das maiores causas da mortalidade em pacientes com câncer de mama [57, 141].



Figura 14: Curvas de sobrevida global em função da expressão dos elementos-traço.

Mesmo não apresentando diferenças significativamente estatísticas para os outros elementos, os gráficos da figura 14 indicam que a positividade na expressão dos elementostraço está associada com um maior risco de óbito, exceto para o elemento cálcio, cuja tendência é inversa.

O estudo e a aplicação de novos marcadores prognósticos podem proporcionar avanços na área médica, uma vez que podem melhorar a seleção de pacientes para terapias adjuntas e proporcionar um nível mais individualizado na conduta terapêutica. Quanto maior o número de marcadores, maior o número de possíveis combinações que podem ajudar o médico a identificar pacientes com tumores muito agressivos e instituir a terapia apropriada para cada caso, podendo até alterar o curso da doença. Fatores como a concentração de elementos-traço, avaliados neste trabalho, se mostraram importantes objetos de estudo para que num futuro próximo sejam estabelecidos como fatores prognósticos.

5.6. Alteração das concentrações dos elementos-traço em tecidos

5.6.1. Cálcio

O aumento da concentração de cálcio nas neoplasias mamárias, em relação a tecidos normais, possivelmente está associado à presença de microcalcificações nos tecidos, que podem até influenciar a progressão dos tumores [83, 142]. A figura 15 apresenta as distribuições de concentração do cálcio obtidas nos diferentes tipos de neoplasias, onde se observa que este metal se acumula em maiores níveis em tecidos de menor malignidade. Isto pode ser justificado pelo fato de o cálcio ser inversamente associado com o grau de malignidade dos tumores devido à diferenças nas estruturas das microcalcificações [84, 142]. Cabe ressaltar ainda que esta hipótese também é sustentada pelos resultados da curva de sobrevida (figura 14.a), que indica que pacientes com expressão negativa para cálcio apresentam um maior risco de óbito.



Figura 15: Distribuições de concentração do cálcio nos diferentes tipos de neoplasias.

As diferenças observadas entre os níveis de cálcio em neoplasias benignas e malignas podem estar relacionadas ao tipo de microcalcificação que compõe cada tecido. No caso de tecidos benignos, as microcalcificações são compostas por cristais de oxalato de cálcio (tipo I) e em tecidos malignos compostas por cristais de hidroxiapatita (tipo II) [84, 85]. Embora as microcalcificações do tipo II sejam em princípio compostas por hidroxiapatita, elas também contém quantidades traço de várias impurezas biológicas como proteínas e lipídeos [84]. Estas impurezas podem ser encontradas em menores níveis em lesões benignas e pode ser possível que o conteúdo mineral total de cálcio seja maior em lesões benignas [142].

5.6.2. Ferro

O aumento da concentração de ferro em neoplasias mamárias (mais acentuada em neoplasias malignas e menos acentuada em benignas – figura 16.a) pode estar relacionado com a alteração nos níveis de proteínas responsáveis pela homeostase do ferro intracelular (como complexos de ferritina/Fe), fazendo com que este elemento possa apresentar dupla função: a deficiência de ferro pode acelerar o crescimento do tumor devido à ativação da





Figura 16: Correlações entre as expressões de ferro e (a) tipo de tecido (b) idade (c) menopausa e (d) menopausa e expressão de VEGF.

As figuras 16.b e 16.c mostram que a expressão negativa do ferro ocorre com maior freqüência em mulheres jovens e pré menopausadas, provavelmente devido à concentração de ferro sistêmica ser menor em mulheres nestas condições [147, 148]. Entretanto, como observado na figura 16.d, a deficiência do ferro pode induzir a formação do fator de

crescimento vascular endotelial (VEGF), fazendo com que estas pacientes sejam mais suscetíveis à angiogênese [147-150].

As figures 16.b e 16.c mostram ainda que a expressão positiva do ferro é maior em mulheres idosas, provavelmente devido ao acúmulo de ferro no organismo devido à menopausa [147, 148]. Este acúmulo de ferro pode promover um ambiente pró-oxidante, contribuindo para o stress oxidativo e tornar essas mulheres mais susceptíveis ao desenvolvimento do câncer de mama [147, 148].

O maior acúmulo de ferro em tecidos neoplásicos malignos em relação aos benignos pode estar relacionado ao nível de proteínas receptoras de ferro, que aparece em maior quantidade em neoplasias mamárias malignas quando comparadas a tecidos normais ou neoplasias benignas [89, 143, 144].

5.6.3. Cobre

Assim como o ferro, os níveis de cobre em tecidos mamários podem estar relacionados aos processos oxidativos para a produção de radicais livres, ou ao processo angiogênico [145, 146]. As conseqüências do acúmulo do cobre com relação ao estresse oxidativo são similares às do ferro, uma vez que o acúmulo deste elemento pode catalisar a produção de espécies reativas de oxigênio [57, 151].

A figura 17 apresenta a correlação entre a expressão do cobre e a expressão do VEGF obtidas neste trabalho, onde se pode observar que dentre os casos positivos para cobre, 91% também apresentaram expressão imunohistoquímica positiva para o VEGF. Isto pode ser justificado pelo fato que baixos níveis de cobre são suficientes para a atividade normal de algumas enzimas, porém em níveis elevados (no caso das neoplasias), o cobre pode estimular a proliferação e a migração das células endoteliais, ativando fatores pró angiogênicos como o VEGF [57, 94, 152]. Cabe ressaltar que neste trabalho, pacientes com expressão positiva para

o cobre apresentaram menores taxas de sobrevida global (figura 14.c), concordando com a hipótese de correlação inversa entre a expressão do VEGF e a sobrevida global de pacientes nodo-positivos e nodo-negativos [153].



Figura 17: Correlação entre a expressão de cobre e VEGF

O acúmulo de cobre mais pronunciado em neoplasias benignas pode estar associado a proteínas dependentes de cobre, como os fatores de crescimento fibroblástico (fibroblast growth factor - FGF), que controlam o crescimento e a diferenciação celular e podem regular o crescimento das neoplasias benignas da mama [57, 94, 154]. Os FGF são expressos na maioria dos tumores, porém o mRNAs destas proteínas são expressos em níveis significativamente maiores em tecidos hiperplásicos e tumores benignos que em tumores malignos [155-157]. Futuros estudos podem ser realizados com o intuito de avaliar a correlação da expressão do cobre com os FGF.

5.6.4. Zinco

O aumento dos níveis de zinco em tecidos neoplásicos pode ser atribuído tanto às causas do tumor, contribuindo com o processo carcinogênico, quanto às conseqüências, inibindo o processo neoplásico. Sua contribuição à tumorigênese pode ser decorrente da

alteração na homeostase do zinco, uma vez que a deficiência deste metal pode causar danos oxidativos, quebra e fragmentação do DNA [158], e o acúmulo pode auxiliar na alta atividade celular, uma vez que o zinco é um dos elementos responsáveis pela ativação da enzima transcriptase reversa [95, 96, 159].

Outra possível contribuição do zinco com a progressão do tumor, é ilustrada na figura 18, que apresenta a correlação da expressão do zinco com tecidos neoplásicos que apresentaram expressão positiva no estudo imunohistoquímico para os marcadores de MMP-1, -2, -9 e TIMP-1 e -2. Apesar de não apresentar correlação estatística significante, os resultados sugerem uma correlação direta entre a presença de zinco nos tecidos neoplásicos e a expressão dos marcadores estudados, que pode ser explicado pela presença deste metal na estrutura das MMPs, que degradam a matriz extracelular durante a proliferação da neoplasia [160]. Cabe ressaltar que o papel das TIMPs é inibir a ação das MMPs [57].



Figura 18: Expressão do zinco em tecidos positivos para MMP-1,-2,-3 e TIMP-1,-2.

A atuação do zinco na supressão do processo neoplásico pode estar relacionada, juntamente com o cobre, à atividade antioxidante da enzima Cu/Zn-SOD, uma das principais defesas contra as ROS, e da sua habilidade de prevenir a formação de radicais hidroxila, competindo pelos sítios de ligação com metais de transição pró oxidantes, como o ferro [88].

O acúmulo do zinco em tecidos neoplásicos benignos, também pode estar associado à sua função nas proteínas MMPs, uma vez que níveis plasmáticos destas proteínas são igualmente observados em pacientes com neoplasias benignas e malignas [161].

5.7. Correlações entre os elementos-traço e aspectos histológicos

5.7.1. Correlações entre as concentrações dos elementos-traço

O papel que os elementos-traço desempenham em tecidos mamários neoplásicos, discutidos na seção 5.6 pode auxiliar no entendimento do mecanismo de acúmulo destes elementos nos tecidos. Estes mecanismos podem ainda de certa forma estar correlacionados, tendo em vista que as alterações do microambiente que podem ser causa ou conseqüência da tumorigênese são bastante complexas [45]. Desta forma, foi realizado o teste de Spearman para determinar os valores de correlação (r) entre as distribuições dos elementos.

Os resultados mostraram que tecidos normais apresentam vários elementos diretamente correlacionados, como o Ca e Cu, Ca e Zn, Cu e Zn, com correlação significativamente estatística (p < 0,001). Em tumores malignos, apenas o Ca e o Zn apresentaram alta correlação (r = 0,64) com significância estatística (p < 0,001). Não foram observadas correlações entre os elementos em tecidos normais periféricos ou fibroadenomas.

Embora não tenham apresentado correlação significativamente estatística, outros elementos mostraram uma tendência interessante em tecidos neoplásicos normais e malignos. As figuras 19.a e 19.b mostram os gráficos de correlação para estes elementos, onde é possível observar que os elementos ferro e cobre estão positivamente correlacionados em tumores malignos, corroborando com a hipótese de que ambos contribuem tanto no processo de stress oxidativo, catalisando a formação de ROS [162], quanto no processo angiogênico, estimulando a ativação de fatores pró angiogênicos como o VEGF [94, 150]. Além disso, este

resultado pode ainda ser devido ao cobre ser um importante cofator para o metabolismo do ferro [57].



Figura 19: Correlações entre os elementos-traço em tecidos mamários normais e neoplasias malignas

Ainda na figura 19 é possível observar que os elementos cálcio e cobre apresentam correlação direta (r > 0) em tecidos normais e indireta (r < 0) em tumores malignos, o que concorda com os resultados anteriores que sugerem que o cálcio possui associação inversa com a progressão do câncer [84, 142], enquanto o cobre colabora com sua progressão [94, 150].

Poucos trabalhos analisam a correlação entre as concentrações de elementos-traço em tecidos mamários em níveis macroscópicos [23, 24, 75, 136], sendo que os resultados apresentados nestes trabalhos concordam de forma geral com os discutidos acima, entretanto poderiam não ser estendidos em nível microscópico. Neste trabalho, utilizando a técnica de µ-XRF buscou-se avaliar este aspecto e correlacioná-los ainda com aspectos histológicos dos tecidos e a expressão imunohistoquímica de marcadores de interesse.

5.7.2. Correlação espacial - medidas de µ-XRF e expressão imunohistoquímica

As correlações espaciais observadas microscopicamente apresentaram a mesma tendência macroscópica, como ilustrado na figura 20, que apresenta uma imagem histológica de um tecido normal (figura 20.a), indicando a região que foi mapeada pela técnica de μ -XRF e as figuras 20.b e 20.c apresentam os mapas de distribuição dos elementos cálcio e cobre. A escala de cores indica a intensidade do pixel, que por sua vez está correlacionada com a área de emissão fluorescente (concentração) do elemento-traço naquele pixel [43].







Figura 20: (a) Lâmina histológica de um tecido normal (aumento x20); mapa de µ-XRF para os elementos (b) cobre, (c) cálcio e (d) correlação entre Ca e Cu. O tamanho de cada pixel era de 0,03mm, de forma que o tamanho real da área mapeada era de 0,63 x 0,54 mm.

As figuras 20.b e 20.c mostram que os elementos-traço apresentam um padrão de distribuição em tecidos normais, praticamente uniformes na superfície da amostra. O teste de Spearman indicou correlação espacial dos elementos Ca e Cu (figura 20.d), com significância estatística (p < 0,001).

A figura 21.a apresenta a lâmina histológica de um carcinoma ductal de grau III, onde se observa a proliferação do epitélio ductal. As figuras 21.b, 21.c e 21.d apresentam a distribuição espacial do cálcio, do zinco e a correlação espacial entre ambos (apresentando uma significância estatística p < 0,001), respectivamente. Observa-se que o cálcio e o zinco acumulam-se com maior intensidade na região de proliferação epitelial, sugerindo a associação destes elementos à presença das MMPs. Para esta amostra, a marcação imunohistoquímica foi positiva para MMP1, TIMP1 e VEGF.

A correlação entre os elementos Ca e Zn pode ser atribuída à presença de metaloproteinases de matriz (MMPs) em regiões do tumor, uma vez que além do zinco, estas proteínas também contêm íons de cálcio em seu domínio catalítico, essenciais para manter a sua estabilidade estrutural e atividade, deixando-as menos susceptíveis a desnaturação e

proteólise [163-165]. Cabe ressaltar que os elevados níveis de cálcio observados em tecidos neoplásicos provavelmente associados à presença de cristais de hidroxiapatita (HA) podem ainda desempenhar um importante papel na progressão tumoral, pois além de realçar a mitogênese em células mamárias epiteliais e tumorais, podem induzir a produção de uma variedade de MMPs [97].





Figura 21: (a) Lâmina histológica de um tecido com carcinoma ductal de grau III (aumento x20); mapa de µ-XRF para os elementos (b) cálcio, (c) zinco, (d) correlação entre Ca e Zn, (e) ferro, (f) cobre e (g) correlação entre Fe e Cu. O tamanho de cada pixel era de 0,03mm, de forma que o tamanho real da área mapeada era de 0,72 x 0,81 mm.

Nas figuras 21.e, 21.f e 21.g é possível observar ainda as distribuições espaciais dos elementos ferro e cobre, e a correlação entre ambos (p <0,001). Nota-se que tanto o ferro quanto o cobre se acumulam com maior em intensidade na região de proliferação epitelial, resultado possivelmente relacionado com importantes aspectos das neoplasias: a) ao papel de ambos no processo angiogênico e nos processos oxidativos para a produção de radicais livres [145, 146], e b) à função do cobre de estimular a proliferação e a migração das células endoteliais, e ativação fatores pró angiogênicos como o VEGF [57, 94]

A figura 22.a apresenta uma lâmina histológica de um carcinoma ductal de grau I marcada positivamente para VEGF e as figuras 22.b e 22.c mostram as distribuições de ferro e cobre neste tecido, indicando que a distribuições espaciais destes elementos estão correlacionadas com a marcação de VEGF.





Figura 22: (a) Lâmina histológica de um tecido com carcinoma ductal de grau I (imunohistoquímica, positiva para VEGF, aumento x20); mapa de µ-XRF para os elementos (b) ferro e (c) cobre. O tamanho de cada pixel era de 0,03mm, de forma que o tamanho real da área mapeada era de 0,60 x 0,81 mm.

No caso de neoplasias benignas, apesar de não terem sido observadas correlações macroscópicas, observou-se correlação entre as distribuições espaciais de cálcio e zinco. A figura 23.a mostra uma lâmina histológica de um fibroadenoma, caracterizada por vários fatores como, por exemplo, uma proliferação epitelial ductal, evidenciada pelo aumento dos ductos mamários.





(c)

1050

900

750

600

450

300

150

0



Figura 23: (a) Lâmina histológica de um tecido com fibroadenoma (aumento x4); mapa de μ-XRF para os elementos (b) cálcio, (c) zinco e (d) correlação entre ambos. Lâminas histológicas de (e) células positivas para MMP1 (imunohistoquímica, marcação citoplasmática, x20) e (f) células positivas para TIMP2 (imunohistoquímica, marcação citoplasmática, x20). O tamanho de cada pixel era de 0,03mm, de forma que o tamanho real da área mapeada era de 1,23 x 0,81 mm.

Nas figuras 23.b e 23.c pode-se observar que a distribuição espacial dos elementos cálcio e zinco apresentam um padrão similar de distribuição, que quando comparados à lâmina histológica, indicam um maior acúmulo destes elementos na região de proliferação ductal. Na figura 23.d observa-se o mapa de correlação destes elementos, que apresentou significância estatística (p < 0,001). Estes resultados corroboram com a hipótese que as expressões dos elementos cálcio e zinco possam estar correlacionados em tecidos alterados devido à presença destes na estrutura de proteínas MMPs [24, 163, 165]. Esta hipótese é sustentada ainda pela comparação dos mapas de distribuição dos elementos com os resultados de marcação imunohistoquímica (figuras 23.e e 23.f), que mostram a expressão positiva de MMP1 e TIMP2, também na região de proliferação ductal.

Cabe ressaltar que os resultados obtidos acerca da associação entre a distribuição espacial dos elementos-traço e a marcação imunohistoquímica são observações preliminares, devido ao pequeno número de amostras avaliadas neste estudo. Entretanto, alguns deles

parecem ser consistentes com as hipóteses discutidas sobre a função dos elementos-traço em neoplasias mamárias.

6. Conclusões

6.1. Determinação da concentração de elementos-traço através de EDXRF e TXRF

Neste trabalho foram utilizadas as técnicas de EDXRF e TXRF para determinar as concentrações de Ca, Fe, Cu e Zn em tecidos normais e neoplásicos de mama. Dentre as vantagens da técnica de EDXRF destacam-se a pequena quantidade de material necessário para análise e o fato de ser uma técnica não destrutiva uma vez que não necessita de digestão e homogeneização como requer a TXRF. Dentre as vantagens da técnica de TXRF, pode-se citar a possibilidade de padronização interna das amostras para quantificação das concentrações de elementos-traço, menores limites de detecção e maiores valores de sensibilidade. Todos os elementos identificados foram encontrados em concentrações maiores em tecidos neoplásicos quando comparados a tecidos normais, com significância estatística (p < 0,05).

Devido às diferenças obtidas nos resultados de EDXRF e TXRF, no caso de se utilizar a técnica de fluorescência de raios X para uma eventual aplicação clínica, é necessário que os procedimentos experimentais e de preparação das amostras, assim como a metodologia da análise, sejam estabelecidos por padrões interlaboratoriais. Desta forma, a XRF pode ser utilizada como técnica complementar ao diagnóstico de neoplasias mamárias, assim como para outros tipos de neoplasias.

6.2. Elementos-traço como marcadores tumorais

A combinação das concentrações dos elementos-traço em tecidos mamários e técnicas estatísticas apropriadas (análise de discriminante e curvas ROC) mostrou-se uma ferramenta eficaz para distinguir diferentes tipos de tecidos mamários, incluindo a distinção entre neoplasias malignas e benignas.

A acurácia preditiva da análise discriminante sugere que a técnica de XRF pode ser utilizada como uma ferramenta adicional na identificação precoce das neoplasias mamárias, utilizando as concentrações dos elementos-traço em amostras de mama (por exemplo, biópsias) para classificar diferentes tipos de tecido.

Através da análise das curvas ROC foi ainda possível determinar valores de pontos de corte para classificar os tecidos como neoplásicos ou normais, utilizando a concentração dos elementos-traço como marcadores tumorais.

6.3. Elementos-traço como fator prognóstico

A partir dos valores de corte obtidos da análise das curvas ROC foi possível avaliar a expressão dos elementos-traço, e correlacioná-las com os dados clinicopatológicos de importância prognóstica. As expressões de todos os elementos-traço se mostraram significativamente correlacionadas com parâmetros como tipo de tecido, idade e estado menstrual. Além disso, tendências diretas e indiretas foram observadas na correlação da expressão dos elementos-traço com outros parametros clínicos. O elemento cobre mostrou ainda correlação estatística com a sobrevida global.

O conhecimento dos fatores prognósticos são fundamentais para que o médico considere a eficácia de diferentes alternativas de tratamento e a relação custo/benefício de resultados para o paciente. Os resultados obtidos sugerem que a expressão dos elementos-traço é uma ferramenta em potencial para esta tarefa, podendo ser integrada no processo de decisão, bem como para individualizar o tratamento.

6.4. Funções e correlações entre elementos-traço em tecidos

Os níveis elevados dos elementos-traço em tecidos mamários neoplásicos observados neste trabalho podem estar associados tanto à causa como consequência da presença da neoplasia. Com relação às causas, pode-se citar que os níveis elevados de Fe e Cu podem catalisar a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Com relação às conseqüências, pode-se citar o papel do Fe e Cu na angiogênese favorecendo o crescimento do tumor, e a presença do Ca e Zn nas metaloproteinases de matriz (MMPs), que degradam a matriz extracelular de tecidos neoplásicos.

Estas hipóteses foram avaliadas através da correlação dos resultados de µ-XRF e imunohistoquímica, e os resultados indicaram que a expressão dos elementos-traço cálcio e zinco estão diretamente correlacionados com os marcadores MMPs e TIMPs, assim como o Fe e o Cu estão para o VEGF.

7. Contribuições deste trabalho para a área de conhecimento

Uma vez que o câncer de mama se desenvolve como resultado de uma combinação de diversos fatores, é difícil a identificação de apenas um fator específico ou mecanismo responsável pela doença. Neste trabalho focamos entender o mecanismo de acúmulo de elementos-traço em tecidos neoplásicos por meio da combinação das técnicas de fluorescência de raios X e imunohistoquímicas, bem como avaliar seu papel diagnóstico e prognóstico.

Os resultados deste trabalho demonstram a eficácia das técnicas de XRF tanto em aplicações diagnósticas quanto no auxílio em entender os fenômenos celulares e/ou moleculares do câncer de mama. Além disso, os resultados são clinicamente relevantes, pois além de colaborar com o diagnóstico da doença e um melhor entendimento do papel destes elementos no ambiente tumoral, terapias alvo podem ser desenvolvidas com base na expressão dos elementos-traço.

ANEXO I

www.hcrp.fmrp.usp.br **USP - RIBEIRÃO** Ribeirão Preto, 23 de junho de 2009 Oficio nº 1984/2009 CEP/MGV **Prezados Senhores**, O trabalho intitulado "ESTUDO DE ELEMENTOS TRACOS EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS ATRAVÉS DE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS - X E ANÁLISES IMUNO-HISTOQUÍMICAS" foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 289ª Reunião Ordinária realizada em 22/06/2009 e enquadrado na categoria: APROVADO, de acordo com o Processo HCRP nº 4308/2009. Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS. Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa. Atenciosamente. Japines DR^a MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP Ilustríssimos Senhores MARINA PIACENTINI DA SILVA PROF. DR. MARTIN EDUARDO POLETTI (Orientador) Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP - Campus Universitário FWA – 0000 2733; IRB – 0000 2186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4 Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.fmrp.usp.br Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto

ANEXO II

PROTOCOLO PARA COLETA DE DADOS DOS PRONTUÁRIOS

Número pro	ontuário:					
Data clínica	1:		Follow up:			
Idade:						
Menopausa	: 🗌 pré	D pós				
Cirurgia: 🛛 mastoplastia redutora				retirada de nódulo		
	🗌 mastectomia radical			retirada de linfonodos axilare		
Número Bić	ópsia:					
Mama:	ama: 🗌 Direita 🗌 Esquerda			Bilateral		
Tamanho d	o Nódulo:					
Diagnóstico	biópsia:					
Metástase li	infonodal:	🗌 sim	□não	quantos:		
Metástase à	distância:	\square_{sim}	□ _{não}	onde:		
Bloom e Ric	chardson: grau	H	M	N		
R. Estrógen	10:					
R. Progeste	rona:					
Her 2: s	core:					
p53:						
outros:						

ANEXO III

PROTOCOLO DE IMUNOHISTOQUÍMICA

Desenvolvido pelo Laboratório de Proliferação Celular do Departamento de Patologia da FMRP/USP

1. Preparação e Bateria de desparafinização:

- Cortar no micrótomo as amostras de tecido parafinados com 3µm e colocar em lâminas silanizadas a 8%;
- Desparafinizar o tecido em xilol I, II e II por 5 minutos cada;
- Reidratar o tecido passando em alcoóis decrescentes (absoluto, 95% e 70%), por 3 minutos cada;
- Lavar em água corrente e em água destilada;

2. Recuperação antigênica

- Mergulhar as lâminas em um recipiente com tampão Citrato^a (pH 6,0) e deixar por 40 minutos na panela de vapor. A função desta etapa é recuperar as estruturas das proteínas, uma vez que foram fixadas em formol e parafinadas.
- Deixar esfriar por 20 minutos em temperatura ambiente e depois lavar em água corrente e em água destilada;
- Lavar as lâminas com PBS^b (pH 7,4) e circular as lâminas com a caneta hidrofóbica (Pan Pen), de forma que a solução fique concentrada no material, na área delimitada pela caneta;
- 3. Bloqueio da Peroxidase Endógena
 - Colocar a solução peroxidase endógena^c por 10 minutos;
 - Lavar em PBS por duas vezes de 5 minutos cada;
 - Lavar em TBST^d por 5 minutos;
- 4. Bloqueio dos anticorpos inespecíficos
 - Colocar a solução (BSA 2% em PBS pH 7,4 com o detergente tween 20 a 0,05%) por 10 minutos;
 - Lavar com TBST por 3 minutos;
- 5. Anticorpo primário
 - Incubar no Anticorpo primário overnight (os anticorpos são previamente diluídos em BSA e conservados em geladeira a 4°C);
 - Lavar em TBST por três vezes de 3 minutos cada;
- 6. Anticorpo secundário
 - Incubar no Anticorpo secundário (Post primary Kit Novolink) por 30 minutos;
 - Lavar em TBST por três vezes de 3 minutos cada;
 - Incubar no polímero (Kit Novolink) por 30 minutos;
 - Lavar em TBST duas vezes de 3 minutos cada;
 - Lavar em Tris-HCl^e (pH 7,6) por 3 minutos;
- 7. Revelação com o DAB
 - Aplicar o DAB por aproximadamente 6 minutos (5 a 12 minutos);

- Lavar em água destilada;
- Contra-corar com Hematoxilina por 10 a 20 minutos;
- Lavar em água corrente e azular em água amoniacal;
- Lavar em água destilada;

8. Bateria de desidratação e diafinização

- Desidratar as lâminas passando pelos alcoóis em ordem crescente (70%, 95% e absoluto)
- Diafanizar (passar pelo xilol para retirar todo o restante de parafina)
- Montar a lâmina final utilizando Permount® para colar a lamínula.

REAGENTES E SOLUÇÕES:

a. <u>Tampão Citrato pH 6,0</u> \rightarrow 2,10 g de Citrato, 1 L de água destilada.

b. <u>PBS (Phosphate buffered Saline) pH 7,4</u> → 32,68 g de Cloreto de sódio, 4,2 g de Fosfato de sódio dibásico,

1,44 g de Fosfato de sódio monobásico, 4 L de água destilada. Ajustar o pH com NaOH 1M.

c. <u>Peroxidade Endógena</u> \rightarrow 30 ml de PBS, 1 ml de água oxigenada, 30 ml de metanol.

d. <u>TBST concentrado pH 7,6</u> \rightarrow 80 g de NaCl, 6,05 g de Tris (PM 121,1 g), 1 L de água destilada, 4,4 ml de HCl 1M. Se precisar ajustar o pH com HCl 1M. Diluir 100 ml de TBS concentrado com 900 ml de água destilada (1:10) e acrescentar 500 ml de tween 20.

e. <u>Tris-HCl pH 7,6</u> \rightarrow 6,06 g de Tris, 950 ml de água oxigenada. Ajustar o pH com HCl 1M puro

Referências

- 1. INCA: Estimativas 2010: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA: Ministério da Saúde, Brasil; 2009
- Johns PC, Yaffe MJ: X-ray characterisation of normal and neoplastic breast tissues. *Phys Med Biol* 1987, 32(6):675-695
- Tomal A, Mazarro I, Kakuno EM, Poletti ME: Experimental determination of linear attenuation coefficient of normal, benign and malignant breast tissues. *Radiation Measurements* 2010, 45(9):1055-1059
- Kolb TM, Lichy J, Newhouse JH: Comparison of the performance of screening mammography, physical examination, and breast US and evaluation of factors that influence them: An analysis of 27,825 patient evaluations. *Radiology* 2002, 225(1):165-175
- Irwig L, Macaskill P, Houssami N: Evidence relevant to the investigation of breast symptoms: the triple test. *Breast* 2002, 11(3):215-220
- Sarvazyan A, Egorov V, Son JS, Kaufman CS: Cost-Effective Screening for Breast Cancer Worldwide: Current State and Future Directions. Breast Cancer: Basic and Clinical Research 2008, 2008(BCBCR-1-Sarvazyan-et-al):91
- 7. Fox SB, Generali DG, Harris AL: Breast tumour angiogenesis. Breast Cancer Res 2007, 9(6)
- Sayer HG, Kath R, Kliche KO, Hoffken K: Premenopausal breast cancer. Drugs 2002, 62(14):2025-2038
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL: Human-Breast Cancer -Correlation of Relapse and Survival with Amplification of the Her-2 Neu Oncogene. Science 1987, 235(4785):177-182
- Thor AD, Moore DH, Edgerton SM, Kawasaki ES, Reihsaus E, Lynch HT, Marcus JN, Schwartz L, Chen LC, Mayall BH *et al*: Accumulation of P53 Tumor Suppressor Gene Protein an Independent Marker of Prognosis in Breast Cancers. J Natl Cancer Inst 1992, 84(11):845-855
- 11. Kawai H, Li HC, Chun P, Avraham S, Avraham HK: Direct interaction between BRCA1 and the estrogen receptor regulates vascular endothelial growth factor (VEGF) transcription and secretion in breast cancer cells. *Oncogene* 2002, **21**(50):7730-7739
- Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred C, Clark GM, Ruby SC, O'Malley F, Sinpson LF, Connolly JL *et al*: Prognostic factors in breast cancer - College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000, 124(7):966-978
- Dowsett M, Dunbier AK: Emerging Biomarkers and New Understanding of Traditional Markers in Personalized Therapy for Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2008, 14(24):8019-8026
- 14. Weigel MT, Dowsett M: Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocrine-Related Cancer* 2010, **17**(4):R245-R262
- Theodorakou C, Farquharson MJ: Human soft tissue analysis using x-ray or gamma-ray techniques. Phys Med Biol 2008, 53(11):R111-R149
- Cesareo R: Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry. Nuclear Analytical Techniques in Medicine., vol. 8. New York: Ed. Elsevier; 1988

- Carvalho ML, Magalhaes T, Becker M, von Bohlen A: Trace elements in human cancerous and healthy tissues: A comparative study by EDXRF, TXRF, synchrotron radiation and PIXE. Spectroc Acta Pt B-Atom Spectr 2007, 62:1004-1011
- 18. Ebrahim AM, Eltayeb MAH, Shaat MK, Mohmed MA, Eltayeb EA, Ahmed AY: Study of selected trace elements in cancerous and non-cancerous human breast tissues from Sudanese subjects using instrumental neutron activation analysis. Science of the Total Environment 2007, 383:52-58
- Geraki K, Farquharson MJ, Bradley DA: Concentrations of Fe, Cu and Zn in breast tissue: a synchrotron XRF study. *Phys Med Biol* 2002, 47(13):2327-2339
- 20. Majewska U, Banas D, Braziewicz J, Gozdz S, Kubala-Kukus A, Kucharzewski M: Trace element concentration distributions in breast, lung and colon tissues. *Phys Med Biol* 2007, **52**(13):3895-3911
- Millos J, Costas-Rodriguez M, Lavilla I, Bendicho C: Multielemental determination in breast cancerous and non-cancerous biopsies by inductively coupled plasma-mass spectrometry following small volume microwave-assisted digestion. Anal Chim Acta 2008, 622(1-2):77-84
- 22. Poletti ME, Goncalves OD, Perez CA, Magalhaes SD: A preliminary study of the distribution of trace elements in healthy and neoplastic breast tissues with synchrotron radiation X-ray fluorescence. *Radiation Physics and Chemistry* 2004, **71**(3-4):975-976
- 23. Siddiqui MKJ, Jyoti, Singh S, Mehrotra PK, Singh K, Sarangi R: 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* 2006, 32(5):630-637
- 24. Silva MP, Tomal A, Perez CA, Ribeiro-Silva A, Poletti ME: Determination of Ca, Fe, Cu and Zn and their correlations in breast cancer and normal adjacent tissues. *X-Ray Spectrom* 2009, **38**(2):103-111
- 25. da Silva MP, Zucchi O, Ribeiro-Silva A, Poletti ME: Discriminant analysis of trace elements in normal, benign and malignant breast tissues measured by total reflection X-ray fluorescence. Spectroc Acta Pt B-Atom Spectr 2009, 64(6):587-592
- 26. Garg AN, Singh V, Weginwar RG, Sagdeo VN: An Elemental Correlation Study in Cancerous and Normal Breast-Tissue with Successive Clinical Stages by Neutron-Activation Analysis. Biological Trace Element Research 1994, 46(3):185-202
- 27. Poletti ME, Goncalves OD, Mazzaro I: Measurements of X-ray scatter signatures for some tissueequivalent materials. Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms 2004, 213:595-598
- 28. Magalhaes T, Becker M, Carvalho ML, von Bohlen A: Study of Br, Zn, Cu and Fe concentrations in healthy and cancer breast tissues by TXRF. In: 12th International Conference on Total Reflection X-Ray Fluorescence Analysis and Related Methods: Jun 18-22 2007; Trento, ITALY: Pergamon-Elsevier Science Ltd; 2007: 1473-1479
- 29. Szoboszlai N, Polgari Z, Mihucz VG, Zaray G: Recent trends in total reflection X-ray fluorescence spectrometry for biological applications. *Anal Chim Acta* 2009, **633**(1):1-18
- 30. Streli C: Recent advances in TXRF. Appl Spectrosc Rev 2006, 41(5):473-489
- Klockenkamper R, Vonbohlen A: Total Reflection X-Ray-Fluorescence an Efficient Method for Microanalysis, Trace and Surface-Layer Analysis. J Anal At Spectrom 1992, 7(2):273-279

- 32. Zucchi O, Dias AD, Nascimento VF, Salvador MJ: Characterization of two medicinal plants by X-ray spectrometry. *Journal of Trace and Microprobe Techniques* 2000, **18**(3):441-450
- 33. Farquharson MJ, Geraki K, Falkenberg G, Leek R, Harris A: The localisation and micro-mapping of copper and other trace elements in breast tumours using a synchrotron micro-XRF system. Appl Radiat Isot 2007, 65(2):183-188
- Barroso RC, Lopes RT, de Jesus EFO, Oliveira LF: X-ray diffraction microtomography using synchrotron radiation. Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section a-Accelerators Spectrometers Detectors and Associated Equipment 2001, 471(1-2):75-79
- 35. Janssens K: X-ray based methods of analysis. Non-Destructive Micro Analysis of Cultural Heritage Materials 2004, 42:129-226
- Tertian R, Claisse M: Principles of quantitative x-ray fluorescence analysis. London: Ed. Heyden; 1982
- 37. Khuder A, Bakir MA, Karjou J, Sawan MK: XRF and TXRF techniques for multi-element determination of trace elements in whole blood and human hair samples. *Journal of Radioanalytical* and Nuclear Chemistry 2007, 273(2):435-442
- 38. Farquharson MJ, Geraki K: 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 Spectrom 2004, 33(4):240-245
- Geraki K, Farquharson MJ, Bradley DA: X-ray fluorescence and energy dispersive x-ray diffraction for the quantification of elemental concentrations in breast tissue. *Phys Med Biol* 2004, 49(1):99-110
- 40. Kubala-Kukus A, Banas D, Braziewicz J, Gozdz S, Majewska U, Pajek M: Analysis of elemental concentration censored distributions in breast malignant and breast benign neoplasm tissues. Spectroc Acta Pt B-Atom Spectr 2007, 62(6-7):695-701
- 41. Magalhaes T, Carvalho ML, Von Bohlen A, Becker M: Study on trace elements behaviour in cancerous and healthy tissues of colon, breast and stomach: Total reflection X-ray fluorescence applications. Spectroc Acta Pt B-Atom Spectr 2010, 65(6):493-498
- 42. Rizk SL, Skypeck HH: Comparison between Concentrations of Trace-Elements in Normal and Neoplastic Human-Breast Tissue. *Cancer Research* 1984, **44**(11):5390-5394
- 43. Banas A, Banas K, Falkenberg G, Dyduch G, Pawlicki B, Kwiatek WM: Using micro-synchrotron radiation induced X-ray emission distribution maps to determine correlation between elements in prostate tissue. Spectroc Acta Pt B-Atom Spectr 2008, 63(9):957-961
- Farquharson MJ, Al-Ebraheem A, Geraki K, Leek R, Harris AL: Zinc presence in invasive ductal carcinoma of the breast and its correlation with oestrogen receptor status. *Phys Med Biol* 2009, 54(13):4213-4223
- 45. Allen M, Jones JL: Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *J Pathol* 2011, **223**(2):162-176
- 46. Kumar GL, Rudbeck L: Immunohistochemistry Staining Methods Education Guide, 5th edn. Carpinteria, CA: Dako North America; 2009
- 47. Robbins SL, Cotran RS: **Patologia Estrutural e Funcional**, 2 edn. Rio de Janeiro: Editora Interamericana; 1983

- 48. Netter FH: Interactive Atlas of Human Anatomy. In.: Ciba Medical Education & Publications; 1995
- Site didático de Anatomia Patológica NeN-U: Disponível em http://anatpat.unicamp.br. Acesso em 01/08/2011
- Guray M, Sahin AA: Benign breast diseases: Classification, diagnosis, and management. Oncologist 2006, 11(5):435-449
- 51. Abreu E, Koifman S: Fatores prognósticos no câncer da mama feminina Revista Brasileira de Cancerologia 2002, 48(1):113 131
- Bloom HJG, Richardson WW: Histological Grading and Prognosis in Breast Cancer a Study of 1409 Cases of Which 359 Have Been Followed for 15 Years. British Journal of Cancer 1957, 11(3):359-&
- Page DL, Jensen RA, Simpson JF: Routinely available indicators of prognosis in breast cancer. Breast Cancer Res Treat 1998, 51(3):195-208
- 54. Schneider BP, Miller KD: Angiogenesis of breast cancer. J Clin Oncol 2005, 23(8):1782-1790
- 55. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH: Angiogenic and cell survival functions of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2005, 9(4):777-794
- Liotta LA, Steeg PS, Stetlerstevenson WG: Cancer Metastasis and Angiogenesis an Imbalance of Positive and Negative Regulation. *Cell* 1991, 64(2):327-336
- Nasulewiez A, Mazur A, Opolski A: Role of copper in tumour angiogenesis clinical implications. J Trace Elem Med Biol 2004, 18(1):1-8
- Hinestrosa MC, Dickersin K, Klein P, Mayer M, Noss K, Slamon D, Sledge G, Visco FM: Opinion -Shaping the future of biomarker research in breast cancer to ensure clinical relevance. *Nature Reviews Cancer* 2007, 7(4):309-315
- 59. He K: Trace elements in nails as biomarkers in clinical research. European Journal of Clinical Investigation 2011, **41**(1):98-102
- McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM: REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK). *British Journal of Cancer* 2005, 93(4):387-391
- 61. Bast RC, Ravdin P, Hayes DF, Bates S, Fritsche H, Jessup JM, Kemeny N, Locker GY, Mennel RG, Somerfield MR: 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: Clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. J Clin Oncol 2001, 19(6):1865-1878
- 62. Hayes DF, Bast RC, Desch CE, Fritsche H, Kemeny NE, Jessup JM, Locker GY, MacDonald JS, Mennel RG, Norton L *et al*: Tumor marker utility grading system: A framework to evaluate clinical utility of tumor markers. J Natl Cancer Inst 1996, 88(20):1456-1466
- 63. May M: Biomarkers still off the mark for detecting breast cancer. Nature Medicine 2010, 16(1):3-3
- 64. Kuo HW, Chen SF, Wu CC, Chen DR, Lee JH: Serum and tissue trace elements in patients with breast cancer in Taiwan. *Biological Trace Element Research* 2002, **89**(1):1-11
- 65. Jesneck JL, Mukherjee S, Yurkovetsky Z, Clyde M, Marks JR, Lokshin AE, Lo JY: Do serum biomarkers really measure breast cancer? *BMC Cancer* 2009, **9**

- 66. Okumura Y, Yamamoto Y, Zhang ZH, Toyama T, Kawasoe T, Ibusuki M, Honda Y, Iyama K, Yamashita H, Iwase H: Identification of biomarkers in ductal carcinoma in situ of the breast with microinvasion. *BMC Cancer* 2008, 8
- 67. Demetrick DJ: Targeting cancer treatment: the challenge of anatomical pathology to the analytical chemist. *Analyst* 2003, **128**(8):995-997
- Salvajoli JV, Souhami L, Faria SL: Radioterapia em oncologia, vol. 1. Rio de Janeiro: Medsi Editora Médica e Científica Ltda; 1999
- Ribeiro-Silva A, Garcia SB, Chahud F, Zucoloto S: Prognostic impact of BRCA1 immunohistochemistry expression in sporadic breast carcinomas. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2005, 41(3):197-203
- Ludovini V, Sidoni A, Pistola L, Bellezza G, De Angelis V, Gori S, Mosconi AM, Bisagni G, Cherubini R, Bian AR *et al*: Evaluation of the prognostic role of vascular endothelial growth factor and microvessel density in stages I and II breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2003, 81(2):159-168
- 71. Schwartz MK: Role of Trace-Elements in Cancer. Cancer Research 1975, 35(11):3481-3487
- 72. Raju GJN, Sarita P, Kumar MR, Murty G, Reddy BS, Lakshminarayana S, Vijayan V, Lakshmi P, Gavarasana S, Reddy SB: Trace elemental correlation study in malignant and normal breast tissue by PIXE technique. Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms 2006, 247(2):361-367
- 73. Ng KH, Looi LM, Bradley DA: The elemental composition of breast tissue: Can this be related to breast particle deposition. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 1997, **217**(2):193-199
- Santoliquido PM, Southwick HW, Olwin JH: Trace-Metal Levels in Cancer of Breast. Surg Gynecol Obstet 1976, 142(1):65-70
- 75. Majewska U, Braziewicz J, Banas D, KubalaKukus A, Gozdz S, Pajek M, Smok J, Urbaniak A: An elemental correlation study in cancerous breast tissue by total reflection x-ray fluorescence. Biological Trace Element Research 1997, 60(1-2):91-100
- 76. Kubala-Kukus A, Braziewicz J, Banas D, Majewska U, Gozdz S, Urbaniak A: Trace element load in cancer and normal lung tissue. In: 8th International Conference on PIXE and its Analytical Applications: Jun 14-18 1998; Lund, Sweden: Elsevier Science Bv; 1998: 193-199
- Majewska U, Braziewicz J, Banas D, Kubala-Kukus A, Kucharzewski M, Waler J, Gozdz S, Wudarczyk J: Zn concentration in thyroid tissue and whole blood of women with different diseases of thyroid. Biological Trace Element Research 2001, 80(3):193-199
- 78. Kubala-Kukus A, Banas D, Braziewicz J, Majewska U, Pajek M: Comparative study of trace element contents in human full-term placenta and fetal membranes by total reflection X-ray fluorescence. Spectroc Acta Pt B-Atom Spectr 2003, 58(4):725-734
- 79. Kucharzewski M, Braziewicz J, Majewska U, Gozdz S: Iron concentrations in intestinal cancer tissue and in colon and rectum polyps. *Biological Trace Element Research* 2003, **95**(1):19-28
- Geraki K, Farquharson M, Bradley D: X-ray fluorescence and energy dispersive X-ray diffraction for the characterisation of breast tissue. *Radiation Physics and Chemistry* 2004, 71(3-4):969-970

- 81. Magalhaes T, von Bohlen A, Carvalho ML, Becker M: Trace elements in human cancerous and healthy tissues from the same individual: A comparative study by TXRF and EDXRF. Spectroc Acta Pt B-Atom Spectr 2006, 61(10-11):1185-1193
- Cashman KD: Calcium intake, calcium bioavailability and bone health. British Journal of Nutrition 2002, 87:S169-S177
- Morgan MP, Cooke MM, McCarthy GM: Microcalcifications associated with breast cancer: An epiphenomenon or biologically significant feature of selected tumors? J Mammary Gland Biol Neoplasia 2005, 10(2):181-187
- 84. Haka AS, Shafer-Peltier KE, Fitzmaurice M, Crowe J, Dasari RR, Feld MS: Identifying microcalcifications in benign and malignant breast lesions by probing differences in their chemical composition using Raman spectroscopy. *Cancer Research* 2002, 62(18):5375-5380
- 85. Frappart L, Boudeulle M, Boumendil J, Lin HC, Martinon I, Palayer C, Mallet-Guy Y, Raudrant D, Bremond A, Rochet Y *et al*: 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. *Hum Pathol* 1984, 15(9):880-889
- Winston JS, Yeh IT, Evers K, Friedman AK: Calcium-Oxalate Is Associated with Benign Breast-Tissue - Can We Avoid Biopsy. Am J Clin Pathol 1993, 100(5):488-492
- Panjwani P, Tirumalae R, Emmanuel A: Calcium Oxalate Crystals-An Unexpected Finding in a Breast Aspirate. *Diagn Cytopathol* 2011, 39(5):349-351
- Kabat GC, Rohan TE: Does excess iron play a role in breast carcinogenesis? an unresolved hypothesis. Cancer Causes Control 2007, 18(10):1047-1053
- Shpyleva SI, Tryndyak VP, Kovalchuk O, Starlard-Davenport A, Chekhun VF, Beland FA, Pogribny IP: Role of ferritin alterations in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2011, 126(1):63-71
- Reizenstein P: Iron, Free-Radicals and Cancer. Medical Oncology and Tumor Pharmacotherapy 1991, 8(4):229-233
- 91. Abalea V, Cillard J, Dubos MP, Anger JP, Cillard P, Morel I: **Iron-induced oxidative DNA damage and** its repair in primary rat hepatocyte culture. *Carcinogenesis* 1998, **19**(6):1053-1059
- Halliwell B, Gutteridge JMC: Free Radicals in Biology and Medicine., Third edn. New York: Oxford University Press; 1999
- Konemann S, Bolling T, Matzkies F, Willich N, Kisters K, Micke O: Iron and iron-related parameters in oncology. *Trace Elem Electrolytes* 2005, 22(2):142-149
- Lowndes SA, Harris AL: The role of copper in tumour angiogenesis. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2005, 10(4):299-310
- Cavallo F, Gerber M, Marubini E, Richardson S, Barbieri A, Costa A, Decarli A, Pujol H: Zinc and Copper in Breast-Cancer - a Joint Study in Northern Italy and Southern France. Cancer 1991, 67(3):738-745
- Kelleher SL, Seo YA, Lopez V: Mammary gland zinc metabolism: regulation and dysregulation. Genes and Nutrition 2009, 4(2):83-94

- 97. Morgan MP, Cooke MM, Christopherson PA, Westfall PR, McCarthy GM: Calcium hydroxyapatite promotes mitogenesis and matrix metalloproteinase expression in human breast cancer cell lines. *Mol Carcinog* 2001, 32(3):111-117
- Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM: Cancer therapy Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: Trials and tribulations. *Science* 2002, 295(5564):2387-2392
- Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E, O'Higgins N: Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res* 2000, 2(4):252-257
- 100. Curran S, Murray GI: Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. J Pathol 1999, 189(3):300-308
- 101. Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y: Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *Journal of Biological Chemistry* 1997, 272(4):2446-2451
- 102. Würtz SÃ, Schrohl AS, SÃ, rensen NM, Lademann U, Christensen IJ, Mouridsen H, Brünner N: Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in breast cancer. In., vol. 12; 2005: 215-227
- 103. Grieken REV, Markowicz AA: Handbook of X-Ray Spectrometry. New York: Marcel Dekker; 2001
- 104. Bittencourt JC, Elias CF: Métodos em Neurociência, 1 edn. São Paulo: ROCA; 2007
- 105. Benninghoff L, vonCzarnowski D, Denkhaus E, Lemke K: Analysis of human tissues by total reflection X-ray fluorescence. Application of chemometrics for diagnostic cancer recognition. Spectroc Acta Pt B-Atom Spectr 1997, 52(7):1039-1046
- 106. Drake EN, Skypeck HH: Discriminant-Analysis of Trace-Element Distribution in Normal and Malignant Human-Tissues. Cancer Research 1989, 49(15):4210-4215
- 107. Ng KH, Ong SH, Bradley DA, Looi LM: Discriminant analysis of normal and malignant breast tissue based upon INAA investigation of elemental concentration. *Appl Radiat Isot* 1997, 48(1):105-109
- Martinez EZ, Louzada-Neto F, Pereira BdB: A curva ROC para testes diagnósticos. Cadernos Saúde Coletiva 2003, 11(1):7-31
- 109. Zweig MH, Campbell G: Receiver-Operating Characteristic (Roc) Plots a Fundamental Evaluation Tool in Clinical Medicine. Clinical Chemistry 1993, 39(4):561-577
- 110. Conover W: Practical Nonparametric Statistic. New York: John Whiley & Sons; 1980
- 111. Hair JF, Anderson RE, Tatham RL, Black WC: Multivariate Data Analysis, 5^a edn. New Jersey: Prentice Hall; 1998
- 112. Fawcett T: An introduction to ROC analysis. Pattern Recognit Lett 2006, 27(8):861-874
- 113. Obuchowski NA: Receiver operating characteristic curves and their use in radiology. *Radiology* 2003, **229**(1):3-8
- 114. Pszonicki L, Hanna AN: Report on the Intercomparison V-10 of the Determination of Trace Elements in Hay Powder. In. Vienna: IAEA; 1985
- 115. Zucchi O, Moreira S, Salvador MJ, Santos LL: Multielement analysis of soft drinks by X-ray fluorescence spectrometry. J Agric Food Chem 2005, 53(20):7863-7869
- 116. Vives AES, Moreira S, Brienza SMB, Zucchi O, Nascimento VF: Analysis of fish samples for environmental monitoring and food safety assessment by synchrotron radiation total reflection Xray fluorescence. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 2006, 270(1):231-236

- 117. Bolann BJ, Rahil-Khazen R, Henriksen H, Isrenn R, Ulvik RJ: Evaluation of methods for trace-element determination with emphasis on their usability in the clinical routine laboratory. Scand J Clin Lab Invest 2007, 67(4):353-366
- 118. Bertin EP: Introduction to X-ray spectrometric analysis. New York: Plenum Press; 1978
- 119. Karjou J: Matrix effect on the detection limit and accuracy in total reflection X-ray fluorescence analysis of trace elements in environmental and biological samples. Spectroc Acta Pt B-Atom Spectr 2007, 62(2):177-181
- 120. Pavlinskii GV, Smagunova AN, Karpukova OM, Bolormaa O, Dorzh D: Sources of error in total reflection X-ray fluorescence analysis and error correction using the internal standard method. *Journal of Analytical Chemistry* 2002, 57(3):185-193
- 121. Schmeling R, Alt F, Klockenkamper R, Klockow D: Multielement analysis by total reflection X-ray fluorescence spectrometry for the certification of lichen research material. Fresenius Journal of Analytical Chemistry 1997, 357(8):1042-1044
- 122. Farquharson MJ, Al-Ebraheem A, Theodorakou C, Ryan E, Bradley DA, Gurusamy K, Davidson B: Measurement of K, Fe, Cu and Zn levels in secondary colorectal liver cancer and surrounding normal liver tissue, and their potential as a tissue classifier. X-Ray Spectrom 2009, 38(2):81-88
- 123. Perez CA, Radtke M, Sanchez HJ, Tolentino H, Neuenshwander RT, Barg W, Rubio M, Bueno MIS, Raimundo IM, Rohwedder JJR: Synchrotron radiation x-ray fluorescence at the LNLS: Beamline instrumentation and experiments. X-Ray Spectrom 1999, 28(5):320-326
- 124. (IAEA) IAEA: Quantitative X-ray analysis system (QXAS) software package. In., 3.6 edn: International Atomic Energy Agency; 2006
- 125. Marquardt DW: An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters. *Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics* 1963, **11**(2):431-441
- 126. Strachnov VI, Schelenz RFW, Dekner R, Zeiller E, Burns K: Report on the Intercomparison Run IAEA-153: Trace Elements in Milk Powder. In. Vienna: IAEA; 1989
- ICRU ICoRUaM-: Tissue substitutes in radiation dosimetry and measurement. In. Bethesda: ICRU; 1989
- 128. Sole VA, Papillon E, Cotte M, Walter P, Susini J: A multiplatform code for the analysis of energydispersive X-ray fluorescence spectra. Spectroc Acta Pt B-Atom Spectr 2007, 62(1):63-68
- 129. Pellikainen JM, Ropponen KM, Kataja VV, Kellokoski JK, Eskelinen MJ, Kosma VM: Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis. *Clin Cancer Res* 2004, 10(22):7621-7628
- Cunha DM, Oliveira OR, Perez CA, Poletti ME: X-ray scattering profiles of some normal and malignant human breast tissues. X-Ray Spectrom 2006, 35(6):370-374
- 131. Rodrigues JA, Hug I, Diniz MB, Lussi A: Performance of fluorescence methods, radiographic examination and ICDAS II on occlusal surfaces in vitro. *Caries Research* 2008, **42**(4):297-304
- 132. Kroman N, Jensen MB, Wohlfahrt J, Mouridsen HT, Andersen PK, Melbye M: Factors influencing the effect of age on prognosis in breast cancer: population based study. Br Med J 2000, 320(7233):474-478

- Kaplan EL, Meier P: Nonparametric-Estimation from Incomplete Observations. Journal of the American Statistical Association 1958, 53(282):457-481
- Bland JM, Altman DG: Statistics notes Survival probabilities (the Kaplan-Meier method). Br Med J 1998, 317(7172):1572-1572
- Dawson-Saunders B, Trapp RG: Basic and clinical biostatistics. Conneticut: Norwalk: Appleton & Lange; 1994
- Ng KH, Bradley DA, Looi LM: Elevated trace element concentrations in malignant breast tissues. British Journal of Radiology 1997, 70(832):375-382
- 137. Hunter CP: Epidemiology, stage at diagnosis, and tumor biology of breast carcinoma in multiracial and multiethnic populations. *Cancer* 2000, **88**(5):1193-1202
- Deng GR, Lu Y, Zlotnikov G, Thor AD, Smith HS: Loss of heterozygosity in normal tissue adjacent to breast carcinomas. *Science* 1996, 274(5295):2057-2059
- 139. Forsti A, Louhelainen J, Soderberg M, Wijkstrom H, Hemminki K: Loss of heterozygosity in tumouradjacent normal tissue of breast and bladder cancer. European Journal of Cancer 2001, 37(11):1372-1380
- 140. Jensen HM, Chen I, Devault MR, Lewis AE: Angiogenesis Induced by Normal Human-Breast Tissue a Probable Marker for Pre-Cancer. Science 1982, 218(4569):293-295
- 141. Pan Q, Kleer CG, van Golen KL, Irani J, Bottema KM, Bias C, De Carvalho M, Mesri EA, Robins DM, Dick RD *et al*: Copper deficiency induced by tetrathiomolybdate suppresses tumor growth and angiogenesis. *Cancer Research* 2002, 62(17):4854-4859
- Baker R, Rogers KD, Shepherd N, Stone N: New relationships between breast microcalcifications and cancer. *British Journal of Cancer* 2010, 103(7):1034-1039
- 143. Wright RM, McManaman JL, Repine JE: Alcohol-induced breast cancer: A proposed mechanism. Free Radic Biol Med 1999, 26(3-4):348-354
- 144. Faulk WP, Hsi BL, Stevens PJ: Transferrin and Transferrin Receptors in Carcinoma of the Breast. Lancet 1980, 2(8191):390-392
- 145. Brem SS, Zagzag D, Tsanaclis AMC, Gately S, Elkouby MP, Brien SE: Inhibition of Angiogenesis and Tumor-Growth in the Brain - Suppression of Endothelial-Cell Turnover by Penicillamine and the Depletion of Copper, an Angiogenic Cofactor. American Journal of Pathology 1990, 137(5):1121-1142
- 146. Tapia L, Suazo M, Hodar C, Cambiazo V, Gonzalez M: Copper exposure modifies the content and distribution of trace metals in mammalian cultured cells. *Biometals* 2003, **16**(1):169-174
- 147. Jian JL, Yang Q, Dai JS, Eckard J, Axelrod D, Smith J, Huang X: Effects of iron deficiency and iron overload on angiogenesis and oxidative stress-a potential dual role for iron in breast cancer. Free Radic Biol Med 2011, 50(7):841-847
- 148. Huang X: Does iron have a role in breast cancer? Lancet Oncology 2008, 9(8):803-807
- Le NTV, Richardson DR: The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta-Rev Cancer* 2002, 1603(1):31-46
- 150. Dunst J, Pigorsch S, Hansgen G, Hintner I, Lautenschlager C, Becker A: Low hemoglobin is associated with increased serum levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cancer patients - Does anemia stimulate angiogenesis? *Strahlentherapie Und Onkologie* 1999, 175(3):93-96

- 151. Kwiatek WM, Banas A, Banas K, Gajda M, Galka M, Falkenberg G, Cichocki T: Iron and other elements studies in cancerous and non-cancerous prostate tissues. *Journal of Alloys and Compounds* 2005, 401(1-2):178-183
- 152. Brewer GJ, Dick RD, Grover DK, LeClaire V, Tseng M, Wicha M, Pienta K, Redman BG, Jahan T, Sondak VK *et al*: Treatment of Metastatic Cancer with Tetrathiomolybdate, an Anticopper, Antiangiogenic Agent: Phase I Study. In., vol. 6; 2000: 1-10
- 153. Gasparini G: Prognostic Value of Vascular Endothelial Growth Factor in Breast Cancer. The Oncologist 2000, 5(suppl 1):37-44
- 154. La Rosa S, Sessa F, Colombo L, Tibiletti MG, Furlan D, Capella C: Expression of acidic fibroblast growth factor (aFGF) and fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) in breast fibroadenomas. J Clin Pathol 2001, 54(1):37-41
- 155. Anandappa SY, Winstanley JHR, Leinster S, Green B, Rudland PS, Barraclough R: Comparative Expression of Fibroblast Growth-Factor Messenger-Rnas in Benign and Malignant Breast Disease. British Journal of Cancer 1994, 69(4):772-776
- 156. Penaultllorca F, Bertucci F, Adelaide J, Parc P, Coulier F, Jacquemier J, Birnbaum D, Delapeyriere O: Expression of Fgf and Fgf Receptor Genes in Human Breast-Cancer. Int J Cancer 1995, 61(2):170-176
- 157. Yoshimura N, Sano H, Hashiramoto A, Yamada R, Nakajima H, Kondo M, Oka T: The expression and localization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1) and FGF receptor-1 (FGFR-1) in human breast cancer. *Clin Immunol Immunopathol* 1998, 89(1):28-34
- 158. Oteiza PI, Olin KL, Fraga CG, Keen CL: Zinc-Deficiency Causes Oxidative Damage to Proteins, Lipids and DNA in Rat Testes. *Journal of Nutrition* 1995, 125(4):823-829
- Prasad AS, Oberleas D: Trace Elements in Human Health and Disease. New York: Academic Press; 1976
- Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ: Human endothelial gelatinases and angiogenesis. Int J Biochem Cell Biol 2001, 33(10):960-970
- 161. Solai F, Nardo T, Patrizi G, Annessi M, Santulli M, Amabile MI, Vasaturo F: Comparison of plasma matrix metalloproteases 2, 3, 9 in breast carcinomas and fibroadenomas. G Chir 2010, 31(8-9):365-367
- 162. Huang YL, Sheu JY, Lin TH: Association between oxidative stress and changes of trace elements in patients with breast cancer. Clin Biochem 1999, 32(2):131-136
- Diaz N, Suarez D: Molecular dynamics simulations of matrix metalloproteinase 2: Role of the structural metal ions. *Biochemistry* 2007, 46(31):8943-8952
- Maurer P, Hohenester E: Structural and functional aspects of calcium binding in extracellular matrix proteins. *Matrix Biology* 1997, 15(8-9):569-580
- 165. Borkakoti N: Structural studies of matrix metalloproteinases. J Mol Med 2000, 78(5):261-268