**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FÍSICA**

ANDRÉ LUIZ COELHO CONCEIÇÃO

**ESTUDO DAS ORGANIZAÇÕES MOLECULARES E
SUPRAMOLECULARES DE TECIDOS MAMÁRIOS
NORMAIS E NEOPLÁSICOS POR ESPALHAMENTO DE
FÓTONS**

RIBEIRÃO PRETO, SP – BRASIL

JANEIRO DE 2011

ANDRÉ LUIZ COELHO CONCEIÇÃO

**ESTUDO DAS ORGANIZAÇÕES MOLECULARES E
SUPRAMOLECULARES DE TECIDOS MAMÁRIOS
NORMAIS E NEOPLÁSICOS POR ESPALHAMENTO DE
FÓTONS**

Versão corrigida da tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada à Medicina e Biologia

Orientador: Prof. Dr. Martin Eduardo Poletti

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Conceição, André Luiz Coelho

Estudo das organizações moleculares e supramoleculares de tecidos mamários normais e neoplásicos por espalhamento de fótons / André Luiz Coelho Conceição; Orientação: Prof. Dr. Martin Eduardo Poletti, Ribeirão Preto: FFCLRP / USP, 2011.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, 2011.

1. Espalhamento de Raios-X.	3. Câncer de mama.
2. Tecido mamário.	4. Radiodiagnóstico.

Nome: ANDRÉ LUIZ COELHO CONCEIÇÃO

Título: Estudo das organizações moleculares e supramoleculares de tecidos mamários normais e neoplásicos por espalhamento de fótons

Esta tese foi julgada adequada à obtenção do grau de Doutor em Ciências e aprovada em sua forma final pelo Curso de Doutorado em Física Aplicada à Medicina e Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo.

Ribeirão Preto, ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Martin Eduardo Poletti
Orientador - Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Sauli dos Santos Junior
Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Alessandro Martins da Costa
Universidade de São Paulo

Prof. Dra. Iris Concepcion Linares de Torriani
Universidade de Campinas

Prof. Dr. Carlos Manuel Giles Antúñez de Mayolo
Universidade de Campinas

*“Aplica o coração ao ensino e os ouvidos
às palavras do conhecimento”.*

Provérbios 23:12

*Dedico este trabalho à Débora,
meus pais e meu irmão.*

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é o resultado de um esforço coletivo de todas as pessoas que participaram do meu desenvolvimento pessoal e profissional. Não há palavras que consigam descrever o verdadeiro e imensurável sentimento de gratidão a todas elas:

À Deus, pela vida, saúde, paz, iluminação, força de vontade e oportunidades a mim concedidas.

À minha noiva e futura esposa Débora pelo amor e compreensão dedicados a mim durante o desenvolvimento deste trabalho, bem como os aconselhamentos que me fizeram crescer como pessoa.

À toda minha família, em especial aos meus pais, Osmar e Ana, e meu irmão, Flávio, pelo amor e incentivos incondicionais.

Ao Prof. Dr. Martin Eduardo Poletti, pelo excelente trabalho de orientação tanto na parte técnica ao longo do programa de mestrado, quanto em ensinamentos para a vida.

Aos companheiros do grupo Física das Radiações e Dosimetria pela sabedoria compartilhada.

À Prof^ª. Dra. Iris Concepcion Linares de Torriani pelo apoio, disposição e conhecimento transmitido na área de SAXS.

Ao Prof. Dr. Alfredo Ribeiro Silva, pela experiência transmitida na área de patologia de doenças mamárias.

Aos técnicos Eldereis de Paula e José Luis Aziani, pela ajuda na montagem e manutenção técnica do laboratório de física das radiações e dosimetria.

Ao Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto pelas amostras de tecido mamário cedidas, sem as quais este trabalho não se tornaria possível.

Ao pessoal das secretarias do Departamento de Física e Matemática e da Faculdade de Filosofia, de Ciências e Letras da USP de Ribeirão Preto, pela, sempre presente, boa vontade nos atendimentos.

Aos grandes amigos de Santa Rosa de Viterbo, por estarem sempre próximos tanto nos momentos difíceis, como nos de lazer e diversão, bem como aos novos amigos encontrados em Ribeirão Preto, pelo companheirismo sempre presente.

Em especial aos amigos Rafael, Jonathas, Júlio e Theo pelo companheirismo, incentivo e aprendizado profissional e principalmente pessoal.

Aos funcionários do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron pelos inúmeros auxílios prestados, tanto no momento da realização das medidas, quanto em dúvidas posteriores, principalmente ao pessoal das linhas XRD-1, SAXS-1 e SAXS-2.

À FAPESP, pela concessão da bolsa ao projeto “*Estudo das organizações moleculares e supramoleculares de tecidos mamários normais e neoplásicos por espalhamento de fótons*”, processo 2008/55147-8 e pelo apoio financeiro ao projeto Jovem Pesquisador em centros emergentes “*Caracterização Histopatológica de Tecidos Mamários através da Radiação Secundária*”, processo 02/00380-3.

RESUMO

CONCEIÇÃO, A. L. C. *Estudo das organizações moleculares e supramoleculares de tecidos mamários normais e neoplásicos por espalhamento de fótons*. [Tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2011. 105 p.

A radiação espalhada em radiodiagnóstico, como em mamografia, é usualmente considerada um problema, uma vez que degrada o contraste da imagem. No entanto, pesquisas recentes mostram que a distribuição angular de fótons espalhados (perfil de espalhamento) pode fornecer informações sobre as estruturas que compõem um tecido biológico, permitindo, a partir da análise desta, identificar a presença de anormalidades no tecido.

Neste estudo, foram utilizadas as técnicas de espalhamento de raios X em médio (WAXS) e baixo (SAXS) ângulo para determinar o perfil de espalhamento de tecidos mamários previamente classificados como: tecidos normais (adiposo e fibroglandular), neoplasias benignas e malignas, usando um tubo de raios X e radiação síncrotron. Através das informações de cada perfil foi possível identificar algumas estruturas moleculares e supramoleculares presentes nos tecidos estudados. Além disso, foi construído um modelo de classificação baseado na análise de discriminante dos perfis de espalhamento, o qual permitiu classificar corretamente todas as amostras analisadas neste estudo, quando combinadas as informações das regiões de médio e baixo ângulo. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho sugerem a possibilidade do desenvolvimento de novas técnicas radiológicas que permitiriam ampliar a capacidade de diagnóstico do câncer mamário.

Palavras chave: espalhamento de raios X, tecido mamário, análise estatística.

ABSTRACT

CONCEIÇÃO, A. L. C. *Study of molecular and supramolecular structures of normal and neoplastic human breast tissue by photon scattering*. [Tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2011. 105 p.

Scattering radiation in diagnostic radiology, such as mammography, is usually considered a problem, since it degrades the image contrast. However, recent investigations show that the angular distribution of scattered photons (scattering profile) can provide information about the structures that compose a biological tissue, allowing, from the analysis of the scattering profile, identify the presence of abnormalities in the tissue.

In this study, we have used the wide angle x-ray scattering (WAXS) and small angle x-ray scattering (SAXS) techniques to determine the scattering profiles of human breast tissues previously classified as: normal tissue (adipose and fibroglandular), benign or malignant neoplasia, using a x-ray tube and synchrotron radiation. Through the information provide by each profile was possible to identify some molecular and supramolecular structures present in these tissues. In addition, we built a classification model based on discriminant analysis of scattering profiles, which enabled the correct classification of all samples analyzed in this study, when combined information from WAXS and SAXS regions. Therefore, the results obtained in this work suggest the possibility of developing new radiological techniques would expand the capability of breast cancer diagnosis.

Keywords: x-ray scattering, human breast tissue, statistical analysis

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Diagrama que ilustra a formação da imagem radiográfica convencional considerando a radiação transmitida primária e espalhada. (a) paciente; (b) intensidade da radiação que atinge o filme: B1 representa a radiação espalhada e B2 a total (transmitida + espalhada); (c) imagem radiográfica.....	6
Figura 3.1: Estrutura anatômica da mama (a) e (b). As glândulas mamárias, as quais consistem de lóbulos, são embebidas em tecido adiposo e circundadas por tecido conjuntivo.....	13
Figura 3.2: Tipos de neoplasias.....	16
Figura 3.3: Lâmina histológica de uma amostra de carcinoma ductal, indicando calcificações, necroses, além das células cancerosas. A área rosada na figura corresponde à matriz extracelular, formada principalmente por colágeno. Além disso, observa-se a membrana basal ao redor do ducto.....	17
Figura 3.4: Espectro eletromagnético exibindo a região correspondente aos raios X (retângulo vermelho)...	18
Figura 3.5: Esquema de funcionamento de um wiggler, o qual deve ser inserido em linha reta nas instalações de um síncrotron.....	20
Figura 3.6: Geometria do espalhamento; (a) vetor espalhamento como resultante; (b) a diferença de fase é dada pela diferença de caminhos ópticos. A linha mais espessa é o comprimento do caminho máximo.....	22
Figura 3.7: Seção de choque diferencial Thomson em função do ângulo de espalhamento.	23
Figura 3.8: Fator de forma $F(q, Z)$ para o átomo de Oxigênio reportado por Hubbell <i>et al.</i> (1975).	25
Figura 3.9: Seção de Choque Diferencial para o espalhamento Rayleigh para o átomo de Oxigênio para fótons de 17,44 keV.....	25
Figura 3.10: Fator de forma da molécula de H ₂ O, $F_{mol}(q)$, obtido utilizando distribuição de densidade eletrônica e $F_{mol}^{MAI}(q)$ alcançado através do modelo atômico independente.....	27
Figura 3.11: Seção de choque diferencial elástica para (i) água líquida a 20°C de MORIN (1982), (ii) molécula de água (MAI).....	28
Figura 3.12: Padrão de SAXS de fibras de colágeno orientadas. Da imagem é possível extrair o raio da fibra (R=70nm), a distância entre os centros de duas fibras adjacentes (D=100nm) na direção equatorial e a periodicidade axial da densidade eletrônica da fibra (d=65nm) na direção meridional [Fernández <i>et al.</i> , 2002].	30
Figura 3.13: Visualização da aplicação da análise de discriminante a um conjunto de dados de duas populações. A função discriminante Z otimiza a separação entre as duas populações bivariadas.	33
Figura 4.1: Diagrama do processo de liofilização.	38
Figura 4.2: Arranjo experimental para as medidas de difração de raios X.....	39
Figura 4.3: Fatores de correção para obtenção do μ_{CS} : a) medida experimental das contribuições espúrias; b) variação da intensidade do feixe incidente experimental; c) comportamento do fator de polarização; d) Fator de atenuação teórico para uma amostra de água.....	42
Figura 4.4: (a) comparação do coeficiente linear de espalhamento elástico para água líquida obtido experimentalmente com o reportado por Morin (1982); (b) diferença relativa entre as curvas da figura (a)...	44
Figura 4.5: Distribuição histopatológica das amostras de tecidos analisadas neste experimento.....	45
Figura 4.6: Esboço de posicionamento do porta-amostra no difrattômetro Huber.	45
Figura 4.7: Montagem experimental na linha D12A - XRD1 no LNLS.	46
Figura 4.8: Fatores de correção dos dados experimentais: a) medida experimental do espalhamento por contribuições espúrias; b) Comportamento do fator de atenuação e efeitos geométricos de uma amostra de água líquida na geometria de transmissão.	47

Figura 4.9. a) coeficiente linear de espalhamento elástico experimental para água comparado com o tabulado por Morin (1982); b) Diferença relativa entre as duas curvas exibidas em a).....	47
Figura 4.11: Esboço da montagem experimental padrão para experimentos de SAXS.....	48
Figura 4.13: Montagem experimental da linha D11A-SAXS1 no LNLS utilizada para as medidas combinando WAXS e SAXS simultaneamente.....	52
Figura 4.14: Imagens de WAXS. Da esquerda para a direita, cada faixa corresponde à distribuição de intensidade espalhada de: três tipos de tecidos mamários (normal, maligno e benigno), contribuições espúrias e amostra padrão de alumina.	53
Figura 4.15: Intensidade espalhada por contribuições espúrias para os experimentos de: a) SAXS e b) WAXS.	53
Figura 4.16: Arranjo experimental para determinação da densidade das amostras	55
Figura 5.1: Perfil de espalhamento de amostras típicas dos três tipos de tecidos mamários estudados neste trabalho utilizando WAXS. A categoria denominada tecido normal foi subdividida em normal adiposo e normal fibroglandular.....	57
Figura 5.2: Lâmina histológica de uma amostra de tecido normal adiposo onde é possível visualizar os adipócitos	58
Figura 5.3: Lâmina histológica de uma amostra de tecido neoplásico: em a) neoplasia benigna (fibroadenoma) e em b) neoplasia maligna (carcinoma ductal invasivo).....	59
Figura 5.4: Perfil de espalhamento de uma amostra de carcinoma ductal invasivo destacando a presença de calcificação.....	60
Figura 5.5: Distribuição das amostras no espaço discriminante Função 1 x Função 2. Os símbolos sem preenchimento representam os centróides de cada grupo.....	61
Figura 5.6: Coeficiente linear de espalhamento elástico de amostras de tecido mamário normal e neoplásico. Comparação entre amostras em estado natural e liofilizados de: a) tecido normal; b) neoplasia benigna e c) neoplasia maligna. A figura 5.6-d compara o μ_{cs} para amostras típicas de tecido mamário normal adiposo, neoplasia benigna e maligna em estado liofilizado.	63
Figura 5.7: Comparação com a literatura dos perfis de espalhamento típicos dos três grupos de tecidos analisados neste trabalho: a) tecido normal; b) neoplasia benigna e c) neoplasia maligna.	64
Figura 5.8: Perfil de espalhamento de amostras típicas dos três tipos de tecidos mamários estudados neste trabalho utilizando SAXS. A categoria denominada tecido normal foi subdividida em normal adiposo e normal fibroglandular.....	66
Figura 5.9: Representação esquemática do arranjo hierárquico do colágeno fibrilar de tecidos mamários, exibindo ainda seus parâmetros dimensionais.....	67
Figura 5.10: Distribuição das amostras no espaço discriminante Função 1 x Função 2. Os símbolos sem preenchimento representam os centróides de cada grupo.....	67
Figura 5.11: Perfil de espalhamento de amostras de tecido mamário normal e neoplásico na região de SAXS. Comparação entre amostras em estado natural e liofilizados de: a) tecido normal adiposo; b) neoplasia benigna e c) neoplasia maligna. A figura 5.11d compara o perfil de espalhamento de amostras típicas de tecido mamário normal adiposo, neoplasia benigna e maligna em estado liofilizado para a menor região de momento transferido medida.	69
Figura 5.12: Comparação dos perfis de espalhamento em SAXS de trabalhos prévios com este. Em a) para tecidos normais e em b) para neoplasia maligna.	70
Figura 5.13: Perfil de espalhamento na região de amostras típicas de tecido normal, neoplasia benigna e maligna. Em a) para WAXS e em b) para SAXS.....	71

Figura 5.14: Coeficiente linear de espalhamento elástico total (μ_{CS}), incluindo os dados teóricos computados usando o Modelo Atômico Independente (MAI) para os tecidos normal adiposo e fibroglandular (POLETTI *et al.*, 2002b). 73

Figura 5.15: Distribuição das amostras no espaço discriminante Função 1 x Função 2. Os símbolos sem preenchimento representam os centróides de cada grupo. 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Composição química elementar dos três tipos de tecidos mamários estudados.....	54
Tabela 4.2. Densidade física das amostras de tecidos mamários normais e neoplásicos.....	55
Tabela 4.3. Comparação dos parâmetros físicos das amostras em estado natural e liofilizado	55
Tabela 5.1. Picos dos três tipos de tecidos mamários histologicamente classificados.....	60
Tabela 5.2. Eficácia e Validação do modelo diagnóstico em WAXS.....	61
Tabela 5.3. Eficácia dos modelos de classificação previamente publicados.	62
Tabela 5.4. Eficácia e Validação do modelo diagnóstico em SAXS.	68
Tabela 5.5. Eficácia dos modelos de classificação previamente publicados.	68
Tabela 5.5. Variação do espaçamento axial das fibras de colágeno devido ao processo de liofilização	70
Tabela 5.6. Eficácia e Validação do modelo diagnóstico baseado no $\mu_{CS}(q)$	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADXRD: Difração de raios X dispersivo em ângulo

EDXRD: Difração de raios X dispersivo em energia

HPGe: detector de Germânio Hiperpuro

LNLS: Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

MAI: Modelo Atômico Independente

NaI(Tl): Iodeto de sódio ativado com Tálcio

PMMA: Polimetilmetacrilato

PVC: Policloreto de vinila

Al₂O₃: Alumina

SAXS: Small Angle X-ray Scattering (Espalhamento de raios X em baixos ângulos)

WAXS: Wide Angle X-Ray Scattering (Espalhamento de raios X em médios ângulos)

LISTA DE SÍMBOLOS

$A(q)$: fator de correção para atenuação e efeitos geométricos

C : fator de normalização

$F(q)$: fator de forma

I_R : Intensidade Relativa

$K(q)$: fator de correção para variação da intensidade do feixe para manter área de irradiação constante

n_V : número de átomos por unidade de volume (igual a $(N_A \cdot \rho / M)$, sendo N_A a constante de Avogadro, ρ a densidade e M a massa molecular).

$P(q)$: fator de correção para polarização

q : momento transferido; dado por $q=(4\pi \cdot \sin(\theta/2))/\lambda$.

θ : ângulo de espalhamento

λ : comprimento de onda da radiação

μ_{CS} : coeficiente linear de espalhamento elástico.

Sumário

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2. HISTÓRICO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. O ESPALHAMENTO NO RADIODIAGNÓSTICO: DESVANTAGEM	5
2.2. O ESPALHAMENTO COMO FONTE DE INFORMAÇÃO ESTRUTURAL DE TECIDOS BIOLÓGICOS: VANTAGEM	6
CAPÍTULO 3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	13
3.1. ASPECTOS CLÍNICOS DA MAMA.....	13
3.1.1. <i>Anatomia da mama</i>	13
3.1.2. <i>Histologia da mama</i>	14
3.1.3. <i>Patologias mamárias</i>	15
3.2. FONTES DE RAIOS X	18
3.2.1. <i>Tubo de raios X</i>	18
3.2.2. <i>Síncrotron</i>	19
3.3. INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO COM A MATÉRIA.....	20
3.3.1. <i>Espalhamento Elástico – Seção de choque diferencial</i>	23
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA – MODELO DIAGNÓSTICO: ASPECTOS GERAIS.....	31
3.4.1. <i>Análise de Discriminante</i>	31
3.4.2. <i>Crítério de Classificação</i>	35
3.4.3. <i>Eficácia dos modelos de classificação</i>	35
CAPÍTULO 4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1. AMOSTRAS	37
4.2. EXPERIÊNCIAS DE ESPALHAMENTO ELÁSTICO DE RAIOS X.....	38
4.2.1. <i>Espalhamento de raios X em médio ângulo (WAXS) usando tubo de raios X</i>	38
4.2.2. <i>Espalhamento de raios X em médio ângulo (WAXS) usando radiação síncrotron</i>	44
4.2.3. <i>Espalhamento de raios X em baixo ângulo (SAXS)</i>	48
4.2.4. <i>Combinação simultânea das técnicas de WAXS e SAXS</i>	51
4.3. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO ELEMENTAR E DENSIDADE DAS AMOSTRAS DE TECIDOS MAMÁRIOS	54
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
4.4.1. <i>Obtenção das Funções Discriminantes</i>	56
4.4.1. <i>Modelo de classificação</i>	56
CAPÍTULO 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	57
5.1. ESPALHAMENTO DE RAIOS X EM MÉDIO ÂNGULO (WAXS)	57

5.1.1. Perfil de espalhamento (μ_{cs}): determinação de estruturas moleculares e análise estatística.....	57
5.1.2. Influência da Água	62
5.1.3. Comparação com a literatura.....	64
5.2. ESPALHAMENTO DE RAIOS X EM BAIXO ÂNGULO (SAXS)	65
5.2.1. Perfil de espalhamento: determinação de estruturas supramoleculares e análise estatística.....	65
5.2.2. Influência da Água	69
5.2.3. Comparação com a literatura.....	70
5.3. COMBINAÇÃO SIMULTÂNEA DE WAXS E SAXS	71
5.4. COEFICIENTE LINEAR DE ESPALHAMENTO ELÁSTICO TOTAL - $M_{cs}(Q)$	72
CAPÍTULO 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	75
6.1. CONCLUSÕES.....	75
6.1.1. Sobre os perfis de espalhamento em WAXS	75
6.1.2. Sobre os perfis de espalhamento em SAXS	76
6.1.3. Sobre o coeficiente linear de espalhamento elástico total	76
6.1.5. Sobre a análise estatística: potencialidade dos perfis de espalhamento como ferramenta de diagnóstico	77
6.2. PERSPECTIVAS.....	78
REFERÊNCIAS	79
APÊNDICE A. PRODUÇÃO CIENTÍFICA	87
A1. ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS.....	87
A2. ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO.....	87
A3. COMUNICAÇÕES E RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS OU PERIÓDICOS	88

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer de mama é o tipo de maior incidência entre as mulheres, e responsável por cerca de 20% de todas as mortes devido ao câncer. Mantendo-se esta tendência, até 2015 cerca de 83,2 milhões de mulheres deverão vir a óbito (<http://www.who.int/cancer>). Particularmente no Brasil, conforme estimativas do Instituto Nacional de Câncer, deverão surgir cerca de 49 mil casos de câncer de mama em 2011 (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2009). Todavia, se o câncer de mama é diagnosticado e tratado em sua fase inicial, aproximadamente 90% dos pacientes podem ser curados (SEIDMAN *et al.*, 1982; MICHAELSON *et al.*, 2002).

Dentre as muitas técnicas de detecção de neoplasias mamárias utilizadas atualmente, que incluem a imagem por ressonância magnética nuclear (OREL *et al.*, 1997), ultrassom (SHANKAR, *et al.*, 2003) e a mamografia (FREEDMAN, *et al.*, 2003), esta última é a mais empregada clinicamente para a detecção precoce do câncer de mama. Porém, devido a limitações inerentes a essa técnica, alguns diagnósticos falso-positivo e falso-negativo acontecem, resultando em casos de câncer não diagnosticados ou biópsias desnecessárias, respectivamente (MUSHLIN *et al.*, 1998; SOUHAMI e TOBIAS, 1998). Este fato ocorre principalmente, devido à pequena diferença nas propriedades de atenuação dos tecidos mamários e à ocorrência de efeitos de espalhamento (inelástico e elástico), fatores esses que degradam o contraste da imagem, diminuindo a eficácia de detecção desse exame (KOCH *et al.*, 1996; BARNES, 1991; POLETTI, 1997; FREITAS, 2006).

No intervalo de energia usado em mamografia, 50% da radiação transmitida pela mama é devido aos fótons espalhados (CUNHA *et al.*, 2010). Ainda, em virtude de os fótons espalhados serem provenientes da interação com o tecido, eles carregam informações sobre a organização estrutural destes (SPELLER, 1999). Dessa forma, uma avaliação da distribuição angular dos fótons espalhados elasticamente (perfil de espalhamento) poderia fornecer detalhes sobre possíveis alterações estruturais ocorridas devido à presença de alguma neoplasia mamária. Neste sentido, pesquisadores têm investigado as propriedades de espalhamento dos tecidos mamários visando identificar a presença de patologia (KIDANE *et al.*, 1999; LEWIS *et al.*, 2000; POLETTI *et al.*, 2002a,b; FERNÁNDEZ *et al.*, 2002, 2004; ROUND *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2008 e CONCEIÇÃO *et al.*, 2009, 2010a,b,c,d). Portanto, torna-se necessário a determinação precisa dos perfis de espalhamento (KOSANETZKY *et al.*, 1987; BRADLEY *et al.*, 1989; POLETTI *et al.*, 2002c).

Os perfis de espalhamento dos tecidos mamários são decorrentes da interferência construtiva dos fótons espalhados pelos diferentes tipos de tecido que compõem a mama em seus diversos níveis de organização. Os perfis de espalhamento são definidos pelas estruturas atômicas, moleculares e supramoleculares, sendo determinados experimentalmente através das técnicas de espalhamento Rayleigh, difração ou também denominado espalhamento de raios X em médio ângulo, do inglês *Wide Angle X-ray Scattering* (WAXS), e espalhamento de raios X em baixo ângulo do inglês, *Small Angle X-ray Scattering* (SAXS), respectivamente. Entretanto, como o enfoque deste trabalho está no estudo de organizações moleculares e supramoleculares, apenas as duas últimas técnicas serão estudadas.

A técnica de WAXS permite obter correlações eletrônicas espaciais de pequena escala das estruturas que compõem as células de um tecido, por exemplo água e moléculas de ácidos graxos (PEPLOW e VERGHESE, 1998; KIDANE *et al.*, 1999; POLETTI *et al.* 2002a, 2002b; CUNHA *et al.*, 2006; GRIFFITHS *et al.*, 2007; RYAN *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2008; CONCEIÇÃO *et al.*, 2010c,d). Enquanto a técnica de SAXS possibilita a determinação de características de sistemas moleculares como proteínas e fibras de colágeno (ROGERS *et al.*, 1999; LEWIS *et al.*, 2000; FERNÁNDEZ *et al.*, 2002, 2004, 2005; ROUND *et al.*, 2005; SIDHU, *et al.*, 2008; CONCEIÇÃO *et al.*, 2009). Dessa forma, a combinação dos dados obtidos com ambas as técnicas permitiria correlacionar as informações sobre possíveis mudanças estruturais em escala molecular com aquelas ocorridas em nível supramolecular.

Logo, a análise estatística das informações estruturais obtidas com as técnicas de WAXS e SAXS pode fornecer dados para o desenvolvimento de uma possível ferramenta para diagnóstico do câncer de mama.

Embora existam trabalhos publicados relatando a aplicação das técnicas de WAXS (KIDANE *et al.*, 1999; POLETTI *et al.*, 2002b; GRIFFITHS *et al.*, 2007; RYAN *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2008) e SAXS (ROGERS *et al.*, 1999; LEWIS *et al.*, 2000; FERNÁNDEZ *et al.*, 2002, 2004, 2005; ROUND *et al.*, 2005; FALZON, *et al.*, 2006; SIDHU *et al.*, 2008; CONCEIÇÃO *et al.*, 2009) em tecidos mamários, existem discordâncias entre os resultados apresentados pelos diferentes autores quanto à metodologia de medida e correções dos dados, bem como, quanto às estruturas observadas e os parâmetros encontrados como variáveis significantes para classificação dos tecidos mamários normais e neoplásicos. Além disso, não existe na literatura nenhum trabalho que tenha aplicado simultaneamente as duas técnicas sobre um mesmo conjunto de amostras de tecidos mamários para identificação de estruturas em escala molecular e supramolecular, exceto por um artigo publicado utilizando resultados preliminares desta pesquisa (CONCEIÇÃO *et al.*, 2010a).

Portanto, este trabalho tem como objetivos:

- Obter os perfis de espalhamento nas regiões de WAXS e SAXS de um grande número de amostras mamárias, englobando principalmente as neoplasias benignas e malignas mais corriqueiras;
- classificar os tecidos mamários baseado na análise estatística das informações extraídas do perfil de espalhamento nas regiões de WAXS e SAXS;
- atualizar o banco de dados de seção de choque diferencial elástica ($d\sigma/d\Omega$) de tecidos mamários incluindo efeitos de arranjo em larga escala e de interferência inter e intra-molecular, a partir de medidas de um grande conjunto de amostras.

Para tal, esta tese foi organizada da seguinte forma:

No capítulo 2 é apresentado um breve histórico do papel da radiação espalhada em radiodiagnóstico, destacando suas vantagens e desvantagens. Seguindo com uma sucinta revisão bibliográfica dos dados publicados sobre a utilização da radiação espalhada como ferramenta para determinação de estruturas moleculares e supramoleculares e classificação de tecidos mamários.

O capítulo 3 apresenta uma breve descrição dos fundamentos teóricos em que este trabalho está baseado. Iniciando-se com uma descrição concisa da mama: anatomia, histologia e patologia. Em seguida, é apresentada uma descrição dos tipos de fontes de radiação a serem utilizados, tubo de raios X convencional e radiação síncrotron. Seguindo pela definição das abordagens para descrever a seção de choque diferencial de espalhamento elástico em diversos sistemas, partindo do caso mais simples, o espalhamento de fótons por um elétron livre, até o caso que envolve um material amorfo (várias moléculas), sendo este último o mais apropriado para descrever o espalhamento por tecidos biológicos. Por fim, são apontados os conceitos envolvidos na análise de discriminante, destacando também os critérios de classificação.

O capítulo 4 apresenta os materiais utilizados para a realização dos experimentos de ambas as técnicas (WAXS e SAXS), bem como a metodologia aplicada às medidas em cada configuração experimental, onde são descritas as correções necessárias para a obtenção dos perfis de espalhamento e os processos para estimar as incertezas associadas a tais perfis e, a validação da metodologia experimental desenvolvida. Ainda, são exibidos os procedimentos utilizados para a obtenção da análise química elementar e a densidade física das amostras. Finalmente, é mostrado o protocolo para a construção de um modelo de classificação de amostras de tecidos mamários baseada na análise de discriminante das informações decorrentes dos perfis de espalhamento.

No capítulo 5, os perfis de espalhamento obtidos por cada técnica são apresentados e, as informações extraídas a partir da análise e interpretações destes são correlacionadas às estruturas presentes nos tecidos mamários normais e neoplásicos. Além disso, são mostrados os resultados

obtidos através da análise estatística dos perfis de espalhamento para cada uma das regiões (WAXS e SAXS) e as comparações com trabalhos prévios. Adicionalmente, o perfil de espalhamento resultante das medidas simultâneas em médio e baixo ângulo é apresentado. Por fim, é mostrado o perfil de espalhamento total, resultante da fusão dos dados nas duas regiões medidas e também, o modelo de classificação baseado nas informações destes perfis.

O capítulo 6 é dedicado às conclusões sobre as técnicas utilizadas, os resultados obtidos, o modelo de classificação e seu potencial diagnóstico, bem como, as perspectivas para trabalhos futuros.

CAPÍTULO 2. HISTÓRICO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentado o papel do espalhamento no radiodiagnóstico, considerando suas vantagens e desvantagens. Além disso, será também apresentada uma breve revisão bibliográfica dos dados publicados sobre a utilização do fenômeno de espalhamento elástico para determinação de estruturas em materiais, principalmente em tecidos mamários, bem como sua aplicabilidade como ferramenta de classificação de tecidos.

2.1. O espalhamento no radiodiagnóstico: desvantagem

As imagens radiográficas convencionais são obtidas através das diferenças de coeficientes de atenuação linear dos diversos tipos de tecidos e materiais, detectando corpos de diferentes densidades e formas em um dado material. A radiação transmitida, composta da radiação primária e espalhada, impressiona um receptor de imagem, geralmente uma combinação tela-filme, gerando um padrão de contraste no filme (JOHNS e CUNNINGHAM, 1983).

A figura 2.1 mostra como o espalhamento atua na formação da imagem, adicionando à intensidade um fundo quase constante ao longo da distribuição espacial (curva B1 na figura 2.1-b). Este fundo é decorrente da interpretação que o receptor faz, não diferenciando fótons espalhados daqueles transmitidos sem nenhuma interação. Desta forma, fótons espalhados contribuem para a redução do contraste na imagem radiológica e caso não sejam reduzidos, podem diminuir o contraste em até 60% (BARNES, 1991). Em particular, na mamografia esta degradação do contraste torna-se crítica (CUNHA *et al.* 2010). Por isso, diversos investimentos em pesquisas têm como objetivo explorar e controlar o efeito da radiação espalhada, de forma a permitir que a imagem contenha informações mais claras e precisas como, o uso de grades, espaço de ar, etc (BARNES, 1979; POLETTI *et al.*, 1997, 2001).

Figura 2.1: Diagrama que ilustra a formação da imagem radiográfica convencional considerando a radiação transmitida primária e espalhada. (a) paciente; (b) intensidade da radiação que atinge o filme: B1 representa a radiação espalhada e B2 a total (transmitida + espalhada); (c) imagem radiográfica.

2.2. O espalhamento como fonte de informação estrutural de tecidos biológicos: vantagem

Entretanto, o conceito de considerar o espalhamento como uma desvantagem vem mudando ao longo dos últimos anos, devido a dois fatores importantes: em primeiro lugar, os fótons espalhados carregam informação sobre a estrutura presente nos tecidos do paciente (SPELLER, 1999) (informação que não é considerada na radiografia convencional) e em segundo lugar, na maioria das energias usadas nas aplicações médicas, a interação mais provável é o espalhamento (elástico + inelástico) (JOHNS e CUNNINGHAM, 1983). Estes fatos levaram à investigação das propriedades de espalhamento dos diferentes tecidos biológicos incluindo ossos (ROYLE e SPELLER, 1995; BATCHELAR *et al.*, 2006), cérebro (SIU *et al.*, 2005), rim (ANCHAROV *et al.*, 2005) e mama (KIDANE *et al.*, 1999; LEWIS *et al.*, 2000; POLETTI *et al.*, 2002b; FERNÁNDEZ *et al.*, 2002, 2004; ROUND *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2008 e CONCEIÇÃO, 2009), como meio de determinar as características de suas estruturas e, assim identificar patologias. Portanto,

tornando-se necessária a obtenção de medidas precisas dos perfis de espalhamento dos diferentes tecidos humanos (KOSANETZKY *et al.*, 1987; BRADLEY *et al.*, 1989; POLETTI *et al.*, 2002c).

Denomina-se perfil de espalhamento a distribuição do número de fótons espalhados elasticamente em função do ângulo de espalhamento (ou do momento transferido), sendo esta distribuição decorrente dos efeitos coletivos de espalhamento devido ao átomo, molécula ou arranjos supramoleculares presentes no material. Para uma dada energia, os fenômenos de espalhamento em altos ângulos são devido à estrutura atômica do material (KANE *et al.*, 1985), sendo assim, nessa região não são detectadas as interferências entre os diversos átomos que compõem o tecido. Já em ângulos intermediários aparecem interferências atômicas ou moleculares (KLUG e ALEXANDER, 1974) e, em baixos ângulos surgem interferências de grupos de moléculas (estruturas supramoleculares) (GLATTER e KRATKY, 1982). Esses efeitos de interferência atômica, molecular e supramolecular causam, na distribuição angular de intensidade espalhada, um único e característico perfil de espalhamento, o qual pode ser computado se forem conhecidos os parâmetros estruturais (distribuição eletrônica espacial, distância entre átomos, etc.). Como estes parâmetros são, em geral, desconhecidos *a priori*, o perfil de espalhamento deve ser medido experimentalmente (POLETTI, 2001).

Os perfis de espalhamento de estruturas atômicas, moleculares e supramoleculares podem ser medidos experimentalmente através das técnicas de espalhamento Rayleigh, difração ou também denominado espalhamento de raios X em médio ângulo do inglês *Wide Angle X-ray Scattering* (WAXS) e espalhamento de raios X em baixo ângulo do inglês *Small Angle X-ray Scattering* (SAXS), respectivamente. Entretanto, como o enfoque deste trabalho está no estudo de organizações moleculares e supramoleculares, apenas as duas últimas técnicas serão detalhadas a seguir.

A técnica de WAXS permite obter a função de correlação de pequenas estruturas presentes em um tecido, cujo tamanho esteja entre 1 e 10 Å (por exemplo, água ou pequenas moléculas, como as de ácidos graxos) (PEPLOW e VERGHESE, 1998; KIDANE *et al.*, 1999; POLETTI *et al.*, 2002a, 2002b; CUNHA *et al.*, 2006; GRIFFITHS *et al.*, 2007; RYAN *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Kosanetzky *et al.* (1987) utilizando um difractômetro de raios X com ânodo de Co ($K\alpha=6,935\text{keV}$), mediram os perfis de espalhamento da água, vários materiais plásticos equivalentes e alguns tecidos biológicos extraídos de animais, tendo observado que o tecido adiposo possui um alto grau de ordenamento. Além disso, diferenças entre os perfis de espalhamento dos tecidos de diferentes órgãos, foram notadas.

Bradley *et al.* (1989) mediram a seção de choque elástica da água, nylon e lucite, utilizando uma fonte monoenergética de raios gama de ^{241}Am (59,54keV) e apresentaram um método para correção dos dados experimentais. Os resultados obtidos mostram a existência de picos de espalhamento que ocorrem em diferentes posições angulares para cada material.

Evans *et al.* (1991) mediram o perfil de espalhamento de tecidos mamários (adiposo, fibroglandular, tumor benigno, carcinoma e fibroadenoma), sangue e alguns materiais equivalentes, utilizando um feixe polienergético produzido por um tubo de raios X com ânodo de cobre (energia média efetiva de 46keV) e um contador proporcional bidimensional sensível a posição, como detector. Tabularam as posições do pico principal de espalhamento e o valor da largura à meia altura de cada tipo de amostra, observando grandes diferenças entre os perfis dos tecidos adiposo e fibroglandular, além de pequenas diferenças entre carcinomas e tecido fibroglandular.

Tartari *et al.* (1997a) mediram a seção de choque diferencial molecular de espalhamento coerente de gordura proveniente de suínos e polimetilmetacrilato (PMMA) utilizando um tubo de raios X com ânodo de cobre ($K\alpha=8,04\text{keV}$). Tabularam o fator de forma a partir dos dados obtidos, considerando os materiais como sendo monomoleculares e mostraram que o PMMA não é um material adequado para simular o espalhamento de tecido adiposo. Também mostraram fatores de correção relevantes que devem ser aplicados aos dados experimentais (1998) e um estudo da validade da aproximação do Modelo Atômico Independente (1997b).

Peplow e Verghese (1998) tabularam o fator de forma molecular de espalhamento coerente de materiais plásticos, tecidos biológicos de animais e tecido mamário humano. Para isso utilizaram radiação síncroton monoenergética de 8keV e 20keV e apresentaram um cálculo para obter o fator de forma através das distribuições medidas utilizando o método de Monte Carlo. Entretanto, apenas uma amostra de tecido mamário foi tabulada, a qual não possuía classificação histológica.

Kidane *et al.* (1999) mediram o perfil de espalhamento para tecidos mamários normais e neoplásicos através da técnica de EDXRD (difração de raios X dispersiva em energia) com um tubo de raios X com ânodo de tungstênio (W) ($K\alpha=58,86\text{keV}$). A composição histológica de cada tecido foi determinada, e os perfis de espalhamento dos diferentes tipos de tecidos comparados. Os resultados mostraram que há diferenças notáveis entre os perfis de espalhamento de tecidos normais e neoplásicos. As posições e altura dos picos principais de espalhamento foram tabuladas, porém os perfis de espalhamento possuem pobre resolução em momento transferido.

Tartari *et al.* (1999) mediram a seção de choque diferencial molecular de tecido ósseo e compararam os resultados obtidos anteriormente para gordura e PMMA (1997) com resultados de outros autores. Posteriormente, Tartari *et al.* (2000) mostraram que pode-se obter o fator de forma de tecidos biológicos hipotéticos através da combinação linear dos fatores de forma de alguns

componentes básicos, como gordura, colágeno, componentes minerais de tecidos ósseos e água, utilizando simulações de Monte Carlo para a geometria experimental utilizada. Em 2002, Tartari *et al.* (2002) tabularam os fatores de forma moleculares para gordura, água, matriz óssea e componente mineral ósseo, e obtiveram, através de simulações de Monte Carlo de um difractômetro comercial operando em modo reflexão, os fatores de forma para tecido adiposo e muscular, comparando-os com resultados obtidos experimentalmente por outros autores.

Poletti *et al.* (2002a) mediram o coeficiente linear de espalhamento elástico de tecidos mamários normais e neoplásicos, e materiais equivalentes utilizando tubos de raios X com ânodo de Cobalto ($K\alpha=6,93\text{keV}$) e de Molibdênio ($K\alpha=17,44\text{keV}$). Os resultados mostravam diferenças consideráveis entre os tecidos mamários e os materiais equivalentes. Diferenças entre os tecidos normais e neoplásicos também foram observadas. Posteriormente, apresentaram novas comparações entre tecidos mamários (adiposo e glandular) e materiais equivalentes (2002b), encontrando novamente diferenças entre eles. Obtiveram também o fator de forma e o coeficiente de atenuação linear para esses tecidos e materiais, além de apresentarem parâmetros para caracterizar seus perfis de espalhamento, tais como posição e altura do pico e largura à meia altura.

Poletti *et al.* (2002c) também apresentaram um método de correção de dados experimentais para se obter a seção de choque diferencial de espalhamento de materiais amorfos, considerando efeitos de polarização do feixe, múltiplo espalhamento, atenuação, geometria, dentre outros fatores. Em 2004 Poletti *et al.* (2004) apresentaram novas comparações entre tecidos mamários, muscular e materiais equivalentes. Os resultados mostraram que os perfis de espalhamento de tecidos humanos e materiais equivalentes apresentam diferenças significativas.

Castro *et al.* (2005) obtiveram os perfis de espalhamento coerente para tecidos mamários humanos normais e neoplásicos, útero e rim, usando radiação síncrotron. Foram medidas amostras pareadas, i.e. amostra de tecido tumoral juntamente com outra amostra contendo o tecido sadio circundante a este tecido tumoral. Eles compararam os perfis de espalhamento de cada amostra com suas respectivas classificações histológicas.

Cunha *et al.* (2006) utilizaram feixe de raios X monoenergético de $8,04\text{keV}$ gerado por um tubo de raios X com ânodo de cobre (Cu) e um monocromador de Si(111), além de um detector cintilador de NaI(Tl) para medir o perfil de espalhamento de tecidos mamário normais e malignos. Nestes perfis de espalhamento medidos, eles aplicaram análise de discriminante e conseguiram classificar corretamente 97% das amostras analisadas.

Griffiths *et al.* (2007) correlacionaram medidas de difração por dispersão de energia com imagens por difração e transmissão usando a técnica de microCT para 19 amostras e mostraram que

a razão entre as intensidades de dois picos característicos em tecidos mamários, sendo em $13,8$ e $18,9\text{nm}^{-1}$, pode ser utilizada para caracterizar cada tipo de tecido.

Ryan *et al.* (2007) utilizaram um tubo de raios X com ânodo de tungstênio (W) para produzir um feixe de raios X polienérgico e um detector HPGe dispersivo em energia para as medidas das densidades eletrônicas e dos perfis de espalhamento de tecidos mamários normais, neoplasia benigna e maligna. Eles empregaram análise multivariada para combinar os resultados de densidade eletrônica obtidos por espalhamento Compton com os de estruturas conseguidos na experiência de EDXRD e conseguiram uma sensibilidade de 100% e especificidade de 54% no modelo.

Oliveira *et al.* (2008) apresentaram perfis de espalhamento de amostras histopatologicamente classificadas como tecido normal, neoplasia benigna e maligna, obtidas com um difractômetro comercial, bem como descreveram os procedimentos para corrigir tais perfis medidos. Além disso, nestes perfis corrigidos foi aplicada análise multivariada, obtendo uma sensibilidade de 95,6% e uma especificidade de 82,3% para o método na distinção entre tecido normal e neoplásico.

Conceição *et al.* (2010c) determinaram os perfis de espalhamento de amostras de tecidos mamários normais e neoplásicos utilizando radiação síncrotron e destes perfis extraíram parâmetros que foram submetidos à análise de discriminante, dos quais destaca-se a razão entre a intensidade dos picos posicionados em $19,8\text{nm}^{-1}$ e $13,9\text{nm}^{-1}$ e a largura à meia altura foram os parâmetros significantes e permitiram classificar corretamente todas as amostras de neoplasia benigna. Ainda, Conceição *et al.* (2010d) aplicaram a análise de discriminante nos perfis de espalhamento na região de WAXS, tomando como variável todo valor de momento transferido medido e, com isso construíram um modelo de diagnóstico que classificou corretamente 91,5% das 106 amostras medidas.

A técnica de SAXS é um poderoso método que permite determinar características de sistemas moleculares em seus diferentes graus de organização, por exemplo, proteínas e fibras de colágeno, correspondendo a estruturas maiores que $10\text{\AA}$ (ROGERS *et al.*, 1999; LEWIS *et al.*, 2000; FERNÁNDEZ *et al.*, 2002, 2004, 2005; ROUND *et al.*, 2005; CONCEIÇÃO *et al.*, 2009). Rogers *et al.* (1999) apresentam resultados preliminares de perfis de espalhamento de tecidos mamários normais e neoplásicos utilizando radiação monocromática e um contador proporcional multi-filamento bidimensional. Eles encontraram uma significativa redução no grau de ordenamento na estrutura das fibras de colágeno em tecidos tumorais em comparação com tecidos normais.

Lewis *et al.* (2000) analisaram os perfis de espalhamento de 99 amostras de tecidos mamários, normais e neoplásicos e encontraram diferenças sistemáticas no espaçamento (d-spacing)

entre as fibras de colágeno, bem como nas intensidades espalhadas por estes tecidos. Eles extraíram valores de dois parâmetros (posição e intensidade do pico de 3ª ordem) dos perfis de espalhamento e verificaram ser possível distinguir entre cada tipo de tecido utilizando estes parâmetros, porém não consideraram a incerteza associada a cada um destes parâmetro.

Fernández *et al.* (2002) correlacionaram o perfil de espalhamento de tecidos mamários normais e neoplásicos obtidos por espalhamento de raios X em baixos ângulos utilizando radiação síncrotron monoenergética de 12,5keV com informações histopatológicas dos mesmos. Dessa correlação, eles observaram diferenças nos parâmetros das fibras de colágeno presentes nos tecidos mamários como, periodicidade espacial, diâmetro e arranjo molecular da fibra. Em 2005, Fernández *et al.* (2005) correlacionaram imagens histológicas com imagem por difração e, a partir dos resultados obtidos verificaram que quanto maior a invasão das células cancerosas nas fibras de colágeno, maior é a degradação destas, provocando aumento da superfície específica e distensão das ligações intermoleculares nestas fibras de colágeno invadidas.

Round *et al.* (2005) encontraram diferenças significativas entre os perfis de espalhamento de amostras de tecidos mamários normais e neoplásicos malignos. As medidas foram realizadas utilizando um feixe de raios X monoenergético de 8,04keV produzido por um tubo de raios X e um detector bidimensional *image plate* com resolução de 50µm. Apesar de serem utilizadas apenas 23 amostras eles obtiveram uma sensibilidade de 100% ao aplicar a técnica de espalhamento de raios X em baixo ângulo para caracterizar um tecido normal de um maligno.

Sidhu *et al.* (2008) utilizaram um feixe monoenergético de radiação síncrotron (8,06keV) e um contador proporcional multi-filamento bidimensional para as medidas de espalhamento e os resultados obtidos foram analisados por componente principal e discriminante quadrático. Assim, eles verificaram que a partir dos valores de espalhamento difuso e amplitude do pico de terceira ordem das fibras de colágeno na direção axial é possível classificar os tecidos mamários entre normal e patológico com uma sensibilidade entre 50% e 95,8% e uma especificidade entre 47,6 e 100%.

Conceição *et al.* (2009) utilizaram um feixe de raios X monoenergético (energia de 7,72keV) e um detector de CCD bidimensional e, verificaram que a combinação dos parâmetros de espalhamento difuso no intervalo de $0,50 \leq q \leq 0,56 \text{ nm}^{-1}$, razão entre as áreas dos picos de quinta ordem na direção axial e de terceira ordem na direção lateral das fibras de colágeno e espaçamento axial no pico de terceira ordem das fibras de colágeno, extraídos dos perfis de espalhamentos de tecidos mamários normais e patológico, permite classificar os tecidos mamários em normal, neoplasia benigna e neoplasia maligna com uma sensibilidade de 83% e uma especificidade de 100%.

A combinação de ambas as técnicas (WAXS e SAXS) permite correlacionar mudanças estruturais em nível atômico com mudanças em escala supramoleculares (ALI *et al.*, 2004; TARTARI *et al.*, 2005; CONCEIÇÃO *et al.*, 2010a e 2010b).

Tartari *et al.* (2005) obtiveram a seção de choque diferencial elástica de alguns materiais e tecidos biológicos, como osso e tecido adiposo. Para tais medidas foi utilizado um feixe de raios X monoenergético de 12,4keV, mas com distâncias da amostra ao detector de 1m e 3m, para WAXS e SAXS respectivamente. Eles apresentam também um procedimento de normalização, bem como incluíram nos cálculos o fator de interferência molecular que considera o efeito dos arranjos moleculares na distribuição dos fótons espalhados.

Conceição *et al.* (2010a), usando radiação síncrotron monocromática de 8,4keV, combinaram simultaneamente as técnicas de WAXS e SAXS sob um mesmo conjunto de amostras de tecidos mamários normais e neoplásicos para obter os perfis de espalhamento destas amostras. Eles extraíram destes perfis dois parâmetros (razão entre as intensidades dos picos, em 13,9 e 20,1nm⁻¹, e intensidade do pico de 3ª ordem de reflexão das fibras de colágeno) e verificaram que a combinação destes parâmetros pode ser utilizada para identificação do câncer de mama.

Por fim, Conceição *et al.* (2010b) combinaram dados das regiões de WAXS e de SAXS de quatro tipos de amostras biológicas: tecido adiposo de porco, tendão de frango, tecido mamário adiposo e tecido mamário fibroglandular, medidos utilizando radiação síncrotron, para cobrir um intervalo de momento transferido de $0,07 \leq q \leq 70,50\text{nm}^{-1}$. Os resultados obtidos por eles mostram a necessidade de atualização dos atuais bancos de dados de seções de choque de espalhamento elástico por meio da inclusão de efeitos de arranjos em larga escala e interferência molecular visando uma representação mais coerente com a realidade.

CAPÍTULO 3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1. Aspectos Clínicos da Mama

3.1.1. Anatomia da mama

O conhecimento da estrutura anatômica normal do tecido mamário é essencial para o estudo de suas patologias. A estrutura anatômica da mama é mostrada na figura 3.1 e, pode ser dividida em duas componentes: componente estrutural e componente funcional (DÂNGELO e FATTINI, 2003; NETTER, 2004).

Figura 3.1: Estrutura anatômica da mama (a) e (b). As glândulas mamárias, as quais consistem de lóbulos, são embebidas em tecido adiposo e circundadas por tecido conjuntivo.

- i. Componente estrutural: responsável pela sustentação e proteção das estruturas da mama, denominado estroma mamário. O estroma mamário por sua vez é dividido em estroma interlobular e intralobular. O estroma interlobular, na mulher jovem, é composto basicamente de tecido conjuntivo denso (fibroso), contando ainda com algumas células de tecido adiposo (adipócitos). Já o estroma intralobular possui grande quantidade de tecido conjuntivo frouxo e uma pequena população de células de linfócitos, além de ser muito sensível às variações hormonais do ciclo menstrual. A constituição do estroma mamário é variável, devido ao fato de que com o passar dos anos é aumentada a quantidade de tecido adiposo e, conseqüentemente diminuída a proporção de tecido conjuntivo.
- ii. Componente funcional: responsável pelas principais funções da mama, como produzir e secretar o leite, é denominado parênquima mamário. O parênquima mamário é composto basicamente por células epiteliais. As mamas são consideradas anexas à pele, uma vez que

as glândulas cutâneas se modificaram e deram origem às glândulas mamárias ou unidades lobulares. Cada glândula mamária é composta de 15 a 20 lóbulos. Os lóbulos mamários são estruturas de contorno circular, formados pelo agrupamento de ácinos e ductos e circundados pelo estroma interlobular. Os ácinos têm a função de secretar o leite e são compostos por dois tipos de células: uma camada interna de células epiteliais e uma camada externa de células mioepiteliais. A função das células mioepiteliais é a de se contrair para promover a extrusão do leite secretado. Os ductos mamários, como os ácinos, são formados por uma dupla população de células de revestimento, epiteliais (interno) e mioepiteliais (externo), possuindo grande quantidade de água em sua composição, cuja principal função é drenar os lóbulos.

A distribuição dos tecidos conjuntivo denso e frouxo, epitelial e adiposo, depende de fatores como: ciclo hormonal, idade, alimentação e principalmente de fatores genéticos.

3.1.2. Histologia da mama

Apesar da sua grande complexidade, a mama como o organismo humano é constituída por apenas quatro tipos básicos de tecidos: conjuntivo, epitelial, muscular e nervoso. Estes tecidos são formados por células e moléculas da matriz celular (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Nesta revisão serão detalhados apenas os tecidos conjuntivos e epiteliais.

Os tecidos conjuntivos variam consideravelmente tanto na forma quanto na função. Alguns servem como arcabouço sobre o qual as células epiteliais se dispõem para formar órgãos; outros servem como sustentação de vários tecidos e órgãos e ainda outros contêm o meio fluido (fluido tecidual) através do qual, nutrientes e resíduos transitam entre o sangue e as células do corpo. Muitos tipos de células estão associados com os tecidos conjuntivos, mas os fibroblastos e os macrófagos são os mais comuns. Os fibroblastos são células de forma estrelada que sintetizam principalmente elastina e as fibras de colágeno, além das glicosaminoglicanas, proteoglicanas e glicoproteínas multiadesivas. O colágeno é a classe mais abundante de proteínas do organismo humano e representa mais de 30% do total de proteínas no corpo, sendo uma proteína de importância fundamental na constituição da matriz extracelular e responsável por grande parte de suas propriedades físicas. O colágeno é composto por aminoácidos arranjados na forma de alfa-hélice-tripla e existem cerca 28 tipos diferentes de colágeno, possuindo diferentes funções. Na mama, os mais comuns são os dos tipos I, III e IV, sendo os dois primeiros fibrilares e o último não fibrilar (CAMERON *et al.* 2002). Os macrófagos, que geralmente não são tão abundantes como os fibroblastos, são ativos fagócitos, englobando substâncias estranhas, bem como células mortas. O

tecido conjuntivo é dividido em denso e frouxo. O tecido conjuntivo denso (fibroso) distingue-se pela abundância de fibras de colágeno, garantindo à mama, maior capacidade de resistir a graus excepcionais de tensão. Este tipo de tecido pode ser encontrado na forma irregular, cuja forma se assemelha à do tecido conjuntivo frouxo, porém com maior quantidade de fibras colágenas, bem como na forma regular, caracterizada pela predominância de fibras colágenas firmemente unidas em feixes paralelos.

O tecido adiposo é um tipo especial de conjuntivo formado por pequenas células chamadas adipócitos. Essas células contêm basicamente moléculas de lipídios, principalmente triglicerídeos, que por sua vez é composto da união de uma molécula de glicerol e três de ácidos graxos, tendo como função básica fornecer às outras células nutrientes e energia. No corpo, os adipócitos podem ser encontrados isolados ou em pequenos grupos no tecido conjuntivo comum, porém, a maioria deles forma grandes agregados, constituindo-se no tecido adiposo.

Os tecidos epiteliais são formados por células intimamente unidas, com um mínimo de material intercelular entre elas, que recobrem as superfícies e revestem as cavidades do corpo. As células epiteliais são acompanhadas de tecido conjuntivo subjacente, com o qual se ligam por uma delgada camada chamada membrana basal. A membrana basal é geralmente formada pela fusão de duas lâminas basais ou de uma lâmina basal e uma lâmina reticular. A lâmina basal consiste basicamente de colágeno tipo IV (não fibrilar), glicoproteínas e proteoglicanas, e desempenham vários papéis como na conexão dos órgãos, na filtração de moléculas, influenciando a polaridade das células, mas principalmente regulando a proliferação e a diferenciação celular. Enquanto que, a lâmina reticular é composta de fibras reticulares que se desenvolvem a partir do tecido conjuntivo e sua principal função é fornecer suporte e proteção às células epiteliais.

Existem vários tipos de tecidos epiteliais que se diferem quanto ao arranjo das camadas celulares e a forma das células da superfície livre do tecido. Dentre estes, o de maior interesse para esse trabalho é o tecido epitelial glandular. Os epitélios glandulares são constituídos por células especializadas na atividade de secreção e as moléculas a serem secretadas são armazenadas em pequenas vesículas chamadas grânulos de secreção. As glândulas mamárias podem sintetizar, armazenar e secretar proteínas, lipídios ou complexos de carboidratos e proteínas.

3.1.3. Patologias mamárias

Uma patologia, ou lesão patológica, é considerada como uma anormalidade que surge nos tecidos. O termo neoplasia descreve aquelas patologias que aparecem na forma de tumores ou

massas estranhas ao organismo, referindo-se também a fibrose e angiogênese (aumento da vascularização) associados ao desenvolvimento do tumor.

De acordo com a natureza patológica, as neoplasias ou tumores mamários podem ser classificados como benigno e maligno.

As neoplasias benignas possuem como característica um crescimento lento e seu tecido de sustentação, estroma, é semelhante ao de tecidos normais, no que se refere à não ocorrência de invasão tecidual ou metástases. As neoplasias malignas são originadas por células geneticamente modificadas, que sofreram mutações em seu DNA, e a multiplicação dessas células, além de exagerada e desordenada, em alguns casos é também invasiva, ou seja, invade os tecidos adjacentes, processo denominado de metástase. Em alguns casos o tecido cresce tão rapidamente que não há suporte sanguíneo necessário, provocando necroses (COTRAN *et al.*, 1989). Somente as neoplasias malignas podem ser denominadas como câncer. A figura 3.2 apresenta um organograma representando os tipos de neoplasias.

Figura 3.2: Tipos de neoplasias

Dentre as neoplasias benignas mamárias destacam-se o fibroadenoma (tipo misto).

O fibroadenoma é o tumor benigno mamário mais comum e ocorre mais frequentemente em mulheres na idade fértil. O fibroadenoma é criado a partir da proliferação do estroma intralobular, contendo também glândulas. As células da parte conjuntiva do tumor são monoclonais e as da parte epitelial são policlonais, o que indica que estas últimas não são propriamente neoplásicas, mas proliferam em resposta a estímulos químicos secretados pelas células do estroma. No fibroadenoma o estroma é frouxo, composto por células estreladas (fibroblastos) separadas por material intersticial levemente basófilo e o parênquima forma túbulos ramificados e dilatados em meio ao estroma, mas ainda possui a dupla população de células (epiteliais e mioepiteliais), um importante elemento em favor da benignidade do tumor (NHSBSP Publication 58, 2005).

Dos tumores malignos, os tipos mais frequentes são os tumores mistos, epiteliais e conjuntivos, como o carcinoma ductal invasivo, e os tumores epiteliais não invasivos como o carcinoma ductal *in situ* e carcinoma lobular *in situ*.

O carcinoma lobular *in situ* é muitas vezes considerado uma situação pré-cancerosa, sendo caracterizado pela proliferação de fibroblastos e ácinos dentro dos lóbulos. Os ductos distendidos são preenchidos por células monoclonais fracamente aderente umas às outras. Entretanto, essas células ficam limitadas ao lóbulo não se espalhando para outras regiões (WINCHESTER, D. J. e WINCHESTER, D. P., 2000).

O carcinoma ductal *in situ* é caracterizado por uma proliferação irregular de células epiteliais com características citológicas de malignidade dentro das estruturas do parênquima, e confinadas nos ductos lobulares por uma membrana basal intacta (WINCHESTER, D. J. e WINCHESTER, D. P., 2000).

O carcinoma ductal invasivo é um tumor pouco diferenciado, cujas células formam cordões sólidos que se disseminam no tecido mamário, ele recebe esse nome porque as células cancerosas invadem os tecidos epiteliais dos ductos e vão se espalhando, à partir de reações bioquímicas induzidas por essas células. Este tipo de tumor é caracterizado por extensa proliferação fibroblástica e produção de fibras de colágeno, o que fornece maior consistência ao tumor, além de poder conter microcalcificações. Na periferia, o tumor é mal delimitado e sem cápsula, disseminando-se no tecido adiposo e no tecido mamário pré-existente (WINCHESTER, D. J. e WINCHESTER, D. P., 2000). A figura 3.3 exhibe o exemplo da lâmina histológica de uma amostra de carcinoma ductal invasivo.

Figura 3.3: Lâmina histológica de uma amostra de carcinoma ductal, indicando calcificações, necroses, além das células cancerosas. A área rosada na figura corresponde à matriz extracelular, formada principalmente por colágeno. Além disso, observa-se a membrana basal ao redor do ducto.

3.2. Fontes de Raios X

Wilhelm Conrad Roentgen descobriu um tipo desconhecido de radiação em 1895 que chamou de raios X. Os raios X descrevem uma grande região no espectro eletromagnético, com intervalo de energia de centenas de elétron-volts (raios X moles, próximo a radiação ultravioleta) até energias de centenas de keV (raios X duros, próximos aos raios γ), figura 3.4, e tem a propriedade de penetrar em materiais o que permite inspecionar o interior de objetos. Imediatamente após sua descoberta, as aplicações para este tipo de radiação se tornaram evidentes principalmente na medicina, através de radiografias.

Figura 3.4: Espectro eletromagnético exibindo a região correspondente aos raios X (retângulo vermelho).

Algumas das formas pelas quais os raios X são gerados estão explicadas mais detalhadamente nos dois próximos tópicos.

3.2.1. Tubo de raios X

Um tubo de raios X é um circuito elétrico constituído principalmente de um cátodo, e um ânodo. O cátodo é um filamento que quando aquecido libera elétrons por efeito termoiônico, já o ânodo é o alvo onde estes elétrons colidem. Entre o cátodo e o ânodo existe um campo elétrico criado por um potencial da ordem de dezenas de kV, que aceleram os elétrons do cátodo em direção ao ânodo. No ânodo, a energia acumulada pela interação dos elétrons com o ânodo é convertida principalmente na produção de calor e apenas 1% em produção de radiação (raios X).

O espectro de um tubo de raios X apresenta uma componente contínua (*bremsstrahlung*, raios X de frenagem ou radiação branca) e outra discreta (raios X característicos) em energia. A radiação branca é formada pela desaceleração dos elétrons no ânodo através de interações coulombianas inelásticas. Já os raios X característicos são fótons de energia discreta, resultantes do preenchimento de uma vacância deixada por um elétron de uma camada mais interna (que interagiu com elétrons provenientes do cátodo) por outro elétron de uma camada superior mais energética. As intensidades entre a radiação branca e a característica dependem do tipo de alvo e da tensão aplicada, e, além disso, podem ser modificadas através do uso de filtros (ATTIX, 1986).

3.2.2. Síncrotron

A radiação síncrotron é produzida por elétrons relativísticos acelerados em movimento circular em instalações denominadas síncrotrons. Os elétrons, inicialmente liberados por efeito termoiônico de um filamento ou por uma fonte radioativa, são acelerados através de um acelerador linear alcançando velocidade relativística. Estes elétrons relativísticos são então inseridos em um anel de propulsão, onde um campo magnético aumenta sincronicamente, até atingir a energia desejada. Finalmente eles são injetados em um anel de armazenamento, a verdadeira fonte de radiação. No anel de armazenamento os elétrons são mantidos em uma órbita estável por meio de campos magnéticos. A radiação síncrotron tem um amplo intervalo espectral desde infravermelho até raios X duros e a faixa de energia de interesse é selecionada por monocromadores (DUKE, 2000).

Na chamada terceira geração de síncrotrons, existem três tipos de fontes, denominadas: ímãs defletores, onduladores e wigglers.

Os ímãs defletores constituem os vértices do anel de armazenamento e são responsáveis por alterar a direção dos elétrons por meio de um dipolo uniforme fazendo com que estes percorram uma órbita circular, como consequência desta mudança na direção do movimento dos elétrons é emitida radiação, principalmente, na direção tangencialmente à órbita circular.

Existem secções das órbitas dos elétrons entre os ímãs defletores em forma de linhas retas, onde wigglers e onduladores podem ser instalados. Estas fontes são chamadas dispositivos de inserção (ID) e são formados por um conjunto de pequenos dipolos com a polaridade alternadamente periódica. Esta variação alternada dos dipolos induz uma trajetória oscilatória dos elétrons, fazendo com que estes irradiem radiação síncrotron em toda mudança de direção de oscilação.

As oscilações nos onduladores são pequenas, de forma que as radiações de sucessivas fontes pontuais interferem e dão origem a radiações que possuem somente o comprimento de onda resultante da interferência construtiva destas ondas. A radiação proveniente destas fontes é muito bem colimada e contém comprimentos de onda harmônicos.

As oscilações dos elétrons no wiggler são muito mais amplas, onde o fenômeno de interferência não é importante, figura 3.5. A intensidade dos pólos N é somada. A distribuição espectral é similar à distribuição contínua de radiação dos ímãs defletores.

Figura 3.5: Esquema de funcionamento de um wiggler, o qual deve ser inserido em linha reta nas instalações de um síncrotron.

Especificamente o Brasil, conta com uma fonte de luz síncrotron, o Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas. Atualmente, 14 linhas de luz estão em funcionamento permitindo diversos tipos de experiências. O LNLS é uma fonte de radiação síncrotron de terceira geração, cuja energia do elétron no anel de armazenamento é de 1,37GeV, tendo como fonte um ímã defletor e estações de wiggler, sendo capaz de produzir um fluxo tipicamente de 5×10^{10} fótons.s⁻¹ em 8keV (<http://www.lnls.br>).

3.3. Interação da Radiação com a Matéria

As interações dos raios X com a matéria dependem basicamente da energia dos fótons incidentes e do material que constitui o alvo (número atômico e densidade). Os principais fenômenos de interação da radiação com a matéria considerando a faixa de energia utilizada em radiodiagnóstico ($E < 140\text{keV}$) são o efeito fotoelétrico e os espalhamentos inelástico e elástico. Em particular, para fótons com energia utilizada em mamografia ($\text{MoK}\alpha = 17,44\text{ keV}$) numa amostra de tecido mamário, 80% do total de interações ocorrem por efeito fotoelétrico, 11% para o espalhamento inelástico e 9% para o espalhamento elástico (JOHNS e CUNNINGHAM, 1983).

No processo fotoelétrico, um fóton de energia $h\nu$ interage com um átomo transferindo toda sua energia para este durante a colisão, ejetando um elétron com energia cinética igual à diferença entre a energia do fóton incidente e a energia de ligação deste elétron, principalmente de uma camada eletrônica mais interna, camada K, por exemplo. Este elétron ejetado é denominado fotoelétron. A vacância deixada por este elétron pode ser preenchida através do efeito Auger ou produção de raios X característicos. No efeito Auger a energia excedente criada pela vacância é liberada através de um elétron de uma camada mais externa. Já, a emissão de raios X característicos ocorre quando a vacância é preenchida por um elétron de uma camada mais energética e o fóton produzido tem energia igual à diferença de energia entre os dois níveis de energia (vide seção 3.2.1).

Por outro lado, quando um fóton incidente interage com um elétron atômico e transfere parte de sua energia a este elétron de forma a liberá-lo e, um fóton com energia menor que a incidente é emitido, caracteriza-se o processo de espalhamento inelástico ou Compton.

Quando um fóton interage com a matéria desviando-se de sua trajetória inicial de modo que não sofra variação em sua energia, denomina-se espalhamento elástico ou coerente. O campo elétrico da onda eletromagnética incidente, com comprimento de onda λ , associada a esse fóton induz oscilações, como em um dipolo, nos elétrons presentes na matéria. Estas cargas aceleradas por sua vez geram ondas secundárias (radiação espalhada) de mesmo comprimento de onda λ que a radiação incidente (JOHNS e CUNNINGHAM, 1983).

Como o objetivo deste trabalho está na obtenção do coeficiente linear de espalhamento elástico para determinação das estruturas moleculares e supramoleculares e classificação das amostras de tecidos mamários, passaremos a detalhar melhor esta grandeza nos próximos tópicos, porém, anteriormente é necessário realizar uma discussão sobre o vetor de espalhamento.

Vetor de Espalhamento

Considerando o espalhamento elástico de um fóton de comprimento de onda λ por um átomo em que o fóton incidente tem o vetor de onda $\vec{k}$ e o fóton espalhado $\vec{k}'$, o vetor de espalhamento $\vec{q}$, figura 3.6, é definido como:

$$\vec{q} = \vec{k}' - \vec{k} \quad (3.1)$$

em que: $|\vec{k}| = 2\pi/\lambda$. A interferência será construtiva ou destrutiva dependendo da diferença de fase entre os diferentes fótons espalhados.

Figura 3.6: Geometria do espalhamento; (a) vetor espalhamento como resultante; (b) a diferença de fase é dada pela diferença de caminhos ópticos. A linha mais espessa é o comprimento do caminho máximo.

A diferença de fase total, figura 3.6(b) é dada por:

$$\Delta\phi(\vec{r}) = \vec{k}' \cdot \vec{r} - \vec{k} \cdot \vec{r} = \vec{q} \cdot \vec{r} \quad (3.2)$$

O vetor espalhamento $\vec{q}$ pode ser calculado geometricamente a partir da figura 3.6(a). Usando a lei dos cossenos, temos:

$$|\vec{q}|^2 = q'^2 = k^2 + q^2 - 2kq \cos\left(\frac{\pi}{2} - \frac{\theta}{2}\right) \quad (3.3)$$

Como estamos tratando de espalhamento elástico, $k' = k$ e usando que $\cos\left(\frac{\pi}{2} - \frac{\theta}{2}\right) = \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$,

$$q^2 = k^2 - k^2 + 2kq \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (3.4)$$

ou

$$q = 2k \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (3.5)$$

Portanto, como $k = \frac{2\pi}{\lambda}$,

$$q = \frac{4\pi \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)}{\lambda} \quad (3.6)$$

$q = |\vec{q}|$ é o módulo do vetor de espalhamento.

3.3.1. Espalhamento Elástico – Seção de choque diferencial

3.3.1.1. Espalhamento por elétron livre

Se o espalhamento elástico ocorre devido somente a um elétron livre ele recebe o nome de espalhamento Thomson, em homenagem ao primeiro cientista que obteve a seção de choque diferencial de espalhamento para um elétron (THOMSON, 1906). Thomson considerando um feixe de fótons não polarizado e apenas suposições de física clássica obteve a seguinte expressão:

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right)_{Th} = \frac{r_0^2}{2} (1 + \cos^2 \theta) \quad (3.7)$$

em que: $r_0 = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{e^2}{m_0 c^2} = 2.82 \times 10^{-15} m$ é o raio clássico do elétron e θ é o ângulo de espalhamento.

A forma da seção de choque Thomson está representada na figura 3.7.

Figura 3.7: Seção de choque diferencial Thomson em função do ângulo de espalhamento.

Quando a radiação é polarizada, a seção de choque diferencial elástica é dada por:

$$\frac{d\sigma}{d\Omega_{Th}} = r_0^2 (1 - \sin^2 \theta \cos^2 \phi) \quad (3.8)$$

onde: θ é o ângulo polar de espalhamento e ϕ é ângulo azimutal de espalhamento (medido da direção de polarização) (HANSON, 1986).

3.3.1.2. Espalhamento por múltiplos elétrons

Se consideramos que a carga de um elétron está distribuída volumetricamente, segundo a densidade de carga ρ_e , neste caso amplitude total espalhada devido a cada elemento de carga ($\rho_e dV$) dependerá do fator de espalhamento por elétron (f_e). Este fator representa a transformada de Fourier da distribuição de cargas do elétron e é expresso por:

$$f_e = \int e^{i(\vec{q} \cdot \vec{r})} \rho_e dV \quad (3.9)$$

3.3.1.3. Espalhamento por átomo livre

No caso de um átomo, o espalhamento elástico de fótons por um átomo livre é chamado espalhamento Rayleigh em homenagem ao cientista que o discutiu para a luz visível Lord Rayleigh (1881). As ondas espalhadas por cada elétron sofrem interferência construtiva devido à diferença de caminho ótico percorrido no átomo e a seção de choque diferencial pode ser expressa na forma:

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right)_{Ray} = [F(q, Z)]^2 \left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right)_{Th} \quad (3.10)$$

em que: q é vetor de espalhamento, dado pela equação (3.6), sendo proporcional ao momento transferido pelo fóton na interação com o átomo. Z é o número atômico. $F(q, Z)$ é chamado fator de forma atômico ou fator de espalhamento atômico. A partir desse ponto será usado q para representar o momento transferido.

A função $F(q, Z)$ é a transformada de Fourier da distribuição de cargas do átomo, dada pela soma dos fatores de espalhamento por elétron dos n elétrons que constituem o átomo $F(q, Z) = \sum_n f_{e_n}$. O fator de forma $F(q, Z)$ está representado na figura 3.8 para o átomo de Oxigênio ($Z=8$).

A partir da figura 3.8 pode-se notar que para baixos valores de momento transferido q , isto é $q \rightarrow 0$, $F(q, Z) \rightarrow Z$ (interferência construtiva). Para altos valores de q ($q \rightarrow \infty$), $F(q, Z) \rightarrow 0$ (interferência destrutiva).

Figura 3.8: Fator de forma $F(q, Z)$ para o átomo de Oxigênio reportado por Hubbell *et al.* (1975).

Este comportamento modela a seção de choque Thomson, produzindo a seção de choque diferencial $\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{Ray}$ como mostrado na figura 3.9.

Figura 3.9: Seção de Choque Diferencial para o espalhamento Rayleigh para o átomo de Oxigênio para fótons de 17,44 keV.

3.3.1.4. Espalhamento por Molécula Livre

A seção de choque diferencial elástica para uma molécula livre é da forma:

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right)_{elas}^{mol} = F_{mol}^2(q) \left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right)_{Th} \quad (3.11)$$

em que $F_{mol}^2(q)$ é o fator de forma molecular, e pode ser obtido por três aproximações.

A primeira aproximação considera a correlação da distribuição da densidade eletrônica dentro da molécula (BLUM, 1971; NARTEN e LEVY, 1971). Entretanto, em geral, esta não é bem conhecida para inúmeras moléculas.

A segunda aproximação requer o conhecimento das distâncias atômicas dentro de uma molécula, pois leva em conta a correlação entre diferentes átomos desta (DEBYE, 1915). Em baixo momento transferido, esta correlação da origem a efeitos de interferência, dependendo do grau de ordenamento estrutural da molécula.

A terceira aproximação é a forma mais simples de se calcular o espalhamento de fótons por uma molécula livre, pois supõe que o espalhamento por uma molécula livre é composto pelas contribuições independentes de cada átomo que a compõe e, portanto, o fator de forma molecular será determinado pela soma dos fatores de forma de cada átomo independentemente. Essa última aproximação é também chamada Modelo Atômico Independente (MAI) (CHAN e DOI, 1983).

Para um composto ou mistura existem duas maneiras de calcular o fator de forma molecular:

Se o número de átomos for conhecido, $F_{mol}^2(q)$ assume a forma:

$$F_{mol}^2(q) = \sum n_i F_i^2(q) \quad (3.12)$$

em que: F_i é o fator de forma de cada átomo e n_i o número de átomos de cada elemento.

Se o número de átomos for desconhecido, $F_{mol}^2(q)$ pode ser obtida pela fração de massa w_i e pela massa atômica m_i do átomo i :

$$\frac{F_{mol}^2(q)}{M} = \sum \left(\frac{w_i}{m_i} \right) F_i^2(q) \quad (3.13)$$

em que: M é o peso molecular.

A figura 3.10 mostra o comportamento da função $F_{mol}(q)$ para molécula de água utilizando a distribuição de densidade de carga eletrônica (primeira aproximação mencionada)

(HUBBEL *et al.*, 1975) e o modelo atômico independente (última aproximação mencionada) (CHAN e DOI, 1983). Pode-se notar que as duas aproximações convergem para o mesmo valor quando $q > 40 \text{ nm}^{-1}$.

Figura 3.10: Fator de forma da molécula de H_2O , $F_{\text{mol}}(q)$, obtido utilizando distribuição de densidade eletrônica e $F_{\text{mol}}^{\text{MAI}}(q)$ alcançado através do modelo atômico independente.

É útil nesta parte definir o coeficiente linear de espalhamento elástico, μ_{CS} , o qual está diretamente relacionado à seção de choque diferencial elástica por:

$$\mu_{\text{CS}} = n_v \frac{d\sigma}{d\Omega} \quad (3.14)$$

em que n_v é o número de átomos ou moléculas por unidade de volume $\left(n_v = \frac{\rho \cdot N_A}{M}\right)$ sendo ρ a densidade da amostra, M a massa atômica ou molecular e N_A o número de Avogadro).

3.3.1.5. Espalhamento por Conjunto de Moléculas

A descrição do espalhamento por um conjunto de moléculas também pode ser obtida através da aproximação de fator de forma. A expressão para o coeficiente linear de espalhamento elástico por molécula é da forma:

$$\mu_{CS} = n_V \left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right)_{elas} = n_V Y(q) \left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right)_{elas}^{mol} = n_V Y(q) F_{mol}^2(q) \left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right)_{Th} \quad (3.15)$$

em que: $\left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right)_{elas}$ é a seção de choque diferencial por molécula, $Y(q)$ é a função auto-correlação, que leva em conta o grau de ordem da estrutura atômica (ou molecular), $\left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right)_{elas}^{mol}$ é a seção de choque para o espalhamento de uma molécula livre (3.11). $Y(q)$ assume a forma:

$$Y(q) = 1 + \sum_i \gamma_i \frac{\sin(qr_i)}{qr_i} \quad (3.16)$$

em que: γ_i é a função de correlação e representa a correlação entre as flutuações de densidade eletrônica (GUINIER, 1994).

Figura 3.11: Seção de choque diferencial elástica para (i) água líquida a 20°C de MORIN (1982), (ii) molécula de água (MAI).

A figura 3.11 mostra a seção de choque diferencial para água líquida a 20°C obtida a partir do fator de forma equivalente tabulado por Morin (1982), deduzidos dos dados experimentais realizados por Narten e Levi (1971). Observa-se que a função de interferência provoca oscilações na seção de choque do conjunto de moléculas. Tais oscilações ocorrem em torno da seção de choque da molécula livre calculada a partir do MAI, observando-se também a existência de interferência destrutiva para valores baixos de momento transferido. Este efeito coincide com os encontrados pela termodinâmica (KLUG e ALEXANDER, 1974). Para valores de q maiores as

duas curvas convergem para os mesmos valores. A partir dos picos de espalhamento, é possível, utilizando a lei de Bragg (CULLITY, 1978), obter a distância de correlação para o material analisado, em particular, para a água neste caso.

A formulação descrita acima, não engloba arranjos supramoleculares compostos por grandes cadeias (estruturas maiores que 10Å), por isso é necessário outro tratamento para esses materiais.

Os fótons espalhados elasticamente pelas estruturas supramoleculares presentes em tecidos compreendem a região de espalhamento de raios X em baixo ângulo (SAXS). A formulação geral para estudo dos perfis de espalhamento de SAXS foi desenvolvida para sistemas de partículas isotrópicos que não possuíam ordenamento em longas cadeias (GUINIER, 1994). Para estes casos, se uma molécula de volume V é irradiada, a amplitude de espalhamento está relacionada à distribuição de densidade eletrônica desta molécula, em unidades de elétron, por uma transformada de Fourier:

$$F(\vec{q}) = A_e \int \rho(\vec{r}) e^{-i(\vec{q}\vec{r})} dV \quad (3.17)$$

em que A_e é a amplitude de espalhamento de um elétron e $\rho(\vec{r})$ é o número de elétrons por unidade de volume na posição $\vec{r}$. Um elemento de volume dV em $\vec{r}$ contém $\rho(\vec{r}) dV$ elétrons.

Considerando uma fibra como uma cadeia de várias moléculas em forma de discos, ordenadas paralela e covalentemente, possuindo um eixo de orientação preferencial, porém sem ordenamento em longas cadeias, ao interagir elasticamente com a radiação incidente, apresenta uma distribuição de intensidade dada por:

$$I_f(\vec{q}) = Y_f(\vec{q}) \langle F(\vec{q}) F^*(\vec{q}) \rangle \quad (3.18)$$

em que $Y_f(\vec{q})$ é a função de auto-correlação, a qual considera a correlação entre as flutuações de densidade eletrônica devido aos fótons espalhados por diferentes moléculas na fibra; o termo subsequente representa a intensidade média espalhada por uma fibra. Porém, levando em conta algumas suposições e modelos estruturais do material em estudo, essa formulação pode ser estendida para estudo de objetos densamente agrupados (como encontrado nos tecidos humanos em geral), os quais permitem considerar orientações anisotrópicas e/ou ordenamento em longas cadeias, como os arranjos de fibras de colágeno presentes nos tecidos conjuntivos frouxo e denso (WESS *et al.*, 1998; WILKINSON e HUKINS, 1999). Dessa forma, a intensidade espalhada por um arranjo de fibras de colágeno orientadas em um eixo preferencial, porém permitindo orientação anisotrópica, é dada pela convolução da função de distribuição de orientação $g(\phi)$ com a distribuição de

intensidade de uma fibra $I_f(\vec{q})$, eq. (3.19) (HUKINS, 1981). A função de distribuição de orientação tem simetria cilíndrica e representa a probabilidade de se encontrar uma fibra orientada entre ϕ e $\phi + \delta\phi$, com relação à orientação preferida da fibra.

$$I_a(\vec{q}) = g(\phi) \otimes I_f(\vec{q}) \quad (3.19)$$

A intensidade espalhada por um arranjo de fibras é proporcional ao coeficiente linear de espalhamento:

$$\mu_{CS} = n_V \frac{d\sigma}{d\Omega} \propto I_a(q) \quad (3.20)$$

Para este sistema anisotrópico duas direções de espalhamento são definidas: a direção meridional, paralela ao eixo da fibra e a direção equatorial perpendicular ao eixo da fibra (HULMES *et al.*, 1995). Na direção meridional, os fótons são espalhados principalmente pela distribuição eletrônica que varia ao longo do eixo da fibra e estão associados à periodicidade axial da densidade eletrônica da fibra e à estrutura do arranjo molecular (picos de Bragg). Na direção equatorial, a distribuição de intensidade dos fótons espalhados elasticamente contém informações sobre o tamanho da fibra (diâmetro) e de sua orientação dentro de um tecido (picos de Bessel) (GLATTER e KRATKY, 1982), conforme explicitado na figura 3.12.

Figura 3.12: Padrão de SAXS de fibras de colágeno orientadas. Da imagem é possível extrair o raio da fibra ($R=70\text{nm}$), a distância entre os centros de duas fibras adjacentes ($D=100\text{nm}$) na direção equatorial e a periodicidade axial da densidade eletrônica da fibra ($d=65\text{nm}$) na direção meridional [Fernández *et al.*, 2002].

3.4. *Análise Estatística – Modelo diagnóstico: Aspectos gerais*

A construção de um modelo que permita classificar corretamente os tecidos mamários nos grupos normais, benignos e malignos baseado em parâmetros quantitativos resultantes dos perfis de espalhamento é o principal objetivo das técnicas de radiológicas. Quando se comparam dois ou mais grupos de amostras, pode-se formular a hipótese de que os grupos são iguais (hipótese nula) ou diferentes (hipótese alternativa). Uma hipótese é uma suposição a ser verificada com base nos dados observados, podendo ser aceita ou rejeitada. A veracidade de uma hipótese é verificada através da aplicação de testes estatísticos que permitem obter conclusões a respeito dos dados de forma probabilística. Essa probabilidade é chamada de nível de significância do teste, definido previamente, e corresponde à confiabilidade do resultado. Por exemplo, um nível de significância de 0,05 diz que há 95% de chance de a hipótese estar correta (SPIEGEL, 2004).

A comparação entre grupos de amostras pode ser realizada a partir da análise estatística de uma (análise univariada) ou múltiplas variáveis experimentais (análise multivariada). Sabendo que os perfis de espalhamento apresentam muitas variáveis, a utilização da última abordagem permite um melhor aproveitamento da informação contida nas variáveis envolvidas (DEMÉTRIO, 1985).

A classificação de grupos de amostras está baseada na categorização dos dados observados em classes identificáveis através da comparação entre as características existentes em cada amostra do conjunto de dados com padrões pré-determinados, reconhecimento de padrões. Tratando-se de análise multivariada, a técnica mais indicada para se reconhecer padrões e tornar evidente as diferenças entre grupos de amostras é a técnica de análise de discriminante.

3.4.1. *Análise de Discriminante*

A técnica de análise de discriminante visa encontrar uma combinação linear das variáveis originais, denominada função discriminante, que permita obter a melhor separação entre os grupos de amostras. Entretanto, para aplicação da análise de discriminante é necessário que as variáveis tenham distribuição normal, que haja relação de linearidade entre elas e que as matrizes de covariância dos grupos sejam homogêneas.

O caso mais simples supõe que um conjunto de dados pertença a dois grupos distintos, e pode ser generalizado para o caso em que existam vários grupos.

3.4.1.1. Função discriminante para separação de duas populações

Considerando inicialmente o caso em que se tenham duas populações distintas, contendo respectivamente n_1 e n_2 elementos cada, então pode-se formar dois conjuntos de dados, X_1 e X_2 contendo os valores observados em cada população. Dessa forma, a função discriminante Z é obtida por uma combinação linear dos valores observados X conforme a expressão abaixo:

$$Z = aX \quad (3.20)$$

onde a é o coeficiente discriminante.

A combinação linear de X_1 fornece os valores $Z_{11}, Z_{12}, \dots, Z_{1n}$ para a primeira população contendo n_1 elementos enquanto X_2 fornece os valores $Z_{21}, Z_{22}, \dots, Z_{2n}$ para a segunda. A separação desses grupos em função dessas combinações lineares é dada então pela diferença dos valores médios $\bar{Z}_1$ e $\bar{Z}_2$ padronizadas em unidades de desvio padrão, como exibido na seguinte equação:

$$separação = \frac{|\bar{Z}_1 - \bar{Z}_2|}{s_z} \quad (3.21)$$

$$e \quad s_z^2 = \frac{\sum_{j=1}^{n_1} (Z_{1j} - \bar{Z}_1)^2 + \sum_{j=1}^{n_2} (Z_{2j} - \bar{Z}_2)^2}{n_1 + n_2 - 2} \quad (3.22)$$

é a variância combinada (*pooled variance*). Então, o objetivo é encontrar os coeficientes da matriz a que maximizem a separação entre as médias $\bar{Z}_1$ e $\bar{Z}_2$.

Pode-se mostrar (RENCER, 1992) que a combinação linear que maximiza a separação Z_1 e Z_2 é dada pela função discriminante de Fisher:

$$Z = (\bar{X}_1 - \bar{X}_2)' S_{pooled}^{-1} X \quad (3.23)$$

em que S_{pooled} é a matriz de covariância combinada, formada pela média ponderada das matrizes de covariância S_1 e S_2 de cada população. Essa matriz é da forma:

$$S_{pooled} = \left[\frac{n_1 - 1}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1)} \right] S_1 + \left[\frac{n_2 - 1}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1)} \right] S_2 \quad (3.24)$$

Além disso, também é possível mostrar (JOHNSON E WICHERN, 2002) que o valor máximo de separação entre as populações é dado por:

$$D^2 = (\bar{X}_1 - \bar{X}_2)' S_{pooled}^{-1} (\bar{X}_1 - \bar{X}_2) \quad (3.25)$$

O fator D^2 é conhecido como distância de Mahalanobis, e no caso acima mede a distância entre as médias $\bar{X}_1$ e $\bar{X}_2$.

O efeito da aplicação do método de análise de discriminante é projetar os valores observados de cada grupo no eixo definido pela combinação linear, conforme figura abaixo, e encontrar a direção em que essas projeções atinjam a separação máxima.

Figura 3.13: Visualização da aplicação da análise de discriminante a um conjunto de dados de duas populações. A função discriminante Z otimiza a separação entre as duas populações bivariadas.

3.4.1.2. Função discriminante para separação de mais de 2 populações

Generalizando o método para o caso em que se tem um conjunto de g grupos, tal que $g > 2$, o objetivo é calcular funções discriminantes na forma de combinações lineares das variáveis que maximizem a soma das diferenças da média de cada grupo em relação à média total (RENCER, 1992):

$$\frac{\sum_{i=1}^g (\bar{Z}_i - \bar{Z})}{s_\gamma} = \frac{a' Ba}{a' Wa} \quad (3.26)$$

em que $B = \sum n_i (\bar{X}_i - \bar{X})(\bar{X}_i - \bar{X})'$ mede a variabilidade das médias populacionais em relação à média total e $W = \sum \sum (\bar{X}_{ij} - \bar{X}_i)(\bar{X}_{ij} - \bar{X}_i)'$ é uma matriz que mede a variabilidade dos valores observados de uma população em relação à média daquela população (JOHNSON E WICHERN, 2002).

Pode se mostrar que o vetor a que maximiza a equação (3.26) pode ser escrito como autovetor da matriz $W^{-1}B$, e que haverá um número de $(g - 1)$ autovetores positivos (JOHNSON E WICHERN, 2002). Consequentemente, para um conjunto formado por g populações, o número de funções discriminantes que se pode obter é $\min(g - 1, p)$, onde p é o número de variáveis.

3.4.1.3. Métodos para obtenção das funções discriminantes

As funções discriminantes podem ser calculadas através de dois métodos: o método direto e o método passo-a-passo (*stepwise*).

O método direto, também chamado método simultâneo, consiste em calcular as funções discriminantes utilizando todas as variáveis do conjunto de dados, independentemente da capacidade discriminatória de cada uma na separação dos grupos.

O método *stepwise* é uma alternativa ao método direto, e consiste em selecionar as variáveis que serão utilizadas no cálculo das funções discriminantes baseando-se em algum critério de seleção, e em seguida calculando as funções em etapas. A cada etapa a variável que satisfaz o critério de seleção é adicionada ao cálculo. Entretanto, nem todas as variáveis que satisfaçam esse critério entram indiscriminadamente no cálculo das funções. Cada variável é submetida a um teste de tolerância, calculado como $TOL_i = 1 - R_i^2$ onde R_i^2 é obtido através de um modelo de regressão linear (SEN E SRIVASTAVA, 1990), que visa a identificar a existência de multicolinearidade, entre elas, ou seja, se existem variáveis cuja correlação é tão forte a ponto de uma poder ser totalmente explicada por uma combinação das outras, fato que pode prejudicar a capacidade de produzir funções capazes de separar satisfatoriamente os grupos. As variáveis aceitas no teste de tolerância são utilizadas para o cálculo dos autovalores e autovetores da matriz $W^{-1}B$. Como a análise de discriminante está sendo aplicada para tentar diferenciar três grupos de dados, o número de autovalores encontrados é $\min(g - 1, p) = 2$, os quais fornecem o coeficiente da matriz a , que

maximiza a separação entre os grupos. Esse método é indicado quando se deseja averiguar quais variáveis contribuem significativamente para a separação dos grupos e quais podem ser descartadas sem comprometer o resultado final.

3.4.2. Critério de Classificação

O critério de classificação dos elementos de cada grupo é baseado na medida da distância de Mahalanobis do i -ésimo elemento ao centróide do j -ésimo grupo, dada pela equação (3.25), em que cada elemento é classificado como pertencente ao grupo cujo centróide está mais próximo.

$$D^2 = (X_i - \overline{X}_j)' S_{pooled}^{-1} (X_i - \overline{X}_j) \quad (3.27)$$

Além disso, a validade dos resultados é testada através do processo de validação cruzada, indicado nos casos em que o número de amostras em cada grupo é relativamente pequeno (HAIR *et al.*, 1998). Nesse procedimento, um elemento é retirado do conjunto e as funções discriminantes são novamente calculadas, obtendo novos centróides para cada grupo. Então, mede-se a distância D^2 entre as coordenadas deste elemento e os novos centróides, classificando-o quanto à menor distância.

3.4.3. Eficácia dos modelos de classificação

As variáveis identificadas como significantes ($p < 0,01$) para diagnóstico na análise de discriminante foram utilizadas para classificar as amostras dentro dos três grupos de tecidos analisados neste trabalho. Em um modelo de classificação, nem sempre um resultado positivo ou negativo corresponde respectivamente à presença ou ausência de uma alteração, por isso, é recomendado que sejam utilizados alguns indicadores para estabelecer a eficiência do método, tais como:

Sensibilidade (S): É a probabilidade de detectar a alteração quando ela realmente está presente. Se VP é o número de verdadeiros-positivos e FN de falsos-negativos, a sensibilidade é dada por:

$$S = VP / (VP + FN) \quad (3.28)$$

Especificidade (E): É a probabilidade de se obter um resultado que não detecta uma anomalia. Se VN é o número de verdadeiros-negativos e FP o de falsos-positivos, a especificidade é dada por:

$$E = \frac{VN}{VN + FP} \quad (3.29)$$

Kappa de Cohen (κ): É um parâmetro usado para verificar a reprodutibilidade e validar o modelo, a partir da comparação por métodos de avaliação independentes (diagnóstico médico vs diagnóstico do modelo). Este índice varia de -1 à +1, sendo que $\kappa=-1$ indica completo desacordo entre os avaliadores, $\kappa=0$ indica um dado diagnóstico dado ao acaso e $\kappa=+1$ indica total concordância quanto ao resultado. O procedimento para obtenção do valor de κ é descrito em Pereira (2005).

CAPÍTULO 4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostras

As amostras de tecido mamário analisadas neste trabalho foram fornecidas pelo Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (DP-HCFMRP). Foi coletada a porção mais homogênea do material residual de tecidos retirados em procedimentos cirúrgicos de mastectomia (cirurgia para retirada de parte da mama invadida por tumores) e mastoplastia (cirurgia plástica para redução da mama).

Após coletadas, as amostras eram armazenadas em recipientes plásticos adequados para este tipo de armazenagem e fixados em formalina (10% formaldeído em água) à temperatura ambiente e classificadas histopatologicamente por profissionais do DP-HCFMRP através da análise microscópica das lâminas de tecido, como tecido normal, neoplasia benigna e neoplasia maligna. Esta classificação foi posteriormente confirmada por um docente especialista em patologias mamárias do DP-HCFMRP-USP utilizando os mesmo critérios. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do hospital das Clínicas FMRP-USP de acordo com diretrizes éticas da Declaração de Helsinki e suas revisões (Processo nº 4305/2009).

Neste estudo foram analisadas um total de 106 amostras de tecidos mamários e, destas foram selecionadas dez, as quais representam a distribuição dos diferentes tipos de tecidos estudados neste projeto (5 normais, 2 de neoplasias benignas e 3 de malignas), sendo estas últimas submetidas ao processo de liofilização, visando o estudo da influência das moléculas de água no processo de espalhamento. Neste processo, as amostras foram inicialmente congeladas à -50°C e, em seguida inseridas no liofilizador modelo LS 3000 da Terroni®. Neste, as amostras foram submetidas a pressões negativas (vácuo) e aumento gradativo da temperatura, reduzindo-se deste modo a pressão circunvizinha, fazendo com que a água contida nas amostras passasse diretamente da fase sólida para a fase gasosa (sublimação), sem entretanto modificar as propriedades estruturais das amostras (REY e MAY, 1999). A figura 4.1 esquematiza o processo de liofilização.

Figura 4.1: Diagrama do processo de liofilização.

4.2. Experiências de Espalhamento Elástico de Raios X

Nesta seção serão brevemente descritas as experiências de espalhamento elástico de raios X em médio (WAXS) e baixo ângulo (SAXS). As experiências de WAXS foram realizadas variando o tipo de fonte de radiação (tubo de raios X e radiação síncrotron) e o tipo de geometria (transmissão e reflexão), bem como a forma de preparação das amostras (OLIVEIRA *et al.*, 2008; CONCEIÇÃO *et al.*, 2010c,d). As experiências de SAXS foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron e, como nos experimentos de WAXS também foi modificado o modo de preparação das amostras (CONCEIÇÃO *et al.*, 2009). Por fim, a última parte desta seção será dedicada à descrição de uma experiência teste na qual foram combinadas as técnicas de WAXS e SAXS simultaneamente sobre um mesmo conjunto de amostras (CONCEIÇÃO *et al.*, 2010a).

4.2.1. Espalhamento de raios X em médio ângulo (WAXS) usando tubo de raios X

Nesta seção serão apresentados os materiais e o arranjo experimental utilizados para os experimentos de WAXS usando tubo de raios X convencional, bem como a metodologia de correção e normalização aplicada aos dados medidos de modo a os coeficientes lineares de espalhamento elástico. Maiores informações podem ser obtidas na referência (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

4.2.1.1. Distribuição de Amostras

Para esta experiência foram utilizadas 78 amostras de tecidos mamários, sendo 41 normais, 11 benignas e 26 malignas. Além dessas, também foram estudadas as dez amostras em estado

liofilizado, descritas na seção 4.1. No momento da medida, as amostras foram alocadas em porta-amostras cilíndricos de acrílico, consistindo de uma cavidade central cilíndrica de $18\pm0,2\text{mm}$ de diâmetro e espessura de $4\pm0,2\text{mm}$ e, cobertas por uma fina camada de policloreto de vinila (filme de PVC) com espessura de $1,5\pm0,2\mu\text{m}$.

4.2.1.2. Arranjo Experimental

A distribuição angular dos fótons espalhados elasticamente foi medida no difrattômetro comercial Siemens D-5005 operando em modo de reflexão, pertencente ao Laboratório de Difractometria do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, cujo arranjo experimental adotado é mostrado na figura 4.2.

Figura 4.2: Arranjo experimental para as medidas de difração de raios X.

O arranjo experimental consiste basicamente de um tubo de raios X com ânodo de Cu ($Z=29$; $K_{\alpha} = 8,04 \text{ keV}$ e $K_{\beta} = 8,91 \text{ keV}$) e filtração adicional de Ni. O feixe emergente do ânodo foi colimado por uma fenda divergente vertical com abertura variável localizada a uma distância de $85\pm1\text{mm}$ do ânodo de modo a manter a área irradiada na amostra constante ($6\times12\text{mm}^2$). Em seguida, o feixe passava por uma fenda Söller, localizada a $35\pm1\text{mm}$ da fenda divergente, que tornava o feixe incidente paralelo na horizontal até atingir a amostra. A amostra foi posicionada no centro do goniômetro localizado sobre o eixo central do difrattômetro e a $210\pm1\text{mm}$ do ânodo e girava de forma que o ângulo incidente e o ângulo espalhado fossem iguais em relação à normal à superfície da amostra. O feixe de raios X espalhado pela amostra atravessava uma fenda divergente com abertura variável a $135\pm1\text{mm}$ do centro do goniômetro e uma fenda Söller localizada a $25\pm1\text{mm}$ da fenda divergente. Em seguida, este feixe atingia o monocromador de grafite

($2d=0,2708\text{nm}$) distante $100\pm 1\text{mm}$ da fenda Söller e posicionado em um ângulo de $\theta_m=26,6^\circ$ em relação ao feixe espalhado a fim de selecionar somente os fótons com energia de $8,04\text{ keV}$ e excluir as outras energias (como Compton e múltiplo espalhamento). A radiação espalhada era coletada pelo detector de cintilação, NaI(Tl), com eficiência de 95% na energia selecionada. O detector estava associado a uma eletrônica padrão (fotomultiplicadora e amplificador) e conectado a um microcomputador por uma placa de interface. O software de aquisição dos dados é próprio do difractômetro.

Os fótons espalhados foram detectados variando o ângulo de espalhamento no intervalo de 5° à 80° para as amostras em estado natural e de 2° à 75° para aquelas em estado liofilizado, em passos de $1/3$ de grau, com tempo de contagem típico de 20s em cada ângulo, garantindo assim uma boa contagem de fótons no detector, com uma incerteza estatística ($1/\sqrt{\text{contagens}}$) de 4% .

4.2.1.3. Metodologia

O procedimento necessário para se determinar o perfil de espalhamento (μ_{CS}) a partir das medidas de espalhamento de raios X em médio ângulo por tecidos mamários engloba várias etapas, seguindo a abordagem teórica descrita para espalhamento elástico na região de WAXS (seção 3.3.1.4) e dado pela seguinte equação:

$$\mu_{CS} = [I_{\text{exp}}(q) - B(q) \cdot T(q)] \cdot (K(q) \cdot P(q) \cdot A(q))^{-1} \cdot \frac{r_0^2}{2} (1 + \cos^2 \theta) \cdot C \quad (4.1)$$

A primeira etapa consiste em remover, da intensidade espalhada medida $I_{\text{exp}}(q)$, os fótons que chegam ao detector não oriundos da amostra de tecido analisada, neste caso devido ao ar, ao porta-amostras e ao filme de PVC, através do fator $B(q)$ ponderado pelo fator de transmissão da amostra ($T(q)$). Em seguida, é necessário que a intensidade espalhada exclusivamente pela amostra (termo entre colchetes) seja corrigida pelos fatores: $K(q)$ devido à variação de intensidade do feixe para se manter a área de irradiação constante, $P(q)$ decorrente da polarização parcial induzida pelo uso do monocromador de grafite no feixe espalhado (AZZAROF, 1968), atenuação e fatores geométricos $A(q)$ e multiplicado pela seção de choque Thomson ($r_0^2/2(1+\cos^2\theta)$), onde θ está relacionado a q por: $\theta = 2 \sin^{-1} \left(q \cdot \frac{\lambda}{4\pi} \right)$ e r_0 corresponde ao raio clássico do elétron. Por fim, a

grandeza obtida deve ser normalizada pelo fator C para se obter o μ_{cs} . Os procedimentos de correção e normalização realizados serão detalhados a seguir.

Todos os fótons que atingem o detector, não oriundos da amostra de tecido analisada, são considerados como contribuições espúrias ao perfil de espalhamento. Conforme mostrado na figura 4.3a para uma amostra de água líquida, as contribuições espúrias foram registradas em vários experimentos: (i) a intensidade espalhada pelo porta-amostras coberto com o filme de PVC, (ii) somente pelo porta-amostras e por fim (iii) somente pelo ar ; em seguida foram removidas da equação (4.1) através do fator $B(q)$ ponderado pelo fator de transmissão da amostra ($T(q)$). Ainda, na figura 4.3a nota-se que o filme de PVC apresenta um pico em baixo momento transferido que poderia influenciar as medidas nesta região, bem como, o porta-amostra apresenta intensidade crescente em altos momentos transferidos, representando cerca de 10% na intensidade total medida nesta região, o que evidencia a importância de se remover as contribuições espúrias da intensidade total medida.

Para se manter a área irradiada constante sobre a superfície da amostra, de modo a irradiar sempre a mesma área do tecido, foi utilizado um recurso do difractômetro em que a abertura das fendas divergentes variava com o ângulo de medida. Conforme o ângulo de incidência do feixe de raios X aumentava, uma maior abertura da fenda era necessária para manter a área de irradiação constante, isto era, portanto, acompanhado por um aumento do número de fótons que atingem a referida área. Dessa forma, há a necessidade de que as medidas sejam corrigidas pela variação da intensidade do feixe, provocada pelo aumento da abertura da fenda. O fator de variação da intensidade $K(q)$ foi obtido experimentalmente, obtendo-se o valor do ângulo de divergência da fenda em cada ângulo de medida e, posteriormente colocando um cristal, cujo ângulo de difração do cristal era conhecido na posição da amostra. Então, mediu-se a intensidade espalhada para cada ângulo de divergência da fenda obtendo assim, a variação da intensidade do feixe em relação à abertura de divergência da fenda e, finalmente foi determinada a variação da intensidade espalhada em relação ao ângulo de incidência do feixe na amostra, conforme mostrado na figura 4.3b. Esse fator foi comprovado teoricamente e, verificado que se comporta como uma função $\sin(\theta)$. Entretanto, na figura 4.3b, este comportamento não é evidente, isto se deve ao fato de que no eixo das abscissas a grandeza presente é o momento transferido que também depende da função seno.

Ainda, ao utilizarmos um cristal monocromador no sistema de detecção, o feixe emergente deste será parcialmente polarizado (JAMES, 1962). A polarização parcial induzida pelo uso de um monocromador no feixe espalhado pela amostra deve ser considerada, uma vez que ela afetará a

intensidade medida. Portanto, há a necessidade de se corrigir as intensidades medidas pelo fator de polarização $P(q)$, dado mostrado por Azzarof (1968) (equação 4.2) e exibido na figura 4.3c.

$$P = \frac{1 + \cos^2 \theta \cos^2 \theta_M}{1 + \cos^2 \theta} \quad (4.2)$$

em que θ é o ângulo de espalhamento da amostra e θ_M é o ângulo de difração do monocromador.

Para a geometria utilizada neste experimento de WAXS em que ambos, fonte e detector, estão do mesmo lado da amostra, denominada de modo reflexão, o fator de atenuação e efeitos geométricos $A(q)$ pode ser calculado seguindo o método proposto por Milberg (1958), considerando algumas variações decorrentes da condição de área irradiada constante. Este fator foi calculado e seu comportamento em função do momento transferido para uma amostra de água líquida é exibido na figura 4.3d.

Figura 4.3: Fatores de correção para obtenção do μ_{CS} : **a)** medida experimental das contribuições espúrias; **b)** variação da intensidade do feixe incidente experimental; **c)** comportamento do fator de polarização; **d)** Fator de atenuação teórico para uma amostra de água.

Finalmente, para se obter o coeficiente linear de espalhamento elástico a quantidade corrigida foi normalizada através do fator de normalização C . Este fator pode ser calculado como a média da razão entre os dados teóricos I_{Theor} e os dados experimentais correspondentes I_{exp} , no intervalo de momento transferido $40\text{-}70\text{nm}^{-1}$, que além de assegurar que os efeitos de interferência podem ser ignorados, também representa um período completo, onde dois máximos adjacentes de difração sejam praticamente imperceptíveis (POLETTI *et al.*, 2002b). Assim, o fator de normalização é dado por:

$$C = \frac{1}{n} \sum_i \frac{I_{Theor}(q_i)}{I_{exp}(q_i)} \quad 40 \leq q \leq 70 \text{ nm}^{-1} \quad (4.3)$$

em que n é o número de pontos medidos no intervalo escolhido.

Neste caso, o I_{Theor} foi calculado a partir do MAI baseando-se nas composições químicas elementares de cada amostra apresentadas na seção 4.3 e na equação 4.3.

A incerteza associada ao μ_{CS} foi estimada por propagação de erros da equação (4.1) e as variáveis foram assumidas não correlacionadas e apenas incertezas associadas a grandezas experimentais foram levadas em conta, resultando em uma incerteza total final de 8%. Em relação à incerteza devido ao momento transferido, esta foi determinada da mesma maneira sendo em média 2% no intervalo utilizado neste estudo.

De modo a validar o procedimento experimental adotado neste estudo de WAXS utilizando tubo de raios X foi feita uma comparação do coeficiente linear de espalhamento elástico obtido experimentalmente com o reportado por Morin (1982) para uma amostra de água líquida. No intervalo de momento transferido medido, a discrepância máxima entre os dois resultados foi de 6% e, portanto dentro das incertezas experimentais, figura 4.4.

Figura 4.4: (a) comparação do coeficiente linear de espalhamento elástico para água líquida obtido experimentalmente com o reportado por Morin (1982); (b) diferença relativa entre as curvas da figura (a).

4.2.2. Espalhamento de raios X em médio ângulo (WAXS) usando radiação síncrotron

Nesta seção serão abordados os materiais e o procedimento de medida adotados para os experimentos de WAXS usando radiação síncrotron, bem como a metodologia de correção e normalização aplicada aos dados medidos de modo a obter os coeficientes lineares de espalhamento elástico (CONCEIÇÃO *et al.*, 2010c,d).

4.2.2.1. Distribuição de Amostras

Neste experimento foram utilizadas 106 amostras de tecidos mamários classificadas histopatologicamente conforme figura 4.5. No instante da realização das medidas, as amostras foram cortadas de modo a preencher um porta-amostras de dimensões, $15,0 \pm 0,1 \text{ mm} \times 8,0 \pm 0,1 \text{ mm} \times 4,0 \pm 0,1 \text{ mm}$ e cobertas por uma folha de kapton, de $170 \pm 5 \mu\text{m}$ de espessura, em ambos os lados do porta-amostra, como mostrado na figura 4.6.

Figura 4.5: Distribuição histopatológica das amostras de tecidos analisadas neste experimento.

Figura 4.6: Esboço de posicionamento do porta-amostra no difrattômetro Huber.

4.2.2.2. Arranjo Experimental

Os experimentos de WAXS utilizando radiação síncrotron foram realizados na linha D12A–XRD1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas, Brasil. A escolha da radiação síncrotron se deve as vantagens em relação ao tubo de raios X como: alta intensidade do feixe, colimação natural, polarização linear, entre outras características que permitem reduzir o tempo de medida e as correções espectrais, diminuindo assim as incertezas experimentais. A montagem experimental (figura 4.7) utilizada é composta basicamente de uma fonte (dipolo), um espelho sagital usado para filtrar fótons de altas energias e focalizar verticalmente o feixe, um monocromador de duplo cristal de Si(111) ($d = 3,1356 \text{ \AA}$) usado para selecionar a energia de 11keV e reduzir a área de irradiação sobre a amostra (5,5mm x 1,0mm) e um difrattômetro Huber de 3+1 círculos, operando em modo de transmissão, onde as amostras foram inseridas centralmente sobre uma mesa rotativa e distante $210 \pm 1 \text{ mm}$ do sistema de detecção, composto por um monocromador de grafite, para selecionar somente os fótons espalhados com energia de 11keV e um detector cintilador de NaI(Tl) com capacidade para 10^6 contagens/s e ao redor de 50% na energia utilizada neste experimento.

Figura 4.7: Montagem experimental na linha D12A - XRD1 no LNLS.

O difratômetro Huber tem precisão angular de $\pm 0,03^\circ$ e neste experimento foram realizadas medidas no intervalo de $0,8^\circ$ a $78,55^\circ$ com passos de $0,25^\circ$, correspondendo a um intervalo de momento transferido de $0,7 \leq q \leq 70,55 \text{ nm}^{-1}$. O tempo de medida foi escolhido para que a incerteza estatística ($1/\sqrt{\text{counts}}$) associada ao fluxo de fótons durante as medidas fossem menores que 2%.

4.2.2.3. Metodologia

O coeficiente linear de espalhamento elástico para cada amostra foi determinado de maneira semelhante aos procedimentos adotados para obtenção do mesmo usando tubo de raios X (seção 4.2.1.3), exceto pelo fato de que neste caso as correções devido à variação da intensidade do feixe $K(q)$ e à polarização $P(q)$ não são necessárias:

$$\mu_{CS}(q) = [I_{\text{exp}}(q) - B(q) \cdot T(q)] \cdot A(q)^{-1} \cdot \frac{r_0^2}{2} (1 + \cos^2 \theta) \cdot C \quad (4.4)$$

Semelhante ao descrito para WAXS usando tubo de raios X, neste experimento o termo $B(q)$ está relacionado às contribuições espúrias devido ao ar, porta-amostras e folhas de kapton, figura 4.8a; o termo $A(q)$ corresponde ao fator de correção para atenuação e efeitos geométricos. Para a geometria de transmissão, como a utilizada neste experimento, o fator $A(q)$ foi determinado analiticamente e seu comportamento, exibido na figura 4.8b, concorda com os obtidos por Gonçalves e Magalhães (2000).

Figura 4.8: Fatores de correção dos dados experimentais: **a)** medida experimental do espalhamento por contribuições espúrias; **b)** Comportamento do fator de atenuação e efeitos geométricos de uma amostra de água líquida na geometria de transmissão.

Posteriormente às correções, os dados foram normalizados seguindo o mesmo procedimento utilizado para o experimento de WAXS usando tubo de raios X.

Para este experimento WAXS utilizando radiação síncrotron, a incerteza total associada ao coeficiente linear de espalhamento elástico foi de 6% e aquela relativa ao momento transferido foi novamente de 2%.

Por fim, o procedimento experimental empregado neste experimento foi validado através da água. Assim, da comparação dos perfis de espalhamento de amostras de água líquida, as discrepâncias foram menores que 5% no intervalo de momento transferido medido e dentro das incertezas experimentais, figura 4.9.

Figura 4.9. **a)** coeficiente linear de espalhamento elástico experimental para água comparado com o tabulado por Morin (1982); **b)** Diferença relativa entre as duas curvas exibidas em a).

4.2.3. Espalhamento de raios X em baixo ângulo (SAXS)

Nesta seção serão descritos os materiais, a montagem experimental e a metodologia adotada na obtenção dos perfis de espalhamento de tecidos mamários em baixos ângulos. Maiores detalhes podem ser obtidos na referência (CONCEIÇÃO *et al.*, 2009).

4.2.3.1. Distribuição de Amostras

Para os experimentos de SAXS foram utilizadas um total de 106 amostras, englobando os três tipos de tecidos mamários previamente descritos, conforme exibido na figura 4.5. Além destas, as dez amostras em estado liofilizado, descritas na seção 4.1, também tiveram seu perfil de espalhamento em baixo ângulo determinado.

Cada amostra foi cortada de forma a preencher um porta-amostras cilíndrico de alumínio com diâmetro interno de 10,0mm e espessura de 1,0mm e coberta por folhas de mica de espessuras de 0,2mm em ambos os lados do porta-amostras no momento da realização das medidas, conforme figura 4.10.

4.2.3.2. Arranjo Experimental

Os experimentos de SAXS foram implementados na linha D02-SAXS2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas, Brasil, cuja montagem experimental é exibida abaixo:

Figura 4.11: Esboço da montagem experimental padrão para experimentos de SAXS.

Conforme exibido na figura 4.11, a montagem experimental consiste basicamente de uma fonte, monocromador de duplo cristal de silício, Si(111), curvado elasticamente, para monocromatizar o feixe em 8,4keV ($\lambda=1,488\text{\AA}$) e focalizá-lo em uma pequena área sobre o detector

(1,0mm x 0,5mm), um porta-amostras, uma câmara de vácuo para reduzir o espalhamento do ar e perdas por absorção entre a amostra e o detector, dois conjuntos de espalhador/detector (placa de alumínio/ detector NaI(Tl)) para determinação da atenuação da amostra e, um detector de CCD bidimensional da MARUSA®, composta de 2048 x 2048 pixels, cada um com resolução espacial de 79µm. Ainda, um disco de chumbo de 8mm de diâmetro, denominado *beam stop*, foi adicionado adjacente ao detector e centralizado a este, para evitar que o feixe primário, de alta intensidade, o atinja, saturando-o. Três imagens SAXS foram adquiridas para cada tecido, sendo uma na porção central e outras duas adjacentes a esta separadas por 2mm. Essas imagens foram somadas a fim de se obter um perfil de espalhamento médio para toda a amostra, uma vez que essas foram consideradas homogêneas.

Nos vários experimentos de SAXS, diferentes distâncias entre a amostra e o detector foram utilizadas, desde 381mm até 2043mm de forma a permitir medidas no intervalo de momento transferido $0,058\text{nm}^{-1} \leq q \leq 2,500\text{nm}^{-1}$, para amostras em estado natural e no intervalo de $0,150\text{nm}^{-1} \leq q \leq 8,500\text{nm}^{-1}$ para amostras em estado liofilizado. Amostra padrão de Behenato de prata $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOAg}]$ foi utilizada para calibração da imagem para o espaço recíproco, q , a partir dos resultados de Huang *et al.* (1993).

4.2.3.3. Metodologia

As imagens SAXS, isto é a distribuição radial dos fótons espalhados, consistem de arcos, cujo raio aumenta com o momento transferido (q) e, no caso das amostras de tecidos mamários duas direções podem ser claramente observadas: meridional e equatorial, conforme figura 3.12. Dessa forma, foi extraída a intensidade espalhada elasticamente unidimensional em função de q para todas as amostras medidas, tecidos e contribuições espúrias, através da integração das imagens SAXS nas direções meridional e equatorial (WILKINSON *et al.*, 2006), figura 4.12, usando o programa Fit2D, disponibilizado por *European Synchrotron Radiation Facilities* (<http://www.esrf.eu/computing/scientific/FIT2D/>).

As intensidades espalhadas foram corrigidas por tempo de exposição, variação da corrente de elétrons no anel síncrotron e atenuação, tanto da amostra quanto das folhas de mica. A atenuação de cada amostra foi experimentalmente determinada usando o conjunto espalhador/detector e considerada constante para todo o intervalo de momento transferido medido, pois pode-se considerar $\cos(\theta) \approx 1$ para espalhamento em baixos ângulos. Por fim, para se obter uma relação

com o coeficiente linear de espalhamento elástico foram removidas as contribuições espúrias, que neste caso são devidas ao porta-amostras e as folhas de mica, já devidamente corrigidas pelos fatores descritos anteriormente.

$$\mu_s(q) \propto [I_{A+BG}(q) \cdot A_{A+BG}(q) - I_{BG}(q) \cdot A_{BG}(q)] \quad (4.5)$$

em que I_{A+BG} e I_{BG} são as intensidades totais espalhadas por (amostra + porta-amostra + folhas de mica) e (porta-amostra + folhas de mica), respectivamente, normalizadas pelo tempo de exposição e pela variação da corrente de elétrons no anel síncrotron. $A(q)$ corresponde ao fator de atenuação. Os índices das grandezas na expressão acima estão relacionados à amostra (A) e porta-amostra + folhas de mica (BG).

Figura 4.12: Exemplo de uma imagem de SAXS com o sistema de coordenadas.

Ao invés de utilizar o coeficiente linear de espalhamento elástico que é proporcional à quantidade do lado direito da equação 4.5, será utilizado o parâmetro intensidade relativa I_R , uma vez que nesta região de momento transferido, os efeitos de interferência entre os átomos não podem ser desprezados, por isso, torna-se incorreto normalizar os dados como foi feito para os dados na região de WAXS utilizando o conceito de MAI para a obtenção do coeficiente linear de espalhamento elástico.

$$I_R = I_{A+BG}(q) \cdot A_{A+BG}(q) - I_{BG}(q) \cdot A_{BG}(q) \quad (4.6)$$

Neste experimento, a incerteza total associada à intensidade relativa espalhada pela amostra, determinada através da propagação de erros da equação (4.6) e as grandezas assumidas não correlacionadas, foi, em média, de 5,5%. Quanto ao momento transferido a incerteza se manteve em 2% como nos experimentos anteriores.

3.2.4. Combinação simultânea das técnicas de WAXS e SAXS

Com a finalidade de permitir a correlação entre as mudanças em nível atômico e molecular com aquelas em escala supramolecular, foram combinadas as técnicas de WAXS e SAXS usando radiação síncrotron sobre um mesmo conjunto de amostras.

3.3.4.a. Distribuição de Amostras

Por se tratar de uma experiência teste foram utilizadas um total de oito amostras, sendo quatro classificadas como normais, duas como neoplasia benigna e três como neoplasia maligna. No momento da realização das medidas, as amostras foram cortadas nas dimensões de 10mm x 2mm x 1mm, alocadas em porta-amostras e cobertas por folha de mica em ambos os lados, como nos experimentos de SAXS.

3.2.4.b. Arranjo Experimental

A combinação simultânea das técnicas de WAXS e SAXS foi implementada na linha D11A-SAXS1 do LNLS, cujo arranjo experimental é exibido na figura 4.13. Essa montagem é muito similar àquela utilizada para os experimentos de SAXS, exceto por: i) foi inserido um detector para registrar os fótons espalhados na região de WAXS; e ii) ao invés de uma câmara CCD foram utilizados detectores bidimensionais “image plate” modelo BAS III da Fuji, os quais, após expostos, passavam pelo scanner de alta resolução (100 μ m) MAR 300 da Molecular Dynamics®. A distribuição radial dos fótons espalhados elasticamente pelas amostras de tecidos mamários foi detectada simultaneamente em ambos os detectores, cujas distâncias da amostra foram fixadas em 200mm e 1590mm cobrindo os intervalos de momento transferido de $6,28\text{nm}^{-1} \leq q \leq 50,26\text{nm}^{-1}$ e $0,15\text{nm}^{-1} \leq q \leq 1,90\text{nm}^{-1}$ para WAXS e SAXS, respectivamente. Amostras padrões de alumina

(Al₂O₃) e behenato de prata [CH₃(CH₂)₂₀COOAg] foram utilizadas para calibração das imagens de WAXS e SAXS para o espaço recíproco, q , respectivamente. O tempo de medida foi ajustado para garantir uma incerteza estatística, menor que 2%, na contagem dos fótons espalhados elasticamente.

Figura 4.13: Montagem experimental da linha D11A-SAXS1 no LNLS utilizada para as medidas combinando WAXS e SAXS simultaneamente.

3.2.4.c. Metodologia

Posteriormente à digitalização, todas as imagens (padrões, amostras e porta-amostra) de WAXS e SAXS foram processadas usando o programa Fit2D (<http://www.esrf.eu/computing/scientific/FIT2D/>) para se extrair a distribuição de intensidade espalhada em função do momento transferido. Para as imagens de WAXS, cada faixa nas imagens foi integrada na direção vertical, figura 4.14. Enquanto que, para as imagens de SAXS esta integração foi realizada em ambas as direções, meridional e equatorial (WILKINSON *et al.*, 2006), como mostrado na figura 4.12.

A obtenção coeficiente linear de espalhamento elástico (μ_{CS}) a partir da distribuição angular dos fótons espalhados elasticamente neste experimento requer várias etapas. A primeira corresponde à correção das medidas pela variação da corrente de elétrons no anel síncrotron durante as medidas. Já a segunda etapa consiste em eliminar todos os fótons provenientes de contribuições espúrias, que para este experimento são devidas ao porta-amostras, folhas de mica e colimadores (figura 4.15). Na etapa seguinte, o resultado deve ser corrigido por atenuação e efeitos geométricos seguindo os mesmos procedimentos descritos nas seções 4.2.2.3 e 4.2.3.3 respectivamente para WAXS e SAXS, resultando na equação (4.7). Por fim, o μ_{CS} é determinado normalizando a quantidade obtida até então por um fator de normalização C na região entre 40nm⁻¹ e 50nm⁻¹, equação (4.7).

$$\mu_{CS}(q) = [I_{A+BG}(q) \cdot A_{A+BG}(q) - I_{BG}(q) \cdot A_{BG}(q)] \cdot C \quad (4.7)$$

Uma vez que não existe um intervalo de momento transferido comum aos experimentos de WAXS e SAXS, o que permitiria normalizar a distribuição de intensidade espalhada na região de SAXS utilizando o perfil de espalhamento da mesma na região WAXS, será utilizada novamente o parâmetro intensidade relativa (I_R) para quantificar a intensidade espalhada na região de SAXS, conforme mencionado anteriormente para o experimento independente de SAXS, equação (4.6), seção 4.2.3.3.

Figura 4.14: Imagens de WAXS. Da esquerda para a direita, cada faixa corresponde à distribuição de intensidade espalhada de: três tipos de tecidos mamários (normal, maligno e benigno), contribuições espúrias e amostra padrão de alumina.

Figura 4.15: Intensidade espalhada por contribuições espúrias para os experimentos de: a) SAXS e b) WAXS.

As incertezas foram estimadas da mesma maneira que nos experimentos anteriores, resultando uma incerteza final para o μ_{CS} (em WAXS) de 6,4% e 5,5% para a I_R (em SAXS).

4.3. Determinação da composição elementar e densidade das amostras de tecidos mamários

Visando realizar uma correção mais apropriada aos espectros medidos, foram determinadas a composição química elementar e a densidade física das 106 amostras de tecidos mamários em estado natural, bem como das 10 em estado liofilizado estudadas neste trabalho.

A análise química elementar foi realizada no Laboratório de Análise Elementar do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, utilizando um Analisador Elementar (CHN), modelo EA 1110, da CE Instrumentos. Para esse procedimento, uma pequena porção de cada amostra, entre 2 e 3mg, foi acondicionada em uma cápsula de estanho e, posteriormente inserida no analisador. Os elementos C, H e N, foram analisados simultaneamente mediante curva de calibração obtida com padrões secos e de alta pureza em condições iguais às das análises, com temperatura de queima de 60 segundos, sob temperatura de 1000°C e fluxo de gás de hélio. Todas as análises foram feitas em duplicatas e, assumindo que as amostras possuem apenas concentrações relevantes de C, H, N e O, a concentração de O foi calculada pela diferença entre o total e a soma das concentrações dos outros três elementos. Os valores experimentais obtidos estão dispostos na tabela 4.1 e concordam com outros previamente publicados (WOODARD e WHITE, 1986; POLETTI *et al.*, 2002).

Tabela 4.1. Composição química elementar dos três tipos de tecidos mamários estudados

Tecidos	Hidrogênio (H)			Carbono (C)			Nitrogênio (N)			Oxigênio (O)		
	Min.	Máx.	Méd.	Min.	Máx.	Méd.	Min.	Máx.	Méd.	Min.	Máx.	Méd.
Normal	6,3	11,0	9,3	40,9	72,9	53,6	0,3	4,9	2,4	11,4	48,7	30,0
Benigno	1,8	8,4	4,1	8,6	33,7	15,4	2,1	4,3	3,2	55,4	86,2	77,3
Maligno	2,4	10,8	6,4	11,7	67,2	29,4	0,5	5,8	3,4	21,4	81,1	60,8

Já a densidade das amostras foi determinada a partir de pequenas porções de volume de cada amostra, aproximadamente 1cm³, através do método da “pesagem hidrostática”, baseado no princípio de Arquimedes e as medidas de seu volume e suas massas, real e aparente. Este princípio considera que, devido ao empuxo, a massa aparente de um corpo varia quando este está imerso em diferentes fluidos. Para tal procedimento foi medida a massa real no ar e a massa aparente, quando esta encontrava imersa em um béquer com água, de cada amostra, conforme o arranjo experimental exibido na figura 4.16. Dessa forma, os valores de densidade para os três tipos de tecidos estudados neste trabalho são exibidos na tabela 4.2.

Figura 4.16: Arranjo experimental para determinação da densidade das amostras

Tabela 4.2. Densidade física das amostras de tecidos mamários normais e neoplásicos

Tecidos	Mínimo (g/cm³)	Máximo (g/cm³)	Médio (g/cm³)
Normal	0,89	1,04	0,96
Benigno	1,02	1,08	1,05
Maligno	1,01	1,07	1,04

Ainda, as amostras submetidas ao processo de liofilização também tiveram seus parâmetros químicos e físicos determinados através dos mesmos procedimentos descritos acima para análise química elementar e densidade física. Na tabela 4.3 é feita uma comparação entre os valores destes parâmetros para as mesmas amostras de cada tipo de tecido em estado natural e liofilizado.

Tabela 4.3. Comparação dos parâmetros físicos das amostras em estado natural e liofilizado

Tecidos	Estado	H	C	N	O	Densidade (g/cm³)
Normal	Natural	10,7	63,0	3,0	23,3	0,91
	Liofilizado	10,8	70,8	0,8	17,6	0,78
Benigno	Natural	9,8	16,3	4,1	69,8	1,06
	Liofilizado	7,3	45,5	13,1	34,1	0,67
Maligno	Natural	10,2	16,9	3,9	69,0	1,04
	Liofilizado	7,4	46,4	11,9	34,3	0,59

4.4. Análise Estatística

Os perfis de espalhamentos obtidos nos experimentos de SAXS e WAXS foram submetidos à análise estatística exploratória para verificar estatisticamente quais as variáveis mais significantes na diferenciação dos três grupos de tecidos mamários analisados neste trabalho. Posteriormente, as funções discriminantes foram calculadas a fim de elaborar um modelo diagnóstico baseado nos perfis de espalhamento.

4.4.1. Obtenção das Funções Discriminantes

A análise de discriminante consiste em encontrar uma combinação linear das variáveis originais que maximize a separação entre os grupos de amostras, para isso cada valor de momento transferido (q) dos perfis de espalhamento foi considerado como uma variável independente conforme mostrado por Cunha *et al.* (2006). Em seguida, foram testados os parâmetros exigidos para o cálculo da função discriminante (linearidade, normalidade e homogeneidade), conforme descrito na seção 3.4.1, e aceitos dentro do nível de significância adotado ($p < 0,01$). Posteriormente, foram calculadas as funções discriminantes pelo método passo-a-passo (stepwise) utilizando a distância D^2 de Mahalanobis entre os centróides $\bar{Z}_1$ e $\bar{Z}_2$ de cada grupo como critério de seleção através do software SPSS (versão 13.0, LEAD Technologies, Inc., 2004).

4.4.1. Modelo de classificação

O modelo de classificação foi construído utilizando a medida da distância de Mahalanobis como critério de classificação de uma amostra.

A validação do modelo de classificação foi verificada através do procedimento de validação cruzada, onde uma amostra é retirada e as funções discriminantes são recalculadas, comparando-se então a projeção dessa amostra no novo espaço, e classificando-a quanto à sua proximidade aos centróides.

Ainda, foram calculados os parâmetros sensibilidade e especificidade para avaliar a eficácia do modelo, bem como o parâmetro κ para analisar a reprodutibilidade deste.

CAPÍTULO 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Espalhamento de raios X em médio ângulo (WAXS)

5.1.1. Perfil de espalhamento (μ_{CS}): determinação de estruturas moleculares e análise estatística

Os perfis de espalhamento na região de WAXS, representados pelos coeficientes lineares de espalhamento elástico μ_{CS} , foram obtidos para cada tipo de tecido mamário em ambos estados (natural e liofilizado) através da aplicação dos procedimentos de correção e normalização, descritos anteriormente (seções 4.2.1.3 e 4.2.2.3), às distribuições angulares da intensidade de fótons espalhados elasticamente medidas. Assim, através desses perfis foram determinadas as estruturas moleculares presentes nos tecidos mamários normais e neoplásicos.

Figura 5.1: Perfil de espalhamento de amostras típicas dos três tipos de tecidos mamários estudados neste trabalho utilizando WAXS. A categoria denominada tecido normal foi subdividida em normal adiposo e normal fibroglandular¹.

¹ Tecido normal fibroglandular é a denominação utilizada para designar amostras compostas por proporções de tecido fibroso e glandular.

A figura 5.1 apresenta o perfil de espalhamento de amostras típicas dos três tipos de tecidos mamários estudados neste trabalho. Dessa figura pode-se observar que o perfil de espalhamento representa uma assinatura de cada grupo de tecido e possui características de materiais amorfos, como picos alargados. Ainda, da comparação dos perfis apresentados na figura 5.1 verifica-se diferenças tanto na posição quanto na intensidade de cada pico.

O perfil de espalhamento típico de uma amostra de tecido normal adiposo é caracterizado por um intenso pico na posição de $q=13,9\text{nm}^{-1}$ e outro situado em $q=28,2\text{nm}^{-1}$. O primeiro pico está relacionado ao espalhamento construtivo de elementos que distam cerca de $4,5\text{\AA}$ entre si como ocorre na cadeia carbônica dos ácidos graxos (LIDE, 1996). Os ácidos graxos são os principais componentes dos adipócitos, visualizados na lâmina histológica de uma amostra de tecido normal adiposo apresentada na figura 5.2. Já o segundo pico pode estar associado ao espalhamento harmônico do pico de ácidos graxos em $q=13,9\text{nm}^{-1}$. Um harmônico corresponde a um múltiplo inteiro do momento transferido fundamental, especificamente neste caso, $q=13,9\text{nm}^{-1}$. Portanto, nessa região de momento transferido podemos concluir que o perfil de espalhamento de tecido normal adiposo carrega informação sobre estruturas relacionadas a moléculas de ácidos graxos.

Figura 5.2: Lâmina histológica de uma amostra de tecido normal adiposo onde é possível visualizar os adipócitos

Diferentemente do perfil de espalhamento referente a tecido normal adiposo, o perfil associado a tecido normal fibroglandular apresenta um pico na posição de $q=19,8\text{nm}^{-1}$ ao invés do pico de ácidos graxos ($q=13,9\text{nm}^{-1}$) característico de tecido adiposo. Esse pico corresponde ao espalhamento entre centros espalhadores, cuja distância entre eles é de $3,0\text{\AA}$ e, segundo Voet (1995) essa é a distância entre os centros espalhadores oxigênio-oxigênio de duas moléculas de água adjacentes. Além do pico, o restante do perfil também apresenta uma grande similaridade com o perfil de espalhamento obtido para uma amostra da água líquida (MORIN, 1982). A existência de água nestes tecidos já era esperada dada a grande quantidade de ácinos, a unidade fundamental do

tecido glandular, cujo principal constituinte é a água, conforme descrito na seção 3.1 e avaliada na próxima seção. Portanto, o estudo dos tecidos fibroglandulares na região de WAXS permite obter informações sobre a presença de água nesses tecidos, representando a componente glandular, uma vez que nesta região de momento transferido, o espalhamento das fibras de colágeno que representaria a componente fibrosa é insignificante (BOHNDIEK *et al.*, 2008).

Visto que o desenvolvimento dos tecidos neoplásicos ocorre a partir dos tecidos fibroglandulares, as lâminas histológicas mostradas nas figuras 5.3a e b, correspondentes a amostras de fibroadenoma e carcinoma ductal invasivo respectivamente, destacam estas duas componentes teciduais principais: uma formada por fibras (componente fibrosa) e outra por ácinos (componente glandular). Nesse sentido, o perfil de espalhamento das amostras neoplásicas apresenta-se muito similar àquele relativo a tecido normal fibroglandular, figura 5.1, evidenciado, sobretudo pelo pico na posição de $q=19,8\text{nm}^{-1}$. Embora apresentem formas semelhantes, os perfis se diferenciam quanto à intensidade, principalmente no pico correspondente a água. Comparando-se a intensidade do pico relacionado à água, verifica-se que as neoplasias malignas apresentam um pico mais intenso que as benignas. A existência de um maior conteúdo de água em tumores malignos, em concordância com Kruger *et al.* (2000), deve-se a um aumento na vascularização durante o desenvolvimento do tumor (TROMBERG, *et al.* 1997).

Figura 5.3: Lâmina histológica de uma amostra de tecido neoplásico: em **a)** neoplasia benigna (fibroadenoma) e em **b)** neoplasia maligna (carcinoma ductal invasivo).

Ainda com relação às neoplasias malignas, algumas amostras também apresentaram um pico estreito, característico de estrutura cristalina, na posição de $q=16,8\text{nm}^{-1}$, como pode ser visualizado na figura 5.4. Este pico pode estar associado ao espalhamento construtivo de cristais de

hidroxiapatita (FARQUHARSON e SPELLER, 1997), os quais são indicadores da presença de microcalcificações, que por sua vez apontam para a malignidade do tumor (MORGAN *et al.*, 2005).

Figura 5.4: Perfil de espalhamento de uma amostra de carcinoma ductal invasivo destacando a presença de calcificação.

Dessa forma, na tabela 5.1 é apresentado um resumo das estruturas moleculares extraídas dos perfis de espalhamento para cada grupo de tecido mamário analisado na região de WAXS. Cabe mencionar que a posição do pico está relacionada, através da lei de Bragg, a distância entre os centros espalhadores numa amostra.

Tabela 5.1. Picos dos três tipos de tecidos mamários histologicamente classificados.

Tipo de Tecido	Posição do pico (nm ⁻¹)	Estrutura Molecular
Normal adiposo	13,9±0,3	Ácidos graxos
	28,2±0,7	Ácidos graxos
Normal Fibroglandular	19,8±0,4	Água
Neoplasia benigna	19,8±0,5	Água
Neoplasia Maligna	16,8±0,4	Hidroxiapatita
	19,8±0,5	Água

Finalmente, a aplicação da análise de estatística nos perfis de espalhamento em médio ângulo, conforme procedimento descrito na seção 4.4 permitiu a obtenção de duas funções

discriminantes que maximizava a separação dos três grupos de tecidos (normal, benigno e maligno) e, a partir destas foi construído o gráfico da figura 5.5. A validação do modelo de classificação foi obtida através do método de validação cruzada e os valores resultantes permitiram avaliar a eficácia do modelo, conforme apresentado na tabela 5.2 (CONCEIÇÃO *et al.*, 2010d).

Figura 5.5: Distribuição das amostras no espaço discriminante Função 1 x Função 2. Os símbolos sem preenchimento representam os centróides de cada grupo.

Tabela 5.2. Eficácia e Validação do modelo diagnóstico em WAXS.

Comparação entre Grupos	Sensibilidade (S)	Especificidade (E)	Valor de κ
Normal x Benigno	100%	100%	1,00
Normal x Maligno	88%	93%	0,79
Benigno x Maligno	100%	97%	0,93

Através do modelo diagnóstico baseado nos perfis de espalhamento na região de WAXS, verifica-se que este distingue corretamente as amostras normais das neoplásicas benignas seguindo a mesma tendência que Oliveira *et al.* (2008) e Conceição *et al.* (2010c), tabela 5.3. Ainda da comparação da eficácia deste modelo com aqueles previamente publicados e dispostos na tabela 5.3, vemos que em relação à classificação entre neoplasias benignas e malignas, o modelo desenvolvido neste trabalho apresenta resultados superiores aos publicados por Ryan *et al.* (2007) e Oliveira *et al.* (2008). A disparidade entre os resultados deste trabalho com os de Ryan *et al.* (2007) pode-se dever ao fato de que estes utilizaram como variáveis parâmetros extraídos dos perfis, o que além de aumentar a incerteza pode não ser em número suficiente para classificar corretamente as amostras, já com relação a Oliveira *et al.* (2008) pode ser decorrente do baixo número de amostras

analisadas por estes. Ainda, da eficácia do modelo na separação entre tecido normal e neoplasia maligna, este apresentou bons resultados, porém não alcançou os publicados por Cunha *et al.* (2006). Isto pode ser devido ao fato de que as amostras normais analisadas por estes poderiam possuir maior componente adiposa fato que maximiza a separação entre esses grupos de tecidos, visto pelos picos em $q=13,9\text{nm}^{-1}$ (tecido adiposo) e $q=19,8\text{nm}^{-1}$ (tecido fibroglandular), como visto em Conceição *et al.* (2010d).

Tabela 5.3. Eficácia dos modelos de classificação previamente publicados.

	Comparação entre Grupos	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Cunha <i>et al.</i> (2006)	Normal x Maligno	100	97
	Normal x Benigno	45	89
Ryan <i>et al.</i> (2007)	Normal x Maligno	54	100
	Benigno x Maligno	82	100
Oliveira <i>et al.</i> (2008)	Normal x Benigno	88	83
	Normal x Maligno	93	100
	Benigno x Maligno	63	79
	Normal x Benigno	100	100
Conceição <i>et al.</i> (2010c)	Normal x Maligno	79	96
	Benigno x Maligno	100	99
	Normal x Benigno	100	100

Adicionalmente, é importante mencionar que os resultados obtidos na experiência de WAXS utilizando um tubo de raios X foram publicados em Oliveira *et al.* (2008); e em Conceição *et al.* (2010c e 2010d) utilizando radiação síncrotron.

5.1.2. Influência da Água

Conforme apresentado na seção anterior, o conteúdo de água domina o perfil de espalhamento de amostras de tecidos mamários fibroglandulares e neoplásicos na região de WAXS. Por isso, foi realizado um estudo sobre a influência da água na constituição estrutural destes tecidos e, na figura 5.6 são exibidos os perfis de espalhamento de amostras típicas de tecido mamário normal, neoplasia benigna e maligna em estado natural e liofilizado.

De forma geral, baseado nas comparações entre os perfis de espalhamento das amostras em estado natural e liofilizado exibidos nas figuras 5.6a, 5.6b e 5.6c é possível comprovar a influência

da água como uma das principais fontes de espalhamento nos tecidos mamários na região de ângulos intermediários.

Figura 5.6: Coeficiente linear de espalhamento elástico de amostras de tecido mamário normal e neoplásico. Comparação entre amostras em estado natural e liofilizadas de: **a)** tecido normal; **b)** neoplasia benigna e **c)** neoplasia maligna. A figura **5.6-d** compara o μ_{CS} para amostras típicas de tecido mamário normal adiposo, neoplasia benigna e maligna em estado liofilizado.

Para amostras de tecido normal com maior componente adiposa, figura 5.6a, é observado que os fótons espalhados por moléculas de água contribuem adicionando uma intensidade de fundo ao perfil de espalhamento, visto pela queda na intensidade total (μ_{CS}) em amostras liofilizadas, bem como há o surgimento de um pico em $q = 7,2 \text{ nm}^{-1}$ após a remoção da água desses tecidos. Este pico, cujas estruturas distam $8,7 \text{ \AA}$, pode estar relacionado ao rearranjo de estruturas hidrofílicas (como proteínas), as quais na ausência de água alteraram sua conformação espacial (FRATZL e DAXER, 1993).

Com relação às amostras neoplásicas, figuras 5.6b e 5.6c, verifica-se que estas não são completamente puras, pois a partir da comparação entre os perfis de espalhamento em estado natural e liofilizado é possível ser identificada uma quantidade de moléculas de ácidos graxos (pico

ao redor de $q=13,9\text{nm}^{-1}$), as quais não são observadas em estado natural devido à supressão de seu sinal no perfil de espalhamento pelo sinal da água. Além disso, ao se remover água das neoplasias malignas é notado o aparecimento de um pico em $q=5,3\text{nm}^{-1}$, o que novamente pode ser devido ao rearranjo de estruturas hidrofílicas como proteínas da matriz extracelular (FRATZL e DAXER, 1993).

Embora a intensidade total espalhada por amostras de tecido normal seja menor em amostras liofilizadas em comparação às amostras em estado natural, o pico correspondente às moléculas de ácidos graxos apresenta maior amplitude nas amostras liofilizadas, podendo ser devido ao caráter hidrofóbico e a mobilidade dessas moléculas, o que resulta em um novo rearranjo dessas cadeias na ausência da água, como ocorre em amostras cerebrais (MARSZALEK *et al.*, 2010).

5.1.3. Comparação com a literatura

Os perfis de espalhamento de amostras classificadas como tecido normal, neoplasia benigna e maligna obtidos em trabalhos anteriores são comparados com os determinados neste estudo nas figuras 5.7a, 5.7b e 5.7c.

Figura 5.7: Comparação com a literatura dos perfis de espalhamento típicos dos três grupos de tecidos analisados neste trabalho: **a)** tecido normal; **b)** neoplasia benigna e **c)** neoplasia maligna.

Baseado nos perfis apresentados na figura 5.7 observa-se concordância com relação à posição dos picos, porém, com relação à forma dos perfis de espalhamento e à intensidade dos picos claras diferenças podem ser notadas. Estas diferenças podem ser explicadas, principalmente, pela técnica utilizada (EDXRD) nas medidas de Kidane *et al.* (1999) e Ryan *et al.* (2007), a qual utilizava um feixe polienergético ao em vez de um feixe monoenergético, o que implica em baixa resolução em termos de momento transferido para cada experimento e a diferentes procedimentos de correção (atenuação, polarização, etc) e normalização, o que poderia induzir distorções nos perfis de espalhamentos obtidos em comparação ao que seria esperado como mostrado por Poletti *et al.*

(2002c). Portanto, além da posição dos picos, nenhuma outra conclusão pode ser tirada dessas comparações, uma vez que as diferentes técnicas utilizadas pelos autores influenciam na intensidade dos picos e na forma dos perfis.

5.2. Espalhamento de raios X em baixo ângulo (SAXS)

5.2.1. Perfil de espalhamento: determinação de estruturas supramoleculares e análise estatística

O perfil de espalhamento de amostras típicas de tecido normal, neoplasia benigna e maligna em estado natural pode ser visualizada na figura 5.8.

Dos perfis de espalhamento apresentados na figura 5.8 podem ser destacados três sinais característicos: um pico largo na posição de $q=1,38\text{nm}^{-1}$, a intensidade de fundo com decaimento exponencial, e vários picos no intervalo de momento transferido entre 0,25 e $1,20\text{nm}^{-1}$.

Apenas os tecidos normais apresentam um pico bem definido na posição de $q=1,38\text{nm}^{-1}$, correspondendo a uma distância de correlação de $45,5\text{\AA}$. Esta distância coincide com aquela mostrada por Bouwstra *et al.* (2001) e Fernández (2006) referente à separação de duas cadeias adjacentes de moléculas de triglicerídeos em fase lamelar. A crença na suposição anterior é realçada pelo fato de que a composição de um triglicerídeo dada a partir da união de uma molécula de glicerol e três de ácidos graxos (NELSON e COX, 2006), sendo estes últimos identificados na região de WAXS. Dessa forma, pode-se concluir que a técnica de SAXS permite identificar os arranjos supramoleculares que compõem os tecidos, aqui em especial para tecido normal, os triglicerídeos.

A segunda característica dos perfis de espalhamento de SAXS apresentados na figura 5.8 corresponde ao espalhamento de estruturas correlacionadas numa distância fundamental de 65nm. Segundo Holmes *et al.* (2001) esta distância corresponde à periodicidade axial das fibras de colágeno, cujo arranjo hierárquico é exibido na figura 5.9 e os picos presente nessa região referem-se ao espalhamento de ordens superiores de fibras de colágeno, desde a 3ª ordem ($q=0,29\text{nm}^{-1}$) até a 12ª ($q=1,17\text{nm}^{-1}$). Baseado nestes picos de colágeno foi verificado que a periodicidade axial das fibras de colágeno é ligeiramente maior nas neoplasias benignas em comparação aos outros tipos de tecido, principalmente no pico de 3ª ordem, cuja razão pode estar relacionada a um relaxamento das ligações intermoleculares de longas cadeias, ocorrido pela perda estrutural das fibras invadidas (FERNÁNDEZ *et al.*, 2002). Ainda, comparando a intensidade total espalhada por uma neoplasia

benigna com uma maligna, verifica-se que as neoplasias malignas apresentam uma maior intensidade nos picos relacionados às fibras de colágeno. Este fato pode se dever à crescente invasão das células cancerosas nas fibras e conseqüentemente maior degradação dessas fibras, fazendo com que, em contrapartida, o organismo atue na reparação destas (PUCCI-MINAFRA *et al.* 1993), criando novas fibras (aberrantes) de maior superfície específica e, conseqüente maior intensidade espalhada nas amostras de neoplasia maligna (FERNÁNDEZ *et al.* 2002), além do fato de que nesse estudo todas as amostras benignas correspondem a fibroadenomas, cuja formação e proliferação ocorre no estroma intralobular, o qual é composto basicamente por tecido conjuntivo frouxo, possuindo menor densidade de fibras, conforme seção 3.1.2.

Figura 5.8: Perfil de espalhamento de amostras típicas dos três tipos de tecidos mamários estudados neste trabalho utilizando SAXS. A categoria denominada tecido normal foi subdividida em normal adiposo e normal fibroglandular.

Por fim, a intensidade da radiação espalhada de fundo está relacionada com a componente de espalhamento difuso. Existem vários modelos para explicar o comportamento desta componente em tecidos mamários (ROGERS *et al.*, 1999, WILKINSON *et al.*, 2006), entretanto, todos eles apresentam as mesmas características de decaimento exponencial como as obtidas neste trabalho. Ainda, a variação na componente de espalhamento difuso tem sido associada ao aparecimento de neoplasias mamárias (SIU *et al.*, 2009) uma vez que apresenta maior intensidade nos perfis correspondentes a neoplasias malignas, fato que pode ser devido à desordem das fibras de colágeno e de outros componentes da matriz extracelular (CONCEIÇÃO *et al.*, 2009).

Figura 5.9: Representação esquemática do arranjo hierárquico do colágeno fibrilar de tecidos mamários, exibindo ainda seus parâmetros dimensionais.

Finalmente, da mesma forma como feito para os perfis de espalhamento na região de WAXS foi aplicado o método estatístico de análise por discriminante nos perfis de SAXS, resultando em duas funções que maximizavam a diferença entre os grupos de amostras, figura 5.10. Ainda, o modelo de classificação foi validado através do método de validação cruzada e os valores para avaliar a eficácia do modelo estão apresentados na tabela 5.4.

Figura 5.10: Distribuição das amostras no espaço discriminante Função 1 x Função 2. Os símbolos sem preenchimento representam os centróides de cada grupo.

Tabela 5.4. Eficácia e Validação do modelo diagnóstico em SAXS.

Comparação entre Grupos	Sensibilidade (S)	Especificidade (E)	Valor de κ
Normal x Benigno	100%	100%	1,00
Normal x Maligno	100%	100%	1,00
Benigno x Maligno	55%	76%	0,48

Através dos resultados obtidos com o modelo diagnóstico construído com base nos perfis de espalhamento de um grande número de amostras na região de SAXS, tabela 5.4, pode-se verificar que é possível separar com grande sucesso as amostras normais das neoplásicas, em concordância com os resultados apresentados em trabalhos anteriores tabela 5.5, com destaque para a completa distinção entre amostras normais e neoplásicas malignas conforme Falzon *et al.* (2006) e Conceição *et al.* (2009). Entretanto, da comparação da eficácia do modelo diagnóstico na correta classificação dos grupos de tecidos neoplásicos benignos e malignos, o modelo seguiu a mesma tendência que Sidhu *et al.* (2008), porém não apresentou resultado satisfatório como aqueles publicados anteriormente por Falzon *et al.* (2006) e Conceição *et al.* (2009). A diferença com relação a estas publicações pode ser devido ao fato de que estes tomaram como variáveis parâmetros extraídos dos perfis de espalhamento, o que especifica as variáveis e permite maximizar a diferença entre estes grupos.

Tabela 5.5. Eficácia dos modelos de classificação previamente publicados.

	Comparação entre Grupos	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Falzon <i>et al.</i> (2006)	Normal x Benigno	86	100
	Normal x Maligno	100	100
	Benigno x Maligno	100	91
Sidhu <i>et al.</i> (2008)	Normal x Benigno	96	71
	Normal x Maligno	93	100
	Benigno x Maligno	50	88
Conceição <i>et al.</i> (2009)	Normal x Benigno	85	100
	Normal x Maligno	100	100
	Benigno x Maligno	83	100

Adicionalmente, cabe destacar que os resultados preliminares obtidos nas experiências de SAXS para amostras em estado natural foram publicados no periódico “Analyst” (CONCEIÇÃO *et al.*, 2009).

4.2.2. Influência da Água

Com a finalidade de se conhecer qual o papel da água na organização das estruturas supramoleculares (fibras de colágeno e triglicerídeos) da mama, as mesmas amostras liofilizadas que tiveram seu perfil de espalhamento determinado na região de WAXS foram submetidas ao experimento de SAXS e os resultados estão apresentados na figura 5.11.

Figura 5.11: Perfil de espalhamento de amostras de tecido mamário normal e neoplásico na região de SAXS. Comparação entre amostras em estado natural e liofilizados de: **a)** tecido normal adiposo; **b)** neoplasia benigna e **c)** neoplasia maligna. A figura **5.11d** compara o perfil de espalhamento de amostras típicas de tecido mamário normal adiposo, neoplasia benigna e maligna em estado liofilizado para a menor região de momento transferido medida.

Dos espectros exibidos na figura 5.11, verifica-se que na região de baixo momento transferido a água atua de forma a incluir uma intensidade de fundo nos perfis de espalhamento e, comparando-se a figura 5.11d com a figura 5.8, é claramente observado que após a liofilização a intensidade total espalhada por amostras normais é maior que em tecidos neoplásicos, diferentemente do que ocorre com as amostras em estado natural. Isso era esperado, uma vez que as neoplasias foram as que mais perderam massa de água durante o processo de liofilização, fato que reduz sua intensidade espalhada, pois foram perdidos elétrons, os causadores do espalhamento.

Adicionalmente, ao se comparar cada perfil de espalhamento em estado natural com o seu correspondente em estado liofilizado, verifica-se que há um pequeno deslocamento na posição dos

picos de reflexão de ordens superiores das fibras de colágeno devido à afinidade dessas com as moléculas de água (FRATZL e DAXER, 1993), conforme mostrado na tabela 5.5 para tecido normal. Com relação às neoplasias, dessa comparação pode ser observado o surgimento de dois picos estreitos nas posições de $q=2,63\text{nm}^{-1}$ e $q=3,95\text{nm}^{-1}$ e um pico largo em $q=5,2\text{nm}^{-1}$ para as neoplasias benignas e, um pico em $q=5,7\text{nm}^{-1}$ para as neoplasias malignas, em estado liofilizado. Estes picos podem ser devido a estruturas hidrofóbicas presentes na matriz extracelular, as quais na ausência de água contribuem mais fortemente à intensidade espalhada.

Tabela 5.5. Variação do espaçamento axial das fibras de colágeno devido ao processo de liofilização

Ordem de reflexão da fibra de colágeno	$q \text{ (nm}^{-1}\text{)} - \text{Natural}$	$q \text{ (nm}^{-1}\text{)} - \text{Liofilizado}$
5 ^a	$0,49 \pm 0,01$	$0,51 \pm 0,01$
6 ^a	$0,58 \pm 0,01$	$0,62 \pm 0,01$
7 ^a	$0,68 \pm 0,01$	$0,72 \pm 0,02$

5.2.3. Comparação com a literatura

A figura 5.12 apresenta uma comparação dos perfis de espalhamento dos poucos trabalhos existentes na literatura que empregam a técnica de SAXS para estudo de tecidos mamários (Fernández *et al.*, 2002; Round *et al.*, 2005) com os resultados obtidos neste trabalho. Ainda, nenhum destes apresenta um perfil de espalhamento para amostras de neoplasia benigna, portanto este tipo de tecido mamário não será comparado.

Figura 5.12: Comparação dos perfis de espalhamento em SAXS de trabalhos prévios com este. Em **a)** para tecidos normais e em **b)** para neoplasia maligna.

Conforme mostrado na figura 5.12, os perfis de espalhamento obtidos neste trabalho concordam com aquele reportado por Fernández *et al.* (2002) no intervalo de momento transferido concomitante aos trabalhos, principalmente com relação à forma do perfil de espalhamento e à posição dos picos no intervalo de momento transferido concomitante entre os dois trabalhos (picos de espalhamento de fibras de colágeno da 3ª à 7ª ordem). Entretanto, ao se comparar com os resultados apresentados por Round *et al.* (2005), embora se tenha o mesmo intervalo de momento transferido medido neste experimento de SAXS que o apresentado pelos outros autores, o perfil de espalhamento publicado por estes (ROUND *et al.*, 2005) não apresenta nenhum pico de espalhamento, o que pode ser devido à baixa resolução em momento transferido e/ou deficiência nos procedimentos de correção dos seus dados experimentais.

5.3. Combinação simultânea de WAXS e SAXS

Conforme mostrado nos resultados preliminares de WAXS e SAXS, podemos concluir que estes perfis permitem observar informações sobre várias estruturas moleculares e supramoleculares presentes nos tecidos mamários: adiposo (ácidos graxos e triglicerídeos), conjuntivo denso e frouxo (fibras de colágeno) e epitelial glandular (água), este último está relacionado à presença de ácinos. Contudo, nesta seção serão apresentados resultados de uma experiência, na qual foram combinadas simultaneamente as técnicas de WAXS e SAXS sobre um mesmo conjunto de amostras, experiência que resumiria estas informações, bem como permitiria correlacionar todas estas informações para cada tecido mamário, conforme seção 4.2.4.

Figura 5.13: Perfil de espalhamento na região de amostras típicas de tecido normal, neoplasia benigna e maligna. Em **a)** para WAXS e em **b)** para SAXS.

Os resultados deste estudo estão exibidos na figura 5.13 e foram publicados em Conceição *et al.* (2010a). Para as amostras normais, na figura 5.13 é observada a presença de moléculas de ácidos graxos (região de WAXS) e triglicerídeos (região de SAXS), enquanto para os tecidos neoplásicos podem ser identificadas as duas componentes teciduais principais: fibroso frouxo (benignas) ou denso (malignas) na região de SAXS e epitelial glandular (ácinos) na região de WAXS. Portanto, foi possível correlacionar as informações de ambos os perfis visando identificar o tipo de neoplasia.

5.4. Coeficiente linear de espalhamento elástico total - $\mu_{CS}(q)$

Apesar de ter sido realizado um experimento em que as técnicas de WAXS e SAXS foram aplicadas simultaneamente, os perfis de espalhamento não são passíveis de fusão para a obtenção de um único espectro, pois o intervalo de momento transferido medido para cada técnica não apresenta uma região em comum. Porém, baseado nos resultados independentes obtidos por cada uma das técnicas há um intervalo de momento transferido concomitante às duas regiões ($0,77 \leq q \leq 2,2 \text{ nm}^{-1}$), por esta razão foi possível combinar ambos os espectros, normalizando os dados de SAXS usando os de WAXS, e assim obter o coeficiente linear de espalhamento elástico total ($\mu_{CS}(q)$) de cada amostra para todo o intervalo de momento transferido medido neste trabalho figura 5.14 (CONCEIÇÃO *et al.*, 2010b).

Figura 5.14: Coeficiente linear de espalhamento elástico total (μ_{CS}), incluindo os dados teóricos computados usando o Modelo Atômico Independente (MAI) para os tecidos normal adiposo e fibroglandular (POLETTI *et al.*, 2002b).

Dos resultados obtidos dessa fusão foi possível correlacionar alterações em nível atômico e molecular com aquelas ocorridas em escala supramolecular, fato que nos possibilitou a construção de um modelo de classificação baseado na informação do coeficiente linear de espalhamento elástico total para distinguir os três grupos de tecidos analisados neste trabalho. O modelo de classificação foi elaborado conforme aquele utilizado para a análise estatística dos dados de WAXS e SAXS, a partir do método de análise de discriminante e validado pelo processo de validação cruzada. As funções lineares obtidas pelo modelo estão exibidas na figura 5.15 e os valores dos testes de eficácia e validação do modelo estão dispostos na tabela 5.6.

Figura 5.15: Distribuição das amostras no espaço discriminante Função 1 x Função 2. Os símbolos sem preenchimento representam os centróides de cada grupo.

Tabela 5.6. Eficácia e Validação do modelo diagnóstico baseado no $\mu_{CS}(q)$.

Comparação entre Grupos	Sensibilidade (S)	Especificidade (E)	Valor de κ
Normal x Benigno	100%	100%	1,00
Normal x Maligno	100%	100%	1,00
Benigno x Maligno	100%	100%	1,00

Baseado nos resultados apresentados na tabela 5.6 pode-se verificar uma completa distinção entre as amostras de tecidos normal, neoplasia benigna e neoplasia maligna, indicando que o modelo de classificação baseado na análise de discriminante do coeficiente linear de espalhamento elástico total é uma potencial ferramenta para classificação de amostras de tecidos mamários com excelente eficácia.

CAPÍTULO 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6.1. Conclusões

6.1.1. Sobre os perfis de espalhamento em WAXS

As medidas de espalhamento de raios X em médios ângulos foram realizadas utilizando duas fontes de radiação, tubo de raios X convencional e radiação síncrotron, duas geometrias, reflexão e transmissão, bem como amostras em dois estados, natural e liofilizado. Para cada tipo de experimento foi desenvolvido um procedimento de correção e normalização dos dados e, em geral, as incertezas experimentais associadas aos perfis de espalhamentos obtidos variaram entre 6 e 8% para as todas as configurações experimentais adotadas. Estes procedimentos de correção foram validados pela comparação do perfil de espalhamento para água obtido para cada configuração experimental com outro previamente publicado (MORIN, 1982), sendo que as diferenças entre os dois perfis foram menores que $\pm 4\%$, dentro das incertezas experimentais, significando que a metodologia é satisfatória.

A partir dos perfis de espalhamento na região de médios ângulos foi possível a identificação de estruturas entre 1 e $10\text{\AA}$, como moléculas de ácidos graxos e de água. Os perfis de espalhamento de amostras com componente adiposa sempre apresentaram um pico em $q=13,9\text{nm}^{-1}$ relacionado ao espalhamento construtivo de moléculas de ácidos graxos. Enquanto nas amostras com conteúdo de água surge um pico característico em $q=19,8\text{nm}^{-1}$ (POLETTI *et al.*, 2002b) indicando a existência de grande quantidade de água nestes tecidos. Este último pico foi suprimido no perfil de espalhamento de amostras liofilizadas, o que comprovou sua correspondência com as moléculas de água. Ainda, com relação aos perfis de espalhamento de algumas neoplasias malignas destacamos a presença de picos cristalinos relacionados ao espalhamento construtivo de cristais de hidroxiapatita.

6.1.2. Sobre os perfis de espalhamento em SAXS

As medidas de espalhamento de raios X em baixo ângulo foram realizadas na linha D02A-SAXS2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) para amostras em estado natural e liofilizado e utilizando diferentes distâncias entre a amostra e o detector bidimensional (CCD) de alta resolução, o que permitiu complementar o intervalo de momento transferido medido. Os procedimentos para tratamento dos dados adquiridos foram elaborados especialmente para este tipo de experimento e apresentou uma incerteza final associada de aproximadamente 5%.

A análise dos perfis de espalhamento dos diferentes tipos de tecidos mamários indicou a presença de estruturas de tamanhos maiores que $10\text{\AA}$, como por exemplo, fibras de colágeno e moléculas de triglicerídeos. Foi verificado para todas as amostras com alguma componente fibrosa a presença de picos de espalhamento desde a 3ª ($q=0,29\text{nm}^{-1}$) até a 12ª ordem ($q=1,16\text{nm}^{-1}$) de estruturas com parâmetro de ordem de 65nm (relacionados às fibras de colágeno) e através das medidas com amostras liofilizadas foi possível observar uma forte afinidade entre estas fibras e as moléculas de água. Além disso, as amostras de tecido normal com alguma componente adiposa apresentavam um pico em $q=1,38\text{nm}^{-1}$ correspondendo ao espalhamento de arranjos de triglicerídeos.

6.1.3. Sobre o coeficiente linear de espalhamento elástico total

A fusão dos perfis de espalhamento das regiões de WAXS e SAXS possibilitou a obtenção do coeficiente linear de espalhamento elástico ($\mu_{cs}(q)$) sobre um grande intervalo de momento transferido. Deste, foi possível observar a ocorrência de efeitos de larga escala e de interferência atômica e molecular, os quais deveriam ser incluídos nos atuais bancos de dados de $\mu_{cs}(q)$ de modo a refletir mais realisticamente as características estruturais intrínsecas de cada tipo de amostra

biológica. Ainda, através das informações inerentes deste coeficiente foi possível correlacionar alterações estruturais em nível atômico e molecular (água e ácidos graxos) com aquelas ocorridas em escala supramolecular (fibras de colágeno e triglicerídeos), fornecendo detalhes que podem indicar novos caminhos para o estudo do desenvolvimento e progressão do câncer de mama.

6.1.5. Sobre a análise estatística: potencialidade dos perfis de espalhamento como ferramenta de diagnóstico

Os perfis de espalhamento determinados neste estudo serviram de base para a construção de modelos estatísticos para o diagnóstico de neoplasias mamárias através do método de análise de discriminante. Dos perfis obtidos na região de WAXS o modelo construído permitiu classificar corretamente 97% das amostras, destacando a separação de todas as amostras normais das neoplásicas benignas. Adicionalmente, com relação aos perfis de SAXS o modelo desenvolvido teve sucesso na classificação de 89% das amostras, porém conseguir distinguir de forma correta todas as amostras normais das neoplásicas. Por fim, foi construído um modelo de diagnóstico baseado nas informações do coeficiente linear de espalhamento elástico total de cada amostra e, através deste todas as amostras analisadas neste estudo foram classificadas corretamente em seus devidos grupos.

Portanto, as evidências encontradas nas análises estatísticas aplicadas nos perfil de espalhamento total ($\mu_{CS}(q)$) indicam a potencialidade dos resultados encontrados para o desenvolvimento de novas ferramentas que poderiam ampliar a capacidade de diagnóstico do câncer de mama.

6.2. Perspectivas

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, abrem-se as seguintes perspectivas:

- i. Usar as informações estruturais obtidas com as técnicas de WAXS e SAXS para o desenvolvimento de novas modalidades de imagem da mama, como radiografia seletiva e tomografia por difração de raios X;
 - ii. utilizar as seções de choque para espalhamento elástico determinadas neste estudo para o desenvolvimento de modelos computacionais de transporte de fótons, com aplicação no cálculo de dose;
 - iii. aprimorar o modelo de diagnóstico através da inclusão dos diversos tipos de neoplasias mamárias.
-

REFERÊNCIAS

ALI, L., GREEN, E. M., ELLIS, R. E., BRADLEY, D. A., GROSSMANN, J. G. e WINLOVE, C. P. Study of the molecular and supramolecular organization of elastic tissue by X-ray diffraction. **Radiation Physics and Chemistry** 71 (3-4): 951-952, 2004.

ANCHAROV, A. I., NIZOVSKII, A.I., GRIDNEV, S.A., FEOFILOV, I.V., VICHKANOV, A.N. An attempt of in vivo X-ray diffraction analysis of kidney stones with the use of synchrotron radiation. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A**. 543: 302-305, 2005.

ATTIX, F. H. **Introduction to radiological physics and radiation dosimetry**. A Wiley-Interscience Publication, New York, 1986.

AZZAROF, L. V. **Elements of X-Ray Crystallography**. USA: McGraw-Hill, 1968.

BARNES, G. T. Characteristics of Scatter. **Reduction dose mammography**. Logan WW, Muntz EP. New York: Masson, 223, 1979.

BARNES, G. T. Contrast and scatter in x-ray imaging. **Radiographics** 11(2): 307-323, 1991.

BATCHELAR, D.L., DAVIDSON, M. T. M., DABROWSKI, W., CUNNINGHAM, I. A. Bone-composition imaging using coherent-scatter computed tomography: Assessing bone health beyond bone mineral density. **Medical Physics**. 33: 904-915, 2006.

BLUM, L. X-ray scattering from liquids with nearly spherical molecules. **Journal of Computational Physics** 7: 592, 1971.

BOHNDIEK, S. E., COOK, E. J., ARVANITIS, C. D., OLIVO, A., ROYLE, G. J., CLARK, A. T., PRYDDERCH, M. L., TURCHETTA, R. e SPELLER, R. D. A CMOS active pixel sensor system for laboratory based x-ray diffraction studies of biological tissue. **Physics in Medicine and Biology** 53: 655-672, 2008.

BOUWSTRA, J. A., GOORIS, G. S., DUBBELAAR, F. E. R. e PONEC, M. Phase behavior of lipid mixtures based on human ceramides: coexistence of crystalline and liquid phases. **Journal of Lipid Research** 42: 1759-1770, 2001.

BRADLEY, D. A., DANCE, D. R., EVANS, S. H. e JONES, C. H. Quantitative measurements of small-angle gamma ray scattering from water, nylon, and Lucite. **Medical Physics** 16 (6): 851-857, 1989.

CAMERON, G. J., ALBERTS, I. L., LAING, J. H. e WESS, T.J. Structure of type I and type III heterotypic collagen fibrils: An x-ray diffraction study. **Journal of Structural Biology** 137 (1): 15-22, 2002.

CASTRO, C. R. F., BARROSO, R. C. e LOPES, R. T. Scattering signatures for some human tissues using synchrotron radiation. **X-Ray Spectrometry** 34 (6): 477-480, 2005.

CHAN, H. P. e DOI, K. The validity of Monte Carlo simulation in studies of scattered radiation in diagnostic radiology. **Physics in Medicine and Biology** 28 (2): 109-129, 1983

CONCEIÇÃO, A. L. C., ANTONIASSI, M., POLETTI, M. E. Analysis of breast cancer using small angle x-ray scattering (SAXS). **Analyst**, 134, 1077-1082, 2009.

- CONCEIÇÃO, A. L. C., ANTONIASSI, M., POLETTI, M. E., CALDAS, L. V. E. Preliminary study of human breast tissue using synchrotron radiation combining WAXS and SAXS techniques. **Applied Radiation and Isotopes**, 68, 799-803, 2010a.
- CONCEIÇÃO, A. L. C., ANTONIASSI, M., POLETTI, M. E. Assessment of the differential linear coherent scattering coefficient of biological samples. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A**, 619, 67-70, 2010b.
- CONCEIÇÃO, A. L. C. e POLETTI, M. E. Identification of molecular structures of normal and pathological human breast tissue using synchrotron radiation. **AIP Conference Proceedings** 1266, 72-78, 2010c.
- CONCEIÇÃO, A. L. C.; ANTONIASSI, M., CUNHA, D. M., RIBEIRO-SILVA, A., POLETTI, M. E. Multivariate Analysis of the Scattering Profiles of Healthy and Pathological Human Breast Tissues. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A**. doi:10.1016/j.nima.2010.08.060. 2010d.
- COTRAN, R. S., KUMAR, V. e ROBBINS, S. L. **Pathologic Basis of Disease**. W. B. Saunders Company, 4 ed., 1989.
- CULLITY, B. D. **Elements of x-ray diffraction**. Addison-wesley publishing company, Massachussets, 1978.
- CUNHA, D. M., OLIVEIRA, O. R., PÉREZ, C. A. E POLETTI, M. E. X-ray scattering profiles of some normal and malignant human breast tissue. **X-ray Spectrometry** 35: 370-374, 2006.
- CUNHA, D. M., TOMAL, A., POLETTI, M. E. Evaluation of scatter-to-primary ratio, grid performance and normalized average glandular dose in mammography by Monte Carlo simulation including interference and energy broadening effects. **Physics in Medicine and Biology**. 55: 4335-4346, 2010.
- DÂNGELO, J. G. e FATTINI, C. A. **Anatomia Humana Sistêmica e Segmentar**. 2ª Ed. São Paulo, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto, Belo Horizonte. Atheneu, 2003.
- DEBYE, P. Scattering from non-crystalline Substances. **Annals of Physics** 46: 809-823, 1915.
- DEMETRIO, C.G.B. **Análise multidimensional para dados de cana-de-açúcar**. Piracicaba: ESALQ, 1985. 144p. (Tese, Doutorado).
- DUKE, P. J. **Synchrotron Radiation. Production and Properties**. No. 3 in Oxford Series on Synchrotron Radiation. Oxford University Press, New York, 2000.
- EVANS, S.H., BRADLEY, D., DANCE, D.R., BATERMAN, J.E. e JONES, C.H. Measurements of small-angle photon scattering for some breast tissues and tissue substitute materials. **Physics in Medicine and Biology** 36 (1): 7-18, 1991.
- FALZON, G., PEARSON, S., MURISON, R., HALL, C., SIU, K., EVANS, A., ROGERS, K., LEWIS, R. Wavelet-based feature extraction applied to small-angle x-ray scattering patterns from breast tissue: a tool for differentiating between tissue types. **Physics in Medicine and Biology**. 51: 2465-2477, 2006.
- FARQUHARSON, M. J. e SPELLER, R. D. Measuring bone mineral density in archaeological bone using energy dispersive low angle x-ray scattering techniques. **Journal of Archaeological Science** 24: 765-772, 1997.

FERNÁNDEZ, M., KEYRILÄINEN, J., SERIMAA, R., TORKKELI, M., KARJALAINEN-LINDSBERG, M.-L., TENHUNEN, M., THOMLINSON, W., URBAN, V. e SUORTTI, P. Small-angle x-ray scattering studies of human breast tissue samples. **Physics in Medicine and Biology** 47: 577-592, 2002.

FERNÁNDEZ, M., KEYRILÄINEN, J., FIEDLER, S. e SUORTTI, P. Human breast tissue characterisation with small-angle X-ray scattering. **Spectroscopy** 18 (2): 167-176, 2004.

FERNÁNDEZ, M., KEYRILÄINEN, J., SERIMAA, R., TORKKELI, M., KARJALAINEN-LINDSBERG, M.-L., LEIDENIUS, M., von SMITTEN, K., TENHUNEN, M., FIEDLER, S., BRAVIN, A., WEISS, T. M. e SUORTTI, P. Human breast cancer in vitro: matching histopathology with small-angle x-ray scattering and diffraction enhance x-ray imaging. **Physics in Medicine and Biology** 50: 2991-3006, 2005.

FERNÁNDEZ, M. **X-ray Scattering and diffraction enhance imaging studies of in vitro breast tissues**. Tese (doutorado). Helsinki, 2006.

FRATZL, P. e DAXER, A. Structural transformation of collagen fibrils in corneal stroma during drying. An x-ray scattering study. **Biophysics** 64: 1210-1214, 1993.

FREEDMAN, G. M., ANDERSON, P. R., GOLDSTEIN, L. J. *et al.* Routine mammography is associated with earlier stage disease and greater eligibility for breast conservation in breast carcinoma patients age 40 years and older. **Cancer**. 98: 918-925, 2003.

FREITAS, A. G., KEMP, C., LOUVEIRA, M. H., FUJIWARA, S. M., CAMPOS, L. F. Digital mammography: current view and future applications. **Radiol. Bras.** 39: 287-296, 2006.

GLATTER, O. e KRATKY, O. **Small-angle x-ray scattering**. Academic Press London, 1982.

GRIFFITHS, J. A., ROYLE, G. J., HANBY, A. M., HORROCKS, J. A., BOHNDIEK, S. E. e SPELLER, R. D. Correlation of energy dispersive diffraction signatures and microCT of small breast tissue samples with pathological analysis. **Physics in Medicine and Biology** 52: 6151-6164, 2007.

GUINIER, A. **X-ray diffraction in crystals, imperfect crystals and amorphous bodies**. Dover Publication, New York, 1994.

HAIR, J. F., ANDERSON, R. E., TATHAM, R. L., BLACK, W. C. **Multivariate Data Analysis**. 5ª Ed. New Jersey: Prentice Hall, 1998.

HANSON, A. L. The calculation of scattering cross sections for polarized X-rays. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A*. 243: 583-598, 1986.

HOLMES, D. F., GRAHAM, H. K., TROTTER, J. A. e KADLER, K. E. STEM/TEM studies of collagen fibril assembly. **Micron** 32: 273-285, 2001.

<http://www.esrf.eu/computing/scientific/FIT2D/>. Acesso em 13/03/2009

<http://www.who.int/cancer>. Acesso em 15/12/2010

<http://www.lnls.br>. Acesso em 21/12/2010

HUBBEL, J. H., VEIGELE, E. A., BRIGGS, E. A. BROWN, D. T. CROMER, D. T. e HOWERTON, R. J. Atomic Form Factors, Incoherent Scattering Functions and Photon Scattering

- Cross Sections. **Journal of Physical and Chemical Reference Data** 4 (3): 471-538, 1975.
- HUKINS, D. W. L. **X-ray Diffraction by Disordered and Ordered Systems**. Pergamon, Oxford, 1981.
- HULMES, D. J. S., WESS, T. J., PROCKOP, D. J. e FRATZT, P. Radial packing order and disorder in collagen fibrils. **Biophysics Journal** 68: 1661-1670, 1995.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Estimativa 2010 – Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2009.
- JAMES, R.W. **The optical Principle of the Diffraction of X-ray**. London: Bell, 1962.
- JOHNS, H. E. e CUNNINGHAM, J. R. **The Physics of Radiology**. Springfield: Charles C. Thomas, 1983.
- JOHNSON, R. A. e WICHERN, D. W. **Applied Multivariate Statistical Analysis**. 5ª Ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002.
- JUNQUEIRA, L. C. e CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10ª Ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara, 2004.
- KANE, P. P., KISSEL, L., PRATT, R. H. e ROY, G. J. Elastic scattering of γ -ray and x-ray by atoms. **Physics Reports** 140 (2): 75-159, 1985.
- KIDANE, G., SPELLER, R.D., ROYLE, G.J. e HANBTY, A.M. X-ray scatter signatures for normal and neoplastic breast tissues. **Physics in Medicine and Biology** 44: 1791-1802, 1999.
- KLUG, H. P. e ALEXANDER, L. E. **X-ray Diffraction Procedures for Polycrystalline and Amorphous Materials**. 2nd Ed. John Wiley & Sons. New York, 1974.
- KOCH, H. A., AZEVEDO, C. M., BOECHAT, A. L., CANELLA, E., DUARTE, D. L., PERREIRA, R., KALAF, J. M., LAMAS, J., LOPES, E. R., MARANHÃO, N., PEIXOTO, J. E., SANTOS, R. P. Radiologia da mama - qualidade em mamografia. **Radiologia Brasileira** 29 (5): 257-269, 1996.
- KOSANETZKY, J., KNOERR, B., HARDING, G. e NEITZEL, U. X-ray diffraction measurements of some plastic materials and body tissues. **Medical Physics** 14 (4): 526-532, 1987.
- KRUGER, R. A. MILLER, K. D., REYNOLDS, H. E., KISER, W. L., REINECKE, D. R., KRUGER, G. A. Breast Cancer in Vivo: Contrast Enhancement with Thermoacoustic CT at 434 MHz-Feasibility Study. **Radiology**. 216: 279:283, 2000.
- LEWIS, R. A., ROGERS, K. D., HALL, C. J., TOWNS-ANDREWS, E., SLAWSON, S., EVANS, A., PINDER, S. E., ELLIS, I. O., BOGGIS, C. R. M., HUFTON, A. P. e DANCE, D. R. Breast cancer diagnosis using scattered X-rays. **Journal of Synchrotron Radiation** 7: 348-352, 2000.
- MARSZALEK, R., PISKLAK, M., JANKOWSKI, W., LUKASZKIEWICZ, J., HORSZTYNSKI, D., WAWER, I. NMR and gas chromatography studies of lyophilized human brain tumors. **Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research**. 67: 129-136, 2010.
- MICHAELSON, J. S., SILVERSTEIN, M., WYATT, J., WEBER, G., MOORE, R., HALPERN, E., KOPANS, D. B. e HUGHES, K. Predicting the survival of patients with breast carcinoma using tumor size. **Cancer** 95 (4): 713-723, 2002.

- MILBERG, M. E. Transparency Factor for weakly absorbing samples in X-Ray Diffractometry, **Journal of Applied Physics** 29 (1): 64-65, 1958.
- MORGAN, M. P. COOKE, M. M. e MCCARTHY, G. M. Microcalcifications associated with breast cancer: an epiphenomenon or biologically significant feature of selected tumors? **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia** 10: 181-187, 2005.
- MORIN, L. R. M. Molecular Form Factors and Photon Coherent Scattering Cross Sections of Water. **Journal of Physical and Chemical Reference Data** 11 (4): 1091-1098, 1982.
- MUSHLIN, A. I., KOUIDES, R. W. e SHAPIRO, D. E. Estimating the accuracy of screening mammography A meta-analysis. **American Journal of Preventive Medicine** 14 (2): 143-153, 1998.
- NARTEN, A. H. e LEVY, H. A. Liquid Water: Molecular Correlation Functions from X-Ray Diffraction. **The Journal of Chemical Physics** 55 (5): 2263-2269, 1971.
- NELSON, D. L. e COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 4ª edição, Sarvier, São Paulo, 2006.
- NETTER, F. H. **Atlas de anatomia humana**. 3ª Ed. University of Rochester School of Medicine and Dentistry Rochester New York: Artmed, 2004.
- NHSBSP Publication 58. **Pathologic Reporting of Breast Cancer**. The Royal College of Pathologists. London, 2005.
- OLIVEIRA, O. R., CONCEIÇÃO, A. L. C., CUNHA, D. M., POLETTI, M. E. e PELÁ, C. A. Identification of neoplasias of breast tissue using a commercial powder diffractometer. **Journal of Radiation Research** 49: 527-532, 2008.
- OREL, S. G., REYNOLDS, C., SCHNALL, M. D., SOLIN, L. J., FRAKER, D. L., AND SULLIVAN, D. C.. Breast carcinoma: MR imaging before re-excisional biopsy. **Radiology**. 202: 413-20, 1997.
- PEPLOW, D.E. e VERGHESE, K. Measured molecular coherent scattering form factors of animal tissues, plastics and human breast tissue. **Physics in Medicine and Biology** 43: 2431-2452, 1998.
- POLETTI M.E. **Análise do contraste, dose e desempenho de uma grade relacionada ao espalhamento na imagem mamográfica**. 1997. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada à Medicina e Biologia) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1997.
- POLETTI M.E. **Estudo do Espalhamento de Fótons (6,94, 17,44 e 59,54 keV) em Tecidos Mamários, Materiais Equivalentes e sua Influência em Mamografia**. 2001. 91 f. Tese (Doutorado em Física) – Instituto de Física, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.
- POLETTI, M.E., GONÇALVES, O.D. e MAZZARO, I. Coherent and incoherent-scattering of 17.44 and 6.93 keV X-ray photons scattered from biological and biological-equivalent samples: characterization of tissues. **X-ray Spectrometry** 31: 57-61, 2002a.
- POLETTI, M.E., GONÇALVES, O.D. e MAZZARO, I. X-Ray Scattering from Human Breast Tissues and Breast-Equivalent Materials. **Physics in Medicine and Biology** 47: 47-63, 2002b.

- POLETTI, M.E., GONÇALVES, O. D., SCHECHTER, H. e MAZZARO, I. Precise evaluation of elastic differential scattering cross-sections and their uncertainties in X-ray scattering experiments. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B** 187: 437-446, 2002c.
- POLETTI, M. E., GONÇALVES, O. D. e MAZZARO, I. Measurements of X-ray scatter signatures for some tissue-equivalent materials. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B** 213: 595-598, 2004.
- PUCCI-MINAFRA, I., LUPARELLO, C., ANDRIOLO, M., BASIRICÒ, L., AQUINO, A., MINAFRA, S. A new form of tumor and fetal collagen that binds laminin. **Biochemistry** 32: 7421-7427, 1993.
- RENCER, A. C. **Interpretation of Canonical Discriminant Functions, Canonical Variates and Principal Components**. American Statistical Association 36 (3) 217-225, 1992.
- REY, L. e MAY, J. C. **Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products**. Marcel Dekker, Inc. New York, 1999.
- ROGERS, K. D., LEWIS, R. A., HALL, C., TOWBS-ANDREWS, E., SLAWSON, S., EVANS, A., PINDER, S., ELLIS, I., BOGGIS, C. e HUFTON, A. Preliminary observations of breast tumor collagen. **Synchrotron Radiation News** 12 (1): 15-20, 1999.
- ROUND, A.R., WILKINSON, S.J., HALL, C.J., ROGERS, K. D., GLATTER, O. WESS, T. e ELLIS, I. O. A preliminary study of breast cancer diagnosis using laboratory based small angle X-ray scattering. **Physics in Medicine and Biology** 50: 4159-4168, 2005.
- ROYLE, G. J., SPELLER, R. D. Quantitative X-ray diffraction analysis of bone and marrow volumes in excised femoral head samples. **Physics in Medicine and Biology**. 40: 1487-1495, 1995.
- RYAN, E. A. e FARQUHARSON, M. J. Breast tissue classification using scattering measurements and multivariate data analysis. **Physics in Medicine and Biology** 52: 6679-6696, 2007.
- SEIDMAN, H., STELLMAN, S. D. e MUSHINSKI, M. H. A different perspective on breast cancer risk factors: some implications of the nonattributable risk. **CA: A Cancer Journal for Clinicians** 32 (5): 301-313, 1982.
- SEN, A. K. e SRIVASTAVA, M. S. **Regression analysis: theory, methods and applications**. Springer-Verlag, New York, 1990.
- SHANKAR, P. M., *et al.* ROC analysis of ultrasound tissue characterization classifiers for breast cancer diagnosis. **IEEE Trans. Med. Imaging**. 22: 170-177, 2003.
- SIDHU, S., SIU, K. K. W., FALZON, G., NAZARETIAN, S., HART, S. A., FOX, J. G., SUSIL, B. J. E LEWIS, R. A. X-ray scattering for classifying tissue types associated with breast disease. **Medical Physics** 35(10): 4660-4670, 2008.
- SIU, K.K. W., BUTLER, S.M., BEVERIDGE, T., GILLAM, J. E., HALL, C. J., KAYE, A. H., LEWIS, R. A., MANNAN, K., MCLOUGHLIN, G., PEARSON, S., ROUND, A.R., SCHÜLTKE, E., WEBB, G. I., WILKINSON, S. J. Identifying markers of pathology in SAXS data of malignant tissues of the brain. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A**. 548: 140-146, 2005.

- SIU, K. K. W., SIDHU, S., FALZON, G., NAZARETIAN, S., HART, S. A., FOX, J. G., LEWIS, R. A. Small Angle X-Ray Scattering Signatures for Breast Cancer Detection: Direct Comparison of Synchrotron and Laboratory X-Ray Sources. **IFMBE Proceedings**. 25/2: 607-610, 2009.
- SOUHAMI, R. e TOBIAS, J. **Cancer and Its Management** (London: Blackwell Science Ltd), 1998.
- SPELLER, R. D. Tissue analysis using x-ray scattering. **X-ray Spectrometry** 28: 244-250, 1999.
- SPIEGEL, M. R. **Probabilidade e Estatística**. São Paulo: Pearson Education do Brasil Ltda. 2004.
- TARTARI, A., CASNATI, E., BONIFAZZI, C. e BARALDI, C. Molecular differential cross sections for x-ray coherent scattering in fat and polymethyl methacrylate. **Physics in Medicine and Biology** 42: 2551-2560, 1997a.
- TARTARI, A., CASNATI, E. e BONIFAZZI, C., E. Photon Scattering by Compounds: an Assesment of the Validity of the Independent Atomic Model Approximation. **X-ray Spectrometry** 26: 169-173, 1997b.
- TARTARI, A., BONIFAZZI, C., BARALDI, C. e CASNATI, E. Photon cross-sections data from X-Ray Diffraction Pattern Measurements: correction procedure evaluations. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B** 142: 203-209, 1998.
- TARTARI, A. Molecular differential cross-sections for low angle photon scattering in tissues. **Radiation Physics and Chemistry** 56: 205-211, 1999.
- TARTARI, A., BONIFAZZI, C., FERNANDEZ, J. E., BASTIANO, M., CASNATI, E., BARALDI, C. e DOMENICO, G. D. Molecular coherent scattering data for tissue in photon transport monte carlo codes. **Applied Radiation and Isotopes** 53: 901-906, 2000.
- TARTARI, A., TAIBI, A., BONIFAZZI, C. e BARALDI, C. Updating of form factor tabulations for coherent scattering of photons in tissues. **Physics in Medicine and Biology** 47: 163-175, 2002.
- TARTARI, A., TAIBI, A., BONIFAZZI, C., GAMBACCINI, M. e FELICI, M. Updating of x-ray coherent scattering cross-sections and their effects in microbeam and material analysis applications. **X-ray Spectrometry** 34: 421-425, 2005.
- THOMSON, J.J. **Conduction Electricity Through Gases**. Cambridge, C.U.P., 1906.
- TROMBERG, B. J., COQUOZ, O., FISHKIN, J. B., *et al.* Non-invasive measurements of breast tissue optical properties using frequency-domain photon migration. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B**. 352: 661-668, 1997.
- WESS, T. J., HAMMERSLEY, A. P., WESS, L. e MILLER, A. Molecular packing of type I collagen in tendon. **Journal of Molecular Biology** 275: 255-267, 1998.
- WILKINSON, S. J. e HUKINS, D. W. L. Determination of collagen fibril structure and orientation in connective tissues by x-ray diffraction. **Radiation Physics and Chemistry** 56: 197-204, 1999.
- WILKINSON, S. J., ROGERS, K. D. e HALL, C. J. Model fitting in two dimensions small angle diffraction patterns from soft tissue. **Physics in Medicine and Biology** 51: 1819-1830, 2006.
- WINCHESTER, D. J., e WINCHESTER, D. P. **Atlas of Clinical Oncology: Breast Cancer**. American Cancer Society. Ontario, Canada, 2000.

WOODARD, H. Q. e WHITE, D. R. The composition of body tissues. **The British Journal of Radiology** 59: 1209-1219, 1986.

APÊNDICE A. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Neste apêndice é apresentada a produção científica resultante deste estudo, englobando os artigos publicados e aceitos para publicação, bem como as comunicações e resumos publicados em anais de congressos ou periódicos.

A1. Artigos Publicados em Periódicos

- i) OLIVEIRA, O. R., CONCEIÇÃO, A. L. C., CUNHA, D. M., POLETTI, M. E., PELÁ, C. A. Identification of neoplasias of breast tissues using a commercial powder diffractometer. *Journal of Radiation Research*, **49**, 527-532, 2008.
- ii) CONCEIÇÃO, A. L. C., ANTONIASSI, M., POLETTI, M. E. Analysis of breast cancer using small angle x-ray scattering (SAXS). *Analyst*, **134**, 1077-1082, 2009.
- iii) CONCEIÇÃO, A. L. C., ANTONIASSI, M., POLETTI, M. E., CALDAS, L. V. E. Preliminary study of human breast tissue using synchrotron radiation combining WAXS and SAXS techniques. *Applied Radiation and Isotopes*, **68**, 799-803, 2010.
- iv) CONCEIÇÃO, A. L. C., ANTONIASSI, M., POLETTI, M. E. Assessment of the differential linear coherent scattering coefficient of biological samples. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, **619**, 67-70, 2010.
- v) CONCEIÇÃO, A. L. C. e POLETTI, M. E. Identification of molecular structures of normal and pathological human breast tissue using synchrotron radiation. *AIP Conference Proceedings* **1266**, 72-78, 2010.
- vi) ANTONIASSI, M., CONCEIÇÃO, A. L. C., POLETTI, M. E. Compton scatter densitometry in normal and neoplastic breast tissues using synchrotron radiation. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, **619**, 375-378, 2010.

A2. Artigos Aceitos para Publicação

- i) CONCEIÇÃO, A. L. C.; ANTONIASSI, M, CUNHA, D. M., RIBEIRO-SILVA, A., POLETTI, M. E. Multivariate Analysis of the Scattering Profiles of Healthy and Pathological Human Breast Tissues. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*. doi:10.1016/j.nima.2010.08.060.

- ii) ANTONIASSI, M., CONCEIÇÃO, A. L. C., POLETTI, M. E. Study of effective atomic number of breast tissue determined using the elastic to inelastic scattering ratio. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*. doi:10.1016/j.nima.2010.01.027.

A3. Comunicações e resumos publicados em anais de congressos ou periódicos

- i) CONCEIÇÃO, A. L. C., ANTONIASSI, M., CUNHA, D. M., RIBEIRO-SILVAB, A., POLETTI, M. E. Multivariate Analysis of the Scattering Profiles of Healthy and Pathological Human Breast Tissues. 12th Symposium on Radiation Measurements and Applications. Book of abstracts, 165-165, Michigan, Estados Unidos, 24 à 28 de maio de 2010.
- ii) CONCEIÇÃO, A. L. C., ANTONIASSI, M., POLETTI, M. E. Identification of molecular structures of normal and pathological human breast tissue using synchrotron radiation. 6th International Conference on Medical Applications of Synchrotron Radiation. Proceedings of 6th International Conference on Medical Applications of Synchrotron Radiation, Melbourne, Austrália, 15 à 18 de fevereiro de 2010.
- iii) CONCEIÇÃO, A. L. C., ANTONIASSI, M., POLETTI, M. E. Assessment of the total x-ray coherent differential cross-sections of biological samples. 11th International Symposium on Radiation Physics. Proceedings of 11th ISRP, 170-170, Melbourne, Australia, 20 de setembro à 25 de setembro de 2009.
- iv) CONCEIÇÃO, A. L. C., ANTONIASSI, M., POLETTI, M. E. Study of scattering profiles of human breast tissue at intermediate momentum transfer. 11th International Symposium on Radiation Physics. Proceedings of 11th ISRP, 169-169, Melbourne, Australia, 20 de setembro à 25 de setembro de 2009.
- v) CONCEIÇÃO, A. L. C., ANTONIASSI, M., POLETTI, M. E. Avaliação das estruturas supramoleculares presentes em amostras biológicas através da técnica de SAXS. XIV Congresso Brasileiro de Física Médica. Resumos XIV Congresso Brasileiro de Física Médica, São Paulo, 8 à 12 de outubro de 2009.
- vi) CONCEIÇÃO, A. L. C., ANTONIASSI, M., POLETTI, M. E. Effect of water on the molecular arrangement of normal and pathological human breast tissues. International Conference on Neutron and X-ray Scattering (ICNX2009), Kuala Lumpur, Malásia, 29 de junho à 1 de julho de 2009.

- vii) CONCEIÇÃO, A. L. C., POLETTI, M. E. Determination of human breast tissue structures between 0.15 and 8.50nm⁻¹ using Small Angle X-ray Scattering. 19^a Reunião Anual de Usuários do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas, São Paulo, 09 e 10 de fevereiro de 2009.
- viii) CONCEIÇÃO, A. L. C., ANTONIASSI, M., GIACOMETTI, T. R., CUNHA, A. P. V., POLETTI, M. E. Analysis of breast cancer using small angle x-ray scattering (SAXS). SPEC 2008 - Shedding Light on Disease: Optical Diagnosis for the New Millennium, São José dos Campos, São Paulo, Brasil, 25 à 29 de outubro de 2008.
- ix) CONCEIÇÃO, A. L. C., ANTONIASSI, M., POLETTI, M. E. Estudo de diferentes métodos na determinação dos perfis de espalhamento de tecidos mamários normais e neoplásicos. XIII Congresso Brasileiro de Física Médica, Belo Horizonte, Minas Gerais, 02 à 05 de julho de 2008.
- x) CONCEIÇÃO, A.L.C., ANTONIASSI, M., POLETTI, M.E., CALDAS, L.V. Preliminary study of human breast tissue using synchrotron radiation combining WAXS and SAXS techniques. 7th International Topical Meeting on Industrial Radiation and Radioisotope Measurement Application, Praga, República Tcheca, 22 à 27 de junho de 2008.
- xi) CONCEIÇÃO, A. L. C., GIACOMETTI, T. R., POLETTI, M. E. Application of SAXS technique on study of supramolecular organizations from human breast tissue normal and neoplastic. 18^a Reunião Anual de Usuários do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas, São Paulo, 18 e 19 de fevereiro de 2008.