

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

MARINA PIACENTI DA SILVA

ESTUDO DA FLUORESCÊNCIA DE ELEMENTOS TRAÇOS
PARA IDENTIFICAR A PRESENÇA DE NEOPLASIAS
MAMÁRIAS

RIBEIRÃO PRETO

2007

MARINA PIACENTI DA SILVA

**ESTUDO DA FLUORESCÊNCIA DE ELEMENTOS TRAÇOS
PARA IDENTIFICAR A PRESENÇA DE NEOPLASIAS
MAMÁRIAS**

Dissertação submetida 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, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Martin Eduardo Poletti.

RIBEIRÃO PRETO

2007

Dedico esta dissertação a algumas pessoas especiais:

Ao meu namorado **Luiz Carlos**, por todo seu amor, amizade, por estar sempre ao meu lado e ser uma pessoa tão importante em minha vida.

A meus pais **Geraldo** e **Maria José**, pela formação que me proporcionaram, e por sempre me apoiarem, nunca me deixando desistir.

À **Santa Luzia**, por uma enorme graça a mim concedida.

(... o que importa não é o que você tem na vida, mas QUEM você tem na vida...)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e pelas oportunidades proporcionadas.

Ao Prof. Dr. Martin Eduardo Poletti pela orientação em todas as etapas deste trabalho.

À minha irmã Carolina, uma pessoa tão especial.

À Tia Mara, Tio César, Tati, Bruna, Tia Aninha, Tio Elias, Gabriel Elias, Maria Luiza, Tio Binho, Tia Dri, Letícia e Lucas, por tornarem os momentos em família tão agradáveis.

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

À minha amiga Alessandra por ser companheira em todas as horas e me ajudar neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Virgílio Franco do Nascimento Filho do Laboratório de Instrumentação Nuclear do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo/USP - Campus Piracicaba, pela disposição e ajuda nos experimentos com feixe polienergético.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) por disponibilizar a linha de Fluorescência de Raios-X para as medidas com feixe monoenergético, ao pesquisador Carlos Alberto Pérez pela atenção e construtivas discussões acerca dos resultados e à técnica Simone do laboratório de apoio ao usuário.

Ao Prof. Dr. Alfredo Ribeiro da Silva, pelos esclarecimentos e discussões sobre as características histopatológicas das doenças de mama.

Ao Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, por fornecer os materiais analisados neste trabalho.

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

Aos técnicos do Departamento de Física e Matemática pela ajuda e atenção.

Aos meus amigos da faculdade: Andréa, Andreão, Ana Paula, Betinho, Brunão, Bruno José, Carô, Chico, Fernanda, Ju, Karina, Khallil, Marcelão, Rick, Silvio e tantos outros, por sempre poder compartilhar e discutir importantes assuntos na hora do almoço.

Aos amigos Diego, Mirko, André e Marcelo pelos dias compartilhados no laboratório.

Às meninas de casa: Luciana, Juliana, Tati, Lílian, Ana e Renata, por dividir experiências e as contas...

Aos meus amigos de Araraquara e meu amigo Mario Henrique, pela amizade, mesmo à distância.

Às amigas Valéria e Kátia.

À FAPESP, pela concessão da bolsa ao projeto "Estudo da fluorescência de elementos traços para identificar a presença de neoplasias mamárias", processo 04/12509-6.

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

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Fundamentos Teóricos	6
2.1. Princípios físicos da fluorescência de raios-X	6
2.1.1. <i>Modelo atômico e raios-X característicos</i>	6
2.1.2. <i>Interação da radiação com a matéria</i>	7
2.1.3. <i>Coeficiente de atenuação</i>	9
2.2. As técnicas de Fluorescência de Raios-X induzida por fótons	10
2.2.1. <i>Descrição do espectrômetro de EDXRF</i>	11
2.2.2. <i>Relação entre a intensidade de fluorescência com a concentração</i>	13
2.2.3. <i>Intensidade de radiação espalhada: Espalhamentos incoerente e coerente</i>	17
2.2.4. <i>Métodos de análise quantitativa para a técnica de EDXRF</i>	19
3. Materiais e Métodos	22
3.1. Amostras	22
3.1.1. <i>Aspectos gerais anatômicos e histológicos</i>	22
3.1.2. <i>Coleta das amostras e classificação histológica</i>	23
3.1.3. <i>Preparação das amostras</i>	24
3.2. Arranjo experimental	25
3.3. Metodologia para quantificação dos elementos traços	27
3.3.1. <i>Procedimento de calibração: Métodos de correção para os efeitos de matriz</i>	27
3.3.2. <i>Análise das intensidades dos espectros obtidos</i>	30
3.4. Análise estatística	31
3.4.1. <i>Testes estatísticos</i>	31
3.4.2. <i>Correlação</i>	31
4. Resultados e Discussões	32
4.1. Curvas de calibração	32
4.1.1. <i>Método de correção para feixe polienergético</i>	32
4.1.2. <i>Método de correção para feixe monoenergético</i>	35
4.2. Valores de concentrações	38

4.3. Comparação entre os resultados da utilização de feixes polienergéticos e monoenergéticos com a literatura	42
4.4. Testes estatísticos	44
4.4.1. <i>Frequências de distribuição</i>	44
4.4.2. <i>Comparação entre tecidos normais e neoplásicos</i>	46
4.4.3. <i>Comparação entre neoplasias benignas e malignas</i>	47
4.4.4. <i>Correlações</i>	47
Conclusões	50
Referências	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: (a) excitação de um átomo e (b) emissão de raios-X característicos.....	6
Figura 2.2: Configuração típica de um equipamento de fluorescência de raios-X.....	12
Figura 2.3: Espectro de fluorescência de solução aquosa contendo ferro, cobre e zinco.	13
Figura 2.4: Modelo relacionado aos parâmetros experimentais.....	14
Figura 3.1: Representação da estrutura da glândula mamária.....	22
Figura 3.2: Número total de amostras estudadas.....	24
Figura 3.3: Arranjo experimental para as medidas com feixe polienergético.....	26
Figura 3.4: Porta amostras e detector na análise com feixe monoenergético.	27
Figura 4.1: Espectros de tecidos mamários e soluções padrão obtidos com feixe polienergético de potencial de excitação de 10 kVp.	32
Figura 4.2: Curvas de calibração para os elementos (a) cálcio (10kVp) e (b) zinco (25kVp).....	34
Figura 4.3: Espectros de tecidos mamários e soluções padrão obtidos com feixe monoenergético de energia 11keV.....	35
Figura 4.4: Curvas de calibração para os elementos ferro e cobre (a) e (c) não normalizadas pelo espalhamento e (b) e (d) normalizadas pelo espalhamento, obtidas com feixe monoenergético de 11 keV.....	36
Figura 4.5: Curvas de calibração teóricas para os elementos ferro e cobre (a) e (c) não normalizadas pelo espalhamento e (b) e (d) normalizadas pelo espalhamento.....	37
Figura 4.6: Distribuição das concentrações dos elementos traços (a) cálcio, (b) ferro, (c) cobre e (d) zinco em diferentes tecidos, obtidas com feixe monoenergético.....	41
Figura 4.7: Frequências de distribuição dos elementos traços em tecidos normais, tecidos neoplásicos e tecidos normais periféricos – distribuições obtidas com feixe monoenergético.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Características dos métodos comparativos de análise quantitativa	20
Tabela 3.1: Valores da composição elementar (frações em massa) de tecidos encontrados na literatura e nas soluções utilizadas, com exceção dos elementos traços.	28
Tabela 4.1: Valores de concentração de cálcio em tecidos mamários	39
Tabela 4.2: Valores de concentração de ferro em tecidos mamários	39
Tabela 4.3: Valores de concentração de cobre em tecidos mamários	40
Tabela 4.4: Valores de concentração de zinco em tecidos mamários	40
Tabela 4.5: Valores da magnitude de elevação das concentrações dos elementos traços em tecidos mamários em estado natural.....	42
Tabela 4.6: Valores de magnitude de elevação entre as medianas das concentrações dos elementos traços em tecidos mamários desidratados	44
Tabela 4.7: Significâncias do teste de normalidade para as distribuições de frequências	46
Tabela 4.8: Correlações entre elementos traços em tecidos mamários normais periféricos, normais e neoplásicos (feixe monoenergético).	48

RESUMO

SILVA MP. *Estudo da Fluorescência de Elementos Traços para Identificar a Presença de Neoplasias Mamárias*. [Dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2007. 68p.

Uma das maiores causas da alta taxa de mortalidade em todo o mundo está relacionada com a neoplasia em tecidos. Particularmente, o câncer de mama é o segundo tipo desta doença que mais atinge mulheres no Brasil. O diagnóstico precoce certamente pode diminuir o risco de morte de pessoas com este tipo de doença e o tratamento e a prevenção são certamente um dos grandes desafios enfrentados pela medicina contemporânea. Atualmente, vem surgindo uma nova ferramenta de potencial diagnóstico, baseada no estudo de alguns elementos químicos que estão presentes em pequena quantidade no organismo, conhecidos como elementos traços. Estes elementos, responsáveis por algumas funções biológicas, podem apresentar-se em diferentes concentrações em tecidos normais e neoplásicos, o que pode indicar as mudanças histopatológicas dos tecidos e tornar possível a identificação de cada tipo de neoplasia. Desta forma, o estudo e determinação dos elementos traços em tecidos neoplásicos, que é o foco deste trabalho, apresenta uma nova área de interesse de investigação, principalmente pela possibilidade de oferecer informações diagnósticas, melhorando sua eficiência e em consequência, melhorando o prognóstico da paciente. Neste trabalho, utilizando a técnica de Fluorescência de Raios-X com feixes polienergéticos e monoenergéticos, determinamos as concentrações dos elementos traços em tecidos mamários normais e neoplásicos. Foram estudadas ao total 101 amostras de tecidos mamários normais, neoplásicos e tecidos normais adjacentes às neoplasias. As correções para os efeitos de matriz foram realizadas pelo método de padrão externo e pelo método de radiação espalhada para feixes polienergético e monoenergético respectivamente. Os resultados obtidos mostraram que todos os elementos analisados estão em níveis elevados nas espécies neoplásicas em relação às normais. Nas medidas com feixe polienergético foram verificadas diferenças significativas entre as concentrações dos elementos cobre e zinco entre tecidos normais e neoplásicos de amostras pareadas ($p < 0,005$) e não pareadas ($p < 0,001$). Com feixe monoenergético, foram obtidas diferenças significativas entre as concentrações de todos os elementos (Ca, Fe, Cu e Zn) em tecidos normais e neoplásicos de amostras pareadas e não pareadas (ambas com $p < 0,001$). Para as concentrações dos elementos cálcio e zinco foram observadas ainda diferenças significativas entre tecidos neoplásicos benignos e malignos ($p < 0,001$ e $p < 0,002$ respectivamente). A quantificação das concentrações dos elementos traços em tecidos normais e neoplásicos pode vir, portanto, auxiliar com precisão o diagnóstico das neoplasias de mama.

Palavras-chave: Câncer de mama; Diagnóstico; Elementos traços; Fluorescência de Raios-X

ABSTRACT

SILVA MP. *Study of Trace Elements Fluorescence to identify the presence of breast cancer.* [Dissertation]. Ribeirão Preto: Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2007. 68 p.

One of the major causes of the elevated rate of mortality in the whole world is related with the neoplasias in tissues. Particularly, the breast cancer is the second type of this disease that more reaches women in Brazil. Early diagnosis certainly can reduce the death risk in people with this type of disease and the treatment and prevention are certainly the great challenges found by medicine today. At present, it comes appearing a new diagnostic tool, based in the study of some chemical elements that are in small amount in the organism, known as trace elements. These elements, responsible for some biological functions, can be in different concentrations in healthy and neoplastic tissues that can indicate histopatological changes of breast cancer tissues, and become possible the identification of each type of neoplasias. In this way, the study and determination of trace elements in neoplastic tissues, the aim of this work, can be a new area of interest, mainly for the possibility to offer diagnostic information, improving its efficiency and in consequence, to improve the prognostic of the patient. In this work, using X-ray Fluorescence technique with polienergetic and monoenergetic beams, we determined the concentrations of the trace elements in healthy and neoplastic breast tissues. A total of 101 samples of healthy, neoplastic and adjacent normal tissues to neoplasias had been studied. The corrections for the matrix effect had been carried through by the method of external standard and by the method of scattered radiation for polienergetic and monoenergetic beams respectively. Results showed that all the analyzed elements are in raised levels in the neoplastic tissues in relation to the normal ones. In procedures with polienergetic beam significant differences between the concentrations of the elements copper and zinc had been verified between normal and neoplastic tissues of paired samples ($p < 0,005$) and independent samples ($p < 0.001$). With monoenergetic beam, concentrations of all elements (Ca, Fe, Cu and Zn) in healthy and neoplastic tissues of paired and independent samples showed significant differences (all with $p < 0.001$). For concentrations of the elements calcium and zinc significant differences between benign and malignant neoplastic tissues had been observed ($0.001 p <$ and $p < 0,002$ respectively). The quantification of concentrations of trace elements in normal and neoplastic tissues can, therefore, support with precision the diagnosis of the breast cancer.

Keywords: Breast Cancer; Diagnosis; Trace Elements; X-Ray Fluorescence

Capítulo 1

Introdução

O tratamento e a prevenção do câncer de tecidos é certamente um dos grandes desafios enfrentados pela medicina contemporânea. No Brasil, os carcinomas mamários são o segundo tipo mais comum de câncer, responsáveis por uma alta taxa de mortalidade. As estimativas divulgadas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCa) para o ano de 2006, apontaram a ocorrência de 472.050 novos casos de câncer e dentre estes, 48.930 casos de câncer de mama, acompanhando a mesma tendência observada em todo o mundo (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2005).

O diagnóstico do câncer de mama é na maioria das vezes estabelecido em uma fase tardia da doença, resultado de uma política ineficaz de controle e rastreamento, que tem na mamografia, aliada ao exame clínico das mamas e ao auto-exame, seus instrumentos fundamentais (ABREU E KOIFMAN, 2002; THULER, 2003). Apesar de a mamografia ser atualmente a ferramenta diagnóstica de maior poder de detecção do câncer de mama, em muitos casos esta técnica não fornece critérios definitivos que permitam diferenciar os tipos de tecidos devido à semelhança de atenuação entre tecidos glandulares e neoplásicos (JOHNS E YAFFE, 1987). Desta forma, novos métodos de diferenciação entre os tipos de neoplasia, como o ultra-som, a ressonância magnética, biópsias e avaliação anatomo-patológica dos tecidos, vêm surgindo com o objetivo de diferenciar os tipos de neoplasias e permitir a detecção precoce do câncer de mama, que representa grande importância no aumento da expectativa de vida das mulheres afetadas (HOUSSAMI ET AL, 2005; MAKLUF ET AL, 2006).

Atualmente, vem surgindo uma nova ferramenta de potencial diagnóstico, baseada no estudo de alguns elementos químicos que estão presentes em pequena quantidade no organismo (CESAREO, 1988). Estes elementos são classificados como *elementos traços* e geralmente representam menos de um por cento (1%) do peso do material e podem ser classificados como *essenciais* e *não essenciais* dependendo da necessidade do organismo com relação a estes (CESAREO, 1988), sendo que cerca de 15 elementos traços são essenciais ao organismo humano: Ca, Cu, Cl, F, I, Fe, Mg, Mn, Mo, N, P, K, Na, S e Zn (TOLGYESSY ET AL, 1990). Todos os tecidos humanos apresentam uma composição de elementos traços semelhante, que

varia de acordo com a função exercida pelo tecido ou órgão. Elementos essenciais para o metabolismo celular, em níveis normais, participam de um grande número de processos biológicos que incluem desde a ativação ou inibição de reações enzimáticas até modificações na permeabilidade das membranas celulares, entre outros. É reconhecido, também, que alguns elementos traços representam importantes fatores de risco, uma vez que podem induzir desordens patológicas no organismo (CESAREO, 1998).

Elementos como cálcio, ferro, cobre e zinco, que participam de alguns processos fisiológicos capazes de regular o funcionamento de células e tecidos, podem estar em concentrações elevadas em tecidos tumorais devido principalmente ao aumento do metabolismo celular na região. O cálcio e o zinco, entre outras funções, compõem algumas metaloproteínas de matriz (MMPs), uma família de proteases, cujo papel é degradar a matriz extracelular de tecidos neoplásicos, favorecendo o crescimento do tumor e metástases (GERBER ET AL, 1996; DUFFY ET AL, 2000; BAKER ET AL, 2002; FREIJE ET AL, 2003). Além disso, o Zn é um dos elementos responsáveis pela ativação da enzima transcriptase reversa, o que faz aumentar sua concentração em regiões tumorais, de alta atividade celular [PRASAD E OBERLEAS, 1976]. O ferro e o cobre participam do processo de angiogênese, promovendo a formação de novos vasos sanguíneos e favorecendo o crescimento do tumor e sua disseminação (KIM ET AL, 1993; ELLIS E FIDLER, 1996; LUDOVINI ET AL, 2003). Destaca-se ainda que o cobre é o principal regulador de enzimas essenciais para a respiração celular, defesa contra radicais livres e um importante cofator para o metabolismo do ferro (NASULEWICZA ET AL, 2004).

Atualmente, existem diversos tipos de técnicas, qualitativas e quantitativas, que permitem determinar as concentrações dos elementos traços em tecidos humanos (SANTOLIVUO ET AL, 1976; RIZK E SKY-PECK, 1984; VON BOHLEN ET AL, 1987; ROSEN, 1996; NG ET AL, 1997; BENNINGHOFF ET AL, 1997; BALCERZAK, 1997; MAJEWSKA, 1999; MARCÒ ET AL, 2001; GERAKE ET AL, 2002; HOLLAND, 2003; POLETTI ET AL, 2004; RAO ET AL, 2004; RIBEIRO-SILVA ET AL, 2005; NAGA RAJU ET AL, 2006). As mais tradicionais, aplicadas na área da medicina, realizam *exames imuno-histoquímicos*, que usam marcadores biológicos para caracterizar o local de origem e o tipo de malignidade presente no tecido, bem como o grau de atividade proliferativa do tumor (ROSEN, 1996; HOLLAND, 2003; RIBEIRO-SILVA ET AL, 2005). Outras técnicas de caráter analítico são: a *Espectroscopia por Absorção Atômica* (SANTOLIVUO ET AL, 1976); *ICP-AES* (Inductively Coupled Plasma Atomic

Emission Spectrometry) (BALCERZAK,1997); a *Análise por Ativação Neutrônica* (NG ET AL, 1997); *PIXE* (Particle-induced X-ray emission) (MAJEWSKA, 1999); e a *Fluorescência de Raios-X* (FRX ou XRF – X-Ray Fluorescence) (GERAKI ET AL, 2004.a; GERAKI ET AL, 2004.b; POLETTI ET AL, 2004). Estas técnicas permitem medir e monitorar, simultaneamente, uma ampla quantidade de elementos.

Vários autores vêm estudando os elementos traços em tecidos mamários através das diferentes técnicas analíticas (RIZK E SKY-PECK, 1984; NG ET AL, 1997; GERAKI ET AL, 2002; GERAKI ET AL, 2004.a; POLETTI ET AL, 2004; NAGA RAJU, 2006; SIDDIQUI ET AL, 2006).

Rizk e Sky-Peck (1984) avaliaram através de EDXRF as concentrações de elementos traços em 25 amostras de tecidos mamários, encontrando diferenças significativas ($p < 0,001$) entre amostras normais e neoplásicas para os elementos Ca, V, Cu, Zn, Se e Rb.

Ng et al (1997) estudaram através da Análise por Ativação Neutrônica os elementos Al, Br, Ca, Cl, Co, Cs, Fe, K, Mn, Na, Rb e Zn em 46 amostras de tecidos mamários, encontrando para todos estes elementos concentrações significativamente maiores em tecidos neoplásicos ($p < 0,001$), exceto para o Co ($p < 0,003$). Observou ainda que a elevação dessas concentrações pode estar relacionada ao aparecimento de calcificações na mama.

Geraki et al (2002) e Poletti et al (2004) estudaram respectivamente 80 e 9 amostras de tecidos mamários utilizando a técnica de Fluorescência de Raios-X com radiação monoenergética para determinar a concentração de elementos como K, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn em tecidos mamários utilizando curvas de calibração de soluções aquosas de elementos traços com concentrações conhecidas. Ambos trabalhos mostraram que as concentrações dos elementos traços encontram-se em níveis elevados em tecidos neoplásicos. Em outro trabalho, Geraki et al. (2004.a) combinou ainda técnicas de XRF, XRD (X-Ray Diffraction) e o método de Monte Carlo com o objetivo de melhorar a convergência entre a matriz tecidual e as curvas de calibração, para quantificar os elementos K, Fe, Cu e Zn. Embora esta aproximação tenha permitido que os dados de XRF de cada espécie fossem corrigidos de acordo com sua composição, pouca melhora na acurácia dos resultados foi obtida.

Naga Raju et al, (2006) utilizando PIXE em 18 amostras de tecidos mamários verificou um aumento significativo ($p < 0,05$) de vários elementos traços em tecidos mamários.

Siddiqui et al (2006) avaliou as concentrações dos elementos Pb, Zn, Cu, Fe e Ca em 75 amostras de tecidos mamários com a técnica de Espectroscopia por Absorção Atômica. Seus resultados mostraram um aumento significativo das concentrações destes elementos em tecidos neoplásicos, com exceção do chumbo, que apesar de apresentar concentração elevada em tecidos neoplásicos, a diferença não era significativa.

Os resultados das concentrações de elementos traços reportados por estes autores não são consistentes (e muitas vezes provém da análise de um pequeno número de amostras), além do procedimento experimental e da análise das medidas gerarem dúvidas, principalmente no que se refere a como corrigir o parâmetro físico que está sendo medido, embora todos os trabalhos indiquem um aumento dos elementos traços em tecidos alterados quando comparados com tecidos normais (GERAKI ET AL, 2004.a; NAGA RAJU, 2006; SIDDIQUI ET AL, 2006).

O presente trabalho teve como objetivo dar uma seqüência natural a esses estudos, aumentando o número de amostras para um número estatisticamente significativo e testando as potencialidades reais de relacionar o acúmulo ou diminuição de elementos traços em tecidos mamários com suas patologias através da espectroscopia de Fluorescência de Raios-X. Espera-se que estes resultados sirvam para colaborar no desenvolvimento de uma técnica promissora na identificação dos tecidos patológicos, contribuindo à área diagnóstica, pois permitiria a diferenciação entre tecidos normais e os diversos tipos de câncer.

O trabalho foi organizado da seguinte forma:

O capítulo 2 descreve os conceitos físicos envolvidos com a FRX, como a produção de fluorescência por um átomo (raios-X característicos), processos de interação da radiação com a matéria, e os princípios da técnica de FRX. São deduzidas também as relações teóricas para a intensidade de fluorescência em função da concentração dos elementos traços e para a intensidade da radiação espalhada pela amostra. Finalmente, são descritos de forma geral os diversos métodos de análise quantitativa da técnica de FRX.

No capítulo 3 uma breve discussão é feita acerca dos aspectos anatômicos e histológicos dos tecidos mamários. São apresentados ainda os tipos de tecidos analisados, o arranjo experimental utilizado para a medida das concentrações dos elementos traços, utilizando feixes polienergéticos e monoenergéticos, bem como a metodologia utilizada para a quantificação das concentrações e uma descrição dos testes estatísticos realizados para o estudo da significância das possíveis diferenças nas concentrações dos elementos traços em diferentes tecidos.

O capítulo 4 apresenta os resultados obtidos para os valores de concentração dos elementos traços, obtidos com feixes polienergéticos e monoenergéticos. São apresentados ainda os resultados dos testes estatísticos.

No capítulo 5 são apresentadas as conclusões do trabalho e perspectivas para futuros estudos.

Capítulo 2

Fundamentos Teóricos

2.1. Princípios físicos da fluorescência de raios-X

2.1.1. Modelo atômico e raios-X característicos

O modelo atômico proposto por Niels Bohr resulta na distribuição dos elétrons em camadas quantizadas em torno do núcleo (CESAREO, 1988). Na terminologia de raios-X, a camada eletrônica mais próxima do núcleo é denominada camada K, e as camadas subseqüentes são denominadas camadas L, M, N, etc (CESAREO, 1988). A figura 2.1(a) representa um átomo em seu estado normal, submetido à excitação apropriada, seja na forma de partícula corpuscular ou de radiação eletromagnética. Se a energia incidente possuir valor igual ou maior à energia de ligação do elétron, este será ejetado do átomo formando uma vacância, que será posteriormente preenchida através da captura e/ou decaimento de outro elétron de uma camada mais externa (figura 2.1.(b)). Essa transição eletrônica faz com que o átomo perca energia, emitindo um fóton de raio-X característico (fluorescência), com energia correspondente à diferença de energia entre as camadas (TERTIAN E CLAISSE, 1982).

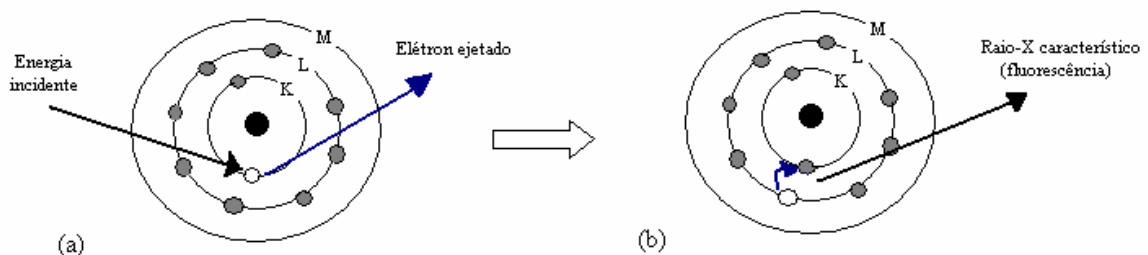


Figura 2.1: (a) excitação de um átomo e (b) emissão de raios-X característicos

A lacuna formada pelo elétron que preencheu a vacância da camada K pode ser por sua vez preenchida por elétrons mais externos dando origem a outras linhas de emissão. A radiação característica correspondente ao preenchimento das vacâncias na camada K é denominada série

K, a corresponde ao preenchimento das vacâncias da camada L é denominada série L, e assim sucessivamente. Em geral, cada série de raios-X é seguida de uma letra grega que indica qual camada sofreu a transição. De forma geral, raios K_α correspondem à transição eletrônica da camada L para K, e raios K_β correspondem à transição de uma camada M para uma camada K (CESAREO, 1988).

2.1.2. Interação da radiação com a matéria

Quando um feixe de raios-X atravessa um meio absorvedor podem ocorrer vários fenômenos de interação dependendo da energia da radiação. Na faixa de energia da fluorescência de raios-X, que vai de 1 keV a aproximadamente 100 keV, as interações predominantes são o efeito fotoelétrico, o espalhamento coerente e o espalhamento incoerente (efeito Compton).

No efeito fotoelétrico um fóton de energia $h\nu$ colide com um átomo transferindo toda sua energia para um elétron que é então ejetado. Para que este fenômeno ocorra, a energia do fóton incidente deve ser maior ou igual à energia de ligação do elétron. Devido a esse fenômeno, os átomos da amostra irradiada irão emitir raios-X característicos como descrito na seção 2.1.1 e as diferentes energias de fluorescência possibilitarão a identificação dos elementos constituintes da amostra (TERTIAN E CLAISSE, 1982). A probabilidade de que um átomo sofra um processo fotoelétrico é dada pela seção de choque τ , que para energias menores que 100 keV é proporcional ao número atômico Z e inversamente proporcional à energia do fóton, como descrito pela equação 2.1 (ATTIX, 1986):

$$\tau \propto \frac{Z^4}{(h\nu)^3} \quad (2.1)$$

De uma forma geral, para energias maiores que a energia de ligação da camada K, toda a energia transferida no efeito fotoelétrico é restrita aos elétrons da camada K, com uma menor contribuição da camada L e contribuições negligenciáveis para outras camadas (ATTIX, 1986).

O espalhamento coerente ou elástico ocorre quando a radiação incidente desvia de sua direção inicial sem variação de energia. O campo elétrico associado a esse fóton dá origem a uma vibração dos elétrons presentes na matéria, que por sua vez emitem radiação eletromagnética na

mesma frequência da radiação incidente, portanto, nenhuma energia é transferida (JOHNS E CUNNINGHAM, 1983). A probabilidade de que um átomo sofra um espalhamento coerente é dada pela seção de choque σ_{coe} . Para energias menores que 100 keV, e considerando um material puro com número atômico Z , a seção de choque para o espalhamento coerente é dada pela equação 2.2:

$$\sigma_{coe} \approx \frac{Z^2}{(h\nu)^2} \quad (2.2)$$

A seção de choque diferencial para espalhamento coerente pode ser descrita através da equação 2.3, na qual $F(x,Z)$ é o fator de forma e representa a transformada de Fourier da distribuição de cargas do material, x é proporcional ao momento transferido na interação do fóton com o átomo ($x = \lambda^{-1} \text{sen}(\theta/2)$, onde λ é o comprimento de onda), θ é o ângulo de espalhamento e $r_0 = 2,8 \cdot 10^{-13}$ cm é o raio clássico do elétron (JOHNS e YAFFE, 1983).

$$\left(\frac{d\sigma_{coe}}{d\Omega} \right)_{Ray} = (F(x,Z))^2 \cdot \frac{r_0^2}{2} (1 + \cos^2 \theta) \quad (2.3)$$

Valores para os fatores $F(x,Z)$ encontram-se tabulados por Hubbell et al (HUBBELL ET AL, 1975) para uma grande quantidade de elementos químicos.

O espalhamento incoerente ou inelástico (efeito Compton) ocorre quando o fóton incidente transfere parte de sua energia para os elétrons do meio na forma de energia cinética, desviando-se de sua trajetória inicial. Nesta interação, um elétron é ejetado e o fóton resultante é espalhado com uma energia menor que a inicial. A equação 2.4 mostra a relação entre a energia do fóton incidente E_0 e a do fóton espalhado E_C , dependendo do ângulo de espalhamento θ . Nesta equação m_0 é a massa de repouso do elétron e c é a velocidade da luz (CESAREO, 1988).

$$E_C = E_0 \cdot \frac{1}{1 + \frac{E_0}{m_0 \cdot c^2} (1 - \cos \theta)} \quad (2.4)$$

A seção de choque diferencial para espalhamento incoerente pode ser descrita através da equação 2.5, definindo uma função do espalhamento incoerente $S(x,Z)$ análoga ao fator de forma do espalhamento coerente.

$$\left(\frac{d\sigma_{inc}}{d\Omega} \right)_{inc} = S(x,Z) \frac{r_0^2}{2} (1 + \cos^2 \theta) F_{KN} \quad (2.5)$$

onde F_{KN} é o fator de Klein-Nishina, descrito pela equação 2.6:

$$F_{KN} = \left\{ \frac{1}{1 + \gamma \cdot (1 - \cos \theta)} \right\}^2 \times \left\{ 1 + \frac{\gamma^2 \cdot (1 - \cos \theta)^2}{[1 + \gamma \cdot (1 - \cos \theta)] \times (1 + \cos^2 \theta)} \right\} \quad (2.6)$$

onde $\gamma = h\nu/m_0c^2$.

Valores para os fatores $S(x,Z)$ encontram-se tabulados por Hubbell et al (HUBBELL ET AL, 1975).

A probabilidade total para a interação de um fóton com um elétron através do espalhamento incoerente (σ_{inc}) é obtida integrando-se a seção de choque diferencial dada pela equação 2.5 para todo intervalo de ângulo sólido (JOHNS E CUNNINGHAM, 1983). Para o caso de materiais heterogêneos, pode-se supor que cada átomo que compõem a amostra contribui de forma independente para estes três efeitos (fotoelétrico, espalhamentos coerente e incoerente). Esta suposição é conhecida como Modelo Atômico Independente (JOHNS E YAFFE, 1983).

2.1.3. Coeficiente de atenuação

Se um feixe monoenergético de energia $h\nu$ e intensidade inicial I_0 atravessa um meio absorvedor de espessura x (cm) e densidade ρ (g/cm^3), a intensidade total de radiação que atravessa o material (I) pode ser descrita pela lei de atenuação exponencial (equação 2.7).

$$I = I_0 \cdot e^{-\mu(\rho, h\nu, Z) \cdot x} \quad (2.7)$$

A quantidade μ é chamada de coeficiente de atenuação linear, ou simplesmente coeficiente de atenuação, que depende do número atômico (Z), da densidade do material (ρ) e da energia da radiação ($h\nu$), podendo ser escrita como a somatória das seções de choque dos processos individuais de interação de fótons com a matéria $\mu = n_v \sum_i \sigma_i = n_v (\tau + \sigma_{coe} + \sigma_{inc})$, onde n_v é o número de átomos por unidade de volume (JOHNS E CUNNINGHAM, 1983).

2.2. As técnicas de Fluorescência de Raios-X induzida por fótons

A análise por fluorescência de raios-X (FRX) induzida por fótons é um método de análise para determinação qualitativa e quantitativa das concentrações de elementos em uma ampla variedade de amostras (SANTOLIVIDO ET AL, 1976; POTTS ET AL, 2006), e consiste na excitação de uma amostra com radiação de energia e intensidade adequadas e a posterior emissão de raios-X característicos pelos elementos que a constituem.

Dentre os tipos de análises por Fluorescência de Raios-X pode-se citar a **Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Comprimento de onda** (WDXRF - Wavelength Dispersive X-Ray Fluorescence), a **Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia** (EDXRF - Energy Dispersive X-Ray Fluorescence), a **Fluorescência de Raios-X por Reflexão Total** (TRXRF - Total Reflection X-Ray Fluorescence), e a **Microfluorescência** (μ -XRF) (BERTIN, 1978; TERTIAN E CLAISSE, 1982).

A **WDXRF** utiliza radionúcleos ou fontes de raios-X para excitar a amostra e um cristal analisador para separar os raios-X fluorescentes em diferentes comprimentos de onda (λ) de acordo com a lei de Bragg (CESAREO, 1988).

A análise por **EDXRF** surgiu com o aparecimento dos detectores semicondutores dispersivos em energia, o que tornou a análise por XRF menos dispendiosa, uma vez que não necessita a utilização de cristais defletores (BERTIN, 1978). Esta técnica, uma vez que será empregada neste trabalho, será melhor discutida na seção 2.2.1.

A análise por **TRXRF** é realizada fazendo-se com que raios-X incidam com ângulo rasante em uma superfície de tal forma que ocorra reflexão total do feixe de acordo com a lei de Snell (KLOCKENKAPER E VON BOHLEN, 1992). Os raios-X excitam os átomos da superfície da amostra e a emissão fluorescente é captada através de detectores de estado sólido (BERTIN, 1978).

A **μ -XRF** é realizada utilizando um feixe de raios-X com poucos micrômetros de diâmetro, de forma a conseguir dados acerca da distribuição espacial dos elementos. Um detector de estado sólido coleta os fótons emitidos e o resultado final é um mapa espacial das espécies presentes na amostra (BERTIN, 1978; TERTIAN E CLAISSE, 1982).

Na próxima seção serão discutidos especificamente os aspectos da técnica de EDXRF, utilizada neste trabalho.

2.2.1. Descrição do espectrômetro de EDXRF

A análise por EDXRF pode possuir vários tipos de configuração: a excitação direta da amostra por uma fonte polienergética (radionuclídeos ou tubo de raios-X), a excitação da amostra a partir de um tubo de raios-X com o auxílio de alvos secundários constituídos de elementos puros (feixe monoenergético), e a excitação feita com o auxílio de monocromadores colocados entre a fonte e a amostra (feixe monoenergético). Os feixes monoenergéticos permitem a escolha da energia de forma a aumentar a eficiência de excitação dos elementos fluorescentes e reduzir o espalhamento.

Um típico sistema de EDXRF está representado na figura 2.2. Este sistema consiste em uma fonte de excitação, um objeto de medida, um detector de radiação, um amplificador e um sistema de leitura.

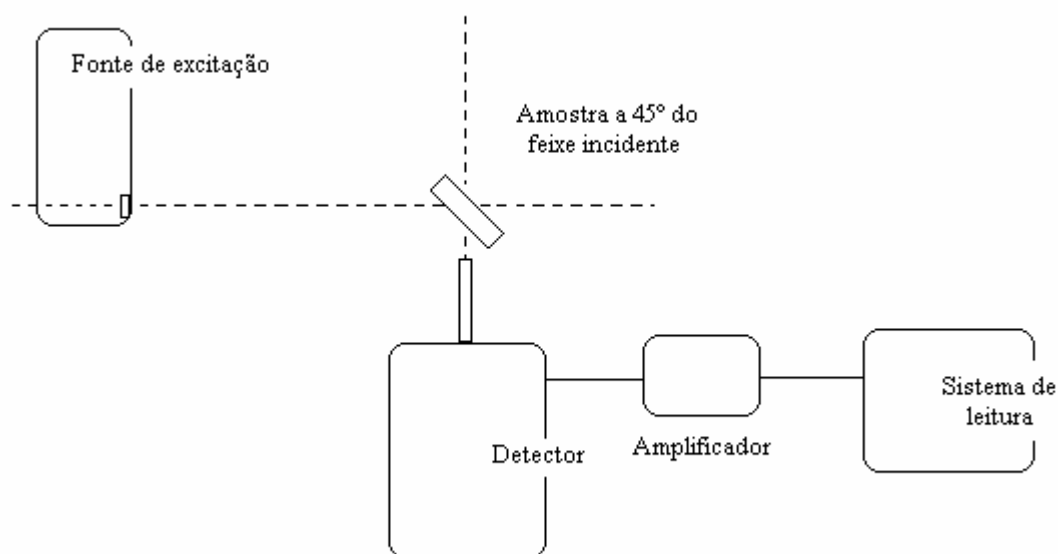


Figura 2.2: Configuração típica de um equipamento de fluorescência de raios-X

As fontes utilizadas neste trabalho foram o tubo de raios-X (polienergética) e radiação síncrotron (monoenergética). Os fótons gerados nos tubos de raios-X são divididos em bremsstrahlung, responsável pelo espectro contínuo polienergético e os fótons de radiação característica, responsáveis pelo espectro discreto (BERTIN, 1978; TERTIAN E CLAISSE, 1982). A radiação síncrotron é gerada quando elétrons de alta energia cinética são defletidos por um campo magnético (CESAREO, 1988). Esta radiação é caracterizada por possuir um alto fluxo de fótons e radiação polarizada, o que reduz os espalhamentos coerente e incoerente (POLETTI ET AL, 2004).

Diferentes tipos de detectores podem ser empregados na espectroscopia de raios-X e a escolha depende entre outros fatores, do tipo de elemento a ser analisado e a sensibilidade desejada. Na técnica de EDXRF os detectores semicondutores (Si/Li, Ge), são hoje os mais empregados em análises multielementares, devido à sua sensibilidade e alta resolução energética (CESAREO, 1988). Após absorver os fótons fluorescentes, os detectores dispersivos em energia os convertem em pulsos eletrônicos com amplitudes proporcionais à energia do fóton (pré-amplificador). A eletrônica associada ao detector é composta de um amplificador e um analisador multicanal. Este conjunto é responsável por organizar a seqüência de pulsos com amplitudes variáveis de forma a refletir a distribuição de fótons do espectro fluorescente e converter essa

informação em um número digital que é armazenado em um histograma, disponível para posterior interpretação e análise (CESAREO, 1988).

Um exemplo do espectro de uma solução aquosa de ferro, cobre e zinco, produzido com energia de excitação de 11 keV com feixe monoenergético é mostrado na figura 2.3. Observam-se neste espectro os picos de emissão, correspondentes às linhas K_{α} e K_{β} dos elementos Fe, Cu e Zn e os picos de espalhamento coerente (11,0 keV) e incoerente (10,8 keV).

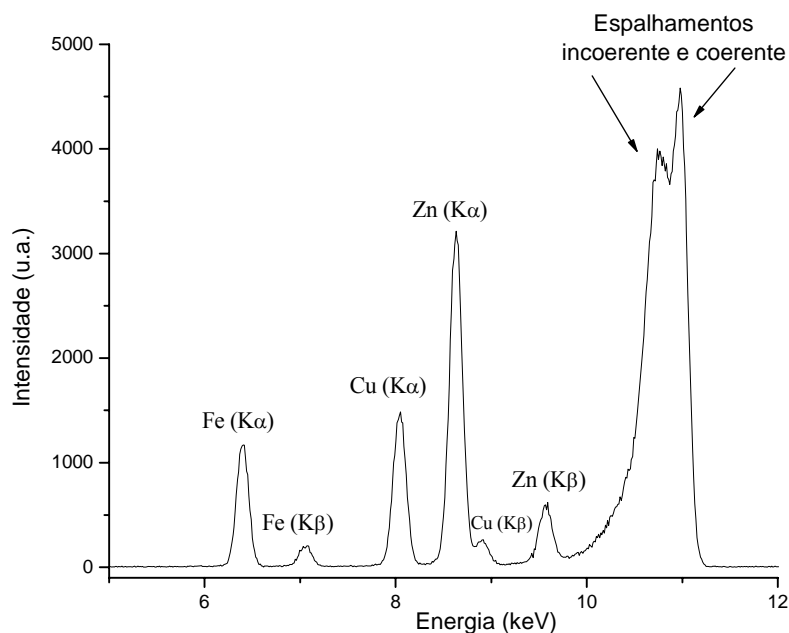


Figura 2.3: Espectro de fluorescência de solução aquosa contendo ferro, cobre e zinco.

A determinação quantitativa das concentrações dos elementos presentes na amostra a partir do espectro pode ser realizada através da relação matemática descrita a seguir.

2.2.2. Relação entre a intensidade de fluorescência com a concentração

A intensidade de fluorescência total de um material de composição heterogênea e distribuição isotrópica, depende da emissão das fluorescências primária (I_p), secundária (I_s) e terciária (I_T). A fluorescência primária resulta do efeito direto do feixe incidente sob a amostra e

é responsável pela maior contribuição da intensidade fluorescente. A fluorescência secundária ocorre quando a fluorescência emitida por um elemento possui energia suficiente para excitar um segundo elemento. Desta forma, este segundo elemento será excitado tanto pelo feixe primário, quanto pela emissão do primeiro elemento. A emissão adicional do segundo elemento pode também ser chamada de *Realce*, e a diminuição na intensidade de fluorescência detectada do primeiro elemento é chamada de *Supressão*. Pode ocorrer ainda a fluorescência terciária envolvendo um terceiro elemento, através do mesmo mecanismo da fluorescência secundária (BERTIN, 1978; TERTIAN E CLAISSE, 1982).

Para calcular teoricamente a relação entre a intensidade de fluorescência primária e a concentração de um elemento, é necessário definir um modelo relacionado aos parâmetros experimentais. Na figura 2.4, considera-se uma espécie plana, homogênea, de espessura h e que contém um elemento fluorescente i com concentração C_i .

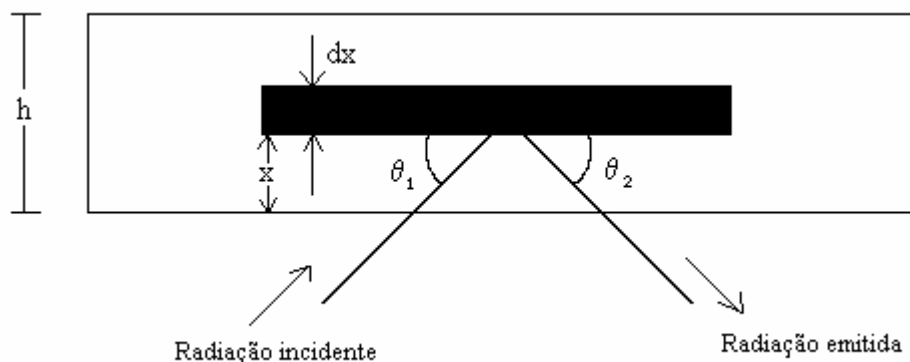


Figura 2.4: Modelo relacionado aos parâmetros experimentais

Se um feixe monoenergético de intensidade espectral I_0 incidir a um ângulo θ_1 com relação à superfície da amostra, a contribuição da fluorescência primária (dI_p) referente à emissão da linha k_α do elemento de volume entre x e $x+dx$, é descrita na equação 2.8 (BERTIN, 1978; TERTIAN E CLAISSE, 1982):

$$dI_{P(x)} = \underbrace{I_0 \exp\left(-\frac{\mu_{M(h\nu)}}{\rho} \cdot \frac{x}{\text{sen}\theta_1}\right)}_{F_1} \cdot \underbrace{\frac{\mu_{(h\nu)}}{\rho} \frac{dx}{\text{sen}\theta_1} \cdot C_i \frac{(\tau_{i(h\nu)}/\rho)}{(\mu_{(h\nu)}/\rho)}}_{F_2} \cdot \underbrace{\left(1 - \frac{1}{j_i}\right) \cdot f_{K_i} \cdot \omega_{k_i}}_{F_3} \cdot \underbrace{\exp\left(-\frac{\mu_{M(h\nu')}}{\rho} \cdot \frac{x}{\text{sen}\theta_2}\right)}_{F_4} \cdot \underbrace{d\Omega \cdot \varepsilon_{(h\nu')}}_{F_5} \quad (2.8)$$

Na equação 2.8, o fator F_1 representa a intensidade de radiação que atinge o elemento de volume depois de ser atenuada pelo caminho $x/\text{sen}\theta_1$, onde ρ é a densidade da amostra e $\mu_{M(h\nu)}/\rho$ é o coeficiente de atenuação mássico da amostra na energia incidente $h\nu$. O fator F_2 representa o número de interações fotoelétricas do feixe primário com o elemento i , no elemento de volume. O termo $(\mu_{(h\nu)}/\rho)(dx/\text{sen}\theta_1)$ representa a fração do número total de interações do feixe incidente e $C_i \cdot [(\tau_{i(h\nu)}/\rho)/(\mu_{(h\nu)}/\rho)]$ é probabilidade que o elemento fluorescente i sofra efeito fotoelétrico. Neste termo, $\tau_{i(h\nu)}$ é a seção de choque para o efeito fotoelétrico do elemento i na energia $h\nu$. O fator F_3 considera que a probabilidade de produção de fluorescência devido a transições para a camada K. O termo j_i (jump ratio) indica a probabilidade de retirar elétrons de todas as camadas em relação à probabilidade de retirar elétrons de todas as camadas com exceção da camada K; o termo f_{K_i} indica a probabilidade que a vacância criada seja preenchida com elétrons da camada L e ω_i (rendimento de fluorescência) representa a probabilidade que o raio-X emitido saia do átomo sem ser reabsorvido. O fator F_4 representa a radiação fluorescente emitida pelo elemento i , transmitida pelo material após atravessar o caminho $x/\text{sen}\theta_2$, sendo θ_2 o ângulo de emergência da radiação com relação à superfície da amostra e $\mu_{M(h\nu')}/\rho$ o coeficiente de atenuação da amostra na energia da fluorescência emitida pelo elemento i ($h\nu'$). O fator F_5 representa um fator geométrico que depende do ângulo sólido formado entre a amostra e o detector $d\Omega$ e a eficiência do detector $\varepsilon_{(h\nu')}$ na energia de emissão $h\nu'$, assumindo que a emissão fluorescente é isotrópica (BERTIN, 1978; TERTIAN E CLAISSE, 1982; CESAREO, 1988).

Integrando a equação 2.8 para uma amostra infinita ($x \rightarrow \infty$), chega-se à seguinte relação para a expressão da intensidade fluorescente primária referente à emissão k_α (equação 2.9):

$$I_{P(i)} = C_i \cdot \left(\frac{\tau_{i(h\nu)}}{\rho} + \frac{\sigma_{inc(h\nu)}}{\rho} \right) \cdot E_i \cdot \frac{1}{\frac{\mu_{M(h\nu)}}{\rho} + \frac{\text{sen}\theta_1}{\text{sen}\theta_2} \cdot \frac{\mu_{M(h\nu')}}{\rho}} \quad (2.9)$$

em que $E_i = I_0 \cdot \left(1 - \frac{1}{j_i} \right) \cdot f_{K_i} \cdot \omega_{k_i} \cdot d\Omega \cdot \varepsilon_{(h\nu')}$

Na geometria utilizada nos experimentos deste trabalho foram escolhidos os ângulos de incidência e emergência iguais ($\theta_1 = \theta_2 = 45^\circ$) e portanto, a equação 2.9 pode ser simplificada, resultando na equação 2.10:

$$I_{P(i)} = \frac{C_i \cdot \left(\frac{\tau_{i(h\nu)}}{\rho} + \frac{\sigma_{inc(h\nu)}}{\rho} \right) \cdot E_i}{\frac{\mu_{M(h\nu)}}{\rho} + \frac{\mu_{M(h\nu')}}{\rho}} \quad (2.10)$$

Esta equação entretanto, não apresenta uma relação direta entre a intensidade de fluorescência e a concentração do elemento fluorescente na amostra, uma vez que os coeficientes de atenuação mássicos no denominador também dependem da composição do material.

As intensidades de fluorescência secundária e terciária, que são responsáveis pelos efeitos de matriz (*realce* e *supressão*), também podem ser explicitadas de forma teórica (TERTIAN E CLAISSE, 1982), mas são geralmente corrigidas a partir de métodos experimentais de análise, melhor discutidos na seção 2.2.2. Cabe lembrar ainda que para a determinação quantitativa das concentrações dos elementos de interesse em amostras desconhecidas, o conhecimento dos coeficientes de atenuação através de métodos experimentais ou teóricos é fundamental. Uma das formas experimentais de estimar as propriedades de atenuação de uma amostra é através da intensidade de radiação espalhada, cuja relação será obtida a seguir.

2.2.3. Intensidade de radiação espalhada: Espalhamentos incoerente e coerente

Os cálculos teóricos das intensidades das radiações espalhadas incoerente e coerente são semelhantes ao cálculo da intensidade fluorescente primária, desta forma, o modelo da figura 2.4 será utilizado. O feixe primário de intensidade espectral I_0 monoenergético incide a um ângulo θ_1 na amostra e a radiação espalhada emerge a um ângulo θ_2 . A contribuição da radiação incoerente espalhada pelo elemento de volume (dI_E) pode ser descrita pela equação 2.11 (BERTIN, 1978; TERTIAN E CLAISSE, 1982):

$$dI_{Einc(x)} = I_0 \underbrace{\exp\left(-\frac{\mu_{M(h\nu)}}{\rho} \cdot \frac{x}{\text{sen}\theta_1}\right)}_{E_1} \cdot \underbrace{\frac{\mu_{(h\nu)}}{\rho} \cdot \frac{dx}{\text{sen}\theta_1} \cdot \frac{d\sigma_{inc(h\nu)}/d\Omega}{\mu_{(h\nu)}/\rho}}_{E_2} \cdot \underbrace{\exp\left(-\frac{\mu_{M(h\nu'')}}{\rho} \cdot \frac{x}{\text{sen}\theta_2}\right) d\Omega \cdot \varepsilon_{(h\nu'')}}_{E_3} \quad (2.11)$$

Na equação 2.11, ρ é a densidade da amostra e $\mu_{M(h\nu)}/\rho$ é o coeficiente de atenuação mássico da amostra na energia incidente $h\nu$. O fator E_1 representa a intensidade de radiação que atinge o elemento de volume depois de atenuada pelo caminho $x/\text{sen}\theta_1$. O fator E_2 representa a fração de fótons que interagem no elemento de volume da amostra e sofrem espalhamento incoerente. O termo $(\mu_{(h\nu)}/\rho)(dx/\text{sen}\theta_1)$ representa a fração do número total de interações no elemento de volume e $(d\sigma_{inc(h\nu)}/d\Omega)/(\mu_{(h\nu)}/\rho)$ é a fração das interações que sofrerão espalhamento incoerente. Como a radiação espalhada não é isotrópica, estes fatores de seção de choque por unidade de ângulo sólido devem ser calculados teoricamente para energia e ângulo de espalhamento apropriados. O fator E_3 representa a radiação espalhada incoerentemente de energia $h\nu''$ pelo elemento de volume, transmitida pelo caminho $x/\text{sen}\theta_2$. $\mu_{M(h\nu'')}/\rho$ é o coeficiente de atenuação mássico da amostra na energia do espalhamento e $d\Omega \cdot \varepsilon_{(h\nu'')}$ é o produto do ângulo

sólido formado entre a amostra e o detector e a eficiência do detector na energia espalhada. (BERTIN, 1978; TERTIAN E CLAISSE, 1982).

Integrando a equação 2.11 para uma amostra infinita ($x \rightarrow \infty$), chega-se à seguinte relação para a expressão da intensidade de radiação espalhada (equação 2.12):

$$I_{Einc} = I_0 \cdot \frac{d\sigma_{inc(h\nu)}}{d\Omega} \cdot d\Omega \cdot \varepsilon_{(h\nu')} \cdot \frac{1}{\frac{\mu_M(h\nu)}{\rho} + \frac{\text{sen } \theta_1}{\text{sen } \theta_2} \cdot \frac{\mu_M(h\nu')}{\rho}} \quad (2.12)$$

Como $\theta_1 = \theta_2 = 45^\circ$, podemos simplificar a equação 2.12 equação para:

$$I_{Einc} = \frac{I_0 \cdot \frac{d\sigma_{inc(h\nu)}}{d\Omega} \cdot d\Omega \cdot \varepsilon_{(h\nu')}}{\frac{\mu_M(h\nu)}{\rho} + \frac{\mu_M(h\nu')}{\rho}} \quad (2.13)$$

A equação 2.13 é para a intensidade de espalhamento incoerente. Para calcular a intensidade de espalhamento coerente (equação 2.14), utiliza-se a seção de choque diferencial $d\sigma_{coe(h\nu)}/d\Omega$. Cabe lembrar que os coeficientes de atenuação no denominador no caso de espalhamento coerente são iguais, e o fator de eficiência do detector na energia $h\nu$, uma vez que a energia espalhada é a mesma que a energia incidente (BERTIN, 1978; TERTIAN E CLAISSE, 1982).

$$I_{Ecoe} = \frac{I_0 \cdot \frac{d\sigma_{coe(h\nu)}}{d\Omega} \cdot d\Omega \cdot \varepsilon_{(h\nu)}}{2 \cdot \left(\frac{\mu_M(h\nu)}{\rho} \right)} \quad (2.14)$$

Considerando os dois espalhamentos, e supondo que a energia do fóton espalhado incoerentemente seja aproximadamente igual à energia incidente, a intensidade espalhada final será a soma das equações 2.13 e 2.14:

$$I_{Einc} = \frac{I_0 \cdot d\Omega \cdot \varepsilon_{(hv)} \left(\frac{d\sigma_{inc(hv)}}{d\Omega} + \frac{d\sigma_{coe(hv)}}{d\Omega} \right)}{2 \cdot \left(\frac{\mu_M(hv)}{\rho} \right)} \quad (2.15)$$

Assim como na equação 2.10, a equação 2.15 depende do coeficiente de atenuação da amostra, sendo possível, como será mostrado na próxima seção, utilizar a medida da intensidade espalhada no espectro obtido para eliminar a dependência com o coeficiente de atenuação. A seguir descreveremos este e outros métodos de análise quantitativa para a determinação das concentrações de elementos.

2.2.4. Métodos de análise quantitativa para a técnica de EDXRF

Como a intensidade da fluorescência de um elemento depende da composição da amostra, vários procedimentos são utilizados para a obtenção dos valores de concentração na análise quantitativa (ROUSSEAU, 2006). Estes procedimentos estão divididos em dois principais grupos: os métodos matemáticos e os métodos comparativos (TERTIAN E CLAISSE, 1982).

Os métodos matemáticos são mais aplicados em casos de análises nas quais a composição da amostra é conhecida, com exceção de apenas alguns elementos traços. Nestes métodos os efeitos de matriz são calculados através de algoritmos ou equações de correção e os termos desconhecidos calculados por técnicas de iteração. Dois tipos de procedimentos matemáticos são bastante utilizados: o método dos parâmetros fundamentais, cujos algoritmos consideram as complexas equações fundamentais para as intensidades de fluorescência de cada elemento; e o método de influência dos coeficientes, no qual simples algoritmos envolvendo a matriz são utilizados (TERTIAN E CLAISSE, 1982).

Os métodos comparativos são mais aplicados em análises parciais, ou seja, na determinação de alguns elementos da amostra. Nestes métodos os efeitos de matriz são compensados, ou seja, a matriz é indiretamente considerada. Os métodos comparativos são divididos em três grupos: os métodos de compensação, os métodos de atenuação e os métodos de

correção por absorção. A tabela 2.1 resume as características de cada tipo de método comparativo.

Tabela 2.1: Características dos métodos comparativos de análise quantitativa (TERTIAN E CLAISSE, 1982).

Métodos de compensação	
1) Padrão externo	As composições da matriz e do padrão externo são consideradas iguais, permitindo o uso de curvas de calibração.
2) Padrão interno	Um padrão interno com propriedades fluorescentes é adicionado à amostra. A taxa entre a intensidade fluorescente do elemento da amostra e o padrão interno é independente da matriz e proporcional à concentração do elemento.
3) Adição	Quantidades conhecidas de um elemento fluorescente são adicionadas sequencialmente à amostra. A comparação entre as intensidades de fluorescência antes e após cada adição permite a compensação para os efeitos de matriz.
4) Diluição Dupla	Diluindo a amostra de diferentes formas e comparando as intensidades fluorescentes, os efeitos de matriz também podem ser compensados.
Métodos de atenuação minimizada	
1) Diluição	A amostra é diluída com excesso de solvente, o que minimiza a variação na composição da matriz, fazendo a intensidade fluorescente aproximadamente proporcional à concentração.
2) Filme fino	A espessura da amostra é muito pequena, da ordem de centenas de Å, e neste caso, os efeitos de matriz são desprezíveis.
Métodos de correção por atenuação	
1) Intensidade espalhada	A intensidade de radiação espalhada pela matriz é uma medida das características da amostra, e conseqüentemente a taxa entre a intensidade fluorescente e intensidade espalhada é praticamente independente da matriz e proporcional à concentração do elemento.
2) Transmissão – Emissão	Aplicado à amostras finas, este método permite através da medida da transmissão determinar a absorção da fluorescência e da radiação primária pela amostra.

Dentre estes métodos, foram utilizados neste trabalho para inferir as concentrações dos elementos traços em amostras mamárias, os métodos comparativos de padrão externo e o de intensidade espalhada, que serão melhor discutidos no capítulo 3.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1. Amostras

3.1.1. Aspectos anatômicos e histológicos gerais

A figura 3.1 representa esquematicamente a anatomia da mama. A glândula mamária é constituída basicamente por tecido glandular e tecido adiposo. Suas menores unidades funcionais são os ácinos, glândulas produtoras de leite, que se agrupam formando um conjunto chamado lóbulo e o conjunto de lóbulos forma o lobo mamário. Cada mama contém entre 15 e 20 lóbulos com um respectivo ducto lactífero, que conduz o leite até um ducto maior chamado sino lactífero, onde o leite é armazenado. Um tecido fibroso rico em fibras e colágeno (estroma) sustenta os ductos mamários e os lóbulos, sendo responsável pela reserva nutricional da célula (KIERSZENBAUM, 2004).

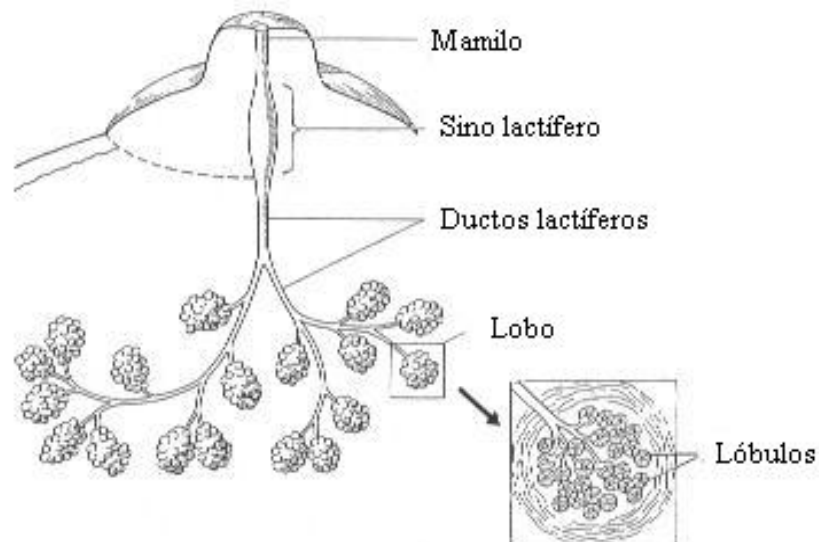


Figura 3.1: Representação da estrutura da glândula mamária

As neoplasias mamárias benignas estão geralmente associadas a mudanças fibrocísticas (conjunto de mudanças decorrentes de alterações hormonais), possuem como característica um crescimento lento, sem a ocorrência de invasão tecidual ou metástases e geralmente localizam-se no estroma e nos ductos mamários (STEVENS E LOWE, 2002).

As neoplasias malignas (tumores) estão geralmente associadas a células geneticamente alteradas, de volume maior e que podem invadir os tecidos adjacentes. A maioria dos tumores consiste de adenocarcinomas invasivos, originários dos ductos terminais ou unidades lobulares, dando origem a carcinomas ductais invasivos ou carcinomas lobulares invasivos. Existem também os carcinomas in situ de ductos ou de lóbulos mamários (intraductais ou intralobulares), que constituem fator de risco para posterior desenvolvimento de carcinoma mamário invasivo. Além dos carcinomas ductais e lobulares, existem outros tipos de tumores mamários, como o carcinoma tubular, o carcinoma mucinoso, etc (STEVENS E LOWE, 2002).

3.1.2. Coleta das amostras e classificação histológica

As amostras de tecido mamário foram fornecidas pelo Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (SERPAT/HCFMRP/USP). O material coletado era residual de tecidos retirados em procedimentos cirúrgicos de mastoplastia (cirurgia plástica para redução da mama) e mastectomia (cirurgia para retirada total ou de parte da mama invadida por neoplasias). Foi coletado um total de 101 amostras, todas provenientes de pacientes do sexo feminino. Após a coleta os tecidos foram preservados em formol tamponado 10%, em temperatura ambiente. O gráfico da figura 3.2 indica a quantidade de amostras de cada tipo de tecido.

A classificação histológica foi realizada por profissionais do SERPAT através da análise microscópica das lâminas dos tecidos. O critério de Bloom e Richardson foi utilizado para a determinação do grau de diferenciação nos casos de carcinomas ductais (BLOMM E RICHARDSON, 1957). Este critério é baseado em aspectos encontrados no tecido, como a formação tubular, o tamanho e a forma das células e seus núcleos.

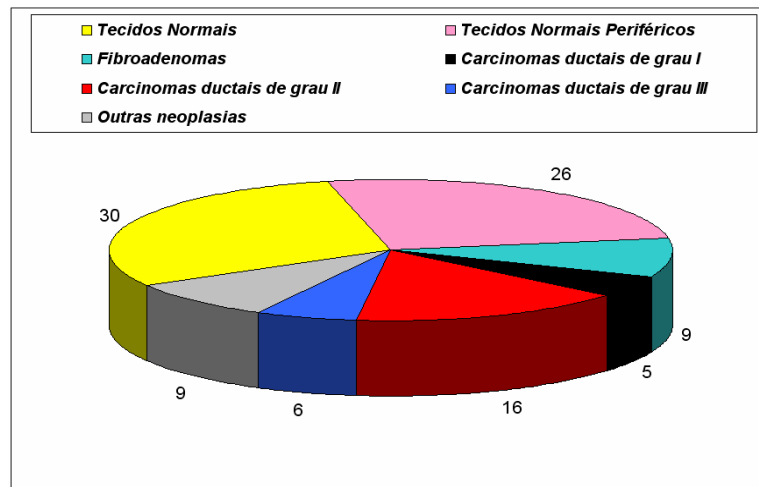


Figura 3.2: Número total de amostras estudadas

O grupo de tecidos normais (56 amostras) compreende amostras de tecido adiposo, tecido normal com adenose (pequena proliferação de ácinos e lóbulos) e tecido glandular. Neste trabalho os tecidos normais provenientes de cirurgias de mastoplastia serão denominados de tecidos normais (TN) e os tecidos normais provenientes das adjacências das neoplasias de tecidos normais periféricos (TNP).

O grupo de tecidos neoplásicos (45 amostras) é formado por fibroadenomas, carcinomas ductais invasivos de grau I, II e III, carcinomas intraductais e carcinomas mucinosos.

3.1.3. Preparação das amostras

Existem vários procedimentos alternativos para preparação da amostra. Alguns autores a congelam a uma temperatura de 70 K e analisam a amostra congelada (BENNINGHOFF ET AL, 1997; CZARNOWSKI ET AL, 1997; NG ET AL, 1997), alguns descongelam no momento da análise colocando a amostra em uma solução fisiológica (GERAKI ET AL, 2002), outros digerem em blocos digestores (VIVES ET AL, 2006) ou retiram água desidratando através de combustão, secagem ou liofilização (TOLGYESSY ET AL, 1990; CARVALHO ET AL, 1998), outros conservam apenas em formol até a análise (SIDDIQUI ET AL, 2006). É esperado que qualquer um destes procedimentos possa gerar erro sistemático ou de interpretação do resultado obtido quando extrapolados para as condições reais no tecido. Os métodos de combustão e

secagem levam a uma considerável diminuição do volume da amostra, porém não podem ser utilizados na determinação de elementos que formam compostos voláteis em amostras biológicas como, por exemplo Hg, As, Sb, Cr, Se. A liofilização é considerada o melhor método de desidratação de amostras biológicas para análises a níveis traços, apesar de não preservar sua estrutura natural.

Neste trabalho, as amostras foram submetidas à análise em seu estado natural, sem pré-processamento químico, com o objetivo de preservar a estrutura dos tecidos mamários e evitar algumas desvantagens dos métodos de secagem, como a grande quantidade de amostra necessária, o aumento da possibilidade de contaminação com outros elementos, e o elevado tempo de preparação.

Para as medidas com feixe polienergético os tecidos foram cortados em fatias de cerca de 1,0 cm x 1,0 cm com bisturis cirúrgicos em local apropriado e tomando todo tipo de cuidado para evitar a contaminação. As amostras cortadas foram colocadas em um porta amostras cilíndrico de acrílico e apoiadas em uma fina camada de plástico Mylar[®] de 0,1mm de espessura. Um total de 57 amostras foi analisado com feixe polienergético: 20 tecidos normais (TN), 10 tecidos normais periféricos (TNP) e 27 tecidos neoplásicos. Dentre os tecidos neoplásicos, 8 fibroadenomas (FA), 5 carcinomas ductais de grau I (CD-I), 6 de grau II (CD-II) e 7 de grau III (CD-III).

Para as medidas com feixe monoenergético os tecidos foram cortados com bisturis cirúrgicos em fatias de cerca de 1,0 cm x 0,5 cm, e colocadas em um porta amostras retangular. Após a acomodação, os porta amostras foram envolvidos por fita Kapton[®] e Parafilm M[®]. Um total de 101 amostras foi analisado com feixe polienergético: 30 tecidos normais (TN), 26 tecidos normais periféricos (TNP) e 45 tecidos neoplásicos. Dentre os tecidos neoplásicos, 9 fibroadenomas (FA), 5 carcinomas ductais de grau I (CD-I), 16 de grau II (CD-II), 6 de grau III (CD-III) e 9 amostras de outros tipos de neoplasias malignas.

3.2. Arranjo experimental

As medidas de EDXRF com feixe polienergético foram realizadas no Laboratório de Instrumentação Nuclear do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) no Campus da Universidade de São Paulo na cidade de Piracicaba. A figura 3.3 mostra o arranjo experimental utilizado. A fonte de excitação utilizada foi um tubo de raios-X com alvo de Molibdênio ($K_{\alpha}=17,5$ keV e $K_{\beta}=19,6$ keV), potência máxima de 2kW e acoplado a um gerador de alta tensão.

Para a análise de elementos com números atômicos baixos foi utilizado um filtro de Níquel ($K_{\alpha} = 7,5$ keV e $K_{\beta} = 8,3$ keV), tensão de 10 kVp e corrente de 25mA. Para a análise de elementos de maiores números atômicos, foi utilizado um filtro de Zircônio ($K_{\alpha} = 15,7$ keV e $K_{\beta} = 17,7$ keV), tensão de 25kVp e corrente de 10mA. Os diferentes filtros foram escolhidos para que a energia de excitação ficasse próxima da borda de absorção dos elementos de interesse. O tempo de cada medida foi fixado em uma média de 3600s de forma a manter as incertezas estatísticas na determinação dos picos de interesse menores a 4%. O porta amostras e o detector estavam posicionados a 45° e 90° respectivamente com relação ao feixe incidente. Esta condição geométrica minimiza a quantidade de espalhamento que chega ao detector (TERTIAN E CLAISSE, 1982). O sistema de detecção era composto por um detector semiconductor de Si(Li), com resolução de 165eV a 5,89keV, janela de Berílio de $12,7\mu\text{m}$, e 80mm^2 de área ativa, acoplado a um módulo amplificador e uma placa multicanal da marca EG&G Ortec.

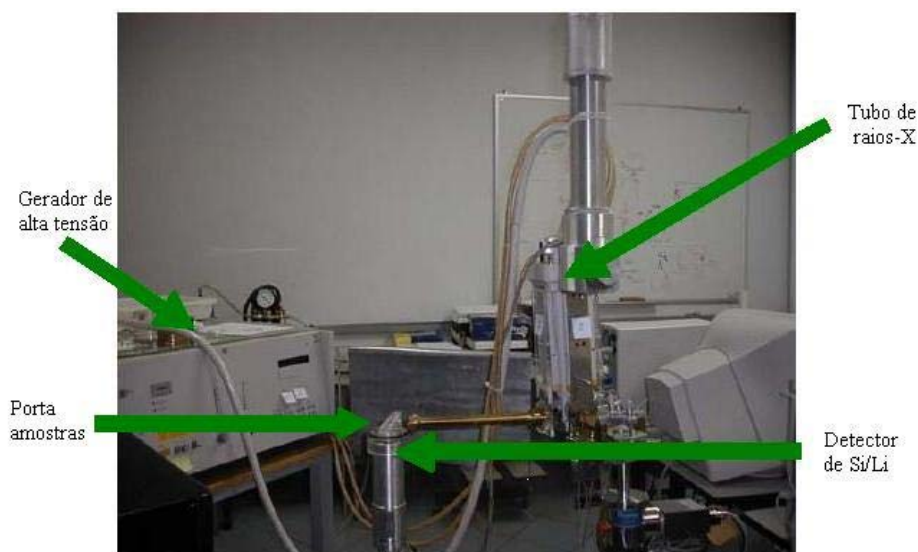


Figura 3.3: Arranjo experimental para as medidas com feixe polienergético.

As medidas com feixe monoenergético foram realizadas na linha de Fluorescência de Raios-X do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas. Um feixe monocromático de 11 keV foi utilizado para excitar os elementos cálcio, ferro, cobre e zinco. O porta amostras e o detector foram, da mesma forma que na análise com feixe polienergético, posicionados a 45° e 90° respectivamente com relação ao feixe incidente. Na figura 3.4 estão representados o porta amostras e o detector da configuração experimental. Para a detecção da

fluorescência emitida foi utilizado um detector hiperpuro de Germânio (HPGe), com resolução de 150eV na energia de 5,9 keV, conectado a um colimador com abertura de 3 mm de diâmetro, para diminuir o volume sensível de fótons espalhados compreendido pelo detector. As amostras e as soluções de calibração foram analisadas em 3 diferentes pontos, de forma a minimizar possíveis efeitos da distribuição espacial não homogênea dos elementos traços. O tempo de aquisição dos espectros de fluorescência foi fixado em 300s de forma que a incerteza estatística permanecesse abaixo de 4%.

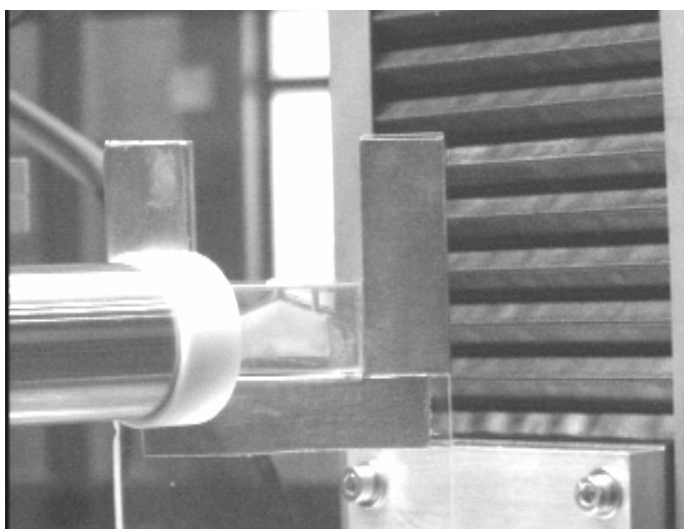


Figura 3.4: Porta amostras e detector na análise com feixe monoenergético.

3.3. Metodologia para quantificação dos elementos traços

3.3.1. Procedimento de calibração: Métodos de correção para os efeitos de matriz

Para a análise com feixe polienergético, a correção dos efeitos de matriz foi realizada utilizando o método de padrão externo. Este método, como foi descrito brevemente no capítulo 2, consiste em determinar a concentração de um elemento em uma espécie desconhecida, por comparação com as concentrações do mesmo elemento em espécies conhecidas, através de curvas de calibração (intensidade fluorescente vs. concentração) (TERTIAN E CLAISSE, 1982). Essas curvas podem ser obtidas a partir de sistemas multielementares, cuja taxa de variação dos elementos permanece constante. De forma geral, este método é aplicado rotineiramente em

análises cujas variações da matriz são pequenas, e por este motivo, a composição elementar da matriz foi um parâmetro importante na escolha do tipo de solução utilizada para as curvas de calibração. Foram preparados dois tipos de soluções multielementares com concentrações conhecidas de elementos traços Ca, Fe, Cu e Zn. A tabela 3.1 mostra a composição elementar dos tecidos mamários encontrados na literatura e a composição das soluções utilizadas.

Tabela 3.1: Valores da composição elementar (frações em massa) de tecidos encontrados na literatura e nas soluções utilizadas, com exceção dos elementos traços.

	H (%)	C (%)	N (%)	O (%)	Outros (%)	ρ (g.ml ⁻¹)
Tecido Adiposo ICRP (1975)	12,0	64,0	0,8	23,3	0,62	0,92
Tecido Adiposo (Hammerstein et al, 1970)	11,2	61,9	1,7	25,1	-	0,93
Tecido Adiposo (Poletti et al, 2002)	12,4	76,5	0,4	10,7	-	0,92
Tecido Glandular (Hammerstein et al 1970)	10,2	18,4	3,2	67,7	-	1,04
Tecido Glandular (Poletti et al, 2002)	9,3	18,4	4,4	67,9	-	1,04
Solução Aquosa	11,1	-	-	88,9	-	1,00
Solução Etanólica	13,0	52,0	-	34,0	1,0	0,84
Solução com Uréia	12,1	29,3	0,8	57,4	0,4	0,95

Poletti et al (2002) mostrou que as composições de tecidos glandulares e neoplásicos são equivalentes, assim como sua atenuação e espalhamento, mostrando que a água seria um bom material equivalente a estes tecidos. Desta forma, a primeira solução foi feita com água mili-Q e sais inorgânicos (CaCl₂, KCl, CuCl₂, FeCl₃ e ZnCl₂) da marca Vetec[®]. A segunda solução foi

feita com os mesmos sais inorgânicos dissolvidos em álcool etílico (etanol) 95%, devido à semelhança elementar do etanol com tecidos normais adiposos (tabela 3.1; MORGAN ET AL, 1998).

Para a análise com feixe monoenergético, foram utilizados dois métodos de correção: o método descrito anteriormente (padrão externo) e o método da intensidade espalhada. O método da intensidade espalhada foi proposto por Andermann e Kemp (ANDERMANN E KEMP, 1958), que observaram que as intensidades fluorescentes e a radiação espalhada primária são afetadas da mesma forma pela absorção da amostra, então sua taxa é praticamente independente da matriz, o que pode ser deduzido a partir da razão entre as equações 2.10 e 2.15. Além disso, essa razão pode ser independente de outras variáveis, como as condições de excitação, variações das características físicas das espécies, como o tamanho das partículas e massa da amostra (TERTIAN E CLAISSE, 1982).

Para estas análises foram utilizadas três soluções multielementares. As duas primeiras soluções foram as mesmas utilizadas para as medidas com feixe polienergético (aquosa e etanólica) e a terceira solução foi preparada com os mesmos sais (CaCl_2 , KCl , CuCl_2 , FeCl_3 e ZnCl_2) diluídos em uma solução aquosa de uréia (12,64 g), álcool isopropílico (336,34 ml) e ácido fosfórico (2,79 ml), em um volume final de 1 litro. Esta solução foi escolhida por possuir propriedades de atenuação similares à de tecidos adiposos (ICRU 44, 1989) e permitirá testar e validar as metodologias empregadas para a determinação das concentrações dos elementos presentes nas amostras de tecidos mamários.

A partir das duas primeiras soluções foram estudados dois tipos de curvas de calibração, sendo o primeiro através da relação direta entre as áreas dos fotopicos e as concentrações de cada elemento das soluções (método de padrão externo), e o segundo através da relação linear entre a razão área do fotopico/área do pico de espalhamento e as concentrações dos elementos (método de intensidade espalhada).

Para todas as análises, foram feitas diluições das soluções padrões de modo a obter soluções com menores concentrações de elementos traços. As concentrações foram escolhidas de acordo com a faixa esperada de concentração dos elementos traços em tecidos mamários normais e neoplásicos (RIZK E SKY-PECK, 1984; GERAKI ET AL, 2002; GERAKI ET AL, 2004.a; GERAKI ET AL, 2004.b; POLETTI ET AL, 2004). A concentração Ca variava entre 35 e 400 ppm, Fe entre 2 e 20 ppm, Cu entre 0,1 e 1 ppm e Zn entre 0,9 e 10 ppm nas análises com feixe

polienergético. Para feixe monoenergético a concentração de Ca variava entre 1,8 e 700 ppm, Cu de 0,1 a 30 ppm, Fe entre 0,2 e 80 ppm, e Zn entre 0,1 e 50 ppm.

3.3.2. Análise das intensidades dos espectros obtidos

Para a determinação das áreas dos fotopicos das linhas características de interesse nos espectros foi utilizado o software AXIL (Analysis of X-ray spectra by Iterative Least-squares fitting) contido no pacote de análise quantitativa QXAS (Quantitative X-ray Analysis System), desenvolvido e distribuído livremente pela IAEA (Agência Internacional de Energia Atômica) (IAEA, 2006). A análise feita pelo AXIL é realizada através do ajuste de funções matemáticas aos espectros de fluorescência obtidos, considerando funções gaussianas para os picos fluorescentes e funções polinomiais para o background. O método utilizado é baseado na minimização do Qui-quadrado, com otimização feita pelo algoritmo de Marquardt, no qual as iterações são interrompidas se a diferença percentual entre dois Qui-quadrados consecutivos for menor que um determinado valor (neste caso menor que 0,1%), ou um número máximo de iterações for alcançado (MARQUARDT, 1963). Neste trabalho foram considerados com qualidade os ajustes de Qui-quadrado menor ou igual a 2 e resíduos menores que ± 5 . Para facilitar a análise foi criado no próprio programa, um modelo de análise que incluía condições específicas de calibração, região e elementos químicos de interesse, além dos parâmetros de background.

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

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

3.4. Análise estatística

3.4.1. Testes estatísticos

O primeiro passo da análise estatística é a exploração dos dados de forma a definir se os testes aplicados serão paramétricos ou não paramétricos, uma vez que a aplicação de testes paramétricos exige que os valores da variável estudada tenham distribuição normal (CONOVER, 1980). Desta forma, a primeira análise foi aplicar o teste Kolmogorov-Smirnov de aderência à curva normal. Neste teste o nível baixo de significância (menor que 0,05) indica que a distribuição dos dados difere significativamente da distribuição normal. Se as distribuições das variáveis não cumprem a hipótese de normalidade, testes não paramétricos devem ser aplicados.

Neste trabalho, utilizamos para verificar as significâncias das diferenças entre as distribuições dos elementos traços em tecidos normais, normais periféricos e neoplásicos, o teste de Wilcoxon (no caso de amostras pareadas) e o teste de Mann-Whitney (no caso das amostras não pareadas). Para estes testes, que comparam as tendências centrais de duas amostras, foi escolhido o nível de significância de $\alpha = 0,05$, de forma que valores de $p < 0,05$ indicavam que os dois grupos possuíam diferenças estatisticamente significativas com relação ao parâmetro analisado (CONOVER, 1980).

3.4.2. Correlação

Para verificar a existência de correlação entre as concentrações de elementos traços, o teste não paramétrico de Spearman foi realizado entre pares de elementos, em tecidos normais periféricos, normais e neoplásicos. Este teste analisa quanto os dados se aproximam de uma reta, de forma que os valores variam de -1 a 1 , indicando associações lineares inversas e diretas, respectivamente, e o valor zero indica ausência de correlação (CONOVER, 1980).

Capítulo 4

Resultados e discussão

4.1. Curvas de calibração

4.1.1. Método de correção para feixe polienergético

A figura 4.1 apresenta a média dos espectros obtidos com feixe polienergético com potencial de excitação de 10kVp para os tecidos mamários, água pura e etanol puro, sendo que nesta energia, foi possível identificar nos tecidos apenas o elemento cálcio. Pode-se observar através dos picos de espalhamento as semelhanças das propriedades de atenuação (absorção e espalhamento) entre tecidos neoplásicos com a água e entre etanol com os tecidos normais. Este fato permite qualitativamente, afirmar que as soluções escolhidas satisfazem as condições impostas pelo método de padrão externo, como descrito na seção 3.3.1.

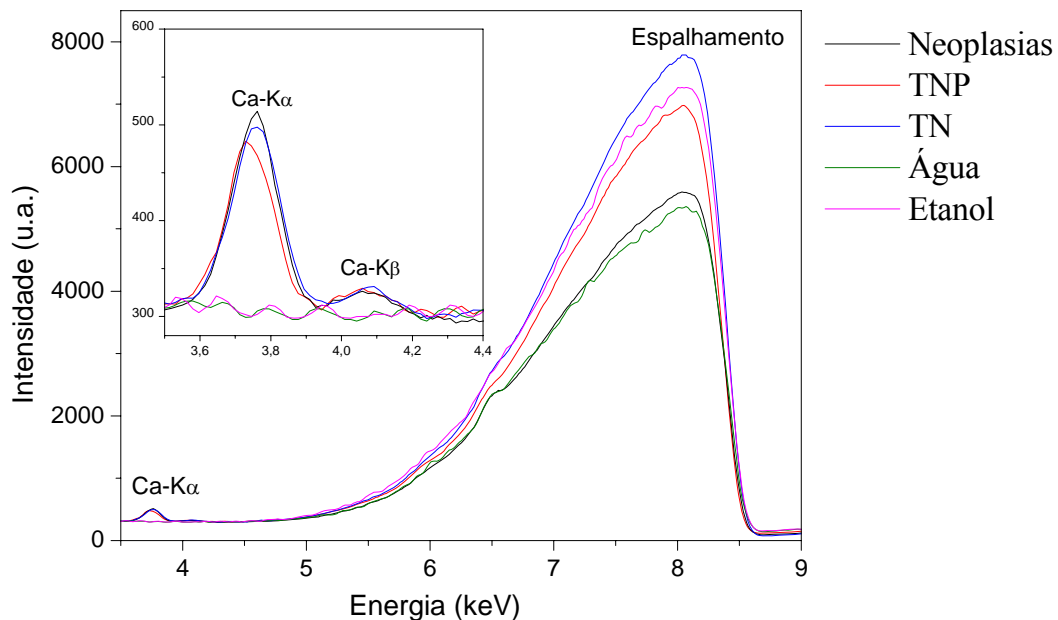


Figura 4.1: Espectros de tecidos mamários e soluções padrão obtidos com feixe polienergético com potencial de excitação de 10 kVp.

Os mesmos comportamentos foram observados nas medidas realizadas com potencial de excitação igual a 25kVp, que permitiram identificar a presença dos elementos ferro, cobre e zinco.

A figura 4.2 apresenta as curvas de calibração típicas para as medidas com feixe polienergético com potenciais de excitação de 10kVp e 25kVp, obtidas através da relação direta entre as áreas dos fotopicos dos elementos cálcio e zinco e suas concentrações. Em ambos os casos a resposta fluorescente dos elementos é fortemente influenciada pelo meio.

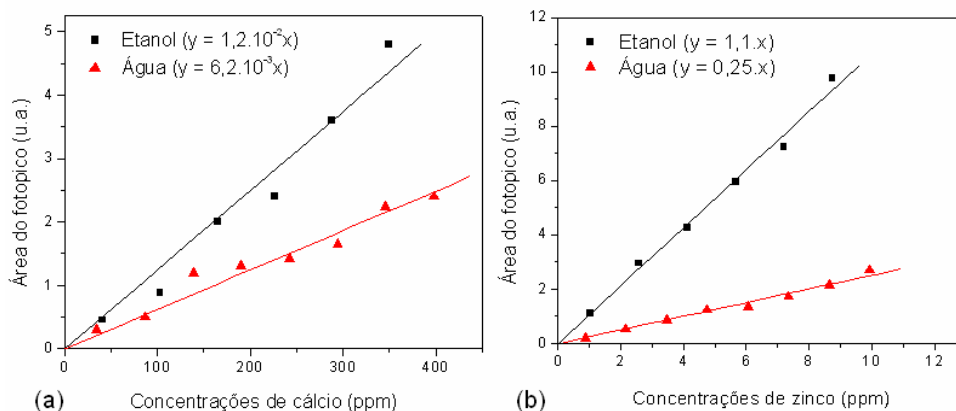


Figura 4.2: Curvas de calibração para os elementos (a) cálcio (10kVp) e (b) zinco (25kVp).

Foram determinados, para ambas configurações experimentais, os limites de detecção com base na relação entre os picos fluorescentes e o background para cada elemento, de acordo com a equação $LD_i = 3 \cdot C_i \sqrt{N_{BG}} / N_i$, na qual C_i representa a concentração do elemento i , N_{BG} o número de contagens por segundo do background sob o pico do elemento i e N_i número de contagens por segundo do pico fluorescente do elemento i (AINGGER E WOBRAUSCHEK, 1985). Desta forma, os limites obtidos a partir dos espectros das soluções de calibração medidos com um tempo de 1500s, determinaram as menores concentrações elementares que o procedimento conseguiria diferenciar confiavelmente do ruído de fundo. Os limites de detecção obtidos com feixe polienergético para os elementos cálcio, ferro, cobre e zinco, foram respectivamente de 38,0 ppm, 6,3 ppm, 0,2 ppm, 0,5 ppm.

A acurácia deste método de quantificação foi avaliada através de padrões de referência da marca MicroMatter[®] de CaF₂, Fe, CuS e ZnTe, com concentrações conhecidas de Ca, Fe, Cu e Zn. As concentrações obtidas pelo método apresentaram diferenças percentuais em relação aos valores nominais, de 30%, 38%, 34% e 29% para os elementos cálcio, ferro, cobre e zinco, respectivamente. Estas discrepâncias podem ser explicadas pelo fato dos padrões certificados

estarem em estado físico diferente (em formato de filme fino) das soluções, tendo, portanto, diferentes efeitos de matriz.

4.1.2. Método de correção para feixe monoenergético

A figura 4.3 apresenta os espectros dos tecidos mamários e de soluções de calibração, obtidos com feixe monoenergético de 11keV. Nesta energia foi possível determinar simultaneamente os elementos cálcio, ferro, cobre e zinco. Nota-se novamente a similaridade dos picos de espalhamento coerente e incoerente entre a água e tecidos tumorais, assim como entre as soluções de etanol com tecidos normais e tecidos normais periféricos, resultado que confirma a proposta do método de padrão externo.

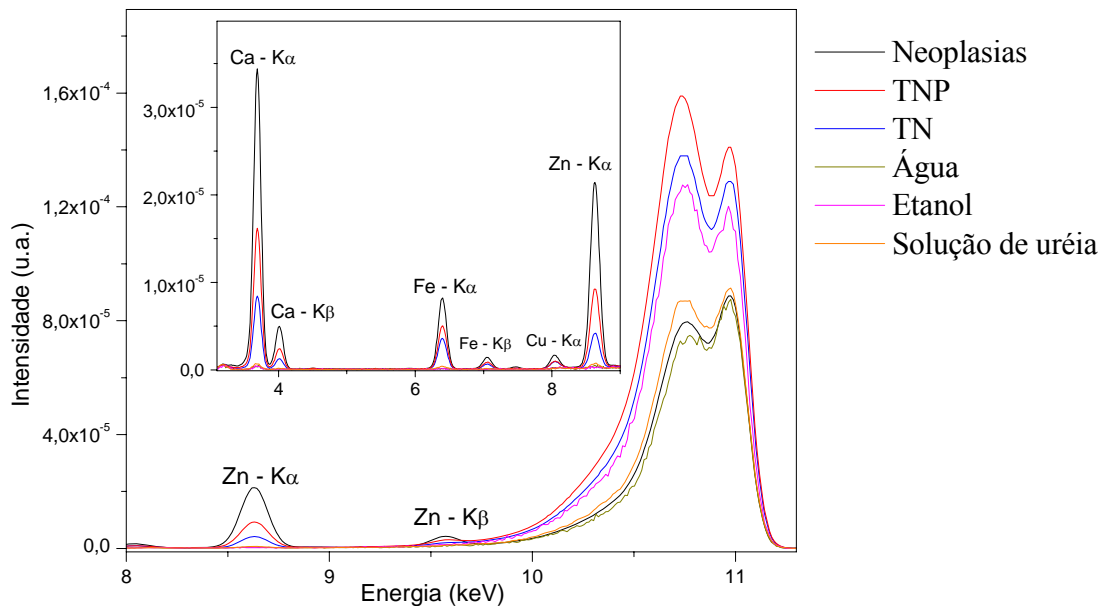


Figura 4.2: Espectros de tecidos mamários e soluções padrão obtidos com feixe monoenergético de energia 11keV.

A figura 4.4 apresenta as curvas de calibração típicas para as medidas com feixe monoenergético, obtidas através da relação direta entre as áreas dos fotopicos e as concentrações de cada elemento (gráficos a e c), e as curvas obtidas através da relação entre a razão área do fotopico e área de espalhamento e as concentrações de cada elemento (gráficos b e d).

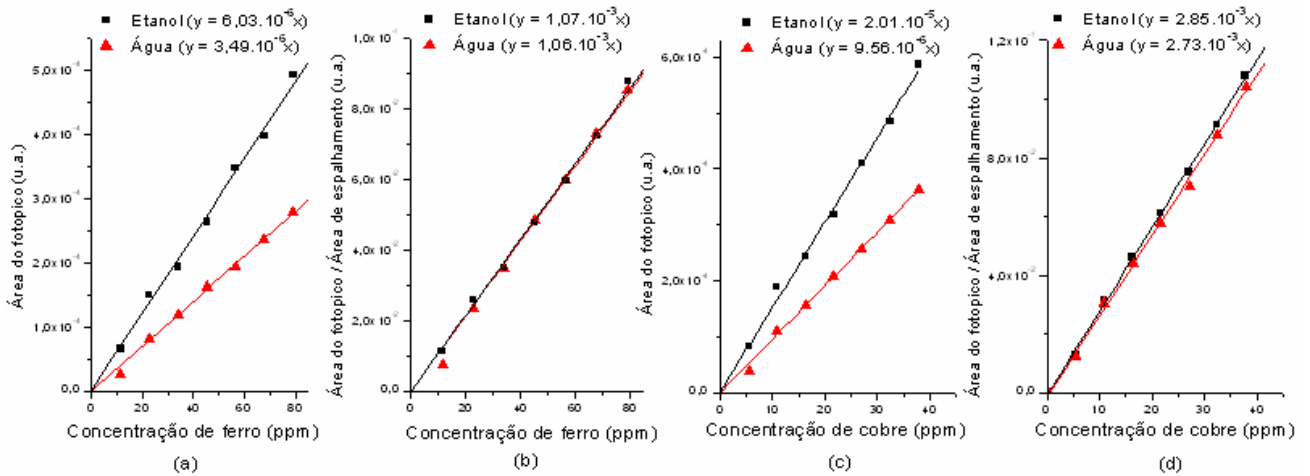


Figura 4.3: Curvas de calibração para os elementos ferro e cobre (a) e (c) não normalizadas pelo espalhamento e (b) e (d) normalizadas pelo espalhamento, obtidas com feixe monoenergético de 11 keV.

Na figura 4.4, os gráficos a e c mostram que as curvas obtidas a partir do método de padrão externo são fortemente influenciadas pelo meio, assim como encontrado para a análise com feixe polienergético. Entretanto, nos gráficos b e d, cujas curvas foram obtidas através do segundo método (radiação espalhada), é observada uma diminuição da influência da matriz. Cabe lembrar, que este método também evita a variação das condições experimentais como espessura da amostra, tamanho das partículas e variações no feixe incidente (NIELSON, 1977).

A diminuição da influência da matriz foi comprovada através de cálculos teóricos para a fluorescência primária e para o espalhamento, utilizando as equações 2.10 e 2.15. A composição elementar das soluções padrão foi utilizada em combinação com o programa XCOM (BERGER e HUBBELL, 1987) para calcular os coeficientes de atenuação nas energias de interesse. Os parâmetros fundamentais, como τ , j , f e ω para cada elemento foram obtidos no programa AXIL (IAEA, 2006). Os gráficos teóricos obtidos são apresentados na figura 4.5. Pode ser observada através de uma comparação entre as figuras 4.4 e 4.5 uma boa concordância entre as medidas experimentais e os resultados teóricos.

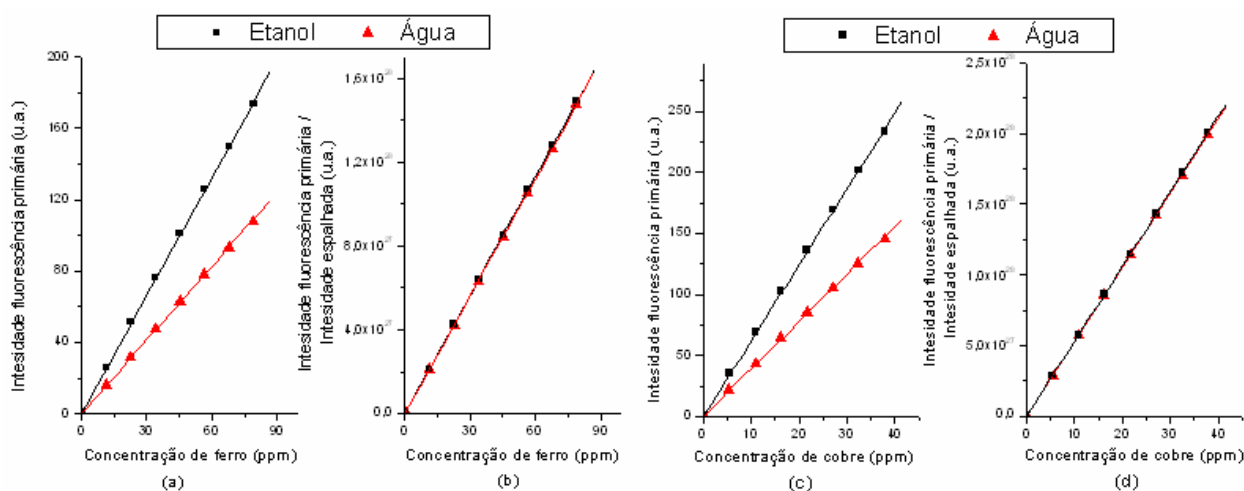


Figura 4.4: Curvas de calibração teóricas para os elementos ferro e cobre (a) e (c) não normalizadas pelo espalhamento e (b) e (d) normalizadas pelo espalhamento

Os limites de detecção para a análise com feixe monoenergético foram determinados da mesma forma que na análise com feixe polienergético e os valores para os elementos cálcio, ferro, cobre e zinco, foram respectivamente de 1,7 ppm, 0,2 ppm, 0,1 ppm, 0,1 ppm.

Foram realizados dois testes de validação do método de correção para feixe monoenergético: de forma experimental e através de padrões certificados. A forma experimental consistia em realizar medidas sobre soluções de uréia e determinar as concentrações dos elementos traços (previamente conhecidas), utilizando o segundo método (método de radiação espalhada). Após a análise foram observadas diferenças de 12% para as concentrações de cálcio, 14% para as concentrações de ferro, 15% para as concentrações de cobre e 10% para as concentrações de zinco.

Como padrão certificado foi utilizado o fígado bovino, do National Institute of Standards and Technology (NIST). Os valores nominais para os elementos cálcio, ferro, cobre e zinco eram respectivamente (116 ± 4) ppm, (184 ± 15) ppm, (160 ± 8) ppm, (127 ± 16) ppm e as diferenças percentuais encontradas entre as concentrações obtidas e os valores nominais foram de 15%, 17%, 17% e 12% para os elementos Ca, Fe, Cu e Zn, respectivamente.

4.2. Valores de concentrações

Após os procedimentos de validação para o método de padrão externo com feixe polienergético, as concentrações dos elementos traços em tecidos normais foram determinadas através do ajuste linear das curvas das soluções etanólicas para cada elemento e em tecidos neoplásicos através do ajuste das curvas de soluções aquosas. Na análise com feixe monoenergético esta determinação foi feita a partir da comparação direta das áreas dos fotopicos de fluorescência (normalizados pelo pico de espalhamento da amostra) dos espectros de tecidos com a equação de ajuste linear da curva de calibração da água, também corrigida pelo método de radiação espalhada.

Um resumo estatístico dos valores de concentrações dos elementos traços em tecidos mamários pareados e não pareados, encontrados através das análises com feixes polienergéticos e monoenergéticos são apresentados nas tabelas 4.1, 4.2, 4.3 e 4.4.

Observa-se um amplo intervalo de variação para as concentrações de todos os elementos, analisados com feixes polienergéticos e monoenergéticos, fato que pode ser justificado pela variabilidade entre diferentes indivíduos, bem como a distribuição espacial possivelmente não homogênea dos elementos traços na amostra (POLETTI ET AL, 2004), embora os procedimentos experimentais adotados neste trabalho tentassem diminuir este último efeito.

Tabela 4.1: Valores de concentração de cálcio em tecidos mamários

Cálcio	Amostras pareadas				Amostras não pareadas			
	Polienergético		Monoenergético		Polienergético		Monoenergético	
	TNP	Neoplasias	TNP	Neoplasias	TN	Neoplasias	TN	Neoplasias
Mín –Máx (ppm)	90,5 - 1483,4	186,1 –2541,9	97,9 – 1830,0	291,0 – 8230,0	188,6 – 1372,2	143,8 – 2441,9	77,4 – 1824,2	291,0 – 8233,4
Média (ppm)	850,6	1635,6	726,4	2434,9	445,9	824,2	461,9	3086,9
Mediana (ppm)	828,4	1515,9	679,0	1450,0	459,6	841,1	367,7	2400,2
25%-75% (ppm)	101,9 – 1272,2	194,3 – 2244,1	399,5 – 1017,5	817,3 – 3650,0	221,8 – 1296,5	184,7 – 1241,7	196,7 – 568,4	942,4 – 5092,5

Tabela 4.2: Valores de concentração de ferro em tecidos mamários

Ferro	Amostras pareadas				Amostras não pareadas			
	Polienergético		Monoenergético		Polienergético		Monoenergético	
	TNP	Neoplasias	TNP	Neoplasias	TN	Neoplasias	TN	Neoplasias
Mín –Máx (ppm)	7,2 – 12,6	7,6 – 23,38	2,4 – 36,5	9,2 – 57,9	6,0 – 16,2	5,4 – 23,4	0,6 – 21,4	9,2 – 57,9
Média (ppm)	7,3	12,9	9,0	25,3	5,5	10,9	7,9	24,2
Mediana (ppm)	8,7	20,8	7,0	22,4	6,6	20,6	5,4	21,6
25%-75% (ppm)	8,3 – 10,3	7,9 – 16,0	4,8 – 10,4	15,5 – 34,1	7,6 – 10,9	7,6 – 13,9	3,2 – 12,4	14,9 – 31,2

Tabela 4.3: Valores de concentração de cobre em tecidos mamários

Cobre	Amostras pareadas				Amostras não pareadas			
	Polienergético		Monoenergético		Polienergético		Monoenergético	
	TNP	Neoplasias	TNP	Neoplasias	TN	Neoplasias	TN	Neoplasias
Mín –Máx (ppm)	0,2 – 1,7	0,7 – 14,5	0,2 – 1,8	0,4 – 4,9	0,2 – 1,8	0,4 – 15,9	0,3 – 1,8	0,4 – 3,9
Média (ppm)	0,5	0,6	0,6	1,8	0,3	0,6	0,7	1,8
Mediana (ppm)	0,6	1,0	0,5	1,5	0,7	1,2	0,6	1,5
25%-75% (ppm)	0,3 – 1,5	0,9 – 9,2	0,3 – 0,7	1,0 – 2,3	0,5 – 1,5	0,8 – 9,1	0,4 – 0,8	1,0 – 2,3

Tabela 4.4: Valores de concentração de zinco em tecidos mamários

Zinco	Amostras pareadas				Amostras não pareadas			
	Polienergético		Monoenergético		Polienergético		Monoenergético	
	TNP	Neoplasias	TNP	Neoplasias	TN	Neoplasias	TN	Neoplasias
Mín –Máx (ppm)	0,5 – 7,3	2,5 – 24,9	1,0 – 8,6	2,2 – 29,9	0,5 – 8,1	1,8 – 28,9	1,2 – 6,9	2,2 – 31,9
Média (ppm)	2,9	12,8	3,8	12,9	3,8	18,5	3,1	14,9
Mediana (ppm)	3,8	13,5	3,2	12,2	4,3	20,2	3,5	14,2
25%-75% (ppm)	0,7 – 5,4	4,9 – 19,3	1,8 – 5,3	6,4 – 15,7	0,7 – 5,9	4,5 – 23,9	1,7 – 3,9	8,9 – 19,3

A figura 4.6 apresenta estes mesmos resultados através de gráficos do tipo box-plot para cada elemento medido com feixe monoenergético, com o objetivo de visualizar as diferenças existentes entre as concentrações.

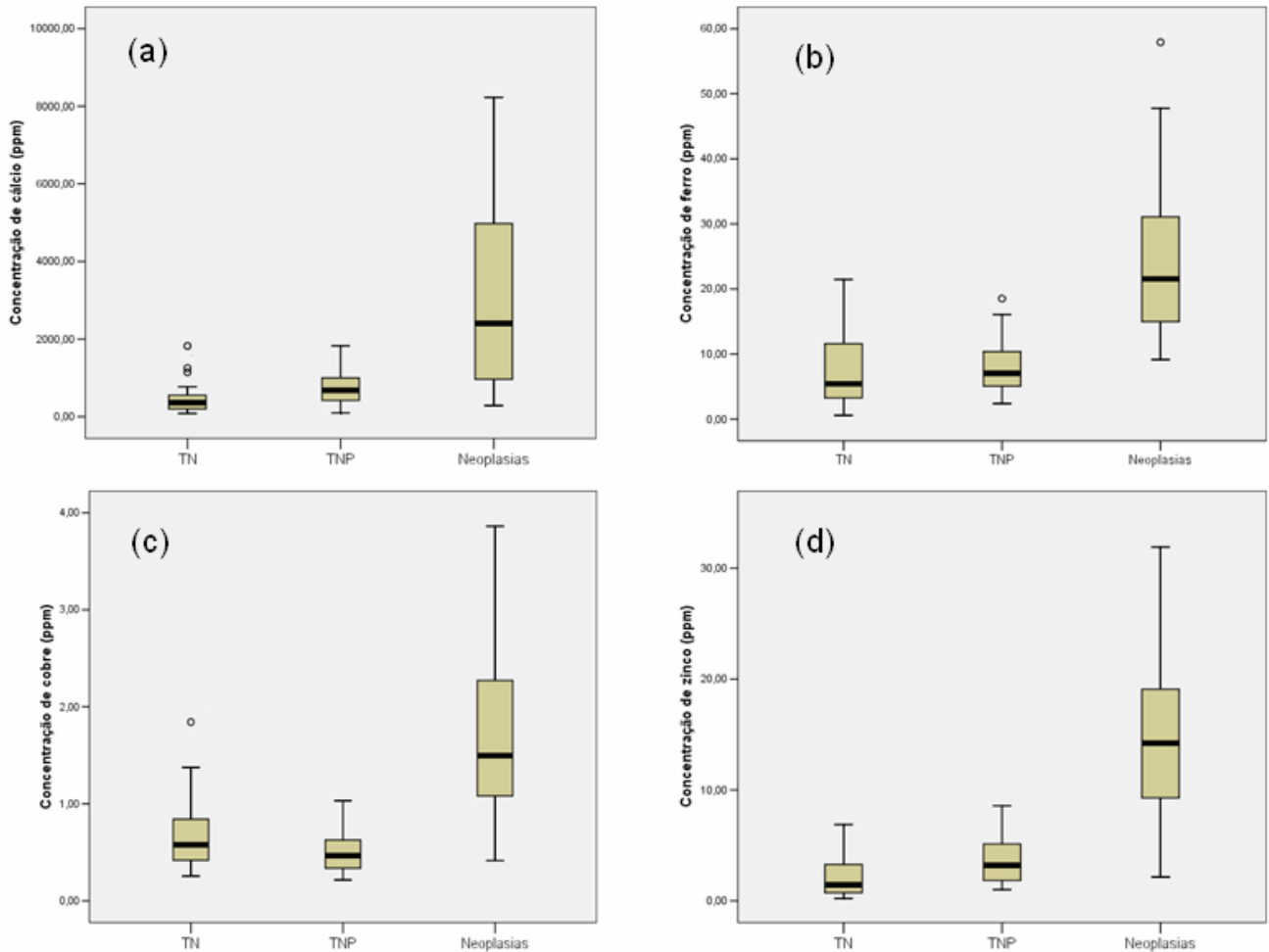


Figura 4.5: Distribuição das concentrações dos elementos traços (a) cálcio, (b) ferro, (c) cobre e (d) zinco em diferentes tecidos, obtidas com feixe monoenergético. Os símbolos ° (outliers) representam concentrações fora dos limites inferiores e superiores definidos entre os 25° e 75° percentis.

Os gráficos da figura 4.6 indicam a diferença entre as concentrações dos elementos traços em tecidos normais e neoplásicos, embora visualmente não seja possível afirmar se estas diferenças são significativas. A presença dos pontos discrepantes (outliers) nos gráficos pode ocorrer devido à ampla variação das concentrações dos elementos traços em diferentes pacientes. Estes pontos são importantes pois acrescentam ao conjunto de dados uma variabilidade que pode ser fisiologicamente real.

4.3. Comparação entre os resultados da utilização de feixes polienergéticos e monoenergéticos com a literatura

A magnitude da elevação das concentrações dos elementos em tecidos é um bom parâmetro de comparação das concentrações obtidas com feixes poli e monoenergéticos, bem como para comparar os resultados obtidos neste trabalho com outras publicações. Quando se descreve um conjunto de dados de distribuição assimétrica, a melhor medida da tendência central de um conjunto de valores é dada pela mediana (CALLEGARI-JACQUES, 2003), desta forma, a magnitude de elevação das concentrações foi obtida através da razão entre as medianas de tecidos neoplásicos e tecidos normais. A tabela 4.5 resume os resultados das magnitudes de elevação dos elementos traços encontrados neste trabalho e por outros autores através da técnica de EDXRF, aplicada em tecidos em estado natural.

Tabela 4.5: Valores da magnitude de elevação das concentrações dos elementos traços em tecidos mamários em estado natural.

Magnitude de elevação das concentrações									
	Técnica	Amostras pareadas				Amostras não pareadas			
		Ca	Fe	Cu	Zn	Ca	Fe	Cu	Zn
Este trabalho - feixe polienergético	EDXRF	1,8	2,4	1,6	3,6	1,8	3,1	1,7	4,7
Este trabalho - feixe monoenergético	SR-EDXRF	2,1	3,2	3,0	3,8	6,5	4,0	2,5	4,1
Geraki et al, 2002	SR-EDXRF	-	2,2	3,0	2,3	-	3,4	4,2	5,2
Geraki et al, 2004.a	SR-EDXRF e EDXRD	-	2,0	3,2	4,2	-	6,1	4,5	4,8
Geraki et al, 2004.b	SR-EDXRF	-	2,1	2,8	2,3	-	4,8	3,3	4,2
Poletti et al, 2004	SR- EDXRF	-	-	-	-	2.3	-	4.0	3.7

Ao avaliar estas razões, a elevação das concentrações dos elementos traços em amostras pareadas é menos pronunciada quando comparada à elevação de amostras não pareadas. Isso pode ser justificado tanto pelo aumento do metabolismo celular na região adjacente à neoplasia quanto pelo próprio pareamento das amostras, uma vez que são retirados neste caso fatores como dieta, idade, tratamento com medicamentos, etc, que podem ser diferentes entre as pacientes. Os resultados deste trabalho apresentam boa concordância com os reportados anteriormente por Geraki (GERAKI ET AL, 2002; GERAKI ET AL, 2004.a GERAKI ET AL, 2004.b) e Poletti (POLETTI ET AL, 2004) para Fe, Cu e Zn. A razão entre as medianas de concentração de cálcio em tecidos normais e tecidos neoplásicos obtidas na análise com feixe polienergético são equivalentes às obtidas por Poletti (POLETTI ET AL, 2004).

A tabela 4.6 apresenta os resultados das razões entre as medianas das concentrações dos elementos traços em tecidos neoplásicos com relação aos normais, obtidos por diferentes autores através de outras técnicas de preparação de amostras e de análise, como a Ativação de Nêutrons (INAA) (NG ET AL, 1997; SCHWARTZ ET AL, 1974; OTHMAN E SPYROU, 1979; MANGAL E KUMAR, 1984), PIXE (NAGA RAJU ET AL, 2006) e Absorção Atômica (AAS) (SIDDIQUI ET AL, 2006). Os resultados publicados por estes foram obtidos após a análise de material desidratado (dry), de forma que é esperado que estes procedimentos possam gerar erros de interpretação do resultado obtido quando extrapolados para as condições reais no tecido. Porém, com a finalidade de comparar os valores reportados com os resultados obtidos neste trabalho, as concentrações foram convertidas através de um fator igual a 2,37 (wet-to-dry ratio), para transformá-las em um valor que representaria o tecido em seu estado natural (wet), como sugerido por Ng et al (1997). Os valores em negrito na tabela 4.6 representam as concentrações em tecido natural (wet) após a conversão.

Tabela 4.6: Valores de magnitude de elevação entre as medianas das concentrações dos elementos traços em tecidos mamários desidratados, e valores convertidos pela “wet-to-dry ratio” (em negrito).

	Técnica	Magnitude de elevação das concentrações			
		Ca	Fe	Cu	Zn
Ng et al, 1997 (dry)	INAA	6,4 (2,7)	3,0 (1,3)	-	4,2 (1,8)
Schwartz et al, 1974 (wet)	INAA	-	2,4	-	5,7
Othman e Spyrou, 1979 (dry)	INAA	15,1 (6,4)	3,6 (1,5)	-	5,9 (2,5)
Mangal e Kumar, 1984 (dry)	INAA	-	5,0 (2,1)	-	9,7 (4,1)
Naga Raju et al, 2006 (dry)	PIXE	7,11 (3,0)	2,8 (1,2)	3,3 (1,4)	5,2 (2,2)
Siddiqui et al, 2006 (wet)	AAS	4,4	2,1	1,6	1,8

A discrepância entre os resultados da tabela 4.6 pode ser justificada pelas diferenças entre os procedimentos experimentais e pela análise das medidas gerarem dúvidas, principalmente no que se refere a como corrigir o parâmetro físico que está sendo medido. Porém, de forma geral, observa-se nas tabelas 4.5 e 4.6, que todos os autores mostram que as neoplasias mamárias apresentam concentrações elevadas para todos os elementos, quando comparadas aos tecidos normais.

4.4. Testes estatísticos

4.4.1. Frequências de distribuição

Na figura 4.7 estão os histogramas que representam as distribuições de frequências das concentrações dos elementos traços obtidas com feixe monoenergético. Estes histogramas mostram que os elementos apresentam comportamentos de distribuição positiva, característica comum em parâmetros biológicos (ALTMAN, 1991).

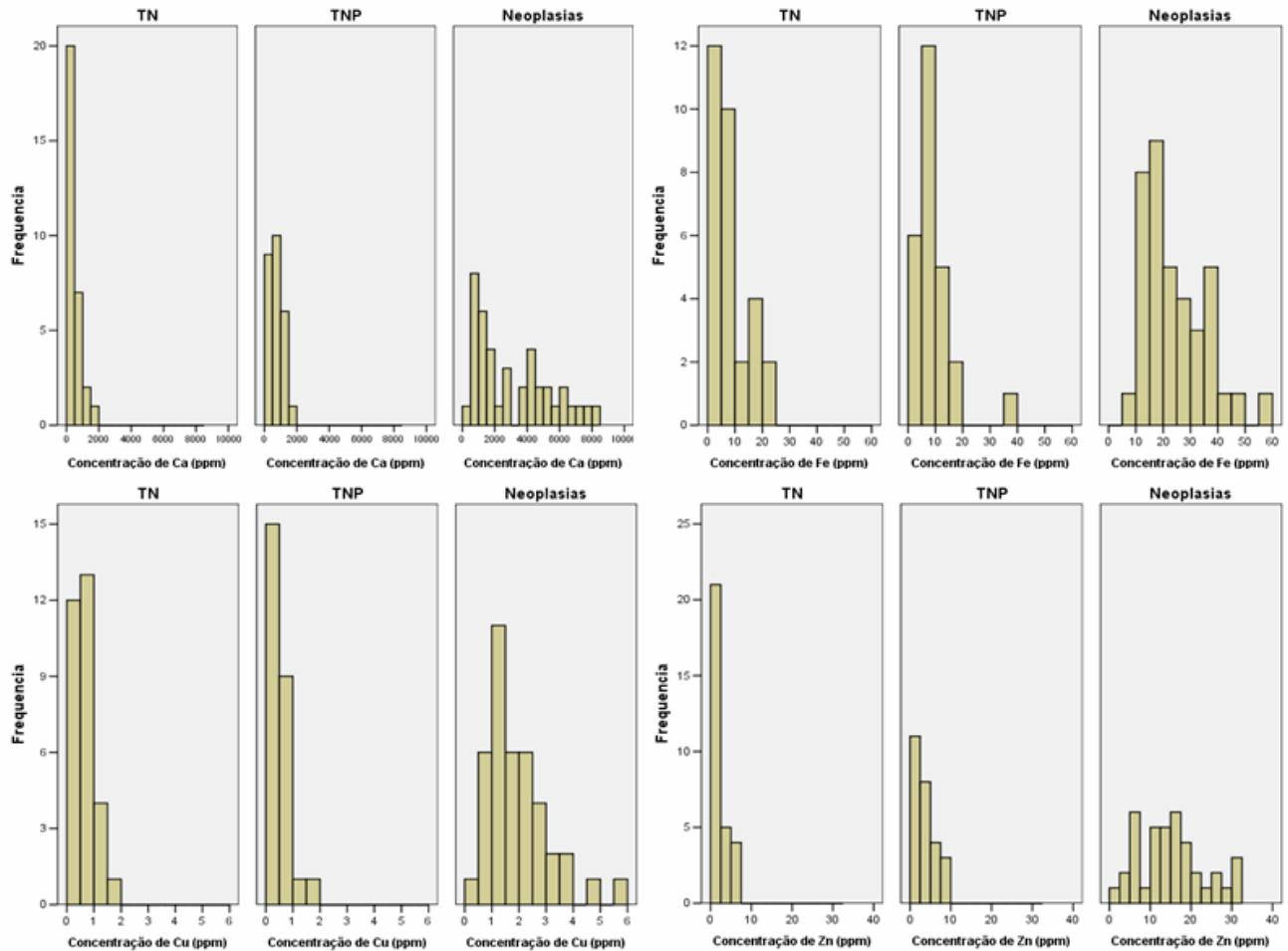


Figura 4.6: Frequências de distribuição dos elementos traços em tecidos normais, tecidos neoplásicos e tecidos normais periféricos – distribuições obtidas com feixe monoenergético.

Para verificar a natureza das distribuições de concentrações, foi realizado o teste Kolmogorov-Smirnov de aderência à curva normal, no qual níveis de significância abaixo de 0,05 indicam que a distribuição dos dados difere significativamente da distribuição normal. A tabela 4.7 mostra os resultados das significâncias do teste de normalidade para as distribuições obtidas com feixes polienergético e monoenergético. Pode-se observar que a maioria das distribuições obtidas não pode ser considerada como normal, e portanto, a comparação entre os valores de cada grupo deve ser realizada com a aplicação de testes de hipóteses não paramétricos (CALLEGARI-JACQUES, 2003).

Tabela 4.7: Significâncias do teste de normalidade para as distribuições de frequências obtidas com feixes polienergéticos e monoenergético. Os valores em negrito representam as distribuições diferentes da distribuição normal

Kolmogorov-Smirnov (significância)						
	Polienergético			Monoenergético		
	TN	TNP	Neoplasias	TN	TNP	Neoplasias
Cálcio	,200	,034	,006	,004	,200	,153
Ferro	,001	,014	,044	,037	,003	,099
Cobre	,200	,200	,000	,015	,008	,171
Zinco	,200	,029	,169	,008	,003	,016

4.4.2. Comparação entre tecidos normais e neoplásicos

Ao avaliar as diferenças das concentrações entre tecidos normais e neoplásicos pode-se fazer dois tipos de comparação: o primeiro avaliando tecidos neoplásicos e seus respectivos tecidos normais periféricos (amostras pareadas), utilizando o teste de Wilcoxon e o segundo tipo avaliando tecidos neoplásicos e tecidos normais obtidos de pacientes independentes (amostras não pareadas), utilizando o teste de Mann-Whitney.

Os resultados encontrados para a análise com feixe polienergético mostraram que em amostras pareadas somente as concentrações dos elementos cobre e zinco diferiam significativamente com $p < 0,005$. Para amostras não pareadas, novamente as concentrações de cobre e zinco apresentaram diferenças significativas, com $p < 0,001$.

Os resultados encontrados para a análise com feixe monoenergético mostraram que para todos os elementos (Ca, Fe, Cu e Zn) as concentrações em tecidos neoplásicos eram significativamente maiores que em tecidos normais ($p < 0,001$), tanto para amostras pareadas quanto em amostras não pareadas.

Estes resultados mostram a existência de diferenças significativas entre as concentrações dos elementos traços em tecidos normais e neoplásicos e que estes elementos podem ser considerados como identificadores da presença de neoplasias. Biologicamente, estes resultados corroboram com a hipótese do aumento da atividade metabólica na região tumoral.

4.4.3. Comparação entre neoplasias benignas e malignas

Embora os resultados da comparação entre tecidos normais e neoplásicos indiquem diferenças significativas entre estes tecidos é interessante avaliar quais elementos permitiriam identificar a natureza benigna ou maligna das neoplasias mamárias.

Ao verificar as diferenças entre as concentrações dos elementos traços em neoplasias benignas e malignas, não foram encontradas diferenças significativas na análise com feixe polienergético, provavelmente devido ao reduzido número de amostras analisadas. Pela análise com feixe monoenergético, os elementos cálcio e zinco apresentaram diferenças significativas, com $p < 0,001$ e $p < 0,002$ respectivamente

Pode-se supor que os elementos cálcio e zinco permitiram diferenciar os tipos de neoplasias, devido à presença de ambos nas metaloproteinases de matriz, que em neoplasias malignas podem estar em maiores concentrações devido à característica invasora deste tipo de tumor. Além disso, estas metaloproteínas possuem atividade total na presença de Ca^{2+} (NGUYEN, 2001). Cabe lembrar ainda que o cálcio é um elemento essencial ao processo de calcificações nos tecidos mamários, como proposto por Ng et al (1997), e o zinco é um dos elementos responsáveis pela ativação da enzima transcriptase reserva, que atua no processo de divisão celular (PRASAD E OBERLEAS, 1976). Este resultado, portanto, mostra esta técnica de análise uma promissora ferramenta de auxílio ao diagnóstico na diferenciação entre neoplasias mamárias benignas e malignas.

4.4.4. Correlações

Com o objetivo de avaliar as regras existentes entre os elementos traços, bem como associações relacionadas aos aspectos biológicos dos tecidos mamários, foram realizados testes de correlação. Os testes de Spearman realizados com as concentrações dos elementos traços obtidas com feixe polienergético mostrou correlação entre os elementos cálcio e ferro ($r = 0,586 / p = 0,002$), em tecidos normais. A análise com feixe monoenergético permitiu identificar a existência de correlação entre os elementos apresentados na tabela 4.8 (valores em negrito).

Tabela 4.8: Correlações entre elementos traços em tecidos mamários normais periféricos, normais e neoplásicos (feixe monoenergético). *correlação significativa com $p < 0,05$ **correlação significativa com $p < 0,001$

	Coeficientes de correlação do teste de Spearman					
	Fe / Cu	Fe / Zn	Cu / Zn	Ca / Cu	Ca / Zn	Ca / Fe
TNP	0,364*	0,486*	0,092	-0,318	0,551**	0,236
TN	0,594**	0,744**	0,397*	0,196	0,622**	0,455*
Neoplasias	0,376*	0,250	0,279	-0,096	0,554**	0,038

A tabela 4.8 indica correlações entre os elementos ferro e cobre em tecidos normais e neoplásicos, que pode ser justificada pela participação destes elementos no processo de formação de novos vasos sanguíneos que nutrem tecidos normais, assim como a região neoplásica (angiogênese). Além disso, este resultado destaca a função do cobre como um importante cofator para o metabolismo do ferro (NASULEWICZA ET AL, 2004).

As correlações mais expressivas entre cálcio e zinco encontradas nos três tipos de tecidos, confirmam as conclusões obtidas na seção 4.4.2, acerca da presença destes elementos nas metaloproteínas de matriz (MMPs), responsáveis pela degradação da matriz extracelular de tecidos neoplásicos, favorecendo o crescimento do tumor e metástases. Não foram encontradas correlações entre as idades das pacientes e as concentrações dos elementos traços.

Os níveis elevados dos elementos traços em tecidos mamários neoplásicos observados neste trabalho podem estar associados tanto à causa como consequência do câncer de mama. Com relação às causas, pode-se citar que os níveis elevados de Fe, Cu e Zn podem promover a formação de radicais livres ou outras espécies reativas de oxigênio (reactive oxygen species - ROS) que afetam o DNA, causando câncer de mama (NAGA RAJU ET AL, 2006). Isto pode ser afirmado uma vez que radicais livres e outras ROS estão presentes nas células em condições fisiológicas normais, e seu estado de redução (Fe^{2+} ou Fe^{3+} / Cu^+ ou Cu^{2+} / Zn^{2+}) na célula é precisamente regulado. Quando a taxa de geração de ROS aumenta, os efeitos tóxicos destes metais oxidantes aparecem (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999) e podem atuar como catalisadores no dano oxidativo de macromoléculas biológicas (STOHS E BAGCHI, 1995; ABALEA ET AL, 1998).

Com relação às conseqüências, pode-se citar além das características anteriormente discutidas acerca do papel de Fe e Cu na angiogênese e de Ca e Zn nas metaloproteinases de matriz, as diferenças histológicas e bioquímicas entre tecidos normais e neoplásicos. Os tumores, caracterizados pela multiplicação desregulada das células, necessita de um substancial aumento de nutrientes, incluindo os elementos traços. Isso provavelmente, realça a concentração dos elementos nos tumores, devido ao aumento da vascularização dos tecidos malignos.

Desta forma, as técnicas de FRX que permitem determinar os níveis dos elementos traços, bem como suas concentrações nos tecidos, pode ser uma importante ferramenta diagnóstica.

Conclusões

Metodologia de medida e comparação entre feixes polienergéticos e monoenergéticos

Na análise com feixe polienergético, o método de padrão externo permitiu através das soluções de água e etanol, específicas para os diferentes tipos de tecidos, determinar as concentrações presentes nos tecidos analisados. Entretanto, a precisão e exatidão deste método são questionáveis pelos resultados obtidos pelos padrões certificados, além das concentrações apresentarem ainda a influência dos efeitos de matriz.

Na análise com feixe monoenergético, o método de correção por radiação espalhada permitiu, através da normalização das áreas dos fotopicos fluorescentes pelos picos de espalhamento, diminuir a influência das condições experimentais no procedimento de quantificação dos elementos traços. O teste de acurácia do método mostrou pequenas diferenças percentuais dos valores obtidos com relação aos valores nominais, nos dois tipos de testes de validação (experimental e através de padrões certificados).

Quando comparados os resultados dos dois métodos, verifica-se que a utilização de feixes monoenergéticos é mais indicada se o elemento de interesse apresentar-se em menores concentrações, devido aos menores limites de detecção desta técnica. Dentre as vantagens da radiação síncrotron sobre o tubo de raios-X pode-se citar ainda que o alto fluxo de fótons incidente na amostra e a radiação altamente polarizada permitiram reduzir o espalhamento. Além disso, considerando que o tempo de análise em feixe monoenergético foi em média de 500s e nas análises com feixe polienergético o tempo médio de cada medida foi de 3600s, experimentos com radiação monoenergética tornam viáveis a análise de um grande número de amostras. A metodologia de preparação das amostras para os dois tipos de feixes, utilizando técnicas não destrutivas, permitiu que os tecidos fossem analisados em seu estado natural.

Medidas: Valores de concentração

Observou-se nos dois tipos de medidas um amplo intervalo de variação para as concentrações de todos os elementos, justificado pela variabilidade entre diferentes indivíduos, além da distribuição espacial possivelmente não homogênea dos elementos traços na amostra. Embora exista a disponibilidade de técnicas de homogeneização, a intenção do projeto era preservar a estrutura natural dos tecidos.

A magnitude da elevação dos níveis de elementos em tecidos calculada pela razão entre as medianas das concentrações dos elementos em tecidos neoplásicos e normais, foi o parâmetro escolhido para comparar as concentrações obtidas, bem como com outras publicações. A elevação das concentrações dos elementos traços em amostras pareadas mostrou-se menos pronunciada quando comparada à elevação de amostras não pareadas, indicando que o processo de acumulação dos elementos nas neoplasias pode alterar também suas concentrações nos tecidos normais adjacentes à lesão. Os resultados deste trabalho apresentam boa concordância com os reportados anteriormente por Geraki (GERAKI ET AL, 2002; GERAKI ET AL, 2004.a GERAKI ET AL, 2004.b) e Poletti (POLETTI ET AL, 2004) para Fe, Cu e Zn. A razão entre as medianas de concentração de cálcio em tecidos normais e tecidos neoplásicos obtidas na análise com feixe polienergético são equivalentes às obtidas por Poletti (POLETTI ET AL, 2004).

Nova ferramenta diagnóstica

Diferenças significativas entre tecidos normais e neoplásicos

Nas medidas com feixe polienergético, a análise estatística dos valores mostrou diferenças significativas das concentrações dos elementos cobre e zinco entre tecidos normais e neoplásicos de amostras pareadas ($p < 0,005$) e não pareadas ($p < 0,001$). Nas medidas com feixe monoenergético, a análise estatística mostrou diferenças significativas entre as concentrações de todos os elementos (Ca, Fe, Cu e Zn) em tecidos normais e neoplásicos de amostras pareadas e não pareadas (ambas com $p < 0,001$).

Diferenças significativas entre neoplasias benignas e malignas

Pela análise com feixe monoenergético, os elementos cálcio e zinco apresentaram diferenças significativas nos valores de concentração entre neoplasias benignas e malignas, sendo portanto, elementos que permitiram diferenciar os diferentes tipos de neoplasias.

Perspectivas futuras

Uma vez que a técnica de FRX com feixe monoenergético permitiu diferenciar as concentrações dos elementos traços em neoplasias benignas e malignas, pretendemos analisar um maior número de amostras com um tubo de raios-X associado a um monocromador ou utilizando alvos secundários, visando a aplicação prática deste método no diagnóstico dos tumores de mama, uma vez que esta técnica pode ser facilmente implementada em pequenos laboratórios, a um custo relativamente baixo. Pretendemos ainda, através de técnicas mais sensíveis de análise, como a TRXRF, avaliar as concentrações de importantes elementos como, entre outros, o manganês e selênio, de menores concentrações nos tecidos.

Para estender o conhecimento das funções fisiológicas dos elementos traços e sua importância no processo carcinogênico, pretendemos ainda investigar aspectos acerca da distribuição espacial destes elementos nos tecidos e suas expressões em diferentes componentes celulares através de técnicas como a microfluorescência de raios-X.

Referências

- ABALEA V, CILLARD J, DUBOS MP, ANGER JP, CILLARD P, MOREL I. Iron-induced oxidative DNA damage and its repair in primary rat hepatocyte culture. **Carcinogenesis**. v.19, n.6, p.1053-1059, 1998.
- ABREU E, KOIFMAN S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v.48, n.1, p.113-131, 2002.
- ALTMAN DG. **Practical Statistics for Medical Research**. Chapman & Hall/CRC, London, 1991.
- ANDERMANN G, KEMP JW. Scattered x-rays as internal standards in x-ray emission spectroscopy. *Analytical Chemistry*. v.30, p.1306-1309, 1958.
- AINGINGER H, WOBRAUSCHEK P. Total reflectance X-ray spectrometry. **Advanced X-Ray Analysis**. v.28 n.1, 1985.
- ATTIX FH. **Introduction to radiological physics and radiation dosimetry**. John Wiley & Sons, Inc, New York, 1986.
- BAKER EA, STEPHENSON TJ, REED MWR, BROWN NJ. Expression of proteinases and inhibitors in human breast cancer progression and survival. **Journal of Clinical Pathology incorporating Molecular Pathology**. v.55, p.300-304, 2002.
- BALCERZAK M. Analytical Methods for the Determination of Platinum in Biological and Environmental Materials. **The Analyst**. v.122, p.67-74, 1997.
- BENNINGHOFF L, CZARNOWSKI D, DENKHAUS E, LEMKE K. Analysis of human tissues by total reflection X-ray fluorescence. Application of chemometrics for diagnostic cancer recognition. **Spectrochimica Acta Part B**. v.52, p.1039-1046, 1997.
- BERGER MJ, HUBBELL JH. **XCOM: Photon Cross Sections Database**. Web Version 1.2. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD 20899.USA, August 1999. Disponível em <http://physics.nist.gov/xcom>. Originalmente publicado como NBSIR 87-3597, XCOM: Photon Cross Sections on a Personal Computer (1987).
- BERTIN EP. **Introduction to X-ray spectrometric analysis**. Plenum Press, New York, 1978.
- BLOMM HJG, RICHARDSON WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. **British journal of câncer**. v.11, n.3, p.359-377, 1957.
- CALLEGARI-JACQUES SM. **Bioestatística: Princípios e Aplicações**. Artmed, Porto Alegre, 2003.
-

CARVALHO ML, BRITO J, BARREIROS MA. Study of trace element concentration in human tissues by EDXRF spectrometry. **X-Ray Spectrometry**. v.27, p.198-204, 1998.

CESAREO R. **Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry**. Nuclear Analytical Techniques in Medicine. Ed. Elsevier, v. 8 1988

CONOVER WJ. **Practical Nonparametric Statistic**. John Wiley & Sons, New York, 1980.

CZARNOWSKI D, DENKHAUS E, LEMKE K. Determination of trace element distribution in cancerous and normal human tissues by total reflection X-ray fluorescence analysis. **Spectrochimica Acta Part B**. v.52, p.1047-1052, 1997.

DUFFY MJ, MAGUIRE TM, HILL A, McDERMOTT E, O'HIGGINS N, Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. **Breast Cancer Research**. v.2, p.252-257, 2000.

ELLIS LM, FIDLER IJ. Angiogenesis and metastasis. **European journal of cancer**. v.32A, n.14, p.2451-2460, 1996.

FREIJE J, BALBIN M, PENDAS AM, SANCHEZ LM, PUENTE XS, LOPEZ-OTIN C. Matrix metalloproteinases and tumor progression. **Advances in experimental medicine and biology**. v.532, p.91-107, 2003.

GERAKI K, FARQUHARSON MJ, BRADLEY DA. Concentrations of Fe, Cu and Zn in breast tissue: a synchrotron XRF study. **Physics in Medicine & Biology**. v.47, n.13, p.2327-2339, 2002.

GERAKI K, FARQUHARSON MJ, BRADLEY DA. X-ray fluorescence and energy dispersive x-ray diffraction for the quantification of elemental concentrations in breast tissue. **Physics in Medicine and Biology**. v.49, p.99-110, 2004.a.

GERAKI K, FARQUHARSON MJ, BRADLEY DA, HUGTENBURG RP. A synchrotron XRF study on trace elements and potassium in breast tissue. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**. v.213, p.564-568, 2004.b.

GERBER M, ASTRE C, SEGALA C, SAINTOT M, SCALI J, SIMONY-LAFONTAINE J, GRENIER J, PUJOL H. Oxidant – antioxidant status alterations in cancer patients: relationship to tumor progression. **The Journal of Nutrition**. v.126, n.4, p.1201-1207, 1996.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Terceira edição, Oxford University Press, New York, 1999.

HOLLAND F. **Cancer Medicine 6**. BC Decker, London, 2003.

HOUSSAMI N, FRENCH J, BRENNAN M, AHERN V, UNG O. Breast cancer-new and emerging technologies for diagnosis and management. **Australian family physician**. v.34, n.8, p.657-661, 2005.

HUBBEL JH, VEIGELE EA, BRIGGS EA, BROWN DT, CROMER DT, HOWERTON RJ. Atomic form factors, incoherent scattering functions and photon scattering cross sections. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**. v.4, n.3, p.471-538, 1975.

IAEA (INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY). **Quantitative X-ray analysis system (QXAS) software package**. 2006. Disponível em: <http://www.iaea.org/>

ICRU (INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIATION UNITS AND MEASUREMENTS). **Report 44 - Tissue substitutes in radiation dosimetry and measurement**. Bethesda, MD, 1989.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, Ministério da Saúde. **Estimativa 2006: Incidência de Câncer no Brasil**. [homepage na Internet]. Rio de Janeiro: INCA, 2005. [citado em 9 set 2005] Disponível em: <http://www.inca.gov.br>.

JOHNS HE, CUNNINGHAM JR. **The Physics of Radiology**. Springfield: Charles C. Thomas, 1983.

JOHNS PC, YAFFE MJ. X-ray characterization of normal and neoplastic breast tissues. **Physics in Medicine and Biology**. v.32, n.6, p.675-695, 1987.

KIERSZENBAUM AL. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. Rio de Janeiro. Elsevier, 2004.

KIM KJ, LI B, WINER J, ARMANINI M, GILLET N, PHILLIPS HS, HEIDI S, FERRARA N. Inhibition of vascular endothelial growth factor induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. **Nature**. v.362, p.841-844, 1993.

KLOCKENKAPER R, VON BOHLEN A. Total Reflection X-Ray Fluorescence--an Efficient Method for Micro - Trace and Surface Layer Analysis. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. v.7, n.2, p.273-279, 1992.

LUDOVINI V, SIDONI A, PISTOLA L, BELLEZZA G, DE ANGELIS V, GORI S, MOSCONI AM, BISAGNI G, CHERUBINI R, BIAN AR, RODINO C, SABBATINI R, MAZZOCCHI B, BUCCIARELLI E, TONATO M, COLOZZA M. Evaluation of the prognostic role of vascular endothelial growth factor and microvessel density in stages I and II breast cancer patients. **Breast Cancer Research and Treatment**. v.81, p.159-168, 2003.

MAJEWSKA U, BRAZIEWICZ J, BANAS D, KUBALA-KUKUS A, GOZDZ S, PAJEK M, ZADROZNA M, JASKOLA M, CZYZEWSKI T. Some aspects of statistical distribution of trace element concentrations in biomedical samples. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**. v.150, p.254-259, 1999.

MAKLUF ASD, DIAS RC, BARRA AA. Avaliação da qualidade de vida em mulheres com câncer da mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v.52, n.1, p.49-58, 2006.

MANGAL PC, KUMAR S. Neutron activation analysis of trace elements in cancerous human breast tissue. **Indian Journal of Physics**. v.58A, p.355-360, 1984.

MARCÒ LMP, CAPOTE T, HERNANDEZ EAC, GREAVES ED. Feasibility study on in situ microwave digestion prior to analysis of biological samples by total reflection X-ray fluorescence. **Spectrochimica Acta Part B**. v.56, p.2187-2193, 2001.

MARQUARDT DW. An algorithm for least-square estimation of nonlinear parameters. **Journal of Society for Industrial and Applied Mathematics**. v.11, p.431, 1963.

MORGAN HM, SHAKESHAFT JT, LILLICRAP SC. Gamma-ray backscatter for body composition measurement. **Applied radiation and isotopes**. v.49, n.5/6, p.555-557, 1998.

NAGA RAJU GJ, SARITA P, KUMAR MR, MURTY GAVR, REDDY BS, LAKSHMINARAYANA S, VIJAYAN V, LAKSHMI PVBR, SATYANARAYANA G, REDD SB. Trace elemental correlation study in malignant and normal breast tissue by PIXE technique. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**. v.247, p, 361-367, 2006.

NASULEWICZA A, MAZURB A, OPOLSKIA A. Role of copper in tumour angiogenesis - clinical implications. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. v.18, p.1-8, 2004.

NG KH, BRADLEY DA, LOOI LM. Evaluated trace element concentrations in malignant breast tissues. **The British Journal of Radiology**. v.70, p.375, 1997.

NIELSON KK. Matrix corrections for Energy Dispersive X-ray Fluorescence Analysis of Environmental Samples with Coherent/Incoherent Scattered X-rays. **Analytical Chemistry**. v.49, n.4, p.641-648, 1977.

NGUYEN M, ARKELL J, JACKSON CJ. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. **The international journal of biochemistry & cell biology**. v.33, p.960-970, 2001.

OTHMAN I, SPYROU NM. Composition of breast tissues using neutron activation and electron microscopy. **Transactions of the American Nuclear Society**. v.7, p.20-26, 1979.

POLETTI ME, GONÇALVES OD, PÉREZ CA, MAGALHÃES SD. A preliminary study of variations of trace amounts within healthy and neoplastic breast tissues with synchrotron radiation x-ray fluorescence. **Radiation Physics and Chemistry**. v.71, p.975-976, 2004.

POLETTI ME, GONÇALVES OD, MAZZARO I. X-ray scattering from human breast tissues and breast-equivalent materials. **Physics in medicine and biology**. v.47, n.1, p.47-63, 2002.

POTTS PJ, ELLIS AT, KREGSAMER P, STRELI C, VANHOOF C, WEST M, WOBRAUSCHEK P. Atomic spectrometry update—X-ray fluorescence spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. v.21, p.1076-1107, 2006.

PRASAD AS, OBERLEAS D. **Trace elements in human health and disease. Vol 1 – zinc and copper**. Academic Press, New York, 1976.

RAO DV, TAKEDA T, KAWAKAMI T, UESUGI K, TSUCHIYA Y, WU J, LWIN TT, ITAI Y, ZENIYA T, YUASA T, AKATSUKA T. Microtomographic images of rat's lumbar vertebra

microstructure using 30 keV synchrotron X-rays: an analysis in terms of 3D visualization. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment**. v.523, p.206-216, 2004.

RIBEIRO-SILVA A, GARCIA SB, CHAHUD F, ZUCCOLOTO S. Prognostic impact of BRCA1 immunohistochemistry expression in sporadic breast carcinomas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v.41, n.3, p. 197-203, 2005.

RIZK SL, SKY-PECK HH. Comparison between concentrations of trace elements in normal and neoplastic human breast tissue. **Cancer Research**. v.44, p.5390-5394, 1984.

ROSEN PP. **Breast pathology**. Ed.Lippincott-Raven. New York, 1996.

ROUSSEAU RM. Corrections for matrix effects in X-ray fluorescence analysis – A tutorial. **Spectrochimica Acta Part B**. v.61, p.759-777, 2006.

SANTOLIVUDO PM, SOUTHWICK HW, OLWIN JH. Trace metal levels in cancer of the breast. **Surgery, gynecology & obstetrics**. v.142, p.65-70, 1976.

SCHWARTZ AE, LEDDICOTTE GW, FINK RW. Trace elements in normal and malignant human breast tissue. **Surgery**. v.76, p.325-329, 1974.

SIDDIQUI MKJ, JYOTI, SINGH S, MEHROTRA PK, SINGH K, SARANGI, R. Comparison of some trace elements concentration in blood, tumor free breast and tumor tissues of women with benign and malignant breast lesions: An Indian study. **Environment International**. v.32, p.630-637, 2006.

STEVENS A, LOWE J. **Patologia**. Segunda edição. Editora Manole, 2002.

STOHS SJ, BAGCHI D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metals ions. **Free Radical Biology & Medicine**. v.18, p.321-336, 1995.

TERTIAN R. AND CLAISSE F. **Principles of quantitative x-ray fluorescence analysis**. Ed. Heyden, London, 1982.

THULER LC. Considerações sobre a prevenção do câncer de mama feminino. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v.49, n.4, p.227-238, 2003.

TOLGYESSY T, HAVRANEK E, DEJMKOVA E. **Radionuclide X-ray Fluorescence analysis with Environmental Applications**. Elsevier, Amsterdam, 1990.

VAN DYCK PM, VAN GRIEKEN RE. Absorption correction via scattered radiation in energy-dispersive x-ray fluorescence analysis for samples of variable composition and thickness. **Analytical Chemistry**. v.52, p.1859-1864, 1980.

VIVES AES, MOREIRA S, BRIENZA SMB, ZUCCHI OLAD, NASCIMENTO-FILHO VF. Analysis of fish samples for environmental monitoring and food safety assessment by

synchrotron radiation total reflection X-ray fluorescence. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**. v270, n.1, p.231-236, 2006.

VON BOHLEN A, ELLER R, KLOCKENKAMPER R, TOLG G. Microanalysis of Solid Samples by Total-Reflection X-ray Fluorescence Spectrometry. **Analytical Chemistry**. v.59, p.2551-2555, 1987.
