

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

ANDRÉ LUIZ COELHO CONCEIÇÃO

**Caracterização estrutural de tecidos mamários normais e
neoplásicos através de espalhamento de raios X**

RIBEIRÃO PRETO, SP – BRASIL

AGOSTO DE 2008

ANDRÉ LUIZ COELHO CONCEIÇÃO

**Caracterização estrutural de tecidos mamários normais
e neoplásicos através de espalhamento de raios X**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Martin Eduardo Poletti

RIBEIRÃO PRETO, SP – BRASIL

AGOSTO DE 2008

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

Conceição, André Luiz Coelho

Caracterização estrutural de tecidos mamários normais e neoplásicos através de espalhamento de raios X / André Luiz Coelho Conceição; Orientação: Prof. Dr. Martin Eduardo Poletti, Ribeirão Preto: FFCLRP / USP, 2008.

Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo.

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

ANDRÉ LUIZ COELHO CONCEIÇÃO

Caracterização estrutural de tecidos mamários normais e neoplásicos através
de espalhamento de raios X

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

Ribeirão Preto, ____/_____/_____.

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

Prof. Dr. Irineu Mazzaro
Universidade Federal do Paraná

Pesquisadora Dra. Daniela Zanchet
Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

“Existe uma coisa que uma longa existência me ensinou: toda a nossa ciência, comparada à realidade, é primitiva e inocente; e, portanto, é o que temos de mais valioso.”

Albert Einstein

*Dedico este trabalho à minha família,
amigos, colegas e educadores*

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

Aos companheiros do grupo Física das Radiações e Dosimetria: João José Guimarães da Costa, Ana Paula Vollet Cunha, Tiago Rangon Giacometti, Diego Merigue da Cunha, Alessandra Tomal, Marina Piacenti Silva, e em especial, Marcelo Antoniassi, pela sabedoria compartilhada.

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

Ao técnico Eldereis de Paula, pela ajuda na montagem e manutenção técnica do laboratório de física das radiações e dosimetria.

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

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

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

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

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

À FAPESP, pela concessão da bolsa ao projeto "*Estudo das organizações moleculares e supramoleculares de tecidos mamários normais e neoplásicos por espalhamento de fótons*", processo 06/54027-3 e pelo apoio financeiro ao projeto Jovem Pesquisador em centros emergentes "*Caracterização Histopatológica de Tecidos Mamários através da Radiação Secundária*", processo 02/00380-3.

Resumo

CONCEIÇÃO, A. L. C. *Caracterização estrutural de tecidos mamários normais e neoplásicos através de espalhamento de raios X*. [Dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2008. 103 p.

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

A proposta deste trabalho foi desenvolver medidas do perfil de espalhamento a médio (WAXS) e baixo ângulo (SAXS) de tecidos mamários previamente classificados, como tecidos normais, alterações benignas ou malignas, usando um tubo de raios X e radiação Síncrotron e, posteriormente, identificar as estruturas moleculares e supramoleculares presentes nos tecidos estudados e verificar estatisticamente se as informações contidas conjuntamente nos perfis de espalhamento a médio e baixo ângulo permitem diferenciar tecidos normais de alterados. Este tipo de estudo é potencialmente importante na área da Saúde por estar associado ao desenvolvimento de novas técnicas radiológicas que permitiriam ampliar a capacidade de diagnóstico do câncer mamário.

Palavras chave: espalhamento de raios X, tecido mamário, mamografia.

Abstract

CONCEIÇÃO, A. L. C. *Structural characterization of human breast tissues normal and neoplastic by x-ray scattering*. [Dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2008. 103 p.

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

The purpose of this study was to develop measurements of scattering profile at wide angle x-ray scattering (WAXS) and small angle x-ray scattering (SAXS) from breast tissue previously classified as normal tissue, benign or malignant disease, using a x-ray tube and synchrotron radiation and, subsequently, identify molecular and supra-molecular structures present in these tissues studied and verify statistically, if the information contained in both scattering profiles at wide and small angle allow differentiate normal tissues of changed. This type of study is potentially important in the health area, since to be associated with the development of new radiological techniques that would allow to expand the ability of breast cancer diagnosis.

Keywords: x-ray scattering, human breast tissue, mammography

Índice

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	- 1 -
CAPÍTULO 2 – HISTÓRICO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	- 6 -
2.1. O espalhamento no radiodiagnóstico: desvantagem.....	- 6 -
2.2. O espalhamento como ferramenta para determinação de estruturas em tecidos biológicos: vantagem	- 7 -
CAPÍTULO 3 – FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	- 15 -
3.1. Aspectos Clínicos.....	- 15 -
3.1.1. Anatomia da mama.....	- 15 -
3.1.2. Histologia da mama	- 17 -
3.1.3. Patologias mamárias.....	- 19 -
3.2. Fontes de produção de raios X	- 22 -
3.2.1. Tubo de raios X	- 23 -
3.2.1. Síncrotron	- 24 -
3.3. Interação dos raios X com a matéria	- 26 -
3.3.1. Vetor de Espalhamento	- 27 -
3.3.2. Espalhamento Elástico.....	- 29 -
3.3.2.1. Espalhamento por elétron livre.....	- 29 -
3.3.2.2. Espalhamento por átomo livre	- 30 -
3.3.2.3. Espalhamento por Molécula Livre.....	- 32 -
3.3.2.4. Espalhamento por Conjunto de Moléculas	- 35 -
CAPÍTULO 4 – MATERIAIS E MÉTODOS	- 39 -
4.1. Amostras	- 39 -
4.2. Experiências de Espalhamento de Raios X	- 40 -
4.2.1. Espalhamento de raios X em médio ângulo (WAXS) usando tubo de raios X.....	- 40 -
4.2.1.1. Distribuição de Amostras	- 40 -
4.2.1.2. Arranjo Experimental	- 41 -
4.2.1.3. Metodologia Adotada	- 43 -
4.2.2. Espalhamento de raios X em médio ângulo (WAXS) usando radiação síncrotron	- 52 -
4.2.2.1. Distribuição de Amostras	- 52 -
4.2.2.2. Arranjo Experimental	- 53 -
4.2.2.3. Metodologia Adotada	- 55 -
4.2.3. Espalhamento de raios X em baixo ângulo (SAXS) usando radiação síncrotron.....	- 60 -
4.2.3.1. Distribuição de Amostras	- 60 -
4.2.3.2. Arranjo Experimental	- 61 -
4.2.3.3. Metodologia Adotada	- 63 -
4.2.4. Combinação de experiências simultâneas de WAXS e SAXS	- 67 -
4.2.4.1. Distribuição das amostras	- 68 -
4.2.4.2. Arranjo Experimental	- 68 -
4.2.4.3. Metodologia	- 70 -
CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES	- 75 -
5.1. Espalhamento de raios X em médio ângulo (WAXS).....	- 75 -

5.1.1. Coeficiente linear de espalhamento elástico: determinação de estruturas moleculares e sua correlação com imagens histológicas	- 75 -
5.1.2. Comparação com a literatura	- 80 -
5.2. Espalhamento de raios X em baixo ângulo (SAXS).....	- 83 -
5.2.1. Perfil de espalhamento: determinação de estruturas supramoleculares e sua correlação com imagens histológicas.....	- 83 -
5.2.2. Comparação com a literatura	- 87 -
5.3. Combinação simultânea de WAXS e SAXS	- 89 -
5.3.1. Perfil de espalhamento: Determinação de estruturas moleculares e supramoleculares.....	- 89 -
<i>CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</i>	<i>- 92 -</i>
6.1. Sobre as medidas de WAXS.....	- 92 -
6.2. Sobre as medidas de SAXS	- 93 -
6.3. Sobre a combinação de WAXS e SAXS	- 95 -
6.4. Perspectivas	- 95 -
<i>Referências</i>	<i>- 97 -</i>

Lista de Figuras

Figura 2.1: Diagrama que ilustra a formação da imagem radiográfica convencional considerando a radiação transmitida primária e espalhada. (a) paciente; (b) intensidade da radiação que atinge o filme: B1 representa a radiação espalhada e B2 a total (transmitida + espalhada); (c) imagem radiográfica.....	- 7 -
Figura 3.1: Estrutura anatômica da mama (a) e (b). As glândulas mamárias, as quais consistem de lóbulos, são embebidas em tecido adiposo e circundadas por tecido conjuntivo.....	- 15 -
Figura 3.2: Tipos de neoplasias	- 20 -
Figura 3.3: Lâmina histológica de uma amostra de carcinoma ductal, indicando calcificações, necroses, além das células cancerosas. A área rosada na figura corresponde à matriz extracelular, formada principalmente por colágeno. Além disso, observa-se a membrana basal ao redor do ducto.	- 22 -
Figura 3.4: Espectro eletromagnético exibindo a região correspondente aos raios X (retângulo vermelho).	- 23 -
Figura 3.5: Esquema de funcionamento de um wiggler, o qual deve ser inserido em linha reta nas instalações de um síncrotron.	- 25 -
Figura 3.6: Geometria do espalhamento; (a) vetor espalhamento como resultante; (b) a diferença de fase é dada pela diferença de caminhos ópticos. A linha mais espessa é o comprimento do caminho máximo.	- 28 -
Figura 3.7: Seção de choque diferencial Thomson em função do ângulo de espalhamento.	- 30 -
Figura 3.8: Fator de forma $F(q, Z)$ para o átomo de Oxigênio dado por Hubbel et al. (1975). -	31 -
Figura 3.9: Seção de Choque Diferencial para o espalhamento Rayleigh para o átomo de Oxigênio para fótons de 17,44 keV.	- 32 -
Figura 3.10: Fator de forma da molécula de H ₂ O, $F_{mol}(q)$, obtido utilizando distribuição de densidade eletrônica e $F_{mol}^{MAI}(q)$ alcançado através do modelo atômico independente (CHAN e DOI, 1983).	- 34 -
Figura 3.11: Seção de choque diferencial elástica para (i) água líquida a 20°C de Morin (1982), (ii) molécula de água (MAI).	- 36 -
Figura 4.1: Distribuição histopatológica dos tecidos analisados no experimento de WAXS usando tubo de raios X.....	- 41 -
Figura 4.2: Arranjo experimental para as medidas de difração de raios X.	- 41 -
Figura 4.3: Visão da área da amostra irradiada.....	- 42 -
Figura 4.4: Medida experimental das contribuições espúrias.	- 45 -
Figura 4.5: Variação da intensidade do feixe incidente experimental.	- 46 -
Figura 4.6: Comportamento do fator de polarização P(q).....	- 48 -
Figura 4.7: Fator de atenuação teórico para uma amostra de água.	- 49 -

Figura 4.8: (a) comparação do coeficiente linear de espalhamento para água líquida obtido experimentalmente com o reportado por Morin (MORIN, 1962); (b) diferença relativa entre as curvas da figura (a).	- 51 -
Figura 4.9: Distribuição histopatológica dos tecidos analisados neste experimento.....	- 52 -
Figura 4.10: Montagem experimental na linha D12A - XRD-1 no LNLS.	- 53 -
Figura 4.11: Medida experimental do espalhamento por contribuições espúrias.	- 56 -
Figura 4.12: Comportamento do fator de atenuação e efeitos geométricos de uma amostra de água líquida para o experimento de WAXS utilizando as geometrias de transmissão e reflexão. -	- 57 -
Figura 4.13: a) coeficiente linear de espalhamento elástico experimental para água comparado com o tabulado por Morin (1982); b) Diferença relativa entre as duas curvas exibidas em a). ..	- 59 -
Figura 4.14: Distribuição das amostras de tecidos mamários utilizados neste experimento.....	- 60 -
Figura 4.15: Esboço da montagem experimental para experimento de SAXS.....	- 61 -
Figura 4.16: Esboço da posição da amostra no disco de chumbo (porta-amostra).	- 62 -
Figura 4.17: Exemplo de uma imagem de SAXS com o sistema de coordenadas.	- 63 -
Figura 4.18: Intensidade espalhada por contribuições espúrias.....	- 65 -
Figura 4.19: Intensidade normalizada medida experimentalmente para uma amostra de SilverBehenate comparado aos valores de Huang et al. (1993).....	- 67 -
Figura 4.20: Distribuição das amostras utilizadas para a combinação WAXS e SAXS.	- 68 -
Figura 4.21: Montagem experimental da linha SAXS-1 no LNLS utilizada para as medidas combinando WAXS e SAXS simultaneamente.	- 69 -
Figura 4.22: Imagens de WAXS. Da esquerda para a direita, cada faixa corresponde à distribuição de intensidade espalhada de: três tipos de tecidos mamários, contribuições espúrias e amostra padrão de alumina.	- 71 -
Figura 4.23: Intensidade espalhada por contribuições espúrias para os experimentos de: a) SAXS e b) WAXS.....	- 72 -
Figura 4.24: Fator de correção para atenuação e efeitos geométricos para uma amostra de tecido adiposo para os experimentos de: a) SAXS e b) WAXS.	- 73 -
Figura 5.1: Comparação do coeficiente linear de espalhamento elástico obtido com a técnica de WAXS, utilizando diferentes configurações experimentais para: a) tecido normal adiposo; b) neoplasia benigna e c) neoplasia maligna. A figura 5.1d compara o μ_s para amostras típicas de tecido mamário normal adiposo, neoplasia benigna e maligna.....	- 76 -
Figura 5.2: Lâmina histológica de uma amostra de tecido normal adiposo.	- 77 -
Figura 5.3: Lâmina histológica de uma amostra de fibroadenoma.	- 79 -
Figura 5.4: Lâmina histológica de uma amostra de carcinoma ductal invasivo.	- 79 -
Figura 5.5: Comparação do perfil de espalhamento de tecido mamário adiposo obtido neste trabalho com outros anteriormente publicados.	- 81 -

Figura 5.7: Comparação do perfil de espalhamento de uma amostra típica de carcinoma ductal invasivo obtido neste trabalho com outros anteriormente publicados.	- 81 -
Figura 5.6: Comparação do perfil de espalhamento de uma amostra típica de fibroadenoma obtido neste trabalho com outros anteriormente publicados.....	- 81 -
Figura 5.8: Perfil de espalhamento de amostras típicas dos três tipos de tecidos mamários estudados neste trabalho utilizando SAXS.....	- 83 -
Figura 5.9: Representação esquemática do arranjo hierárquico do colágeno fibrilar de tecidos mamários, exibindo ainda seus parâmetros dimensionais.	- 85 -
Figura 5.10: Comparação do perfil de espalhamento de uma amostra típica de tecido normal obtido neste trabalho com outros anteriormente publicados.....	- 88 -
Figura 5.11: Comparação do perfil de espalhamento de uma amostra típica de neoplasia maligna obtido neste trabalho com outros anteriormente publicados.....	- 88 -
Figura 5.12: Perfil de espalhamento na região de WAXS de amostras típicas de tecido normal, neoplasia benigna e maligna.	- 90 -
Figura 5.13: Perfil de espalhamento na região de SAXS de amostras típicas de tecido normal, neoplasia benigna e maligna.	- 90 -

Lista de Tabelas

- Tabela 5.1.** Picos dos três tipos de tecidos mamários histologicamente classificados. - 79 -
- Tabela 5.2.** Picos dos três tipos de tecidos mamários histologicamente classificados. - 86 -

Lista de Abreviaturas e Siglas

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

C: fator de normalização

EDXRD: Difração de raios X dispersivo em energia

F(q): fator de forma

HPGe: detector de Germânio Hiperpuro

I_R : Intensidade Relativa

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

LNLS: Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

NAI(Tl): detector de Iodeto de Sódio ativado com Telúrio

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

P(q): fator de correção para polarização

PMMA: Polimetilmetacrilato

PVC: Policloreto de vinila

q: parâmetro relacionado com o momento transferido. Dado por $q = (4\pi \cdot \sin(\theta/2)) / \lambda$.

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

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

μ_s : coeficiente linear de espalhamento elástico

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 11 milhões de pessoas são diagnosticadas com câncer em todo o mundo e cerca de sete milhões destas morrem por ano (12,5% das mortes mundiais) (<http://www.who.int/cancer>). O tipo de câncer de maior incidência entre as mulheres é o câncer de mama, sendo responsável por cerca de 20% de todas as mortes devido ao câncer (ROGERS *et al.*, 1999). Além disso, o câncer de mama é uma das principais causas de morte entre as mulheres nos países em desenvolvimento (PARKIN, 2001). Segundo estimativas de incidência de câncer no Brasil para 2008, o câncer de mama será o segundo tipo mais comum, com cerca de 49.400 casos (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2007). Entretanto, se o câncer de mama é diagnosticado e tratado em sua fase inicial, aproximadamente 90% dos pacientes podem ser curados (SEIDMAN *et al.*, 1982; MICHAELSON *et al.*, 2002). Dentre as muitas técnicas de detecção de neoplasias mamárias utilizadas atualmente, a mamografia é a mais empregada clinicamente para a detecção precoce do câncer de mama. As mamografias são obtidas usando as diferenças entre os coeficientes de atenuação linear dos diversos tipos de tecidos, detectando corpos de diferentes densidades e formas nos tecidos mamários. A radiação transmitida (modulada em intensidade pelo paciente) impressiona um receptor de imagem, gerando um padrão de contraste no filme, sendo esta imagem formada, posteriormente usada para o diagnóstico (JOHNS e CUNNINGHAM, 1983; HAUS e CULLINAN, 1996). Entretanto, esta técnica não é nem 100% sensível, nem 100% específica, uma vez que alguns diagnósticos falso-negativo e falso-positivo acontecem, resultando em casos de câncer não diagnosticados ou biópsias desnecessárias (MUSHLIN *et al.*, 1998; SOUHAMI e TOBIAS, 1998). Este fato ocorre principalmente, devido à pequena diferença nas propriedades de atenuação

dos tecidos mamários e à ocorrência de efeitos de espalhamento (inelástico e elástico) gerando uma degradação do contraste na imagem, fatores estes que acarretam uma diminuição entre os diferentes tons de cinza presentes nas mamografias, diminuindo a detectabilidade do exame (KOCH *et al.*, 1996; BARNES, 1979, 1991; POLETTI, 1997a). Com a finalidade de reduzir os efeitos indesejáveis da radiação espalhada na imagem mamográfica, o espalhamento começou a ser estudado mais intensamente (JOHNS e YAFFE, 1983; MAGALHÃES *et al.*, 1995). Estudos recentes apontaram que a radiação espalhada pode permitir uma imagem seletiva dos diferentes tipos de tecidos irradiados (SPELLER, 1999), visto que os fótons espalhados carregam informação sobre a estrutura presente nos tecidos do paciente, informação que não é considerada na radiografia convencional. Estas descobertas fizeram com que se intensificassem os estudos sobre o espalhamento de fótons de baixa energia, como a utilizada em mamografia, visando obter o perfil de espalhamento de tecidos e materiais equivalentes.

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

átomos, etc.). Como estes parâmetros são, em geral, desconhecidos a priori, o perfil de espalhamento deve ser medido experimentalmente (POLETTI, 2001).

Os perfis de espalhamento de estruturas atômicas, moleculares e supramoleculares podem ser medidos experimentalmente através das técnicas de espalhamento Rayleigh, difração ou também denominado espalhamento de raios X em médio ângulo do inglês *Wide Angle X-ray Scattering* (WAXS) e espalhamento de raios X em baixo ângulo do inglês *Small Angle X-ray Scattering* (SAXS), respectivamente. Entretanto, neste trabalho apenas as duas últimas técnicas serão utilizadas.

Embora existam trabalhos publicados relatando a aplicação das técnicas de WAXS (KIDANE *et al.*, 1999; POLETTI *et al.*, 2002b; GRIFFITHIS *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2008) e SAXS (LEWIS *et al.*, 2000; FERNÁNDEZ *et al.*, 2002, 2004, 2005; ROUND *et al.*, 2005) em tecidos mamários, existem discordâncias entre os resultados apresentados pelos diferentes autores e além disso, não existe na literatura nenhum trabalho que aplique simultaneamente as duas técnicas sobre um mesmo conjunto de amostras de tecidos mamários para identificação de estruturas em escala molecular e supramolecular. Portanto, este trabalho tem como objetivos:

- Obter informações detalhadas das diferentes estruturas em escala molecular e supramolecular existentes nos tecidos mamários normais e neoplásicos, a partir da análise e interpretação dos perfis de espalhamento em médio e baixo ângulo, obtidos através de medidas com feixes de raios X e radiação síncrotron.
- Apresentar resultados de medidas simultâneas de espalhamento de raios X em médio e baixo ângulo, permitindo assim, observar a maioria das estruturas existentes nestes tecidos.

Esta dissertação foi organizada da seguinte forma:

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

No capítulo 3 é feita uma breve descrição dos fundamentos teóricos em que este trabalho está baseado. Principiando por uma descrição concisa da mama: anatomia, histologia e patologia. Posteriormente, dedicou-se a definição dos tipos de fontes de radiação utilizadas neste trabalho, tubo de raios X e radiação síncrotron. Por fim, serão apresentadas as abordagens para descrever a seção de choque diferencial elástica para o espalhamento de fótons em diversos sistemas, partindo do caso mais simples, o espalhamento de fótons por um elétron livre, até o caso que envolve um material amorfo composto por várias moléculas, sendo este último o mais apropriado para descrever o espalhamento por tecidos biológicos.

O capítulo 4 apresenta os materiais utilizados para a realização dos experimentos de ambas as técnicas (WAXS e SAXS), bem como a metodologia aplicada às medidas em cada configuração experimental, onde são descritas as correções necessárias para a obtenção dos perfis de espalhamento, isto é, as correções por contribuições espúrias, atenuação e efeitos geométricos e polarização, bem como, os procedimentos para estimar as incertezas associadas a tais perfis e, por fim a validação da metodologia experimental desenvolvida.

No capítulo 5, os perfis de espalhamento obtidos por cada técnica são apresentados e, as informações extraídas a partir da análise e interpretações destes são correlacionadas às estruturas presentes nos tecidos mamários normais e neoplásicos, Além disso, comparações com trabalhos prévios são mostradas. Por fim, o perfil de

espalhamento resultante das medidas simultâneas em médio e baixo ângulo é apresentado.

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

CAPÍTULO 2 – HISTÓRICO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

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

2.1. O espalhamento no radiodiagnóstico: desvantagem

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

A figura 2.1 mostra como o espalhamento atua na formação da imagem, adicionando à intensidade um fundo quase constante ao longo da distribuição espacial (curva B1 sobre a figura 2.1-b). Este fundo é decorrente da interpretação que o receptor faz, não diferenciando fótons espalhados daqueles transmitidos sem nenhuma interação. Desta forma, fótons espalhados contribuem para a redução do contraste na imagem radiológica e caso não sejam reduzidos, podem diminuir o contraste em até 60% (BARNES, 1991). Em particular, na mamografia esta degradação do contraste torna-se crítica (STRID, 1976; POLETTI, 1997). Por isso, diversos investimentos em pesquisas têm como objetivo explorar e controlar o efeito da radiação espalhada, de forma a permitir que

a imagem contenha informações mais claras e precisas como, o uso de grades, espaço de ar, etc (BARNES, 1979, POLETTI *et al.*, 1997b).

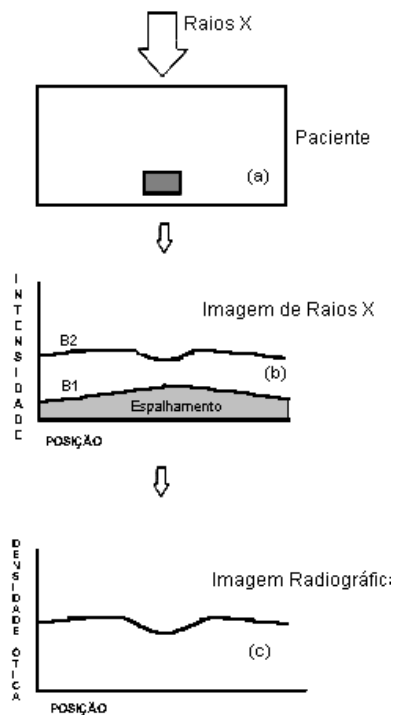


Figura 2.1: Diagrama que ilustra a formação da imagem radiográfica convencional considerando a radiação transmitida primária e espalhada. (a) paciente; (b) intensidade da radiação que atinge o filme: B1 representa a radiação espalhada e B2 a total (transmitida + espalhada); (c) imagem radiográfica.

2.2. O espalhamento como ferramenta para determinação de estruturas em tecidos biológicos: vantagem

Entretanto, o conceito de considerar o espalhamento como uma desvantagem vem mudando ultimamente (SPELLER, 1999), pois estudos recentes mostram que experiências de espalhamento de raios X (espalhamento em médio e baixo ângulo) fornecem informações detalhadas sobre as estruturas que compõe os tecidos, fornecendo meios alternativos para distinguir patologias (KIDANE *et al.*, 1999; LEWIS *et*

al., 2000; POLETTI *et al.*, 2002b; FERNÁNDEZ *et al.*, 2002, 2004; ROUND *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Estes fatos levaram a se pesquisar as propriedades de espalhamento dos diferentes tecidos, tornando-se necessário à obtenção de medidas precisas dos perfis de espalhamento dos diferentes tecidos humanos (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Os perfis de espalhamento correspondentes às estruturas moleculares e supramoleculares existentes em tecidos biológicos podem ser obtidos através da utilização das técnicas de espalhamento de raios X em médio (WAXS) (KLUG e ALEXANDER, 1974) e baixo ângulo (SAXS) (GLATTER e KRATKY, 1982), respectivamente.

Neste tópico será apresentada uma revisão bibliográfica com os principais trabalhos publicados sobre a utilização de ambas as técnicas, WAXS e SAXS, em tecidos biológicos, com ênfase em tecidos mamários.

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

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

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

existência de picos de espalhamento que ocorrem em diferentes posições angulares para cada material.

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

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

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

Kidane *et al.* (1999) mediram o perfil de espalhamento para tecidos mamários normais e neoplásicos através da técnica de EDXRD (difração de raios X dispersiva em

energia) com um tubo de raios X com anodo de tungstênio ($K\alpha=58,86\text{keV}$). A composição histológica de cada tecido foi determinada, e os perfis de espalhamento dos diferentes tipos de tecidos comparados. Os resultados mostraram que há diferenças notáveis entre os perfis de espalhamento de tecidos normais e neoplásicos. As posições e altura dos picos principais de espalhamento foram tabuladas, porém os perfis de espalhamento possuem pobre resolução em momento transferido.

Tartari *et al.* (1999) mediram a seção de choque diferencial molecular de tecido ósseo e compararam os resultados obtidos anteriormente para gordura e PMMA (1997) com resultados de outros autores. Posteriormente, Tartari *et al.* (2000) mostraram que pode-se obter o fator de forma de tecidos biológicos hipotéticos através da combinação linear dos fatores de forma de alguns componentes básicos, como gordura, colágeno, componentes minerais de tecidos ósseos e água, utilizando simulações de Monte Carlo para a geometria experimental utilizada. Em 2002, Tartari *et al.* (2002) tabularam os fatores de forma moleculares para gordura, água, matriz óssea e componente mineral ósseo, e obtiveram, através de simulações de Monte Carlo de um difractômetro comercial operando em modo reflexão, os fatores de forma para tecido adiposo e muscular, comparando-os com resultados obtidos experimentalmente por outros autores.

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

linear para esses tecidos e materiais, além de apresentarem parâmetros para caracterizar seus perfis de espalhamento, tais como posição e altura do pico e largura à meia altura.

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

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

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

Griffiths *et al.* (2007) correlacionaram medidas de difração por dispersão de energia com imagens por difração e transmissão usando a técnica de microCT para 19 amostras e mostraram que a razão entre as intensidades de dois picos característicos em tecidos mamários, sendo em 13,8 e 18,9nm⁻¹, pode ser utilizada para caracterizar cada tipo de tecido.

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

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

A técnica de SAXS é um poderoso método que permite determinar características de sistemas moleculares em seus diferentes graus de organização, por exemplo, proteínas e fibras de colágeno, correspondendo a estruturas maiores que 10Å (ROGERS *et al.*, 1999; LEWIS *et al.*, 2000; FERNÁNDEZ *et al.*, 2002, 2004, 2005; ROUND *et al.*, 2005).

Rogers *et al.* (1999) apresentam resultados preliminares de perfis de espalhamento de tecidos mamários normais e neoplásicos utilizando radiação monocromática e um contador proporcional multi-filamento bidimensional. Eles encontraram uma significativa redução no grau de ordenamento na estrutura das fibras de colágeno em tecidos tumorais em comparação com tecidos normais.

Lewis *et al.* (2000) analisaram os perfis de espalhamento de 99 amostras de tecidos mamários, normais e neoplásicos e encontraram diferenças sistemáticas no espaçamento (d-spacing) entre as fibras de colágeno, bem como nas intensidades

espalhadas por estes tecidos. Eles extraíram valores de dois parâmetros (posição e intensidade do pico de 3ª ordem) dos perfis de espalhamento e verificaram ser possível distinguir entre cada tipo de tecido utilizando estes parâmetros, porém a incerteza associada a cada valor não foi considerada.

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

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

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

Tartari *et al.* (2005) obtiveram a seção de choque diferencial elástica de alguns materiais e tecidos biológicos, como osso e tecido adiposo. Para tais medidas foi utilizado

um feixe de raios X monoenergético de 12,4keV, mas com distâncias da amostra ao detector de 1m e 3m, para WAXS e SAXS respectivamente. Eles apresentam também um procedimento de normalização, bem como incluem nos cálculos o fator de interferência molecular que considera o efeito dos arranjos moleculares na distribuição dos fótons espalhados.

Conceição *et al.* (2008), usando radiação síncrotron monocromática de 8,4keV, combinaram simultaneamente as técnicas de WAXS e SAXS sob um mesmo conjunto de amostras de tecidos mamários normais e neoplásicos para obter os perfis de espalhamento destas amostras. Eles extraíram destes perfis dois parâmetros (razão entre as intensidades dos picos, em 13,9 e 20,1nm⁻¹, e intensidade do pico de 3ª ordem de reflexão das fibras de colágeno) e verificaram que a combinação destes parâmetros pode ser utilizada para identificação do câncer de mama.

Ao se comparar os trabalhos acima entre si, discordâncias são observadas. Dessa forma, este trabalho além de acrescentar novos dados à literatura, tem também como finalidade desenvolver medidas precisas do perfil de espalhamento de tecidos mamários normais e neoplásicos e, através da análise e interpretação deste, determinar as estruturas moleculares e supramoleculares existentes nestes tecidos.

CAPÍTULO 3 – FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1. Aspectos Clínicos

Nesta subseção será apresentada uma breve descrição de uma mama normal englobando suas características anatômicas, histológicas e patológicas.

3.1.1. Anatomia da mama

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

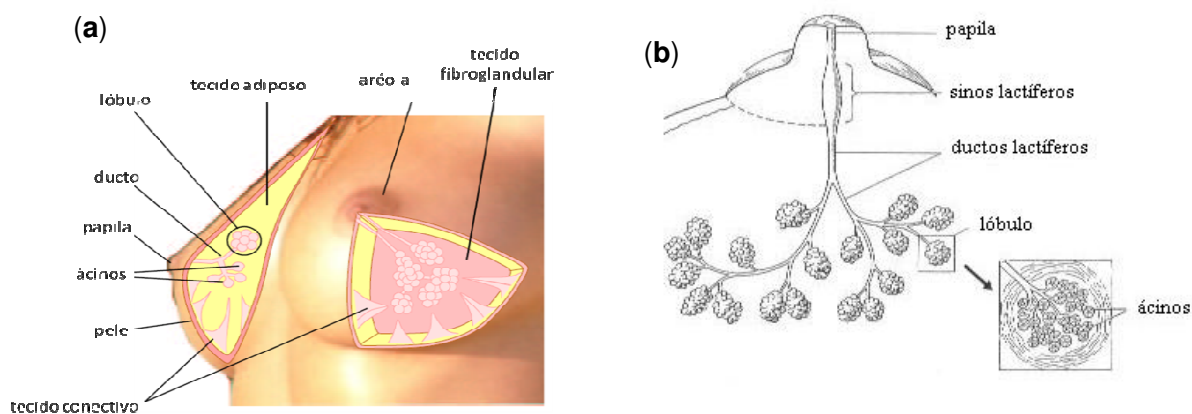


Figura 3.1: Estrutura anatômica da mama (a) e (b). As glândulas mamárias, as quais consistem de lóbulos, são embebidas em tecido adiposo e circundadas por tecido conjuntivo.

i) *Componente estrutural:* responsável pela sustentação e proteção das estruturas da mama, denominado estroma mamário. O estroma mamário por sua vez é dividido em estroma interlobular e intralobular. O estroma interlobular, na mulher jovem, é

composto basicamente de tecido conjuntivo denso (fibroso), contando ainda com algumas células de tecido adiposo (adipócitos). Já o estroma intralobular possui grande quantidade de tecido conjuntivo frouxo e uma pequena população de células de linfócitos, além de ser muito sensível às variações hormonais do ciclo menstrual. A constituição do estroma mamário é variável, com o passar dos anos aumenta a quantidade de tecido adiposo, diminuindo a proporção de tecido conjuntivo.

ii) *Componente funcional:* responsável pelas principais funções da mama, como produzir e secretar o leite, é denominado parênquima mamário. O parênquima mamário é composto basicamente por células epiteliais. As mamas são consideradas anexas à pele, uma vez que as glândulas cutâneas se modificaram e deram origem às glândulas mamárias ou unidades lobulares. Cada glândula mamária é composta de 15 a 20 lóbulos. Os lóbulos mamários são estruturas de contorno circular, formados pelo agrupamento de ácinos e ductos e circundados pelo estroma interlobular. Os ácinos têm a função é a secretar o leite e são compostos por dois tipos de células: uma camada interna de células epiteliais e uma camada externa de células mioepiteliais. A função das células mioepiteliais é contrair-se, promovendo a extrusão do leite secretado. Os ductos mamários, como os ácinos, são formados por uma dupla população de células de revestimento, epiteliais (interno) e mioepiteliais (externo), possuindo grande quantidade de água em sua composição e sua principal função é drenar os lóbulos.

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

3.1.2. Histologia da mama

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

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

a graus excepcionais de tensão. Este tipo de tecido pode ser encontrado na forma irregular, cuja forma se assemelha à do tecido conjuntivo frouxo, porém com maior quantidade de fibras colágenas, bem como na forma regular, caracterizada pela predominância de fibras colágenas firmemente unidas em feixes paralelos.

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

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

Existem vários tipos de tecidos epiteliais que se diferem quanto ao arranjo das camadas celulares e a forma das células da superfície livre do tecido. Dentre os vários, o de maior interesse para esse trabalho é o tecido epitelial glandular. Os epitélios glandulares são constituídos por células especializadas na atividade de secreção e as

moléculas a serem secretadas são armazenadas em pequenas vesículas chamadas grânulos de secreção. As glândulas mamárias podem sintetizar, armazenar e secretar proteínas, lipídios ou complexos de carboidratos e proteínas.

3.1.3. Patologias mamárias

Uma patologia, ou lesão patológica, é considerada como uma anormalidade que surge nos tecidos. O termo neoplasia descreve aquelas patologias que aparecem na forma de tumores ou massas estranhas ao organismo, referindo-se também a fibrose e angiogênese (aumento da vascularização) associados ao desenvolvimento do tumor.

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

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

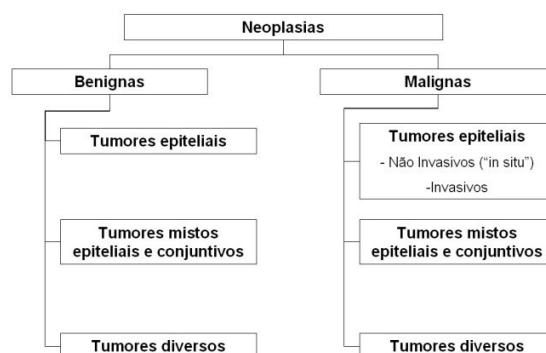


Figura 3.2: Tipos de neoplasias

Dentre as neoplasias benignas mamárias destacam-se a adenose (tipo epitelial), o fibroadenoma e as alterações fibrocísticas (estas últimas de tipo misto).

A adenose é caracterizada pelo aumento do volume dos lóbulos mamários provocado pelo aumento numérico dos ácinos. Isto pode acompanhar-se ou não por fibrose intralobular. Uma vez que o estroma intralobular normal é composto de tecido conjuntivo frouxo, após a fibrose, torna-se semelhante ao estroma interlobular, de tecido fibroso denso (NHSBSP Publication 58, 2005).

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

A alteração fibrocística caracteriza-se por hiperplasia tanto do estroma quanto do epitélio mamários, em proporções variáveis. Pode haver fibrose tanto do estroma interlobular como do intralobular. Ainda outro importante componente da alteração fibrocística são cistos pequenos ou volumosos, derivados de ácinos (NHSBSP Publication 58, 2005).

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

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

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

O carcinoma ductal invasivo é um tumor pouco diferenciado, cujas células formam cordões sólidos que infiltram difusamente o tecido mamário, ele recebe esse nome porque as células cancerosas invadem os tecidos epiteliais dos ductos e vão se espalhando, à partir de reações bioquímicas induzidas por essas células. Este tipo de tumor é caracterizado por extensa proliferação fibroblástica e produção de fibras de colágeno, o que fornecer maior consistência ao tumor. Na periferia, o tumor é mal delimitado e sem cápsula, infiltrando o tecido adiposo e o tecido mamário pré-existente (WINCHESTER, D. J. e WINCHESTER, D. P., 2000). A figura 3.3 exhibe o exemplo da lâmina histológica de uma amostra de carcinoma ductal invasivo.

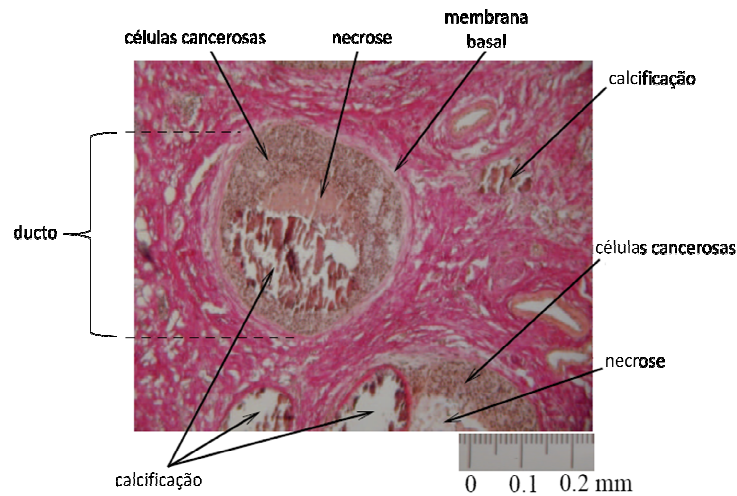


Figura 3.3: Lâmina histológica de uma amostra de carcinoma ductal, indicando calcificações, necroses, além das células cancerosas. A área rosada na figura corresponde à matriz extracelular, formada principalmente por colágeno. Além disso, observa-se a membrana basal ao redor do ducto.

3.2. Fontes de produção de raios X

Wilhelm Conrad Roentgen descobriu um tipo desconhecido de radiação em 1895 que chamou de raios X e, posteriormente, foi também chamado de raios Roentgen (JOHNS e CUNNINGHAM, 1983). Este tipo particular de radiação eletromagnética tem comprimento de onda muito pequeno e a propriedade de atravessar materiais permitindo inspecionar o interior de objetos. Imediatamente após sua descoberta, as aplicações para este tipo de radiação se tornaram evidentes principalmente na medicina, através de radiografias.

Os raios X descrevem uma grande região no espectro eletromagnético, com intervalo de energia de poucos elétron-volts (raios X moles, próximo a radiação ultravioleta) até energias de centenas de keV (raios X duros, próximos aos raios γ), figura 3.4.

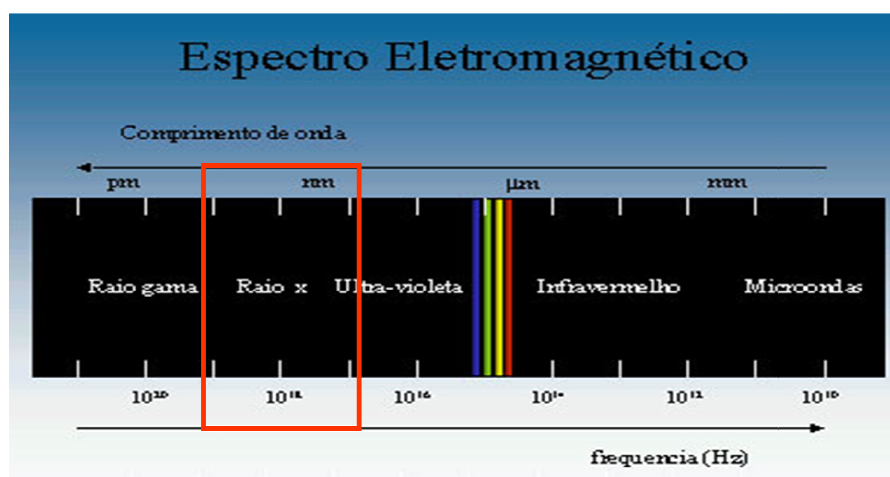


Figura 3.4: Espectro eletromagnético exibindo a região correspondente aos raios X (retângulo vermelho).

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

3.2.1. Tubo de raios X

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

O espectro de um tubo de raios X apresenta uma componente contínua (bremsstrahlung, raios X de frenagem ou radiação branca) e outra discreta (raios X característicos) em energia. A radiação branca é formada pela desaceleração dos elétrons no ânodo através de interações coulombianas inelásticas. Já os raios X

característicos são fótons de energia discreta, resultantes do preenchimento de uma vacância deixada por um elétron de uma camada mais interna (que interagiu com elétrons provenientes do cátodo) por outro elétron de uma camada superior mais energética. As intensidades entre a radiação branca e a característica dependem do tipo de alvo e da tensão aplicada, e, além disso, podem ser modificadas através do uso de filtros (ATTIX, 1986).

3.2.1. Síncrotron

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

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

Os ímãs defletores constituem os vértices do anel de armazenamento, onde os elétrons são curvados por meio de um dipolo uniforme para seguirem na órbita circular, como consequência desta mudança, na direção do movimento dos elétrons, radiação é emitida, principalmente, na direção tangencialmente às suas órbitas.

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

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

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

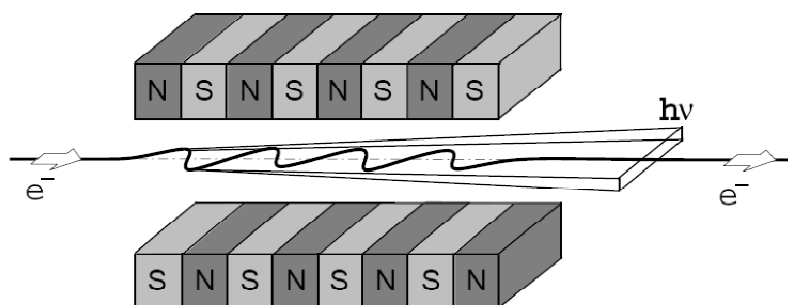


Figura 3.5: Esquema de funcionamento de um wiggler, o qual deve ser inserido em linha reta nas instalações de um síncrotron.

Especificamente o Brasil, conta com uma fonte de luz síncrotron, o Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas. Atualmente, 13 linhas de luz estão em funcionamento permitindo diversos tipos de experiências. O LNLS é uma fonte de radiação síncrotron de terceira geração com a energia do elétron no anel de

armazenamento de 1,37Gev, tendo como fonte um ímã defletor, sendo capaz de produzir um fluxo de $\sim 5 \times 10^{10}$ fótons. s^{-1} em 8keV (<http://www.lnls.br>).

3.3. Interação dos raios X com a matéria

As interações dos raios X com a matéria dependem basicamente da energia dos fótons incidentes e do material alvo (número atômico e densidade). Os principais fenômenos de interação da radiação com a matéria considerando a faixa de energia utilizada em radiodiagnóstico ($E < 100\text{keV}$) são o efeito fotoelétrico e os espalhamentos inelástico e elástico. Em particular, para fótons com energia utilizada em mamografia (17,44 keV) numa amostra de tecido mamário, 80,7% do total de interações ocorrem por efeito fotoelétrico, 10,8% para o espalhamento inelástico e 8,5% para o espalhamento elástico (JOHNS e CUNNINGHAM, 1983).

No processo fotoelétrico, um fóton de energia $h\nu$ interage com um átomo transferindo toda sua energia durante a colisão, ejetando um elétron principalmente de uma camada eletrônica mais interna, camada K, por exemplo. Este elétron ejetado é denominado fotoelétron. A vacância deixada por este elétron ejetado é então preenchida por outro elétron de uma camada mais energética e um fóton (raios X característico, vide seção 3.2.1) é produzido, cuja energia é igual à diferença de energia entre os dois níveis de energia.

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

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

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

3.3.1. Vetor de Espalhamento

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

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

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

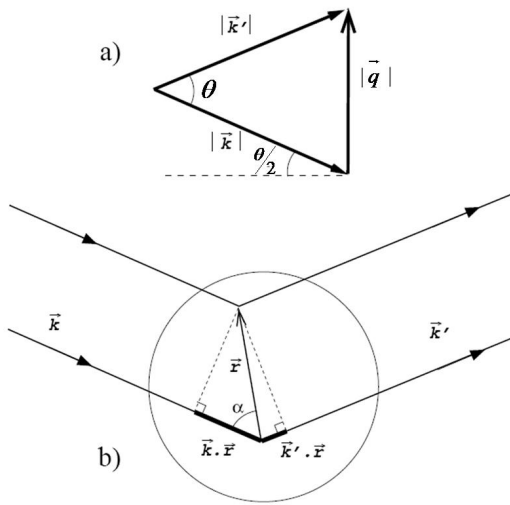


Figura 3.6: Geometria do espalhamento; (a) vetor espalhamento como resultante; (b) a diferença de fase é dada pela diferença de caminhos ópticos. A linha mais espessa é o comprimento do caminho máximo.

A diferença de fase total, figura 6(b) é dada por:

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

O vetor espalhamento \vec{q} pode ser calculado geometricamente a partir da figura 6(a). Usando a lei dos cossenos, temos:

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

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

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

ou

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

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

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

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

3.3.2. Espalhamento Elástico

3.3.2.1. Espalhamento por elétron livre

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

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

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

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

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

em que: θ é o ângulo polar de espalhamento e ϕ é ângulo azimutal de espalhamento (medido da direção de polarização).

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

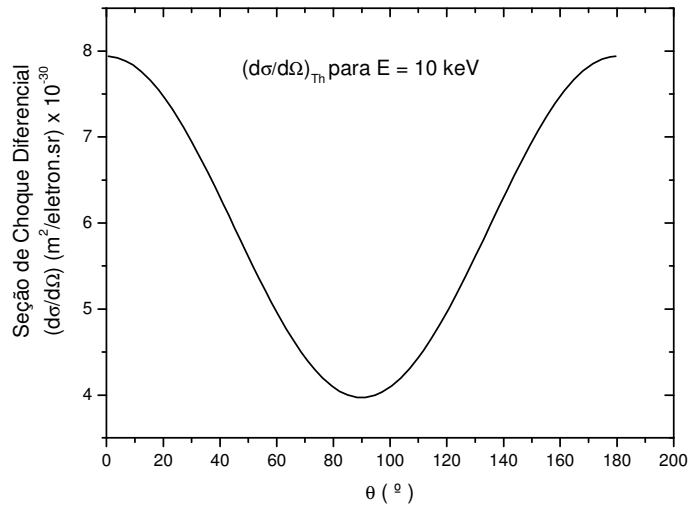


Figura 3.7: Seção de choque diferencial Thomson em função do ângulo de espalhamento.

3.3.2.2. Espalhamento por átomo livre

O espalhamento elástico de fótons por um átomo livre, chamado espalhamento Rayleigh em homenagem ao cientista que o discutiu para a luz visível Lord Rayleigh (1881), ocorre quando os fótons incidentes têm sua energia conservada e sofrem variação de momento após o espalhamento pelos elétrons ligados ao átomo. As ondas espalhadas por cada elétron sofrem interferência construtiva devido à diferença de caminho óptico percorrido no átomo. A seção de choque diferencial pode ser expressa na forma:

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{Ray} = [F(q, Z)]^2 \left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{Th} \quad (3.9)$$

em que: q é vetor de espalhamento, dado pelo equação (3.6), sendo proporcional ao momento transferido pelo fóton na interação com o átomo. Z é o número atômico, $F(q, Z)$

é chamado fator de forma atômico. A partir desse ponto será usado q para representar o momento transferido.

A função $F(q, Z)$ é a transformada de Fourier da distribuição de cargas do átomo (GUINIER, 1994). O fator de forma total do átomo pode ser decomposto na soma dos fatores de forma individuais de cada camada eletrônica do átomo (HUBBEL *et al.*, 1975). O fator de forma $F(q, Z)$ está representado na figura 8 para o átomo de Oxigênio ($Z=8$).

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

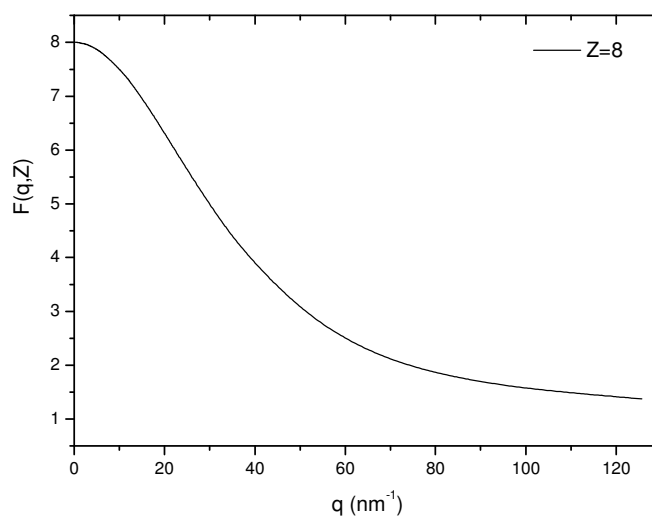


Figura 3.8: Fator de forma $F(q, Z)$ para o átomo de Oxigênio dado por Hubbel *et al.* (1975).

Este comportamento modela a seção de choque Thomson, produzindo a seção de

choque diferencial $\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{Ray}$ como mostrado na figura 3.9.

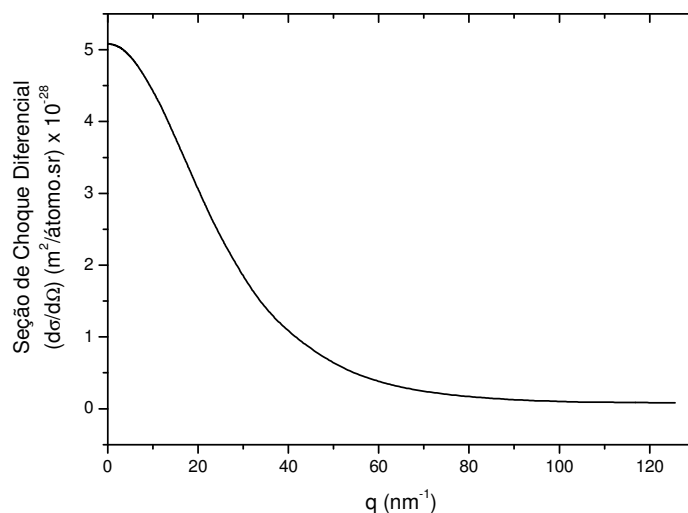


Figura 3.9: Seção de Choque Diferencial para o espalhamento Rayleigh para o átomo de Oxigênio para fótons de 17,44 keV.

3.3.2.3. Espalhamento por Molécula Livre

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

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{elas}^{mol} = F_{mol}^2(q) \left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{Th} \quad (3.10)$$

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

A primeira aproximação considera a correlação entre elétrons de diferentes átomos em uma mesma molécula. Todavia, é necessário o conhecimento da distribuição da densidade eletrônica dentro da molécula, a qual não é bem conhecida para inúmeras moléculas (BLUM, 1971; NARTEN e LEVY, 1971).

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

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

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

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

$$F_{mol}^2(q) = \sum n_i F_i^2(q) \quad (3.11)$$

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

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

$$\frac{F_{mol}^2(q)}{M} = \sum \left(\frac{w_i}{m_i} \right) F_i^2(q) \quad (3.12)$$

em que: M é o peso molecular.

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

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

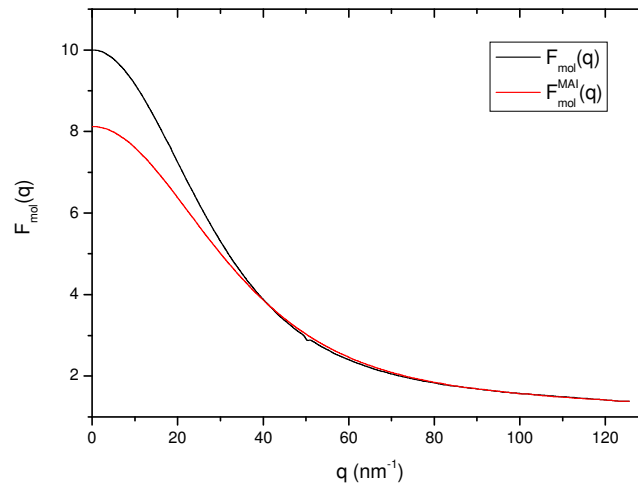


Figura 3.10: Fator de forma da molécula de H₂O, $F_{mol}(q)$, obtido utilizando distribuição de densidade eletrônica e $F_{mol}^{MAI}(q)$ alcançado através do modelo atômico independente (CHAN e DOI, 1983).

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

$$\mu_s = n_v \frac{d\sigma}{d\Omega} \quad (3.13)$$

em que n_v é o número de átomos por unidade de volume ($n_v = \rho \cdot N_A / M$, sendo ρ a densidade da amostra, M a massa molecular e N_A o número de Avogadro) que para amostras de tecidos mamários é desconhecido. Esta grandeza descreve a probabilidade por unidade de caminho, de um fóton espalhar num determinado ângulo sólido.

3.3.2.4. Espalhamento por Conjunto de Moléculas

A descrição do espalhamento por um conjunto de moléculas do mesmo tipo também pode ser obtida através da aproximação de fator de forma:

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{elas} = Y(q)\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{elas}^{mol} = F_{eq}^2(q)\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{Th} \quad (3.14)$$

em que: $\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{elas}$ é a seção de choque diferencial por molécula, $Y(q)$ é a função interferência, que leva em conta o grau de ordem da estrutura atômica (ou molecular),

$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{elas}^{mol}$ é a seção de choque para o espalhamento de uma molécula livre (2.10), $F_{eq}(q)$

é o fator de forma equivalente que permite obter a seção de choque do conjunto de moléculas a partir da seção de choque Thomson na equação (2.7).

$Y(q)$ assume a forma:

$$Y(q) = 1 + \sum_i \gamma_i \frac{\text{sen}(qr_i)}{qr_i} \quad (3.15)$$

em que: γ_i leva em conta a diferença entre a densidade atômica média e a densidade de centros espalhadores em cada posição r_i conforme Poletti *et al.* (2002b).

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

efeito coincide com os encontrados pela termodinâmica (KLUG e ALEXANDER, 1974). Para valores de q maiores as duas curvas convergem para os mesmos valores. A partir dos picos de espalhamento, é possível, utilizando a lei de Bragg (CULLITY, 1978), obter a distância entre os centros espalhadores para o material analisado, em particular, para a água neste caso.

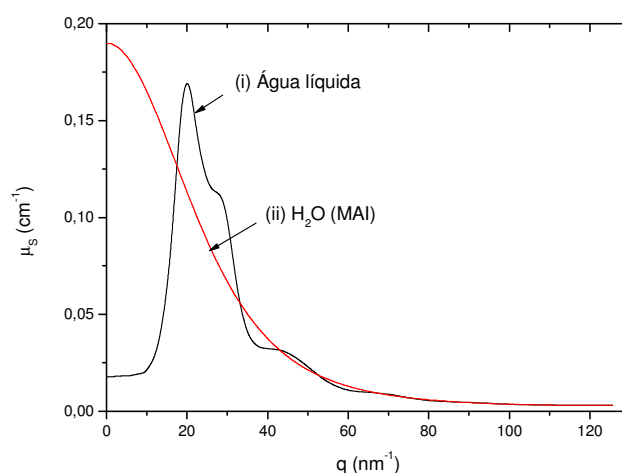


Figura 3.11: Seção de choque diferencial elástica para (i) água líquida a 20°C de Morin (1982), (ii) molécula de água (MAI).

A formulação descrita acima, não engloba arranjos supramoleculares (estruturas maiores que 10\AA), por isso é necessário outro tratamento para essas grandes cadeias moleculares.

Os fótons espalhados elasticamente por estruturas supramoleculares presentes em tecidos compreendem a região de espalhamento de raios X em baixo ângulo (SAXS). A formulação geral para estudo dos perfis de espalhamento de SAXS foi desenvolvida para sistemas de partículas isotrópicos que não possuíam ordenamento em longas cadeias (GUINIER, 1994). Para estes casos, se uma molécula de volume V é irradiada, a

amplitude de espalhamento está relacionada à distribuição de densidade eletrônica desta molécula, em unidades de elétron, por uma transformada de Fourier:

$$F(\vec{q}) = A_e \int \rho(\vec{r}) e^{-i(\vec{q}\vec{r})} dV \quad (3.16)$$

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

Uma fibra de um eixo de orientação preferida, composta de várias moléculas, em forma de discos, ordenadas paralela e covalentemente, porém sem ordenamento em longas cadeias, possui uma distribuição de intensidade dada por:

$$I_f(\vec{q}) = Y_f(\vec{q}) \langle F(\vec{q}) F^*(\vec{q}) \rangle \quad (3.17)$$

em que $Y_f(\vec{q})$ é a função de interferência média, a qual considera a interferência entre os fótons de raios X espalhados por diferentes moléculas na fibra e o termo subsequente representa a intensidade média espalhada por uma fibra.

Porém, levando em conta algumas suposições e modelos estruturais do material em estudo, essa formulação pode ser estendida para estudo de objetos densamente agrupados (como encontrado nos tecidos humanos em geral), os quais permitem considerar orientações anisotrópicas e/ou ordenamento em longas cadeias, como os arranjos de fibras de colágeno presentes nos tecidos conjuntivos frouxo e denso (WESS *et al.*, 1998; WILKINSON e HUKINS, 1999). Dessa forma, a intensidade espalhada por um arranjo de fibras de colágeno com um eixo de orientação preferido, porém permitindo orientação anisotrópica, detectada, é dada pela convolução da função de distribuição de orientação $g(\phi)$ pela distribuição de intensidade de uma fibra $I_f(\vec{q})$, eq. (3.18) (HUKINS, 1981). A função de distribuição de orientação tem simetria cilíndrica e representa a

probabilidade de se encontrar uma fibra orientada entre ϕ e $\phi + \delta\phi$, com relação à orientação preferida da fibra.

$$I_a(\vec{q}) = g(\phi) \otimes I_f(\vec{q}) \quad (3.18)$$

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

$$\mu_s = n_v \frac{d\sigma}{d\Omega} \propto I_a(q) \quad (3.19)$$

Para este sistema anisotrópico duas direções de espalhamento são claramente definidas: a direção meridional, paralela ao eixo da fibra e a direção equatorial perpendicular ao eixo da fibra (HULMES *et al.*, 1995)^[63]. Na direção meridional, os fótons são espalhados principalmente pela distribuição eletrônica que varia ao longo do eixo da fibra e estão associados à periodicidade axial da densidade eletrônica da fibra e à estrutura do arranjo molecular (picos de Bragg). Na direção equatorial, a distribuição de intensidade dos fótons espalhados elasticamente contém informações sobre o tamanho da fibra (diâmetro) e de sua orientação dentro de um tecido (picos de Bessel) (GLATTER e KRATKY, 1982).

CAPÍTULO 4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostras

As amostras de tecido mamário analisadas neste trabalho foram fornecidas pelo Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (DP-HCFMRP). O material coletado era residual de tecidos retirados em procedimentos cirúrgicos de mastectomia (cirurgia para retirada de parte da mama invadida por tumores) e mastoplastia (cirurgia plástica para redução da mama). O volume de tecido colhido era determinado de forma a se ter uma amostra o mais homogênea possível e em quantidade suficiente para ser irradiada.

Após coletadas, as amostras eram armazenadas em recipientes plásticos adequados para este tipo de armazenagem e fixados em formalina (10% formaldeído em água) em temperatura ambiente e classificadas histopatologicamente por profissionais do DP-HCFMRP através da análise microscópica das lâminas de tecido, como tecido normal, neoplasia benigna e neoplasia maligna, este último grupo foi ainda classificado em um subgrupo de acordo com as recomendações de Bloom e Richardson (BLOOM E RICHARDSON, 1957). Esta classificação foi posteriormente confirmada por um docente especialista em patologias mamárias do DP-HCFMRP-USP.

As concentrações de carbono, hidrogênio e nitrogênio de cada amostra foram obtidas pelo método de CHN através de um analisador elementar modelo EA1110 da CE Instruments® pertencente ao Laboratório de Análise Elementar do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (LAE-DQ-FFCLRP-USP). As densidades foram obtidas medindo-se massa e volume.

4.2. Experiências de Espalhamento de Raios X

Nesta seção serão descritas como foram realizadas as experiências de espalhamento de raios X em médio (WAXS) e baixo ângulo (SAXS). As experiências de WAXS foram realizadas variando o tipo de fonte de radiação (tubo de raios X e radiação síncrotron) e o tipo de geometria (transmissão e reflexão) (CONCEIÇÃO *et al.*, 2006; CONCEIÇÃO *et al.* 2007a e CONCEIÇÃO *et al.*, 2008a). As experiências de SAXS foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (CONCEIÇÃO *et al.*, 2007b; CONCEIÇÃO *et al.*, 2007c e CONCEIÇÃO *et al.*, 2008b). Além disso, a última parte desta seção será dedicada à descrição de uma experiência na qual foram combinadas as técnicas de WAXS e SAXS simultaneamente sobre um mesmo conjunto de amostras (CONCEIÇÃO *et al.*, 2008c).

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

Nesta seção serão apresentados os materiais e arranjo experimental utilizados no experimento de WAXS usando tubo de raios X convencional, bem como o método aplicado aos dados medidos, com a finalidade de obter os coeficientes lineares de espalhamento elástico.

4.2.1.1. Distribuição de Amostras

Para as medidas de espalhamento de raios X em médio ângulo (WAXS) foram utilizadas 78 amostras de tecidos mamários normais e neoplásicos, descritos na seção 3.1 e distribuídos de acordo com a figura 4.1.

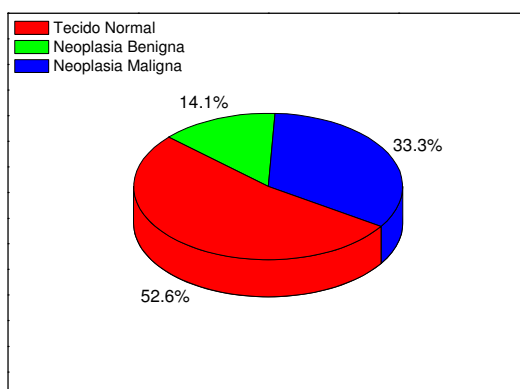


Figura 4.1: Distribuição histopatológica dos tecidos analisados no experimento de WAXS usando tubo de raios X.

4.2.1.2. Arranjo Experimental

As medidas de WAXS foram realizadas em um difractômetro comercial Siemens D-5005, pertencente ao Laboratório de Difractometria do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, cujo arranjo experimental adotado é mostrado na figura 4.2.

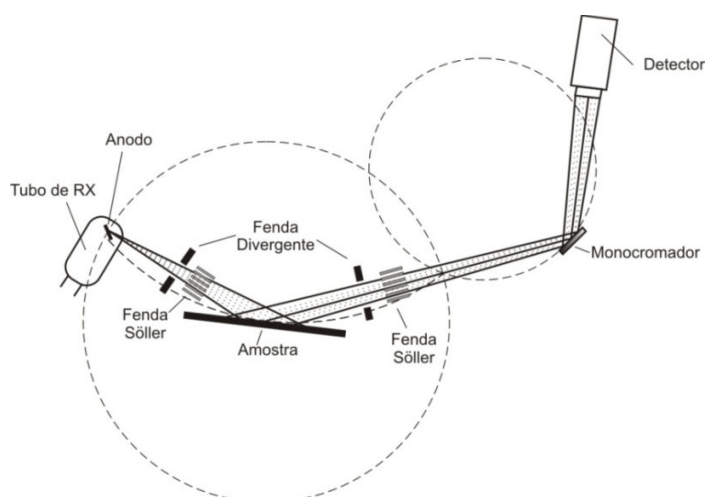


Figura 4.2: Arranjo experimental para as medidas de difração de raios X.

O arranjo experimental montado, modo de reflexão, consistia basicamente de um tubo de raios X, fendas divergentes, fendas Söller, um goniômetro, monocromador e sistema de detecção. O tubo de raios X possuía um anodo de Cu ($Z=29$; $K_{\alpha} = 8,04$ keV e $K_{\beta} = 8,91$ keV). O feixe emergente do ânodo era colimado por uma fenda divergente vertical com abertura variável localizada a uma distância de 85 ± 1 mm do ânodo. A fenda com abertura variável era utilizada para se obter na amostra uma área irradiada constante de 6×12 mm² mesmo variando o ângulo de incidência e detecção, conforme mostra a figura 4.3. Em seguida, o feixe passava por uma fenda Söller que tornava o feixe incidente paralelo na horizontal, localizada a 35 ± 1 mm da fenda divergente.

As amostras de tecidos mamários foram cortadas e acomodadas em um recipiente acrílico cilíndrico (porta-amostra) construído com diâmetro interno de 18mm e uma altura de 4mm. Uma fina camada de policloreto de vinila (filme de PVC), com espessura de $1,5\pm 0,2$ µm, foi utilizada recobrimdo a amostra de forma a sua superfície se tornar o mais regular possível. O porta-amostra foi posicionado no centro do goniômetro localizado sobre o eixo central do difractômetro e a 210 ± 1 mm do anodo, e girava de forma que o ângulo incidente e o ângulo espalhado fossem iguais em relação à normal à superfície da amostra.

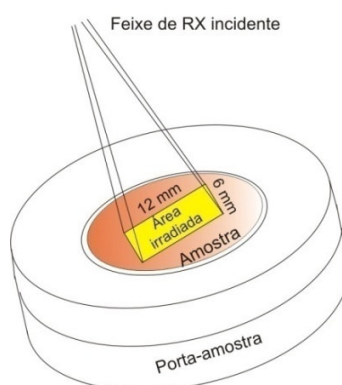


Figura 4.3: Visão da área da amostra irradiada.

O feixe de raios X espalhado pela amostra atravessava uma fenda divergente com abertura variável a 135 ± 1 mm do centro do goniômetro e uma fenda Söller localizada à 25 ± 1 mm da fenda divergente. O feixe espalhado atingia então o monocromador de grafite ($2d=0,2708$ nm) a 100 ± 1 mm da fenda Söller, selecionando os fótons espalhados com energia de 8,04keV com refletância aproximada de 100%. A radiação espalhada por ele atingia finalmente o detector de cintilação, com eficiência de 95% na energia selecionada. O detector estava associado a uma eletrônica padrão (fotomultiplicadora e amplificador) e conectado a um microcomputador por uma placa de interface. O software de aquisição dos dados foi desenvolvido pelo próprio fabricante do difractômetro.

Os fótons espalhados eram detectados variando o ângulo de espalhamento no intervalo $5^\circ - 80^\circ$, em passos de $1/3$ de grau, com tempo de contagem típico de 20s, garantindo assim uma boa contagem de fótons no detector, com uma incerteza estatística ($1/\sqrt{\text{counts}}$) de 4%.

4.2.1.3. Metodologia Adotada

O procedimento adotado para extrair das medidas de espalhamento de raios X em médio ângulo por tecidos mamários, o perfil de espalhamento (μ_s), baseia-se na seguinte equação:

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

em que $I_{\text{exp}}(q)$ é a intensidade espalhada medida, $B(q)$ está relacionado às contribuições espúrias, $T(q)$ é o fator de transmissão da amostra, medido experimentalmente. O termo entre colchetes corresponde à intensidade espalhada exclusivamente pela amostra e,

para obtermos μ_s é necessário que correções sejam aplicadas a esta intensidade devido à variação de intensidade por área de irradiação constante $K(q)$, polarização $P(q)$, atenuação e fatores geométricos $A(q)$, $r_0^2/2(1+\cos^2\theta)$ a seção de choque Thomson (θ está relacionado a q por: $\theta = 2\text{sen}^{-1}\left(q \cdot \frac{\lambda}{4\pi}\right)$) e, por fim, o fator de normalização C (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

i) Correção por contribuições espúrias $B(q)$

Considera-se contribuição espúria ao perfil de espalhamento qualquer contagem de fótons que cheguem ao detector, não oriundas da amostra de tecido analisada. Devido ao arranjo experimental utilizado podemos ter várias dessas fontes de espalhamento, tais como o espalhamento do feixe de raios X no ar, sobre o filme de PVC que cobre a amostra, e ainda a contribuição espalhada devido ao porta-amostra de acrílico. Poderia ser citada também a contribuição proveniente de raios cósmicos e também da radiação natural do ambiente.

As contribuições espúrias foram registradas em vários experimentos: (i) a intensidade espalhada pelo porta-amostra coberto com o filme de PVC, (ii) somente pelo porta-amostra, somente pelo ar e por fim (iii) a intensidade de fundo, registrada sem irradiação, foram medidas e removidas da equação 4.1 através do fator $B(q)$. As intensidades espalhadas provenientes de contribuições espúrias para uma amostra de água líquida são mostradas na figura 4.4.

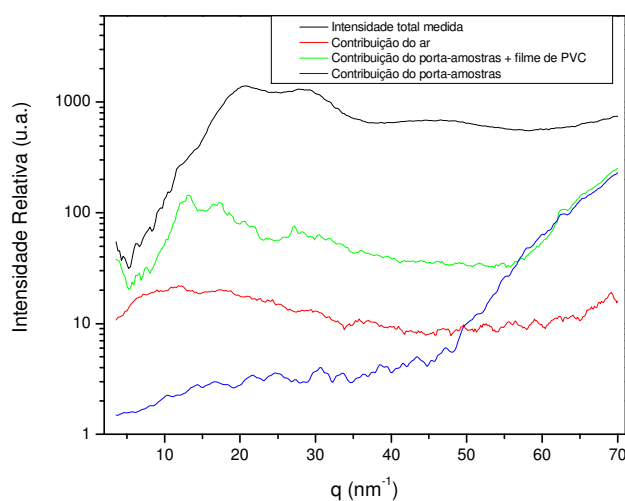


Figura 4.4: Medida experimental das contribuições espúrias.

Na figura 4.4 nota-se que o filme de PVC apresenta um pico em baixo momento transferido que poderia influenciar as medidas nesta região, além disso, o porta-amostra apresenta intensidade crescente em altos momentos transferidos, representando cerca de 10% na intensidade total medida nesta região. Fatos estes que evidenciam a importância de se remover as contribuições espúrias da intensidade total medida.

ii) Correção por Intensidade (área de irradiação constante) $K(q)$

Como já mencionado anteriormente, durante o processo de medida manteve-se a área de irradiação constante sobre a superfície da amostra, de modo a irradiar sempre à mesma do tecido. Este procedimento foi feito utilizando um recurso próprio do difractômetro usado nesta experiência. Para isso, as aberturas das fendas divergentes deviam variar com o ângulo de medida. Conforme o ângulo de incidência do feixe de raios X aumentava, uma maior abertura da fenda era necessária para manter a área de irradiação constante, isto era, portanto, acompanhado por um aumento do número de

fótons que atingem esta área. Dessa forma, há a necessidade de que as medidas sejam corrigidas pela variação da intensidade do feixe, provocada pelo aumento da abertura da fenda. O fator de variação da intensidade foi obtido experimentalmente, obtendo-se ângulo de divergência da fenda em cada ângulo de medida e, posteriormente colocando um monocromador, cujo ângulo de difração do cristal era conhecido, na posição da amostra mediu-se a intensidade espalhada para cada ângulo de divergência da fenda, obtendo a variação da intensidade do feixe em relação à abertura de divergência da fenda e, finalmente a variação da intensidade espalhada em relação ao ângulo de incidência do feixe na amostra foi determinada. Este fator foi comprovado teoricamente e, verificado que se comporta como uma função $\text{sen}(\theta)$. A variação da intensidade do feixe de raios X está representada na figura 4.5, abaixo:

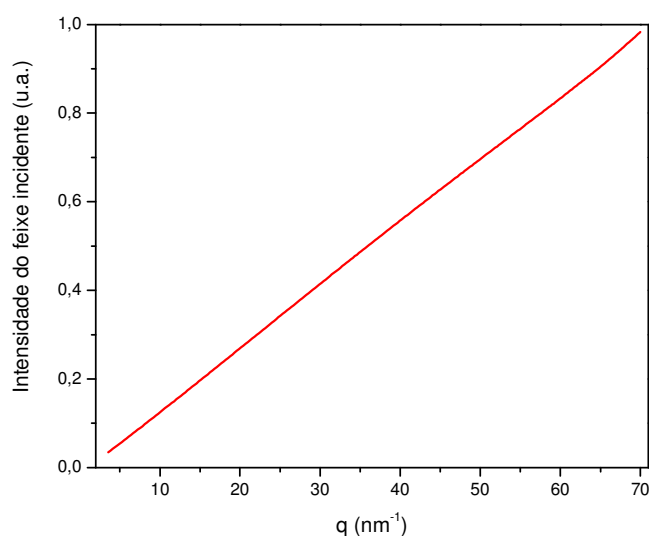


Figura 4.5: Variação da intensidade do feixe incidente experimental.

Conforme mencionado anteriormente, teoricamente o comportamento do fator de correção pela variação da intensidade do feixe, $K(q)$, é de uma função seno. Entretanto, na figura 4.5, este comportamento não é evidente, isto se deve ao fato de que no eixo das

abscissas a grandeza presente é o momento transferido que também depende da função seno.

iii) Correção por polarização $P(q)$

Quando um cristal monocromador é utilizado, o feixe emergente será parcialmente polarizado (JAMES, 1962). A polarização parcial induzida pelo uso de um monocromador no feixe espalhado pela amostra deve ser considerada, uma vez que ela afetará a intensidade medida. Portanto, há a necessidade de se corrigir as intensidades medidas pelo fator de polarização $P(q)$, dado por (AZZAROF, 1968):

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

em que θ é o ângulo de espalhamento da amostra e θ_M é o ângulo de difração do monocromador. Sabendo que $\theta = 2 \operatorname{sen}^{-1} \left(q \cdot \frac{\lambda}{4\pi} \right)$ e λ é o comprimento de onda da radiação proveniente do monocromador e incidente na amostra.

O comportamento do fator de polarização no intervalo de momento transferido medido pode ser visto na figura 4.6:

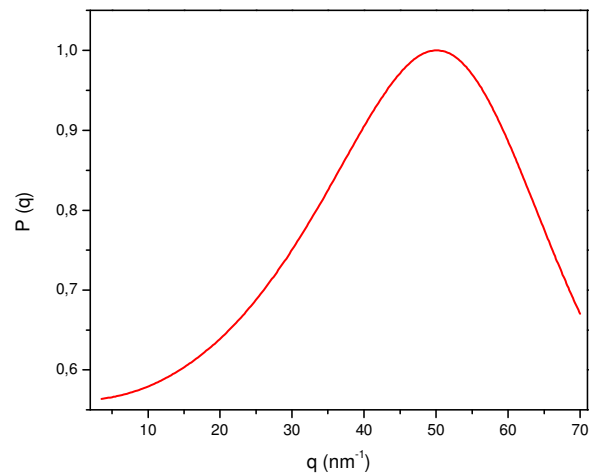


Figura 4.6: Comportamento do fator de polarização $P(q)$.

iv) Correção por atenuação e efeitos geométricos $A(q)$

Para a geometria utilizada neste experimento, em que ambos fonte e detector estão do mesmo lado da amostra, denominada difração no modo reflexão, o fator de atenuação pode ser calculado seguindo o método proposto por Milberg (MILBERG, 1958), considerando algumas variações decorrentes da condição de área irradiada constante. O fator $A(q)$ foi obtido de forma analítica e seu comportamento em função do momento transferido para uma amostra de água líquida é exibido na figura 4.7.

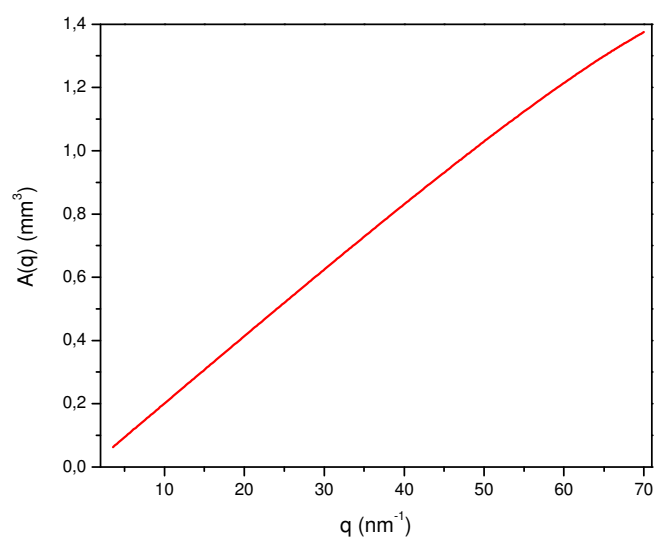


Figura 4.7: Fator de atenuação teórico para uma amostra de água.

v) Fator de Normalização C

O procedimento de normalização consiste em comparar a grandeza experimental corrigida considerando todos os fatores de correção anteriormente mencionados com os valores teóricos para as seções de choque diferenciais elásticas em altos valores de momento transferido, onde os efeitos intramoleculares e intermoleculares podem ser desprezados.

O fator de normalização C pode ser calculado como a média da razão entre os dados teóricos I_{Theor} e os dados experimentais correspondentes I_{exp} , no intervalo de momento transferido $44,05-70,37\text{nm}^{-1}$, que além de assegurar que os efeitos de interferência podem ser ignorados, também representa um período completo, onde dois máximos adjacentes de difração sejam praticamente imperceptíveis (POLETTI, 2001 e POLETTI ET AL., 2002b). O fator de normalização é dado por:

$$C = \frac{1}{n} \sum_i \frac{I_{Theor}(q_i)}{I_{exp}(q_i)} \quad 44,05 \leq q \leq 70,37 \text{ nm}^{-1} \quad (4.3)$$

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

Neste caso, o I_{Theor} foi calculado usando o MAI através das concentrações elementares das amostras determinadas anteriormente, seção 3.1, e a relação 2.14.

vi) Incertezas

A incerteza foi estimada por propagação de erros da equação (4.1), as variáveis foram assumidas não correlacionadas e apenas incertezas associadas a grandezas experimentais foram levadas em conta.

Os dados foram coletados com uma incerteza estatística ($1/\sqrt{\text{counts}}$) de aproximadamente 4% na contagem total de fótons espalhados (I_{exp}), e as contribuições espúrias (B) tiveram no máximo 6% de incerteza. A incerteza estatística associada ao fator de atenuação ficou entre 4 e 5%, além de 3% devido às correções de polarização e 0,9% decorrente da correção da variação da intensidade do feixe. Ainda, o erro proveniente do procedimento de normalização foi de aproximadamente 0,5%, resultando em uma incerteza total final de aproximadamente 8%.

A incerteza associada ao momento transferido é dada por:

$$\Delta q = \pm \sqrt{\left(\frac{4\pi \cos(\theta/2)}{2\lambda}\right)^2 \cdot (\Delta\theta)^2 + \left(\frac{-4\pi \sin(\theta/2)}{\lambda^2}\right)^2 \cdot (\Delta\lambda)^2} \quad (4.4)$$

Substituindo valores na equação (4.4), foi encontrada uma incerteza estatística devido ao momento transferido, Δq , de 2% em média no intervalo medido neste experimento.

vii) Validação do Procedimento Experimental

A validação do procedimento experimental empregado neste experimento de WAXS utilizando tubo de raios X foi feita pela comparação do coeficiente linear de espalhamento elástico obtido experimentalmente com o reportado por Morin (MORIN, 1982) para uma amostra de água líquida. No intervalo de momento transferido medido, a discrepância máxima entre os dois resultados foi de 6% e dentro das incertezas experimentais, figura 4.8.

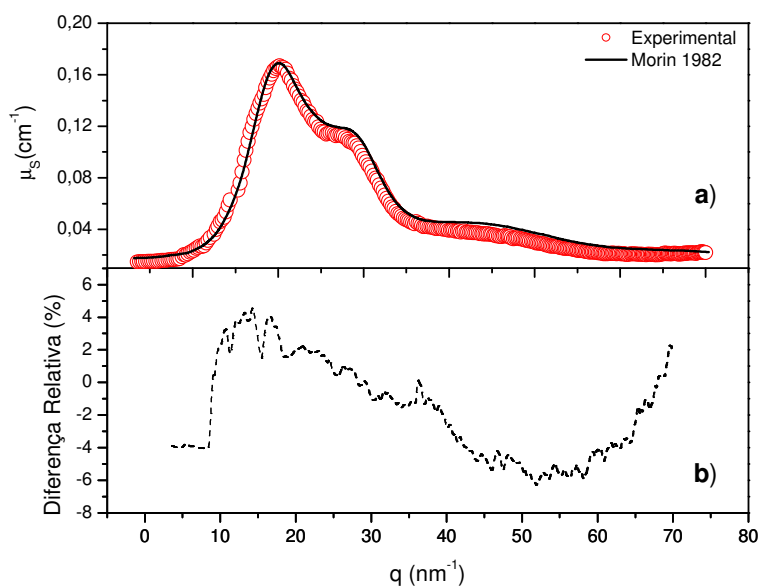


Figura 4.8: (a) comparação do coeficiente linear de espalhamento para água líquida obtido experimentalmente com o reportado por Morin (MORIN, 1962); (b) diferença relativa entre as curvas da figura (a).

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

Nesta seção será descrito o experimento de WAXS usando radiação síncrotron, realizado na linha D12A – XRD1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) para as geometrias de transmissão e reflexão, os materiais utilizados e os procedimentos metodológicos adotados para correção dos dados experimentais em ambas as técnicas para a obtenção do coeficiente linear de espalhamento elástico para os tipos de tecidos mamários estudados.

4.2.2.1. Distribuição de Amostras

Neste experimento foram utilizadas 95 amostras de tecidos mamários normais e neoplásicos, classificadas conforme descrito na seção 3.1 e distribuídas de acordo com a figura 4.9.

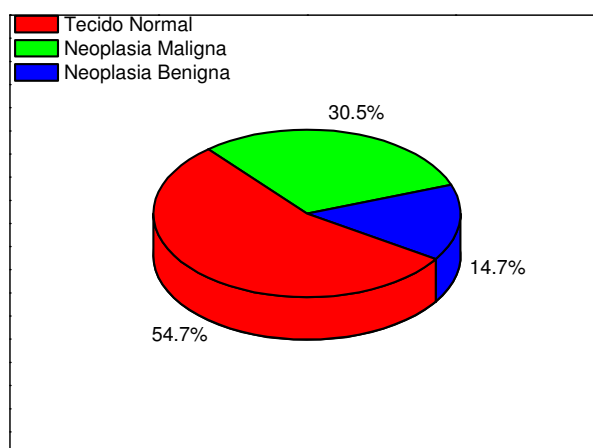


Figura 4.9: Distribuição histopatológica dos tecidos analisados neste experimento

4.2.2.2. Arranjo Experimental

A montagem experimental foi implementada na linha D12A – XRD1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron em Campinas, Brasil, devido às facilidades de instrumentação disponíveis para utilização neste laboratório.

Para este experimento foram utilizadas duas geometrias, transmissão e reflexão. A geometria de transmissão é aquela em que a fonte e o detector estão em lados opostos com relação à amostra. A montagem experimental utilizada para ambas as geometrias é composta basicamente de uma fonte (dipolo), um espelho sagital, um monocromador e um difractômetro Huber de 3+1 círculos, conforme figura 4.10.

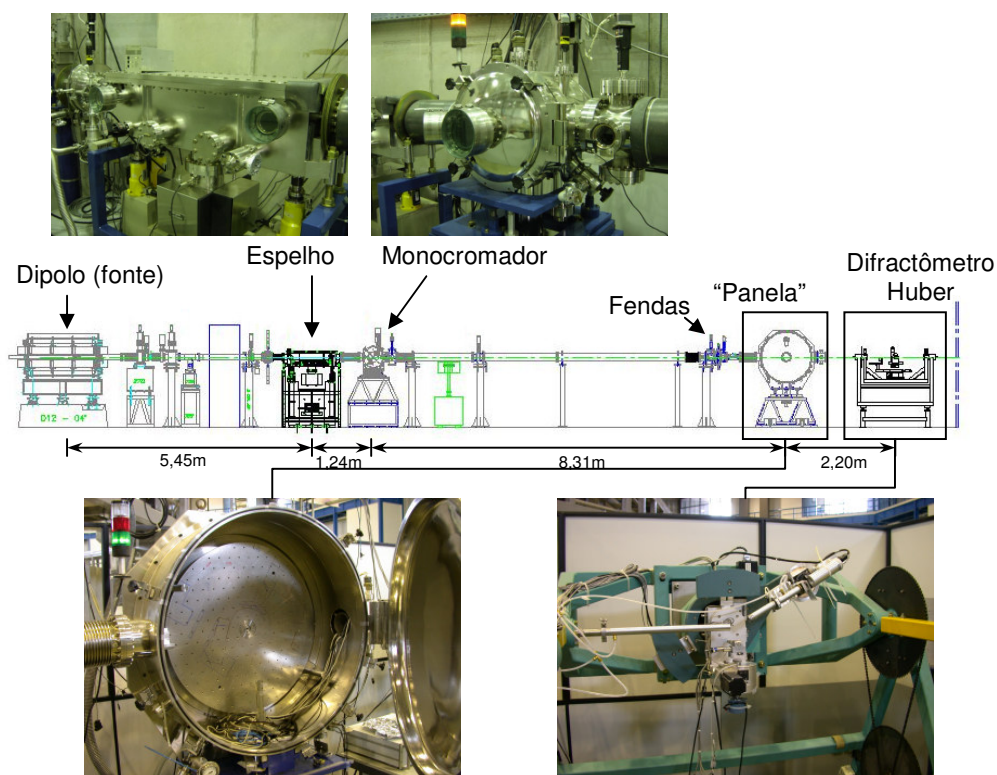


Figura 4.10: Montagem experimental na linha D12A - XRD-1 no LNLS.

O espelho sagital é usado para filtrar fótons de altas energias e focalizar o feixe, reduzindo a área de irradiação sobre a amostra (5,5mm x 1,0mm). O monocromador de

duplo cristal de Si(111) com d-spacing=3,1356Å, foi usado para selecionar uma maior resolução em energia, ($\Delta\lambda/\lambda\sim 10^{-4}$) em 11keV ($\lambda=1,127\text{Å}$) e também para focalização horizontal do feixe. O tempo de medida foi escolhido para que a incerteza estatística ($1/\sqrt{\text{counts}}$) associada ao fluxo de fótons durante as medidas fossem menores que 2%.

As amostras de tecidos mamários humanos, descritas anteriormente, armazenados em adequados recipientes à temperatura ambiente, no instante da realização das medidas, foram cortadas e inseridas dentro de porta-amostras de dimensões, $30\pm 1\text{mm} \times 15\pm 1\text{mm} \times 8\pm 1\text{mm}$ e cobertos por uma folha de kapton, de $170\pm 5\mu\text{m}$ de espessura, em ambos os lados do porta-amostra.

O porta-amostra estava localizado dentro do difractômetro Huber 3+1 círculos posicionado sobre uma mesa rotativa, e a distância da amostra ao detector foi fixada em 210mm. O difractômetro Huber tem precisão angular de $\pm 0,03^\circ$ e permite realizar medidas no intervalo de $0,8^\circ$ a $78,55^\circ$ com passos de $0,25^\circ$.

Entre a amostra e o detector, foi colocado um monocromador de grafite para garantir que apenas os fótons com energia de 11keV atinjam o detector, dessa forma evita-se que os fótons provenientes de espalhamento inelástico sejam detectados. O detector utilizado foi um cintilador de NaI(Tl) com capacidade para 10^6 contagens/s, e a eficiência do detector para a energia de utilizada neste experimento (11keV) é cerca de 40%. Este detector estava acoplado a um analisador monocanal e controlado por um software instalado no computador principal.

4.2.2.3. Metodologia Adotada

As medidas de WAXS para ambas as técnicas foram realizadas no plano vertical ($\phi=90^\circ$), portanto na equação 3.8 $\cos(\phi)=0$. Aplicando esta consideração à equação 3.16, encontra-se que μ_s é:

$$\mu_s(q) = [I_{\text{exp}}(q) - B(q) \cdot T(q)] \cdot A(q)^{-1} \cdot r_0^2 \cdot C \quad (4.5)$$

onde $I_{\text{exp}}(q)$ é a intensidade espalhada medida, $B(q)$ está relacionado às contribuições espúrias, $T(q)$ é o fator de transmissão da amostra medido experimentalmente. O termo entre colchetes corresponde à intensidade espalhada exclusivamente pela amostra e, para obtenção de μ_s . $A(q)$ é o fator de correção por atenuação e efeitos geométricos, o qual apresenta um comportamento específico para cada uma das duas geometrias utilizadas (transmissão e reflexão) e será mais bem explicado adiante. O termo r_0 refere-se ao raio clássico do elétron. O último passo para obtenção do coeficiente linear de espalhamento elástico consiste na normalização dos dados pelo fator de normalização C.

i) Correção por contribuições espúrias B(q)

Considera-se contribuição espúria os fótons espalhados provenientes do espalhamento do feixe de raios X no ar, sobre a folha de kapton que cobre a amostra, e ainda a intensidade espalhada devido ao porta-amostra de acrílico.

As contribuições espúrias foram registradas em vários experimentos. A intensidade espalhada pelo porta-amostra coberto com as folhas de kapton, mas sem amostra e posteriormente a espalhada pelo ar, foram medidos e suas contribuições foram

removidas, através do fator $B(q)$, conforme equação 4.5. Além disso, foi verificado que as contribuições espúrias não dependiam significativamente da geometria empregada e, portanto na figura 4.11 apenas as contribuições para geometria de transmissão são exibidas.

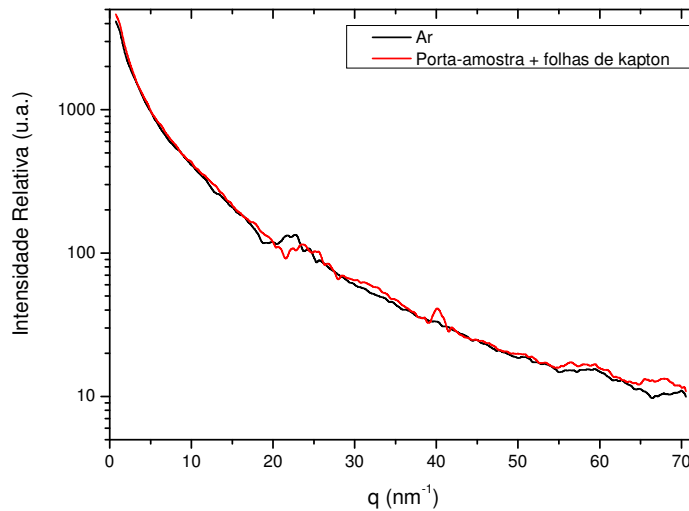


Figura 4.11: Medida experimental do espalhamento por contribuições espúrias.

ii) Determinação do fator de atenuação e efeitos geométricos $A(q)$

Para ambas as geometrias utilizadas neste experimento, o fator $A(q)$ foi determinado analiticamente. As equações 4.6 e 4.7 correspondem ao fator $A(q)$ para as geometrias de transmissão e reflexão, respectivamente.

$$A(q) = \frac{a \cdot b \cdot t \cdot e^{-\mu / \cos(\theta/2)}}{\cos(\theta/2)} \quad (4.6)$$

$$A(q) = \frac{a \cdot b}{\mu} \left[1 + e^{-\left(\frac{\mu b}{\sin(\theta)}\right)} - e^{-\left(\frac{4\mu b}{\sin(\theta)}\right)} \right] \quad (4.7)$$

em que a e b são respectivamente, comprimento e largura da seção transversal do feixe de raios X que incide na amostra, t é a espessura da amostra, θ é o ângulo de espalhamento e μ é o coeficiente de atenuação da amostra. Este último coeficiente foi experimentalmente medido para cada amostra em um experimento independente, anteriormente à coleta de dados.

A figura 4.12 exibe os fatores $A(q)$ normalizados para as duas geometrias empregadas neste experimento, obtidos através das equações 4.6 e 4.7, para uma amostra de água líquida no intervalo de momento transferido utilizado neste estudo.

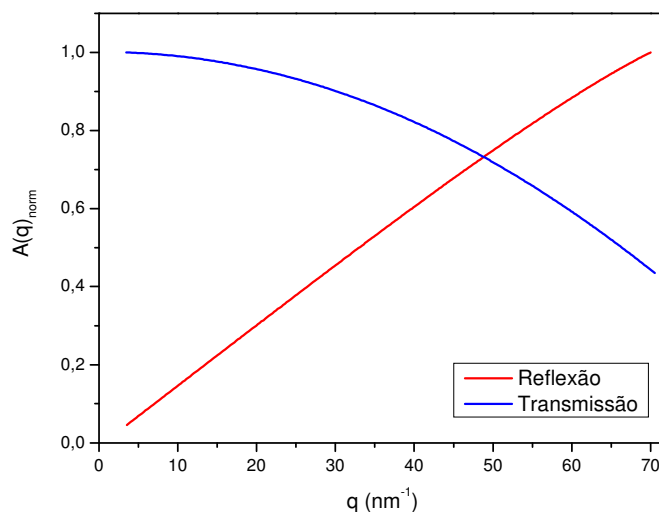


Figura 4.12: Comportamento do fator de atenuação e efeitos geométricos de uma amostra de água líquida para o experimento de WAXS utilizando as geometrias de transmissão e reflexão.

O comportamento do fator de atenuação para ambas as geometrias, exibido na figura 4.12, concorda com os obtidos por Gonçalves e Magalhães (2000).

iii) Procedimento de Normalização

O fator de normalização, C , foi obtido de forma similar à descrita acima (seção 4.2.1.3.v) no intervalo de $47,65-70,55\text{nm}^{-1}$.

iv) Incertezas

A incerteza foi estimada por propagação de erros da equação 4.5. Para este caso, a incerteza estatística na contagem total de fótons espalhados (I_{exp}) foi de 0,2%, as contribuições espúrias (B) tiveram em média 1% de incerteza. A incerteza estatística associada ao fator de atenuação ficou entre 3 e 5%. Ainda, o erro proveniente do procedimento de normalização foi de aproximadamente 0,8%, resultando em uma incerteza total final de aproximadamente 6%.

A incerteza associada ao momento transferido é dada pela equação 3.4 e aplicando-a a este experimento no intervalo de medido, foi encontrada uma incerteza estatística devido ao momento transferido, Δq , de 2% em média.

v) Validação do Procedimento Experimental

O procedimento experimental adotado neste experimento foi validado pela comparação de coeficiente linear de espalhamento elástico para água líquida obtido neste estudo com os tabulados por Morin (MORIN, 1982). As discrepâncias foram menores que

5% no intervalo de momento transferido medido e dentro das incertezas experimentais independentemente do arranjo geométrico utilizado, figura 4.13. Como as curvas experimentais para água líquida para as duas geometrias utilizadas neste experimento praticamente se sobrepunham optou-se por mostrar apenas a referente à geometria de transmissão.

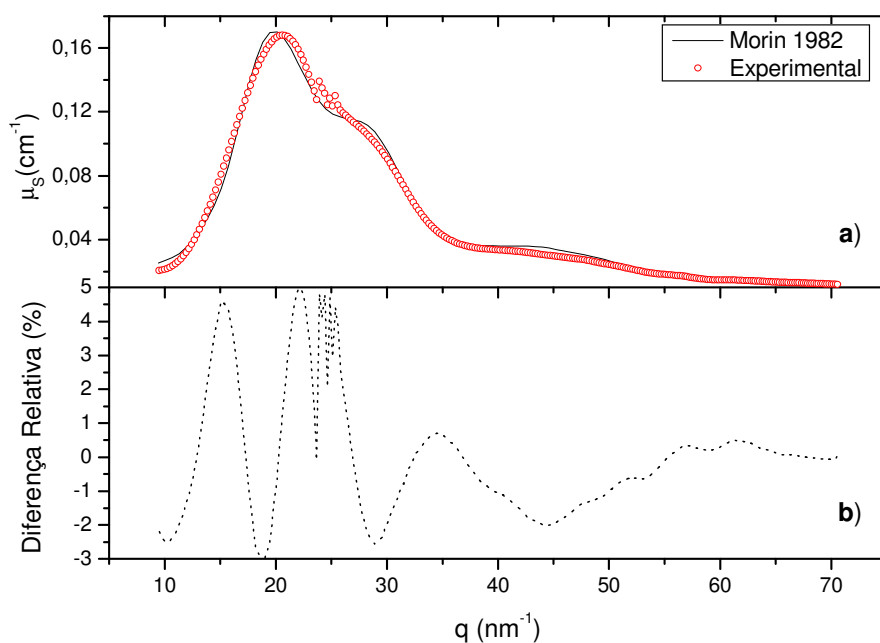


Figura 4.13: a) coeficiente linear de espalhamento elastico experimental para água comparado com o tabulado por Morin (1982); b) Diferença relativa entre as duas curvas exibidas em a).

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

Nesta seção serão descritas a configuração experimental, bem como a metodologia e abordagem teórica adotadas na obtenção dos perfis de espalhamento para baixos ângulos.

4.2.3.1. Distribuição de Amostras

Para este experimento foram utilizadas 20 amostras, englobando os três tipos de tecidos mamários previamente descritos na seção 4.1. A distribuição das amostras analisadas é apresentada na figura a seguir:

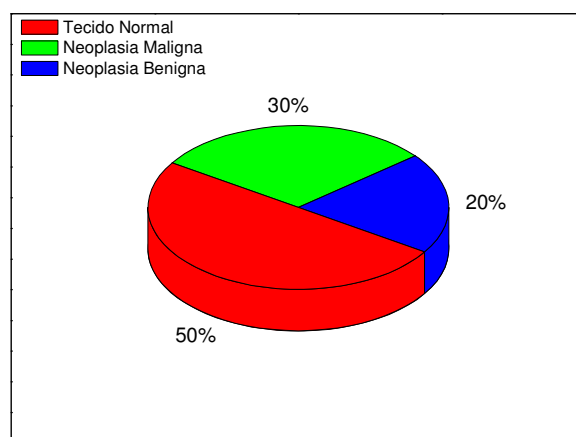


Figura 4.14: Distribuição das amostras de tecidos mamários utilizados neste experimento.

4.2.3.2. Arranjo Experimental

O experimento de SAXS foi implementado na linha SAXS-2 na fonte de luz síncrotron do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron em Campinas, Brasil. A montagem experimental utilizada neste experimento é exibida na figura 4.15.

O feixe de luz síncrotron foi monocromatizado em 7,71keV ($\lambda=1,608\text{\AA}$) e focalizado a partir de um monocromador com duplo cristal de silício curvado elasticamente, em uma pequena área sobre o detector (1,0mm x 0,5mm). Um disco de chumbo de 8mm de diâmetro, denominado beam stop, foi adicionado adjacente ao detector e centralizado a este, para evitar que o feixe primário, de alta intensidade, atinja o detector, saturando-o. A distribuição radial dos fótons espalhados elasticamente pelas amostras de tecidos mamários foi registrada em uma câmara de CCD bidimensional da MARUSA®, composta de 2048 x 2048 pixels, cada um com resolução espacial de 79 μm .

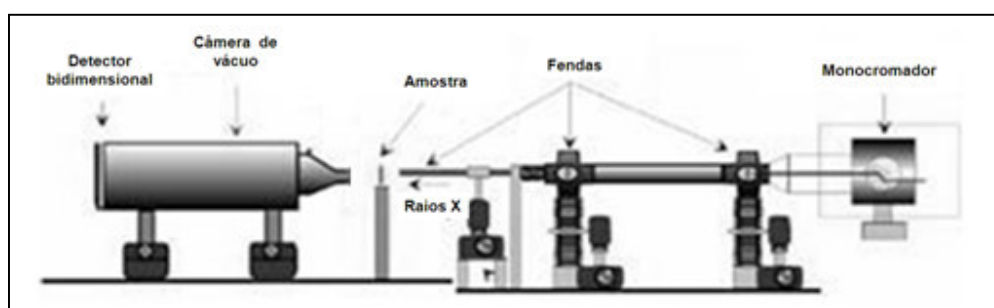


Figura 4.15: Esboço da montagem experimental para experimento de SAXS.

Além disso, a instrumentação da linha de SAXS conta com dois conjuntos de espalhador/detector. Um deles está localizado antes da amostra e mede a intensidade do feixe incidente N_0 , o outro se localiza após a amostra e mede a intensidade do feixe transmitido N_t , o que permite determinar o fator de transmissão da amostra no momento da medida.

Duas distâncias da amostra ao detector foram utilizadas, 804 e 2043mm, permitindo medidas no intervalo de momento transferido $0,058\text{nm}^{-1} \leq q \leq 2,500\text{nm}^{-1}$. Com a finalidade de minimizar os efeitos de espalhamento no ar e perdas por absorção, o espaço entre a amostra e o detector foi colocado sob vácuo.

Nesta experiência as amostras foram cortadas nas dimensões de 10,0mm x 2,0mm x 1,0mm e inseridas em um porta-amostra circular de alumínio com diâmetro de 30,0mm, figura 4.16. Folhas de mica de espessuras de 0,2mm cobriam ambos os lados do porta-amostra, antes dos fótons atingirem a amostra e depois de a atravessarem. O tempo de medida foi ajustado de forma a assegurar incerteza estatística menor que 2% na distribuição angular dos fótons espalhados.

Amostra padrão de Silver Behenate, $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOAg}]$, foi utilizada para calibração da imagem para o espaço recíproco, q , a partir dos resultados de Huang (HUANG *et al.*, 1993).

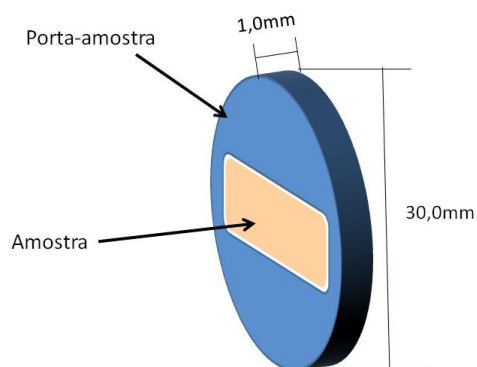


Figura 4.16: Esboço da posição da amostra no disco de chumbo (porta-amostra).

4.2.3.3. Metodologia Adotada

No intervalo de momento transferido medido neste experimento, os fótons espalhados carregam informações das estruturas supramoleculares dos tecidos em estudo. A abordagem teórica adotada para experimentos de raios X em baixo ângulo de materiais amorfos com orientação anisotrópica e ordenamento em longas cadeias é aquela descrita na seção 3.3.2.4 e representada pela equação 3.19.

A intensidade espalhada por todas as amostras medidas, bem como as provenientes das contribuições espúrias foram obtidas através da integração da distribuição radial nas imagens bidimensionais de SAXS em ambas as direções, meridional e equatorial (WILKINSON *et al.*, 2006), figura 4.17, usando o programa Fit2D, disponibilizado por *European Synchrotron Radiation Facilities* (<http://www.esrf.eu/computing/scientific/FIT2D/>).

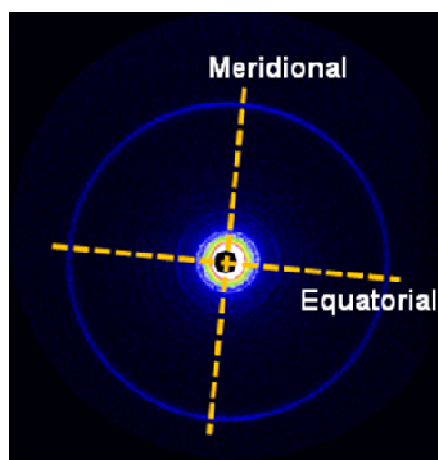


Figura 4.17: Exemplo de uma imagem de SAXS com o sistema de coordenadas.

Após ter sido estabelecido o espaço recíproco, as intensidades espalhadas foram corrigidas por tempo de exposição, variação da corrente de elétrons no anel síncrotron e por atenuação, tanto da amostra quanto das folhas de mica. Por fim, para se obter uma

relação com o coeficiente linear de espalhamento elástico foram removidas as contribuições espúrias, já corrigidas pelos fatores descritos anteriormente.

$$\mu_S(q) \propto [I_{A+BG}(q) \cdot A_{A+BG}(q) - I_{BG}(q) \cdot A_{BG}(q)] \quad (4.8)$$

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

Ao invés de utilizar o coeficiente linear de espalhamento elástico que é proporcional à quantidade do lado direito, será utilizado o parâmetro intensidade relativa I_R , uma vez que nesta região de momento transferido, os efeitos de interferência não podem ser desprezados, por isso, torna-se incorreto normalizar os dados para obtenção do coeficiente linear de espalhamento elástico.

$$I_R = I_{A+BG}(q) \cdot A_{A+BG}(q) - I_{BG}(q) \cdot A_{BG}(q) \quad (4.9)$$

i) Contribuições Espúrias $I_{BG}(q)$

As contribuições espúrias ou também chamadas de espalhamento parasita estão relacionadas ao espalhamento adicional causado por elementos inseridos no caminho do feixe após a amostra (fendas, janelas, etc), bem como pelo conjunto porta-amostra e folhas de mica. A intensidade deste espalhamento parasita foi medida por um tempo

adequado para se ter uma incerteza estatística menor que 2%, colocando o porta-amostra coberto pelas duas folhas de mica, mas sem a presença de amostra, figura 4.18.

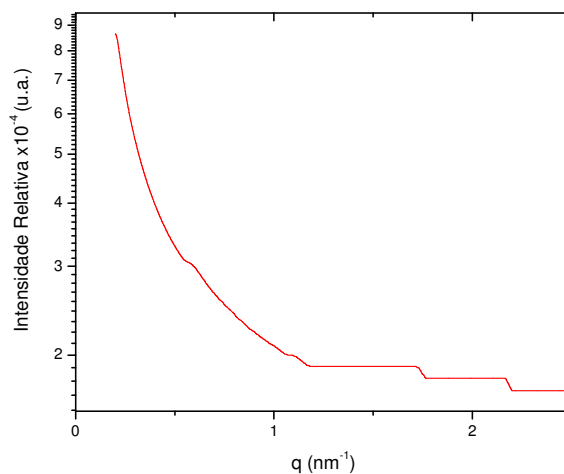


Figura 4.18: Intensidade espalhada por contribuições espúrias.

ii) Atenuação $A(q)$

O fator de correção para atenuação é o mesmo mostrado na equação 4.6 para experimentos de WAXS, uma vez que o experimento de SAXS foi realizado utilizando-se a geometria de transmissão. Entretanto, para SAXS pode-se considerar que $\cos(\theta/2) \approx 1$ e, portanto $A(q)$ é constante para todo o intervalo de momento transferido medido neste experimento, dependendo apenas dos parâmetros físicos da amostra, coeficiente linear de atenuação e espessura, determinados em experimentos independentes anteriormente à coleta de dados de cada amostra.

iii) Incertezas

Assumindo que as incertezas de cada grandeza experimental não estejam correlacionadas e aplicando propagação de erros na equação (4.9), foi determinada a incerteza para I_R .

Para este experimento, a incerteza estatística na contagem total dos fótons espalhados foi de aproximadamente 1,8% as contribuições espúrias tiveram incerteza máxima de 3%. A incerteza estatística associada ao fator de transmissão foi de 0,9%. Ainda, a incerteza proveniente do tempo de exposição e da variação da corrente do anel foi de 0,6%, resultando em uma incerteza final em média 5,5%.

Aplicando a equação (4.4), a incerteza estatística devido ao momento transferido, Δq , é menor que 2% no intervalo medido neste experimento.

iv) Validação do Procedimento Experimental

O procedimento experimental adotado nos experimentos de SAXS foi validado pela comparação das intensidades relativas normalizadas obtidas para uma amostra de SilverBehenate com os valores descritos por Huang *et al.* (1993), figura 4.19.

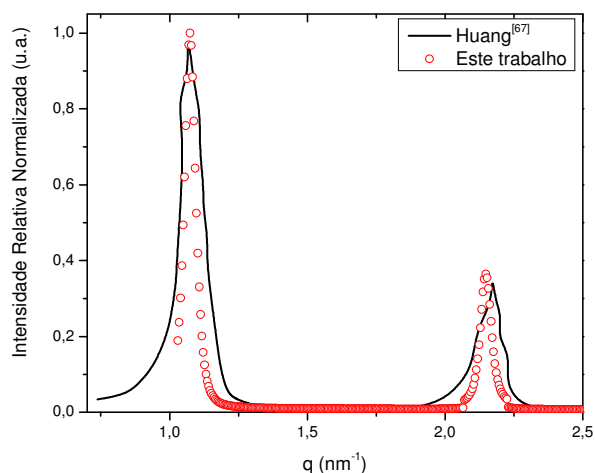


Figura 4.19: Intensidade normalizada medida experimentalmente para uma amostra de SilverBehenate comparado aos valores de Huang *et al.* (1993).

Da figura 4.19 verifica-se a concordância na posição dos picos e nas intensidades relativas, entretanto o perfil de espalhamento de SAXS obtido neste trabalho possui maior resolução em momento transferido que o de Huang (HUANG *et al.*, 1993). As discrepâncias entre os dois experimentos, dentro das incertezas experimentais, foram menores que 4% no intervalo de momento transferido medido.

4.2.4. Combinação de experiências simultâneas de WAXS e SAXS

Foram combinadas as técnicas de WAXS e SAXS usando radiação síncrotron sobre um mesmo conjunto de amostras para que se permita correlacionar mudanças em nível atômico e molecular com alterações em escala supramolecular.

4.2.4.1. Distribuição das amostras

Para a combinação das técnicas de WAXS e SAXS, a distribuição das amostras de tecido mamário utilizadas é apresentada na figura a seguir:

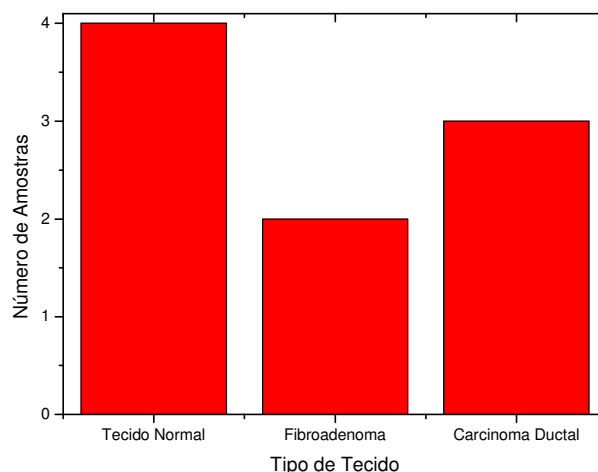


Figura 4.20: Distribuição das amostras utilizadas para a combinação WAXS e SAXS.

4.2.4.2. Arranjo Experimental

A combinação simultânea das técnicas de WAXS e SAXS foi implementada na linha SAXS-1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron em Campinas. A montagem experimental utilizada nestes experimentos pode ser observada na figura 4.21. Um monocromador de duplo cristal de Si (111) foi usado para monocromatizar o feixe de raios X em um comprimento de onda λ de 1,48Å, bem como para reduzir a área de irradiação na amostra (1,0mm x 0,5mm). A distribuição radial dos fótons espalhados elasticamente pelas amostras de tecidos mamários foi registrada em detectores bidimensionais image plate modelo BAS III da Fuji. O detector image plate de WAXS foi fixado sobre um suporte cilíndrico e focalizado sobre a amostra a uma distância de 200mm desta, como pode ser

visto na figura 4.21, cobrindo o intervalo de momento transferido de $6.28\text{nm}^{-1} \leq q \leq 50.26\text{nm}^{-1}$. A distância da amostra ao detector image plate de SAXS foi de 1590mm e para evitar perdas por absorção e espalhamento do ar, o espaço entre amostra e detector de SAXS foi colocado sob vácuo, figura 4.21. Um disco de chumbo de 8mm de diâmetro foi inserido adjacente e centralmente ao detector de SAXS ao detector para evitar a saturação deste produzida pela alta intensidade do feixe primário. Nesse caso, o intervalo de momento transferido possível de ser detectado está entre $0,15\text{nm}^{-1}$ e $1,90\text{nm}^{-1}$. Posteriormente às medidas, os detectores passavam por um scanner de alta resolução ($100\mu\text{m}$) MAR 300 da Molecular Dynamics®, disponível nas instalações desta linha de luz para digitalização dos padrões gravados no detector image plate, gerando as imagens de WAXS e SAXS. O tempo de medida foi ajustado para garantir uma incerteza estatística menor que 2% na contagem dos fótons espalhados elasticamente. Amostras padrões de alumina (N_2O_3) e SilverBehenate [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOAg}$] foram utilizadas para calibração das imagens de WAXS e SAXS para o espaço recíproco, q , respectivamente.

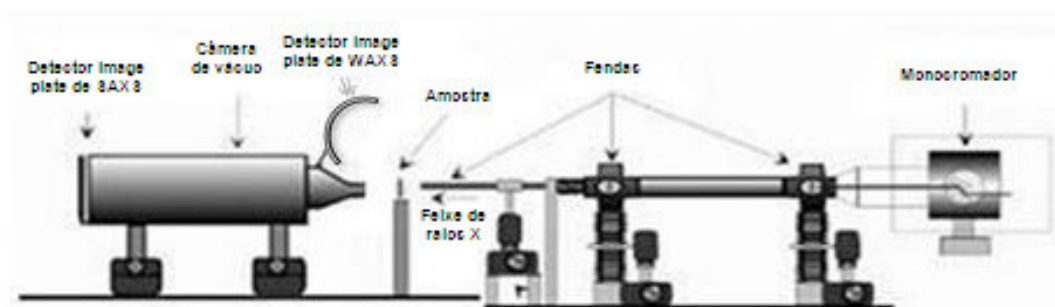


Figura 4.21: Montagem experimental da linha SAXS-1 no LNLS utilizada para as medidas combinando WAXS e SAXS simultaneamente.

4.2.4.3. Metodologia

Ao se combinar as técnicas de WAXS e SAXS, serão identificadas padrões de interferências de estruturas moleculares (menores que 10Å) e supramoleculares (maiores que 10Å). Portanto, a abordagem teórica utilizada será aquela descrita na seção 3.3.2.4 para os dois tipos de estruturas.

Posteriormente à digitalização de todas as imagens (padrões, amostras e porta-amostra) de WAXS e SAXS, estas foram processadas usando o programa Fit2D (<http://www.esrf.eu/computing/scientific/FIT2D/>). Para as imagens de WAXS, a distribuição de intensidade espalhada em função do momento transferido foi integrada na direção vertical no centro de cada faixa, figura 4.22, enquanto para as imagens de SAXS esta integração foi realizada em ambas as direções, meridional e equatorial (WILKINSON *et al.*, 2006), como mostrado na figura 3.17. Para se obter o coeficiente linear de espalhamento elástico, vários passos são necessários. O primeiro é a correção das medidas pela variação da corrente no anel síncrotron durante as medidas. O segundo passo consiste em eliminar todos os fótons provenientes de contribuições espúrias. No passo seguinte, o resultado deve ser corrigido por atenuação e efeitos geométricos. Por fim, o último passo consiste em normalizar os dados, equação 4.10.

$$\mu_S(q) = [I_{A+BG}(q) \cdot A_{A+BG}(q) - I_{BG}(q) \cdot A_{BG}(q)] \cdot C \quad (4.10)$$

em que I_{A+BG} e I_{BG} são as intensidades totais espalhadas por (amostra + porta-amostra + folhas de mica) e (porta-amostra + folhas de mica), respectivamente, normalizadas pela variação da corrente de elétrons no anel síncrotron. $A(q)$ corresponde ao fator de correção para atenuação e efeitos geométricos. Os índices A e BG na expressão acima

estão relacionados à amostra e (porta-amostra + folhas de mica), respectivamente. O fator C é o fator de normalização dos dados.

Uma vez que não existe um intervalo de momento transferido comum aos experimentos de WAXS e SAXS, o que permitiria normalizar a distribuição de intensidade espalhada somente pela amostra utilizando o perfil de espalhamento da mesma amostra na região WAXS, será utilizada novamente o parâmetro intensidade relativa (I_R) para quantificar essa intensidade espalhada em SAXS, conforme mencionado anteriormente para o experimento independente de SAXS, equação 4.9, seção 4.2.3.3.

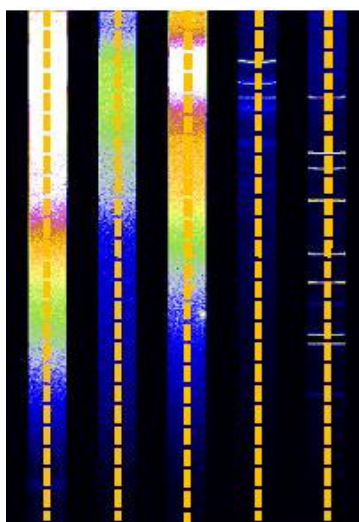


Figura 4.22: Imagens de WAXS. Da esquerda para a direita, cada faixa corresponde à distribuição de intensidade espalhada de: três tipos de tecidos mamários, contribuições espúrias e amostra padrão de alumina.

i) Contribuições Espúrias $I_{BG}(q)$

As contribuições espúrias provenientes de porta-amostra, folhas de mica, colimadores e etc, foram medidas em experimentos independentes e as intensidades espalhadas por estes materiais em função do momento transferido podem ser vistas nas figuras 4.23a e b.

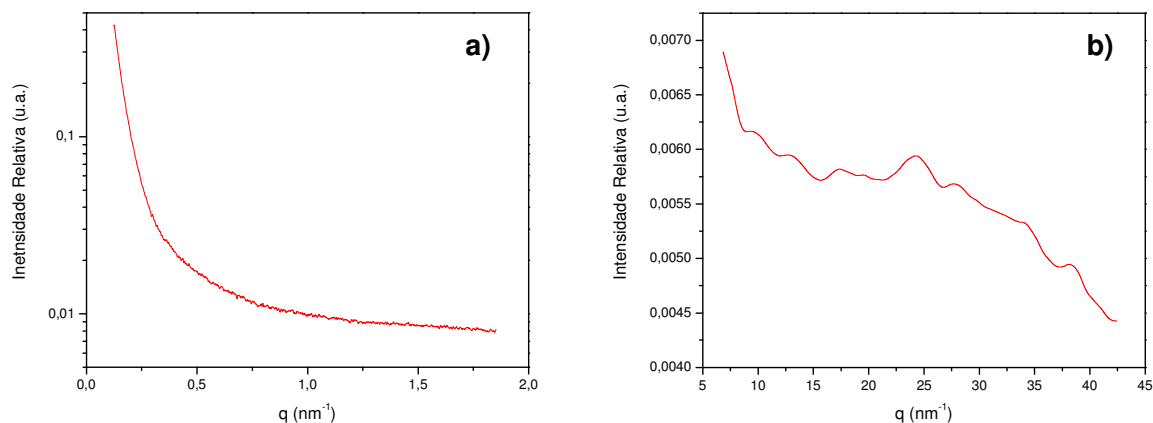


Figura 4.23: Intensidade espalhada por contribuições espúrias para os experimentos de: **a)** SAXS e **b)** WAXS.

ii) Atenuação e efeitos geométricos $A(q)$

Ambos os experimentos de WAXS e SAXS foram realizados utilizando a geometria de transmissão e, por isso, o fator de correção para atenuação é aquele exibido na equação 4.6. Porém para SAXS, aplicando as mesmas considerações descritas na seção 4.2.3.3.iii, observa-se que este coeficiente é constante para cada amostra. Os fatores de atenuação e efeitos geométricos para SAXS e WAXS são exibidos nas figuras 4.24a e b, respectivamente.

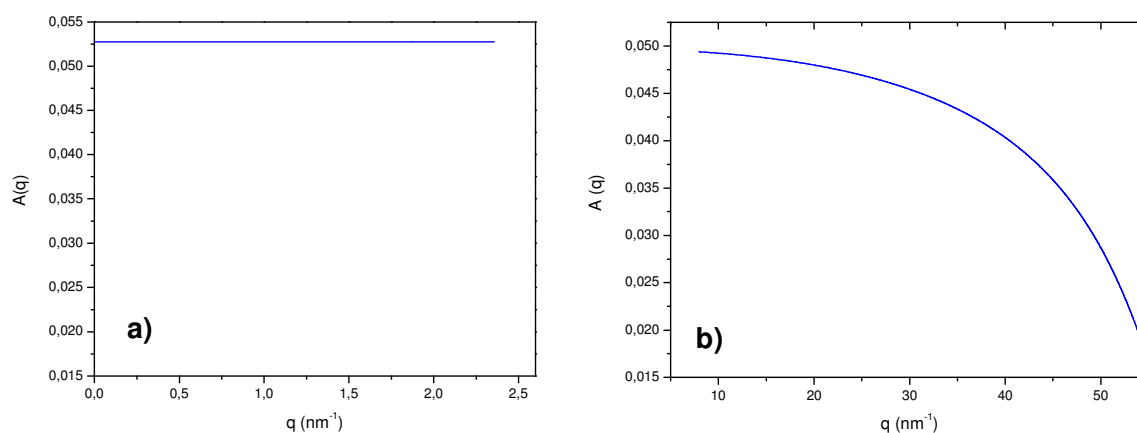


Figura 4.24: Fator de correção para atenuação e efeitos geométricos para uma amostra de tecido adiposo para os experimentos de: **a)** SAXS e **b)** WAXS.

iii) Normalização C

O fator de normalização é obtido a partir da razão entre os valores teóricos e experimentais de μ_s , na região de alto momento transferido onde efeitos de interferência moleculares podem ser desprezados (POLETTI, 2002b), conforme descrito na seção 4.2.1.3.v. Portanto apenas os perfis de espalhamento na região de WAXS foram normalizados.

iv) Incertezas

As incertezas para ambas as técnicas de SAXS e WAXS foram estimadas por propagação de erros das equações 4.9 e 4.10, sendo que as variáveis foram assumidas não correlacionadas e apenas incertezas associadas a grandezas experimentais foram levadas em conta.

Para ambos os experimentos, a incerteza estatística na contagem total dos fótons espalhados foi de aproximadamente 1,8%, enquanto a relacionada às contribuições espúrias tiveram incerteza máxima de 3% e a incerteza proveniente da variação da corrente do anel foi de 0,6% em média, sendo iguais para ambos os experimentos. Porém, a incerteza estatística associada ao fator de atenuação e efeitos geométricos foi de 1,3% e 0,6% para WAXS e SAXS respectivamente. Ainda, para WAXS a incerteza relacionada ao fator de normalização foi de 0,8%. A incerteza final resultante foi em média 7,4% para WAXS e 5,5% para SAXS.

Aplicando a equação (3.4), a incerteza estatística encontrada devido ao momento transferido, Δq , é menor que 2% no intervalo medido neste experimento.

CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

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

5.1.1. Coeficiente linear de espalhamento elástico: determinação de estruturas moleculares e sua correlação com imagens histológicas

Os coeficientes lineares de espalhamento elástico μ_s de cada tipo de tecido mamário foram obtidos através da aplicação dos procedimentos de correção e normalização, descritos no capítulo anterior, às distribuições angulares da intensidade de fótons espalhados medidos em cada experimento de WAXS. Os experimentos de WAXS foram realizados utilizando-se dois tipos de fontes de excitação (raios X e radiação síncrotron) e dois arranjos geométricos (reflexão e transmissão). A comparação entre cada configuração experimental é mostrada na figura 5.1, onde as figuras 5.1a, 5.1b e 5.1c apresentam o coeficiente linear de espalhamento elástico para amostras típicas de tecido normal adiposo, neoplasia benigna e neoplasia maligna, respectivamente. A comparação entre os perfis de espalhamento dos três tipos de tecidos estudados neste trabalho é exibida na figura 5.1d.

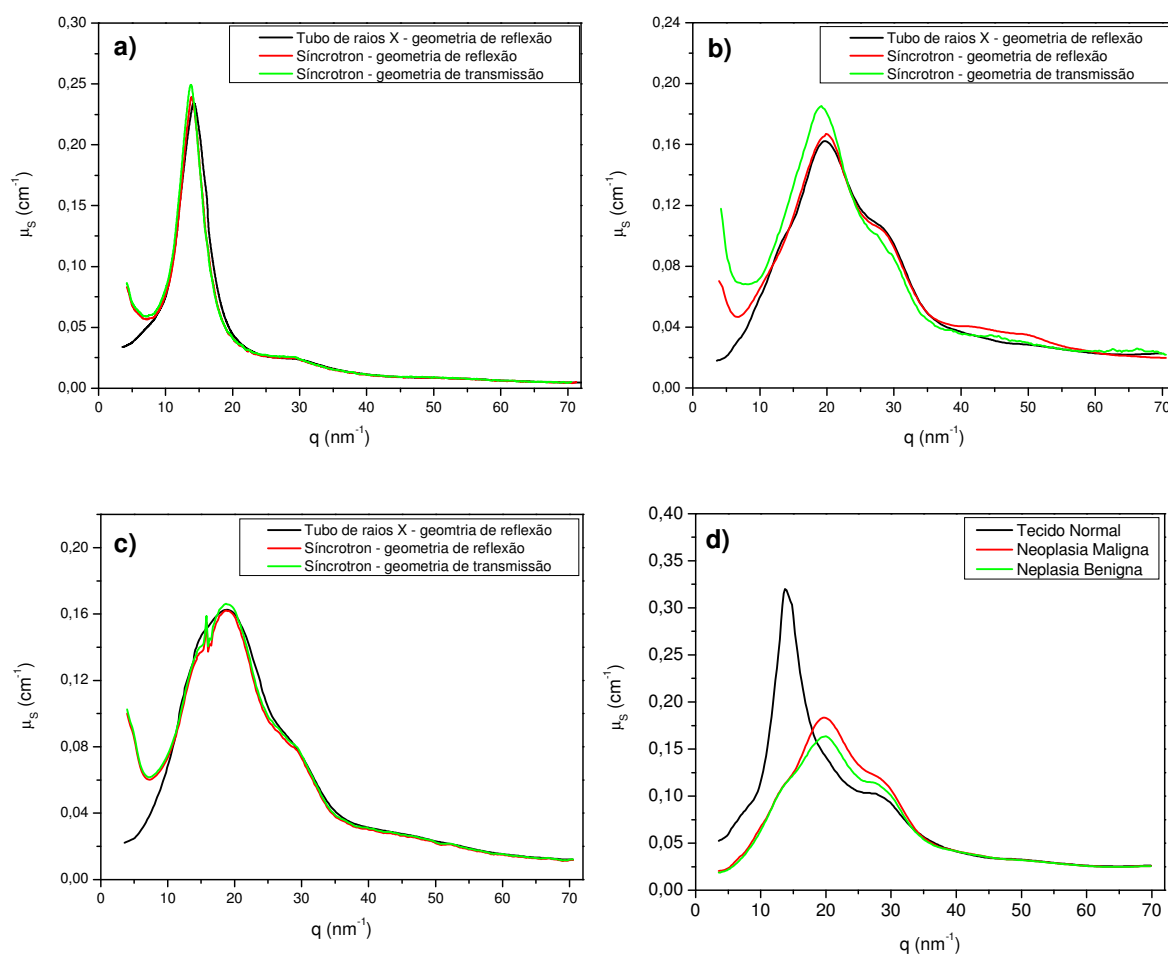


Figura 5.1: Comparação do coeficiente linear de espalhamento elástico obtido com a técnica de WAXS, utilizando diferentes configurações experimentais para: **a)** tecido normal adiposo; **b)** neoplasia benigna e **c)** neoplasia maligna. A figura **5.1d** compara o μ_s para amostras típicas de tecido mamário normal adiposo, neoplasia benigna e maligna.

Baseado nas figuras 5.1a, 5.1b e 5.1c, observa-se que o perfil de espalhamento de cada tipo de tecido possui poucos picos e com formato largo, típico de materiais amorfos, independentemente da fonte e geometria utilizadas, porém os perfis obtidos utilizando radiação síncrotron apresentam maior resolução em momento transferido que os obtidos com tubo de raios X convencional. Além disso, verifica-se que cada grupo de tecido

mamário estudado neste trabalho apresenta um perfil de espalhamento característico, figura 5.1d.

A figura 5.2 apresenta a lâmina histológica correspondente à amostra de tecido normal adiposo apresentada na figura 5.1a, onde podem ser visualizadas as células fundamentais, dos tecidos adiposos, os adipócitos (formato hexagonal na figura), cuja constituição é basicamente de triglicerídeos, os quais por sua vez são formados por uma molécula de glicerol e três de ácidos graxos, como mencionado na seção 3.1.2.

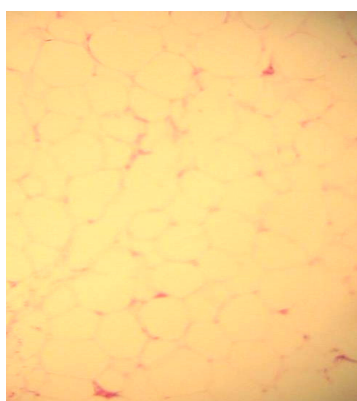


Figura 5.2: Lâmina histológica de uma amostra de tecido normal adiposo.

No correspondente perfil de espalhamento deste tecido, destaca-se a presença de um primeiro pico na posição correspondente a $q=13,9\text{nm}^{-1}$. Através da lei de Bragg (CULLITY, 1978) encontra-se que este pico está relacionado ao espalhamento construtivo de elementos que distam cerca de $4,5\text{\AA}$ entre si. Lide (1996) mostrou que a cadeia carbônica dos ácidos graxos, principais moléculas que compõem o tecido adiposo, apresenta átomos de carbono separados por uma distância de $4,5\text{\AA}$ dos respectivos vizinhos na cadeia adjacente. O outro pico presente no perfil de espalhamento dos tecidos normais adiposos está situado em $q=28,2\text{nm}^{-1}$ e pode estar associado ao espalhamento harmônico do pico de ácidos graxos. Um harmônico é definido como um múltiplo inteiro do momento transferido fundamental, especificamente neste caso, o momento transferido

fundamental é $q=13,9\text{nm}^{-1}$. Portanto, nesta região de momento transferido podemos concluir que o perfil de espalhamento medido carrega informação das estruturas relacionadas aos ácidos graxos.

As figuras 5.3 e 5.4 apresentam as lâminas histológicas correspondentes às amostras de fibroadenoma e carcinoma. Em ambas as lâminas destacam-se duas componentes teciduais principais: uma formada por fibras (componente fibrosa) e outra por ácinos (componente glandular). Cabe mencionar que os carcinomas apresentam um número maior de ácinos e maior densidade de fibras (componente fibrosa densa). Desta forma, é esperado que os perfis de espalhamento correspondentes a estas neoplasias deveriam carregar informações sobre as estruturas presentes nestas duas componentes.

Dos perfis correspondentes às amostras de fibroadenoma (fig. 5.1b) e de carcinoma (fig. 5.1.c) pode ser visto que existe uma semelhança à forma, porém diferenças em relação às intensidades. Em ambos os perfis de espalhamento está evidente a presença de um pico na posição de $q=20,1\text{nm}^{-1}$, o qual pela lei de Bragg corresponde ao espalhamento entre centros espalhadores, cuja distância entre eles é de $3,0\text{Å}$. Segundo Voet (1995) a distância entre os centros espalhadores (oxigênio-oxigênio) de duas moléculas de água adjacentes possuem distância de $3,0\text{Å}$. Além deste pico o resto do perfil apresenta uma grande similaridade com o perfil de espalhamento obtido para uma amostra da água líquida (figura 4.8). A existência de água nestes tecidos pode ser explicada pela grande quantidade de ácinos, os quais são compostos basicamente por água, como mencionado anteriormente. Desta forma, podemos concluir que nesta região de WAXS apenas o espalhamento das moléculas de água podem ser identificados ($q=20,1\text{nm}^{-1}$), uma vez que neste intervalo de momento transferido o espalhamento das fibras de colágeno é insignificante (BOHNDIEK *et al.*, 2008). Ainda, com relação aos perfis de espalhamento das neoplasias malignas utilizando radiação síncrotron,

destacamos que picos cristalinos aparecem em $q=16,8\text{nm}^{-1}$, podendo estar relacionado ao espalhamento construtivo de cristais de hidroxiapatita (FARQUHARSON e SPELLER, 1997), os quais são indicadores da presença de microcalcificações e podem estar associados à presença de câncer de mama (MORGAN *et al.*, 2005).

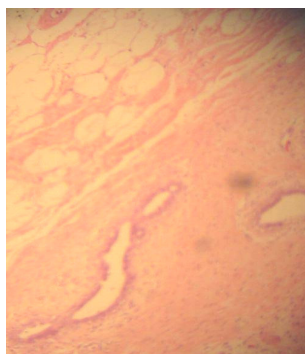


Figura 5.3: Lâmina histológica de uma amostra de fibroadenoma.

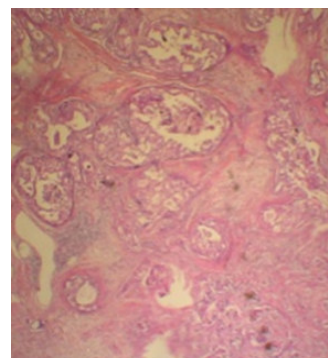


Figura 5.4: Lâmina histológica de uma amostra de carcinoma ductal invasivo.

A tabela 5.1 apresenta o resumo de alguns parâmetros podem ser extraídos dos perfis de espalhamento para cada grupo de tecido mamário analisado como: posição e intensidade média, bem como a estrutura molecular relacionada a tais picos. Cabe mencionar que a posição do pico está relacionada, através da lei de Bragg, a distância entre os centros espalhadores numa amostra. Já a intensidade do pico está diretamente relacionada à densidade de centros espalhadores presentes na amostra em estudo.

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

Tipo de Tecido	Posição do pico (nm^{-1})	Intensidade do pico (u.a.)	Estrutura Molecular
Normal adiposo	13,9±0,3	0,36±0,03	Ácidos graxos
	28,2±0,7	0,120±0,009	

Neoplasia benigna	20,1±0,5	0,148±0,009	Água
Neoplasia Maligna	20,1±0,5	0,27±0,03	Água
	16,8±0,4	0,047±0,02	Hidroxiapatita

O fato de a intensidade média do pico correspondente ao espalhamento das moléculas de água ser maior nas neoplasias malignas do que nas benignas, é devido à maior quantidade de ácinos e, portanto maior quantidade de centros espalhadores (água), existentes nas neoplasias malignas, como pode ser observado na lâmina histológica de uma amostra de carcinoma ductal invasivo, figura 5.4.

Baseado nas informações apresentadas na tabela 5.1, pode-se afirmar que os parâmetros posição e intensidade dos picos de cada estrutura molecular, identificadas através da técnica de WAXS, podem ser úteis para classificação dos diferentes tipos de tecidos mamários (GRIFFITHS *et al.*, 2007). Cabe mencionar que os resultados obtidos na experiência de WAXS utilizando um tubo de raios X foram publicados em: Oliveira *et al.* (2008)

5.1.2. Comparação com a literatura

Existem na literatura alguns trabalhos que utilizam a técnica de WAXS para caracterizar tecidos mamários em escala molecular (KIDANE *et al.* 1999, POLETTI *et al.* 2002b, RYAN *et al.* 2007), por isso é útil comparar os resultados obtidos nestes trabalhos anteriores com os alcançados neste estudo. A figura 5.5 compara o perfil de espalhamento de trabalhos prévios com este para tecido adiposo, enquanto a figura 5.6

faz esta comparação para neoplasia benigna e por fim, a figura 5.7 confronta os resultados de estudos anteriores com este para amostras de neoplasia maligna.

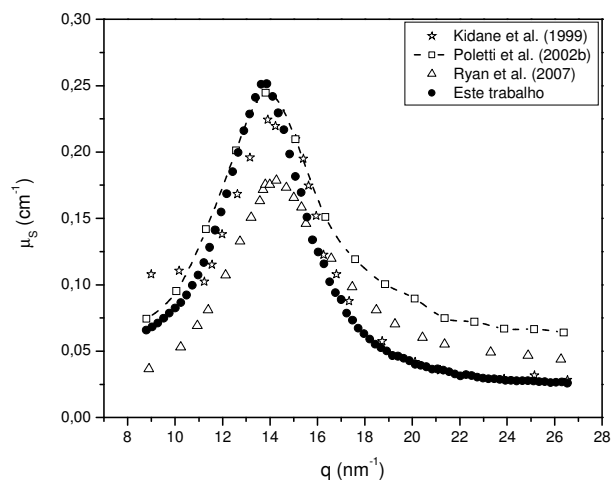


Figura 5.5: Comparação do perfil de espalhamento de tecido mamário adiposo obtido neste trabalho com outros anteriormente publicados.

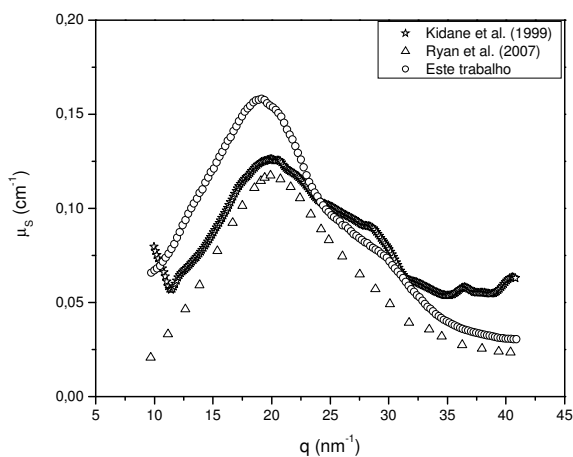


Figura 5.6: Comparação do perfil de espalhamento de uma amostra típica de fibroadenoma obtido neste trabalho com outros anteriormente publicados.

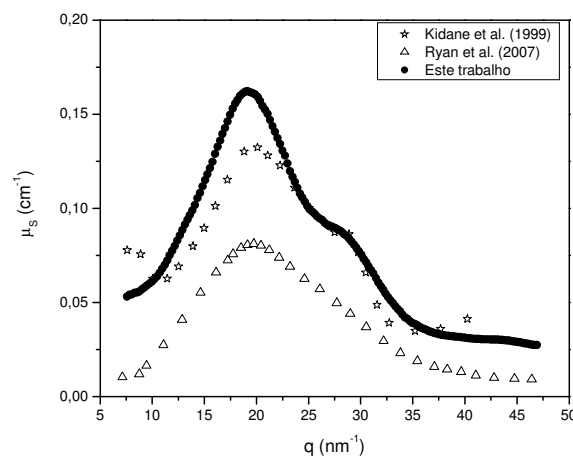


Figura 5.7: Comparação do perfil de espalhamento de uma amostra típica de carcinoma ductal invasivo obtido neste trabalho com outros anteriormente publicados.

Comparando os perfis de espalhamento de todos os grupos de tecidos mamários analisados neste trabalho com outros publicados anteriormente, observa-se concordância

com relação à posição dos picos. Porém, com relação à forma dos perfis de espalhamento e à intensidade dos picos claras diferenças podem ser notadas. Estas diferenças podem ser explicadas, principalmente, pela técnica utilizada (EDXRD) nas medidas de Kidane *et al.* (1999) e Ryan *et al.* (2007), a qual utilizava um feixe polienergético ao em vez de um feixe monoenergético, o que implica em baixa resolução em termos de momento transferido de cada experimento e a diferentes procedimentos de correção (atenuação, polarização, etc) e normalização, o que poderia induzir distorções nos perfis de espalhamentos obtidos em comparação ao que seria esperado como mostrado por Poletti (2001).

A comparação dos perfis de espalhamento de tecido mamário normal adiposo obtido neste trabalho com outros publicados anteriormente (KIDANE *et al.*, 1999, POLETTI *et al.*, 2002b, RYAN *et al.*, 2007) apresenta a mesma posição do pico (ao redor de $13,9\text{nm}^{-1}$), contudo diferenças na forma do perfil e na intensidade do pico são notadas e podem ser devido às causas mencionadas acima. Com relação à comparação dos perfis de espalhamento de um caso específico de neoplasia benigna (fibroadenoma) e maligna (carcinoma ductal invasivo) obtidos neste estudo com outros previamente reportados (KIDANE *et al.*, 1999, RYAN *et al.*, 2007), verifica-se semelhança quanto à posição do pico principal (ao redor de $20,1\text{nm}^{-1}$).

Portanto, além das posições dos picos, nenhuma outra conclusão pode ser tirada destas comparações, uma vez que as diferentes técnicas utilizadas por cada autor, descritas acima, influenciam na forma dos perfis e na intensidade dos picos.

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

5.2.1. Perfil de espalhamento: determinação de estruturas supramoleculares e sua correlação com imagens histológicas

A distribuição da intensidade espalhada em função do momento transferido (perfil de espalhamento) para amostras típicas de tecido normal, neoplasia benigna e maligna, após o tratamento dos dados e aplicação dos procedimentos de correção descritos na seção 4.2.3.3, pode ser visualizada na figura 5.8.

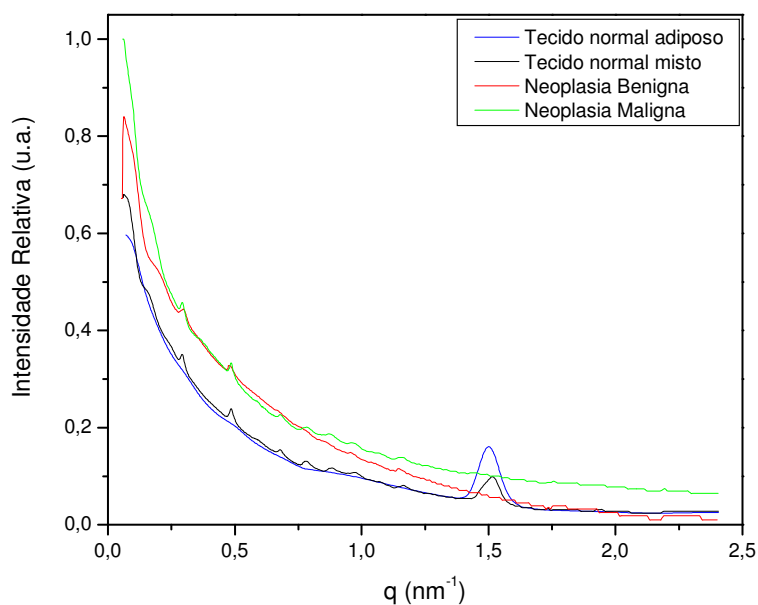


Figura 5.8: Perfil de espalhamento de amostras típicas dos três tipos de tecidos mamários estudados neste trabalho utilizando SAXS.

Dos perfis de espalhamento apresentados na figura 5.8 podem-se destacar três sinais característicos: um pico largo na posição de $q=1,5\text{nm}^{-1}$, a intensidade de fundo com decaimento exponencial, e vários picos no intervalo de momento transferido entre $0,25$ e $1,20\text{nm}^{-1}$.

Apenas os tecidos normais com componente adiposa apresentam um pico bem definido na posição de $q=1,5\text{nm}^{-1}$. Utilizando a lei de Bragg, verifica-se que este pico deve-se ao espalhamento construtivo de centros que distam $41,6\text{\AA}$. Mykhaylyk *et al.* (2007) afirmaram que a distância dos centros espalhadores de duas cadeias adjacentes de triglicerídeos é de aproximadamente $41,6\text{\AA}$. Cada triglicerídeo é formado pela união de uma molécula de glicerol e três de ácidos graxos (NELSON e COX, 2006), sendo estes últimos identificados anteriormente na região de WAXS. Dessa forma, pode-se concluir que utilizando a técnica SAXS é possível identificar os arranjos supramoleculares que compõem determinado tecido, aqui em especial para tecido adiposo, os triglicerídeos.

A intensidade da radiação espalhada de fundo está relacionada com a componente de espalhamento difuso. Existem vários modelos para explicar o comportamento desta componente em tecidos mamários (ROGERS *et al.*, 1999, WILKINSON *et al.*, 2006), entretanto, todos eles apresentam as mesmas características de decaimento exponencial como as obtidas neste trabalho. A maior intensidade de fundo ocorre nas neoplasias malignas e está relacionada à maior densidade eletrônica destes tecidos.

Por fim, a terceira característica dos perfis de espalhamento de SAXS apresentados de na figura 5.8 correspondentes ao espalhamento construtivo de estruturas, cuja distância fundamental é de 65nm . Segundo Holmes *et al.* (2001) esta distância corresponde à periodicidade axial das fibras de colágeno, cujo arranjo hierárquico é exibido na figura 5.9. Portanto, os vários picos presentes nos perfis de espalhamento dos tecidos: normal misto, neoplasia benigna e maligna, correspondem aos picos de espalhamento de ordens superiores destas estruturas fibrilares desde a 3ª ordem ($q=0,29\text{nm}^{-1}$) até a 12ª ($q=1,17\text{nm}^{-1}$). Baseado nestes picos de colágeno, verifica-se que a periodicidade axial das fibras de colágeno é ligeiramente maior nas neoplasias benignas

em comparação aos outros tipos de tecido, principalmente no pico de 3ª ordem, cuja razão pode estar relacionada a um relaxamento das ligações intermoleculares de longas cadeias, ocorrido pela perda estrutural das fibras invadidas (FERNÁNDEZ *et al.*, 2002). Ainda com relação às neoplasias benignas, nota-se que as intensidades dos picos correspondentes às fibras de colágeno são menores, fato que pode ser explicado pela utilização neste experimento de apenas amostras de fibroadenomas, os quais são formados pela proliferação do estroma intralobular que é composto basicamente de tecido conjuntivo frouxo, possuindo menor densidade de fibras, seção 3.1.3, e, portanto menor intensidade espalhada.

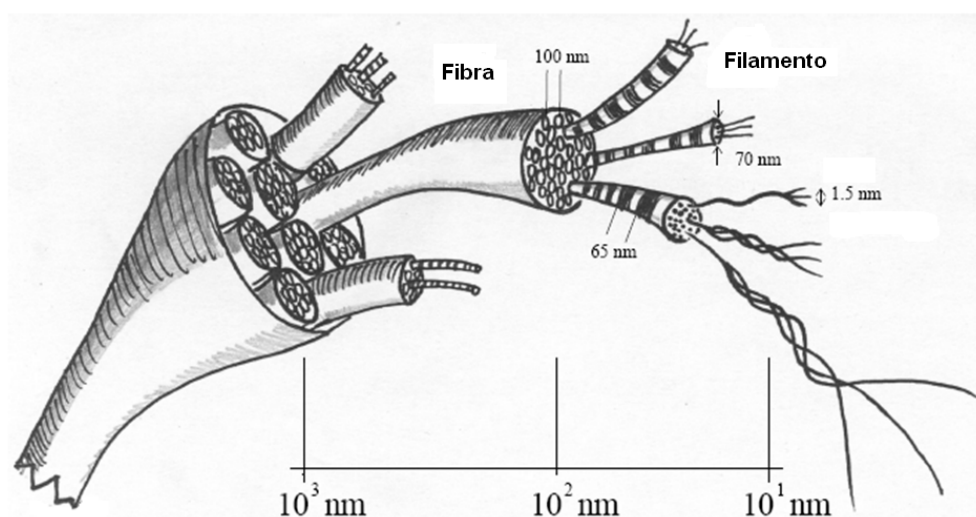


Figura 5.9: Representação esquemática do arranjo hierárquico do colágeno fibrilar de tecidos mamários, exibindo ainda seus parâmetros dimensionais.

A tabela 5.2 mostra as posições e intensidades dos picos de cada tipo de tecido analisado neste experimento, bem como as estruturas relacionadas a tais picos.

Tabela 5.2. Picos dos três tipos de tecidos mamários histologicamente classificados.

Tipo de Tecido	Posição do pico (nm⁻¹)	Intensidade do pico	Estrutura supamolecular
Tecido Normal	1,51±0,03	(270±7)x10 ⁻⁴	Triglicerídeo
	1,16±0,02	(166±4)x10 ⁻⁵	Fibras de colágeno
	1,07±0,02	(362±9)x10 ⁻⁶	Fibras de colágeno
	0,96±0,02	(113±4)x10 ⁻⁵	Fibras de colágeno
	0,87±0,02	(109±3)x10 ⁻⁵	Fibras de colágeno
	0,78±0,02	(241±6)x10 ⁻⁵	Fibras de colágeno
	0,68±0,01	(136±3)x10 ⁻⁵	Fibras de colágeno
	0,58±0,01	(298±8)x10 ⁻⁶	Fibras de colágeno
	0,49±0,01	(201±7)x10 ⁻⁵	Fibras de colágeno
	0,29±0,01	(297±7)x10 ⁻⁵	Fibras de colágeno
Neoplasia Benigna	1,16±0,02	(94±2)x10 ⁻⁴	Fibras de colágeno
	1,07±0,02	(49±1)x10 ⁻⁵	Fibras de colágeno
	0,97±0,02	(77±2)x10 ⁻⁵	Fibras de colágeno
	0,87±0,02	(47±2)x10 ⁻⁵	Fibras de colágeno
	0,78±0,02	(88±2)x10 ⁻⁵	Fibras de colágeno
	0,68±0,01	(297±7)x10 ⁻⁶	Fibras de colágeno
	0,58±0,01	(202±5)x10 ⁻⁶	Fibras de colágeno
	0,48±0,01	(201±5)x10 ⁻⁵	Fibras de colágeno
Neoplasia Maligna	0,30±0,01	(252±8)x10 ⁻⁵	Fibras de colágeno
	1,16±0,02	(145±4)x10 ⁻⁴	Fibras de colágeno
	1,07±0,02	(53±1)x10 ⁻⁵	Fibras de colágeno
	0,97±0,02	(127±3)x10 ⁻⁵	Fibras de colágeno
	0,87±0,02	(125±3)x10 ⁻⁵	Fibras de colágeno
	0,78±0,02	(253±4)x10 ⁻⁵	Fibras de colágeno

0,68±0,01	(142±3)×10 ⁻⁵	Fibras de colágeno
0,58±0,01	(316±8)×10 ⁻⁶	Fibras de colágeno
0,49±0,01	(220±6)×10 ⁻⁵	Fibras de colágeno
0,29±0,01	(301±6)×10 ⁻⁵	Fibras de colágeno

*continuação da tabela 5.2

A partir dos valores de intensidade dispostos na tabela 5.2, verifica-se que as neoplasias malignas apresentam uma maior intensidade nos picos relacionados às fibras de colágeno, isto se deve à crescente invasão das células cancerosas nas fibras e conseqüentemente maior degradação dessas fibras, fazendo com que, em contrapartida, o organismo atue na reparação destas (PUCCI-MINAFRA *et al.* 1993), o que provoca um aumento na superfície específica da fibra reparada, e, conseqüente maior intensidade espalhada (FERNÁNDEZ *et al.* 2002).

5.2.2. Comparação com a literatura

Existem na literatura poucos trabalhos que empregam a técnica de SAXS para estudo de tecidos mamários. Nesta subseção serão confrontados os resultados obtidos neste trabalho com os anteriormente publicados na literatura (FERNÁNDEZ *et al.*, 2002, ROUND *et al.*, 2005). Embora outros autores mencionem terem estudado tecidos mamários (LEWIS *ET AL.* 2000, FERNÁNDEZ *ET AL.* 2005), eles não apresentam os perfis de espalhamento medidos. Destaca-se ainda, que nenhum trabalho apresentou perfis de espalhamento para amostras de neoplasia benigna, portanto este tipo de tecido mamário não será comparado nesta subseção.

As figuras 5.10 e 5.11 apresentam as comparações dos perfis de espalhamento obtidos neste trabalho com os previamente publicados para tecido normal e neoplasia maligna.

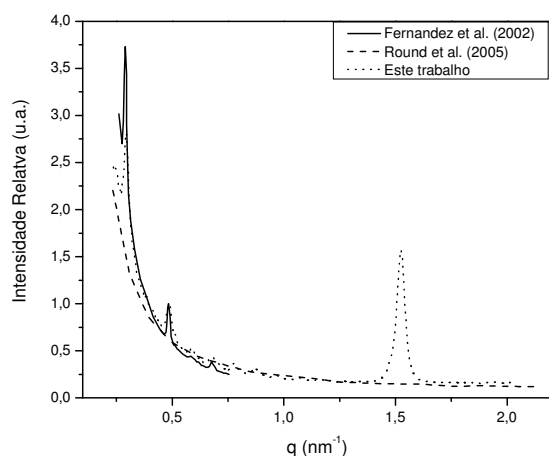


Figura 5.10: Comparação do perfil de espalhamento de uma amostra típica de tecido normal obtido neste trabalho com outros anteriormente publicados.

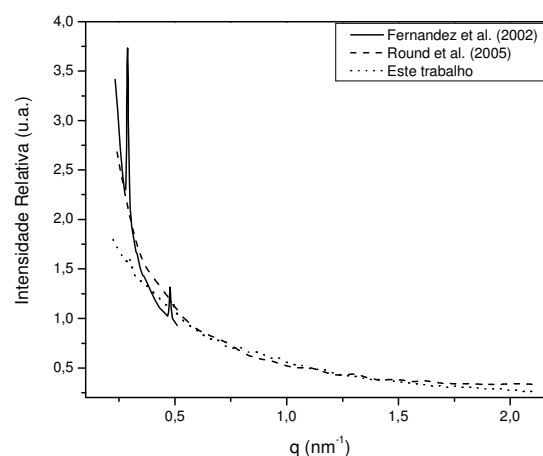


Figura 5.11: Comparação do perfil de espalhamento de uma amostra típica de neoplasia maligna obtido neste trabalho com outros anteriormente publicados.

A partir da figura 5.10 pode-se verificar a concordância dos resultados obtidos neste trabalho para uma amostra típica de tecido normal com os apresentados por Fernández *et al.* (2002), principalmente com relação à forma do perfil de espalhamento e a posição dos picos no intervalo de momento transferido concomitante entre os dois trabalhos (picos de espalhamento de fibras de colágeno da 3^a à 7^a ordem). Com relação a Round *et al.* (2005), embora se tenha o mesmo intervalo de momento transferido medido neste experimento de SAXS que o apresentado por aqueles autores, o perfil de espalhamento publicado por estes, diferentemente do obtido neste estudo, não apresenta nenhum pico de espalhamento, o que pode ser devido à baixa resolução em momento transferido e/ou deficiência nos procedimentos de correção dos seus dados experimentais.

Os perfis de espalhamento referentes à neoplasia maligna comparados na figura 5.11, apresentam concordância com relação à intensidade de fundo. Porém o perfil apresentado por Round *et al.* (2005), como para o caso de tecido normal discutido anteriormente, não apresenta picos de espalhamento das fibras de colágeno como os perfis de espalhamento obtidos neste trabalho e no de Fernández *et al.* (2002), devido novamente aos mesmos problemas citados anteriormente para tecido normal.

5.3. Combinação simultânea de WAXS e SAXS

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

5.3.1. Perfil de espalhamento: Determinação de estruturas moleculares e supramoleculares

As figuras 5.12 e 5.13 apresentam os perfis de espalhamento de amostras típicas de cada grupo de tecido mamário estudado neste trabalho para WAXS e SAXS, respectivamente.

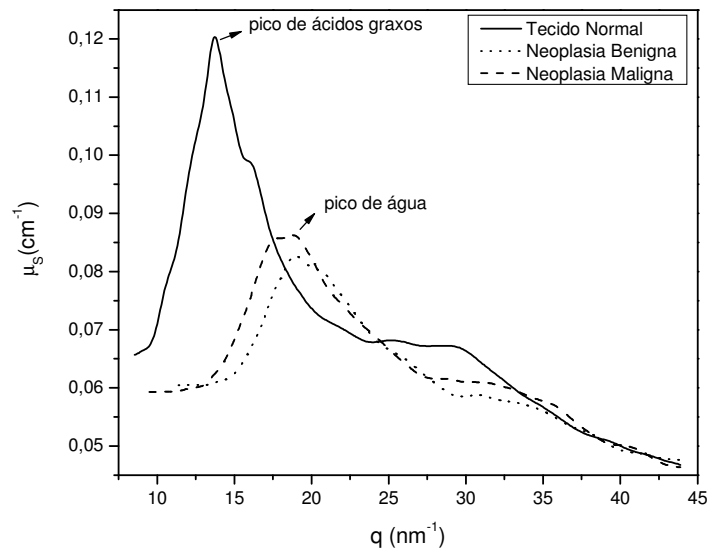


Figura 5.12: Perfil de espalhamento na região de WAXS de amostras típicas de tecido normal, neoplasia benigna e maligna.

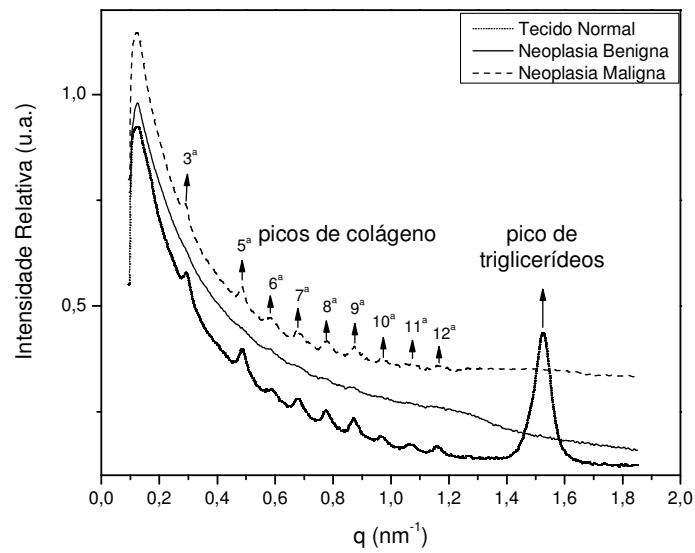


Figura 5.13: Perfil de espalhamento na região de SAXS de amostras típicas de tecido normal, neoplasia benigna e maligna.

Os perfis de espalhamento para WAXS exibidos na figura 5.12 apresentam-se semelhantes aos mostrados na seção 5.1.1, com relação à forma e posição dos picos para cada grupo de tecido mamário estudado neste trabalho. Para tecidos normais verifica-se que um pico está presente em $q=13,9\text{nm}^{-1}$, relacionado ao espalhamento de moléculas de ácidos graxos. Além disso, os perfis de espalhamento correspondentes às neoplasias, tanto benigna quanto maligna, possuem um pico característico em $q=20,1\text{nm}^{-1}$ relacionado à existência de água nestes tecidos, concordando com os resultados exibidos anteriormente.

Pode ser observado da figura 5.13 a presença de picos relacionados ao espalhamento construtivo das fibras de colágeno desde a 3ª ($q=0,29\text{nm}^{-1}$) até a 12ª ordem ($q=1,17\text{nm}^{-1}$) em todos os grupos de tecidos, bem como, variações nas intensidades destes para cada grupo de tecido mamário, conforme visto na seção 5.2.1. Além disso, para tecido normal, o pico relacionado ao arranjo de triglicerídeos também está presente ($q=1,51\text{nm}^{-1}$).

A partir da combinação simultânea das técnicas de WAXS e SAXS torna-se possível identificar ao mesmo tempo estruturas existentes nos tecidos mamários normais e neoplásicos em escala molecular e supramolecular, respectivamente. Por exemplo, com a técnica de WAXS ficou evidenciada a presença de moléculas de ácidos graxos em tecido normal, já na técnica de SAXS foi verificado a existência de triglicerídeos nestes mesmos tecidos. Por outro lado, nos tecidos neoplásicos podem ser identificadas as duas componentes teciduais principais: fibroso frouxo (benignas) ou denso (malignas) e epitelial glandular (ácinos) e, ainda, a partir das análises correlacionando as informações de ambos os perfis (WAXS e SAXS) identificar o tipo de neoplasia (Conceição *et al.* 2008c).

CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6.1. Sobre as medidas de WAXS

- Para cada tipo de experimento de espalhamento de raios X em médios ângulos (WAXS) foi desenvolvido um procedimento de correção e normalização dos dados. Em geral, as incertezas experimentais associadas aos perfis de espalhamentos obtidos variaram entre 6 e 8%. Os procedimentos de correção foram validados pela comparação do perfil de espalhamento para água obtido para cada configuração experimental com outro previamente publicado (MORIN, 1982), sendo que as diferenças entre os dois perfis foram menores que $\pm 4\%$, dentro das incertezas experimentais, significando que a metodologia é satisfatória. Além disto, os procedimentos mostraram-se sólidos uma vez que apesar das diferentes características adotadas em cada montagem experimental, os perfis de espalhamento dos tecidos mamários normais e neoplásicos corrigidos foram semelhantes quanto à forma e posição dos picos apresentando apenas algumas diferenças com relação à resolução em momento transferido.
- Os resultados obtidos mostraram que é possível a identificação de estruturas entre 1 e 10Å. Os perfis de espalhamento de tecidos normais com componente adiposa sempre apresentaram um pico em $q = 13,9 \text{ nm}^{-1}$ (TARTARI *et al.*, 1997b) relacionado ao espalhamento construtivo de moléculas de ácidos graxos (LIDE, 1996), um dos componentes do tecido adiposo. Para as neoplasias benignas e malignas surge um pico característico

em $q=19,4\text{nm}^{-1}$ (POLETTI *et al.*, 2002b) correspondente a existência de grande quantidade de água nestes tecidos (VOET, D. e VOET, J. D. 1995). Em adição, para as neoplasias benignas a quantidade de água presente é menor que nas malignas, fato este, evidenciado pela menor intensidade deste pico no perfil de espalhamento desta neoplasia em comparação à neoplasia maligna. Ainda, com relação aos perfis de espalhamento de algumas neoplasias malignas destacamos a presença de picos cristalinos relacionados ao espalhamento construtivo de cristais de hidroxiapatita (FARQUHARSON e SPELLER, 1997). Portanto, pode-se concluir que a técnica de WAXS pode ser utilizada para determinar as estruturas moleculares que compõem um tecido biológico, particularmente, tecido mamário

6.2. Sobre as medidas de SAXS

- As medidas de espalhamento de raios X em baixo ângulo foram realizadas na linha D11A-SAXS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) utilizando duas distâncias da amostra ao detector bidimensional (CCD) de alta resolução, o que permitiu estender o intervalo de momento transferido medido. O procedimento para tratamento dos dados foi elaborado especialmente para este tipo de experimento e apresentou uma incerteza final associada de aproximadamente 6% e a validação deste, foi obtida pela comparação do perfil de espalhamento de uma amostra padrão de Silver Behenate deste trabalho com outro reportado anteriormente (HUANG *et al.*, 1993), resultando em uma diferença relativa de 4%, dentro das incertezas experimentais.

- Através da análise e interpretação dos perfis de espalhamento dos diferentes grupos de tecidos mamários estudados neste trabalho foi possível a identificação de estruturas de tamanhos maiores que 10Å, como por exemplo, fibras de colágeno e triglicerídeos. Foi verificado para todos os grupos com alguma componente fibrosa a presença de picos de espalhamento desde a 3ª ($q=0,29\text{nm}^{-1}$) até a 12ª ordem ($q=1,17\text{nm}^{-1}$) de estruturas com parâmetro de ordem de 65 nm (relacionados às fibras de colágeno). As neoplasias benignas analisadas neste experimento eram do tipo fibroadenoma, por isso apresentavam menor intensidade nos picos correspondentes às fibras de colágeno, uma vez que este tipo de neoplasia possui menor quantidade de tecido conjuntivo fibroso. Com relação às neoplasias malignas foi observado que estas possuem maior intensidade, fato que comprova o resultado de trabalhos anteriores (FERNÁNDEZ *et al.*, 2002, 2004) que relacionam esta característica a reação do organismo em reparar as fibras de colágeno invadidas pelo câncer (PUCCI-MINAFRA *et al.*, 1993), aumentando a superfície específica destas e, conseqüentemente a intensidade espalhada. Além disso, as amostras de tecido normal com alguma componente adiposa apresentavam um pico em $q=1,51\text{nm}^{-1}$ correspondendo ao espalhamento de arranjos de triglicerídeos (MYKHAYLYK *et al.*, 2007). Portanto, pode-se concluir que a aplicação da técnica de SAXS em um tecido biológico, particularmente, em tecido mamário, pode ser utilizada para determinar as estruturas supramoleculares compõem estes tecidos.

6.3. Sobre a combinação de WAXS e SAXS

- Os resultados preliminares indicam que a combinação das técnicas de WAXS e SAXS permite correlacionar alterações em nível atômico e molecular com as ocorridas em escala supramolecular, como por exemplo, correlacionar modificações estruturais nas componentes fibrosas ou epiteliais glandulares. Embora, ainda seja necessária a realização de medidas complementares, as evidências encontradas até o presente momento sugerem a possibilidade da utilização simultânea de ambas as técnicas como potenciais ferramentas de diagnóstico de câncer de mama (Conceição *et al.*, 2008).

6.4. Perspectivas

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

- Medir o perfil de espalhamento nas regiões de WAXS e SAXS de uma maior quantidade de tecidos mamários (normais e neoplásicos) procurando englobar a maioria das neoplasias benignas e malignas encontradas clinicamente, bem como verificar se o modo de preparação das amostras pode interferir nos perfis medidos.
- Realizar medidas no intervalo de momento transferido entre $q=2,2\text{nm}^{-1}$ e $q=5,1\text{nm}^{-1}$ para verificar se existem estruturas ainda não identificadas, bem como para se ter medidas em uma região que permite unir os perfis de

espalhamento obtidos em WAXS com os de SAXS, mostrando todas as estruturas existentes nos tecidos mamários normais e neoplásicos.

- Os resultados preliminares obtidos da combinação simultânea das técnicas de WAXS e SAXS sugerem a possibilidade de utilização desta combinação como ferramenta de diagnóstico do câncer de mama. Por isso, seria interessante tentar decompor o perfil de espalhamento em contribuições de vários componentes e, a partir disso, elaborar um modelo de diagnóstico.

Referências

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

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

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

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

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

BLOOM H. J. G. e RICHARDSON, W. W. Histological grading and prognosis in breast cancer. A study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. **British Journal of Cancer** 11 (3): 359-377, 1957.

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

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

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

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

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

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

CONCEIÇÃO, A. L. C., CUNHA, D. M., OLIVEIRA, O. R., PELA, C. A., GONCALVES, O. D., POLETTI, M. E. Identification of neoplastic human breast tissue using commercial powder diffractometers. 10th International Symposium on Radiation Physics and Workshop on use of Monte Carlo Techniques for Design and Analysis of Radiation Detectors, Coimbra, Portugal. **Book of Abstract**, 14 – 14, 2006.

CONCEIÇÃO, A. L. C., ANTONIASSI, M., POLETTI, M. E. Application of x-ray diffraction in the identification of neoplastic human breast tissues. 17^a Reunião Anual de Usuários do LNLS, 2007, Campinas. **Resumos de Trabalhos Científicos**, 112 – 112, 2007a.

CONCEIÇÃO, A. L. C., ANTONIASSI, M., POLETTI, M. E. Diferenças estruturais entre tecidos mamários normais e neoplásicos através de imagens de SAXS. 37^a Jornada Paulista de

Radiologia, São Paulo. Sociedade Paulista de Radiologia e Diagnóstico por Imagem. **Revista da Imagem**, (29): 93 – 94, 2007b.

CONCEIÇÃO, A. L. C., ANTONIASSI, M., POLETTI, M. E. Caracterização de tecidos mamários através de espalhamento de raios-X a baixo ângulo. XII Congresso Brasileiro de Física Médica, 2007, Foz do Iguaçu. Associação Brasileira de Física Médica. **Proceedings XII Congresso Brasileiro de Física Médica**, 2007c.

CONCEIÇÃO, A. L. C., ANTONIASSI, M., POLETTI, M. E. Estudo de diferentes métodos na determinação dos perfis de espalhamento de tecidos mamários normais e neoplásicos. XIII Congresso Brasileiro de Física Médica, Belo Horizonte. **Proceedings XIII Congresso Brasileiro de Física Médica**, 2008a.

CONCEIÇÃO, A. L. C., GIACOMETTI, T. R., POLETTI, M. E. Analysis of breast tissues (normal and neoplastic) by Small Angle X-ray Scattering. 18ª Reunião Anual dos Usuários do LNLS, 2008, Campinas. **Resumos de Trabalhos Científicos da 18ª RAU**, 30 – 30, 2008b.

CONCEIÇÃO, A. L. C., ANTONIASSI, M., POLETTI, M. E., CALDAS, L. V. Preliminary study of human breast tissue using synchrotron radiation combining WAXS and SAXS techniques. *Submetido à Applied Radiation and Isotopes*. 2008c.

COTRAN, R. S., KUMAR, V. e ROBBINS, S. L. **Pathologic Basis of Disease**. W. B. Saunders Company, 4 ed., 1989.

CULLITY, B. D. Elements of x-ray diffraction. Addison-wesley publishing company, Massachussets, 1978.

CUNHA, D. M., OLIVEIRA, O. R., PÉREZ, C. A. E POLETTI, M. E. X-ray scattering profiles of some normal and malignant human breast tissue. **X-ray Spectrometry** 35: 370-374, 2006.

DÂNGELO, J. G. e FATTINI, C. A. **Anatomia Humana Sistêmica e Segmentar**. 2ª Ed. São Paulo, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto, Belo Horizonte. Atheneu, 2003.

DEBYE, P. Scattering from non-crystalline Substances. **Annals of Physics** 46: 809-823, 1915.

DUKE, P. J. **Synchrotron Radiation. Production and Properties**. No. 3 in Oxford Series on Synchrotron Radiation. Oxford University Press, New York, 2000.

EVANS, S.H., BRADLEY, D., DANCE, D.R., BATERMAN, J.E. e JONES, C.H. Measurements of small-angle photon scattering for some breast tissues and tissue substitute materials. **Physics in Medicine and Biology** 36 (1): 7-18, 1991.

FARQUHARSON, M. J. e SPELLER, R. D. Measuring bone mineral density in archaeological bone using energy dispersive low angle x-ray scattering techniques. **Journal of Archaeological Science** 24: 765-772, 1997.

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

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

FERNÁNDEZ, M., KEYRILÄINEN, J., SERIMAA, R., TORKKELI, M., KARJALAINEN-LINDSBERG,

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

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

GONÇALVES, O. D. e MAGALHÃES, S. D. Accurate Rayleigh differential cross-sections for 60 keV photons. The Ag case. **Radiation Physics and Chemistry** 59: 201-209, 2000.

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

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

HAUS A. G. e CULLINAN J. E. Record in the Image - **A History of the Radiological Sciences** Ed. McClennan B.L. Radiology Centennial, INC. Reston, VA, 1996.

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

<http://www.esrf.eu/computing/scientific/FIT2D/>. European Synchrotron Radiation Facility. Acesso em 01/06/2008.

<http://www.inls.br>. Laboratório Nacional de Luz Síncrotron. Acesso: 01/06/2008.

<http://www.who.int/cancer>. World Health Organization - Cancer. Acesso em 13/05/2008.

HUANG, T. C., TORAYA, H., BLANTON, T. N. e WU, Y. X-ray Powder Diffraction Analysis of Silver Behenate, a Possible Low-Angle Diffraction Standard. **Journal of Applied Crystallography** 26: 180-184, 1993.

HUBBEL, J. H., VEIGELE, E. A., BRIGGS, E. A. BROWN, D. T. CROMER, D. T. e HOWERTON, R. J. Atomic Form Factors, Incoherent Scattering Functions and Photon Scattering Cross Sections. **Journal of Physical and Chemical Reference Data** 4 (3): 471-538, 1975.

HUKINS, D. W. L. **X-ray Diffraction by Disordered and Ordered Systems**. Pergamon, Oxford, 1981.

HULMES, D. J. S., WESS, T. J., PROCKOP, D. J. e FRATZT, P. Radial packing order and disorder in collagen fibrils. **Biophysics Journal** 68: 1661-1670, 1995.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Estimativa 2008 – Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2007.

JAMES, R.W. **The optical Principle of the Diffraction of X-ray**. London: Bell, 1962.

JOHNS, H. E. e CUNNINGHAM, J. R. **The Physics of Radiology**. Springfield: Charles C. Thomas, 1983.

JOHNS, P. C. e YAFFE, M. J. Coherent scatter in diagnostic radiology. **Medical Physics** 10 (1): 40-50.

JUNQUEIRA, L. C. e CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10^a Ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara, 2004.

KANE, P. P., KISSEL, L., PRATT, R. H. e ROY, G. J. Elastic scattering of γ -ray and x-ray by atoms. **Physics Reports** 140 (2): 75-159, 1985.

KIDANE, G., SPELLER, R.D., ROYLE, G.J. e HANBTY, A.M. X-ray scatter signatures for normal and neoplastic breast tissues. **Physics in Medicine and Biology** 44: 1791-1802, 1999.

KLUG, H. P. e ALEXANDER, L. E. **X-ray Diffraction Procedures for Polycrystalline and Amorphous Materials**. 2nd Ed. John Wiley & Sons. New York, 1974.

KOCH, H. A., AZEVEDO, C. M., BOECHAT, A. L., CANELLA, E., DUARTE, D. L., PERREIRA, R., KALAF, J. M., LAMAS, J., LOPES, E. R., MARANHÃO, N., PEIXOTO, J. E., SANTOS, R. P. Radiologia da mama - qualidade em mamografia. **Radiologia Brasileira** 29 (5): 257-269, 1996.

KOSANETZKY, J., KNOERR, B., HARDING, G. e NEITZEL, U. X-ray diffraction measurements of some plastic materials and body tissues. **Medical Physics** 14 (4): 526-532, 1987.

LEWIS, R. A., ROGERS, K. D., HALL, C. J., TOWNS-ANDREWS, E., SLAWSON, S., EVANS, A., PINDER, S. E., ELLIS, I. O., BOGGIS, C. R. M., HUFTON, A. P. e DANCE, D. R. Breast cancer diagnosis using scattered X-rays. **Journal of Synchrotron Radiation** 7: 348-352, 2000.

LIDE, R.D. **CRC Handbook of Chemistry and Physics**. 77th edition (Boca Raton, FL: Chemical Rubber Company), 1996.

MAGALHÃES, S. D., EICHLER, J. e GONÇALVES, O. D. Calculation of x-ray scattering of 17.4 keV radiation and image degradation in mammography. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B** 95: 87-90, 1995.

MICHAELSON, J. S., SILVERSTEIN, M., WYATT, J., WEBER, G., MOORE, R., HALPERN, E., KOPANS, D. B. e HUGHES, K. Predicting the survival of patients with breast carcinoma using tumor size. **Cancer** 95 (4): 713-723, 2002.

MILBERG, M. E. Transparency Factor for weakly absorbing samples in X-Ray Diffractometry, **Journal of Applied Physics** 29 (1): 64-65, 1958.

MORGAN, M. P. COOKE, M. M. e MCCARTHY, G. M. Microcalcifications associated with breast cancer: an epiphenomenon or biologically significant feature of selected tumors? **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia** 10: 181-187, 2005.

MORIN, L. R. M. Molecular Form Factors and Photon Coherent Scattering Cross Sections of Water. **Journal of Physical and Chemical Reference Data** 11 (4): 1091-1098, 1982.

MUSHLIN, A. I., KOUIDES, R. W. e SHAPIRO, D. E. Estimating the accuracy of screening mammography A meta-analysis. **American Journal of Preventive Medicine** 14 (2): 143-153, 1998.

MYKHAYLYK, O. O., SMITH, K. W., MARTIN, C. M. E RYAN, A. J. Structural models of metastable phases occurring during the crystallization process of saturated/unsaturated triacylglycerols. **Journal of Applied Crystallography** 40: 297-302, 2007.

NARTEN, A. H. e LEVY, H. A. Liquid Water: Molecular Correlation Functions from X-Ray Diffraction. **The Journal of Chemical Physics** 55 (5): 2263-2269, 1971.

NELSON, D. L. e COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 4^a edição, Sarvier, São Paulo,

2006.

NETTER, F. H. **Atlas de anatomia humana**. 3ª Ed. University of Rochester School of Medicine and Dentistry Rochester New York: Artmed, 2004.

NHSBSP Publication 58. **Pathologic Reporting of Breast Cancer**. The Royal College of Pathologists. London, 2005.

OLIVEIRA, O. R. **Determinação experimental dos perfis de espalhamento de tecidos mamários (normais e alterados) e sua potencialidade como ferramenta de diagnóstico**. 2006. 78 f. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada à Medicina e Biologia) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

OLIVEIRA, O. R., CONCEIÇÃO, A. L. C., CUNHA, D. M., POLETTI, M. E. e PELÁ, C. A. Identification of neoplasias of breast tissue using a commercial powder diffractometer. **Journal of Radiation Research** (*In press*). 2008

PARKIN, D. M, BRAY, F. I. e DEVESSA, S. S. Cancer burden in the year 2000 the global picture. **European Journal of Cancer** 37 (8): 4-66, 2001.

PEPLOW, D.E. e VERGHESE, K. Measured molecular coherent scattering form factors of animal tissues, plastics and human breast tissue. **Physics in Medicine and Biology** 43: 2431-2452, 1998.

POLETTI M.E. **Análise do contraste, dose e desempenho de uma grade relacionada ao espalhamento na imagem mamográfica**. 1997. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada à Medicina e Biologia) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1997a.

POLETTI, M.E., ALMEIDA, A., REZENTES, P.S., JUNCK, K.L. e BARNES, G.T. Performance of Mammographic grid. **Physica Medica** 13: 144-147, 1997b.

POLETTI M.E. **Estudo do Espalhamento de Fótons (6,94, 17,44 e 59,54 keV) em Tecidos Mamários, Materiais Equivalentes e sua Influência em Mamografia**. 2001. 91 f. Tese (Doutorado em Física) – Instituto de Física, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

POLETTI, M.E., GONÇALVES, O.D. e MAZZARO, I. Coherent and incoherent-scattering of 17.44 and 6.93 keV X-ray photons scattered from biological and biological-equivalent samples: characterization of tissues. **X-ray Spectrometry** 31: 57-61, 2002a.

POLETTI, M.E., GONÇALVES, O.D. e MAZZARO, I. X-Ray Scattering from Human Breast Tissues and Breast-Equivalent Materials. **Physics in Medicine and Biology** 47: 47-63, 2002b.

POLETTI, M.E., GONÇALVES, O. D., SCHECHTER, H. e MAZZARO, I. Precise evaluation of elastic differential scattering cross-sections and their uncertainties in X-ray scattering experiments. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B** 187: 437-446, 2002c.

POLETTI, M. E., GONÇALVEZ, O. D. e MAZZARO, I. Measurements of X-ray scatter signatures for some tissue-equivalent materials. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B** 213: 595-598, 2004.

PUCCI-MINAFRA, I., LUPARELLO, C., ANDRIOLO, M., BASIRICÒ, L., AQUINO, A., MINAFRA, S. A new form of tumor and fetal collagen that binds laminin. **Biochemistry** 32: 7421-7427, 1993.

ROGERS, K. D., LEWIS, R. A., HALL, C., TOWBS-ANDREWS, E., SLAWSON, S., EVANS, A., PINDER, S., ELLIS, I., BOGGIS, C. e HUFTON, A. Preliminary observations of breast tumor collagen. **Synchrotron Radiation News** 12 (1): 15-20, 1999.

ROUND, A.R., WILKINSON, S.J., HALL, C.J., ROGERS, K. D., GLATTER, O. WESS, T. e ELLIS, I. O. A preliminary study of breast cancer diagnosis using laboratory based small angle X-ray scattering. **Physics in Medicine and Biology** 50: 4159-4168, 2005.

RYAN, E. A. e FARQUHARSON, M. J. Breast tissue classification using scattering measurements and multivariate data analysis. **Physics in Medicine and Biology** 52: 6679-6696, 2007.

SEIDMAN, H., STELLMAN, S. D. e MUSHINSKI, M. H. A different perspective on breast cancer risk factors: some implications of the nonattributable risk. **CA: A Cancer Journal for Clinicians** 32 (5): 301-313, 1982.

SOUHAMI, R. e TOBIAS, J. **Cancer and Its Management** (London: Blackwell Science Ltd), 1998.

SPELLER, R. D. Tissue analysis using x-ray scattering. **X-ray Spectrometry** 28: 244-250, 1999.

STRID K. Analysis of secondary screening with special reference to grids for abdominal radiography. **Acta Radiológica Supplementum** 351: 1-113, 1976

TARTARI, A., CASNATI, E., BONIFAZZI, C. e BARALDI, C. Molecular differential cross sections for x-ray coherent scattering in fat and polymethyl methacrylate. **Physics in Medicine and Biology** 42: 2551-2560, 1997a.

TARTARI, A., CASNATI, E. e BONIFAZZI, C., E. Photon Scattering by Compounds: an Assesment of the Validity of the Independent Atomic Model Approximation. **X-ray Spectrometry** 26: 169-173, 1997b.

TARTARI, A., BONIFAZZI, C., BARALDI, C. e CASNATI, E. Photon cross-sections data from X-Ray Diffraction Pattern Measurements: correction procedure evaluations. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B** 142: 203-209, 1998.

TARTARI, A. Molecular differential cross-sections for low angle photon scattering in tissues. **Radiation Physics and Chemistry** 56: 205-211, 1999.

TARTARI, A., BONIFAZZI, C., FERNANDEZ, J. E., BASTIANO, M., CASNATI, E., BARALDI, C. e DOMENICO, G. D. Molecular coherent scattering data for tissue in photon transport monte carlo codes. **Applied Radiation and Isotopes** 53: 901-906, 2000.

TARTARI, A., TAIBI, A., BONIFAZZI, C. e BARALDI, C. Updating of form factor tabulations for coherent scattering of photons in tissues. **Physics in Medicine and Biology** 47: 163-175, 2002.

TARTARI, A., TAIBI, A., BONIFAZZI, C., GAMBACCINI, M. e FELICI, M. Updating of x-ray coherent scattering cross-sections and their effects in microbeam and material analysis applications. **X-ray Spectrometry** 34: 421-425, 2005.

THOMSON, J.J. **Conduction Electricity Through Gases**. Cambridge, C.U.P., 1906.

VOET, D. e VOET, J. G. **Biochemistry**. John Wiley, N.Y., 1995.

WESS, T. J., HAMMERSLEY, A. P., WESS, L. e MILLER, A. Molecular packing of type I collagen in tendon. **Journal of Molecular Biology** 275: 255-267, 1998.

WILKINSON, S. J. e HUKINS, D. W. L. Determination of collagen fibril structure and orientation in connective tissues by x-ray diffraction. **Radiation Physics and Chemistry** 56: 197-204, 1999.

WILKINSON, S. J., ROGERS, K. D.e HALL, C. J. Model fitting in two dimensions small angle diffraction patterns from soft tissue. **Physics in Medicine and Biology** 51: 1819-1830, 2006.

WINCHESTER, D. J., e WINCHESTER, D. P. **Atlas of Clinical Oncology: Breast Cancer**. American Cancer Society. Ontario, Canada, 2000.