

**AValiação dos efeitos de quimioterápicos em fêmures de ratas
Wistar usando SR- μ XRF**

Arisa Pickler Oliveira

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Nuclear, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Nuclear.

Orientador(es): Delson Braz

Regina Cely Rodrigues Barroso

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2015

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE QUIMIOTERÁPICOS EM FÊMURES DE RATAS
WISTAR USANDO SR- μ XRF

Arissa Pickler Oliveira

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUO ALBERTO
LUIZ COIMBRA PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE)
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA NUCLEAR.

Examinada por:

Prof. Delson Braz, D.Sc

Prof. Regina Cely Rodrigues Barroso, D.Sc

Prof. Ademir Xavier da Silva, D.Sc

Dra. Carla Lemos da Silva Mota, D.Sc

Prof. Carlos Eduardo Veloso de Almeida, Ph.D

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL
FEVEREIRO DE 2015

Oliveira, Arissa Pickler

Avaliação dos efeitos de quimioterápicos em fêmures de ratas Wistar usando SR- μ XRF / Arissa Pickler Oliveira – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2015.

XII, 73 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador(es): Delson Braz

Regina Cely Rodrigues Barroso

Dissertação (Mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Nuclear, 2015.

Referências Bibliográficas: p. 49-55

1. Quimioterápicos. 2. SR- μ XRF. I. Braz, Delson *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Nuclear. III. Título

Aos meus pais, Arilza e Henrique.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, por ter me dado força e determinação para conseguir conquistar meus objetivos.

À minha mãe, minha rainha e meu exemplo de vida. Sem ela ao meu lado nada seria possível.

À professora Regina Cely, pela sua orientação e principalmente pela amizade e carinho durante todo esse trabalho.

Ao professor Delson Braz, por me orientar e me proporcionar esse momento único da minha vida.

Aos amigos do Laboratório de Física Médica da UERJ, que se tornaram uma segunda família, principalmente Deda e Carlinha, que estavam sempre ao meu lado me ajudando e ensinando tudo, no trabalho e também na vida! Tornaram-se verdadeiras irmãs pra mim.

A toda a minha família, que me apoiou sempre em todas as fases da minha vida.

Ao meu namorado Bruno, meu amor e companheiro.

Ao Laboratório de Ciências Radiológicas da UERJ, em especial ao professor Carlos Eduardo e à Camila. Sem eles o trabalho não seria possível.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, pela realização das medidas.

E a CAPES e Faperj, pelo auxílio financeiro.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.).

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE QUIMIOTERÁPICOS EM FÊMURES DE RATAS
WISTAR USANDO SR- μ XRF

Arissa Pickler Oliveira

Fevereiro/2015

Orientadores: Delson Braz

Regina Cely Rodrigues Barroso

Programa: Engenharia Nuclear

O câncer de mama é a segunda neoplasia mais incidente na população feminina. Existem três formas principais de tratamento do câncer: quimioterapia, radioterapia e cirurgia. A quimioterapia tem se tornado uma das mais importantes e promissoras maneiras de combater o câncer. Um dos efeitos colaterais causados por quimioterápicos é a indução de amenorreia em mulheres na pré-menopausa, que pode ser temporária ou não, com uma consequente diminuição na produção de estrogênio. Estudos mostram que mulheres na pré-menopausa submetidas à quimioterapia para o tratamento do câncer de mama têm uma significativa perda de massa óssea no primeiro ano após o início do tratamento, especialmente no fêmur. Nos últimos anos novas técnicas para análise da matriz óssea têm sido desenvolvidas, uma delas, é a fluorescência de raios X (XRF). A microfluorescência de raios X (μ -XRF) é uma variante da XRF que possibilita o mapeamento e quantificação de diferentes elementos presentes na amostra. O objetivo deste trabalho foi avaliar as mudanças elementares no fêmur de ratas submetidas a dois regimes de quimioterapia utilizados para o tratamento de câncer de mama. Para isso foram utilizadas 20 ratas da linhagem *Wistar*, clinicamente sadias, divididas em 4 grupos: Controle, tratado com ciclofosfamida e doxorubicina, tratado com ciclofosfamida e docetaxel, e ratas ovariectomizadas. Os resultados obtidos mostraram uma diminuição de elementos importantes para a saúde do osso quando comparados os grupos tratados com quimioterápicos com o grupo controle.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.).

EVALUATION OF EFFECTS OF CHEMOTHERAPY DRUGS IN FEMUR OF
WISTAR RATS USING SR- μ XRF

Arissa Pickler Oliveira

February/2015

Advisors: Delson Braz

Regina Cely Rodrigues Barroso

Department: Nuclear Engineering

Breast cancer is one of the most common cancers in woman. There are three main types for cancer treatment: chemotherapy, radiotherapy and surgery. Chemotherapy has become one of the most important and promising ways to treat cancer. One of the side effects caused by some chemotherapy drugs is the induction of amenorrhea, temporary or not, in premenopausal women, with consequent decreased production of estrogen. Premenopausal women undergoing chemotherapy for treatment of breast cancer have significant bone loss from the first year after initiation of treatment, especially at the femur. In recent years, new techniques for analysis of bone matrix have been developed. One of the techniques used for this type of analysis is the X-ray Fluorescence (XRF). The X-ray Microfluorescence (μ -XRF) is a variant of XRF that allows to map the elemental concentrations. The aim of this work was evaluate the elemental changes in femur head of rats subjected a chemotherapy regimens used in the breast cancer treatment. For this study were used 20 *Wistar* female rats, clinically healthy, divided in 4 groups: control, treated with cyclophosphamide and doxorubicin, treated with cyclophosphamide and docetaxel and ovariectomized. The results showed a significant decrease of important elements for bone health when comparing the groups treated with chemotherapy with the control group.

ÍNDICE

CAPÍTULO I	1
1. INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO II	4
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	4
2.1. Câncer	4
2.1.1. Formação do câncer	4
2.2. Câncer de mama	5
2.3. Principais tratamentos para o câncer de mama	5
2.3.1. Cirurgia	6
2.3.2. Radioterapia	6
2.3.3. Quimioterapia.....	6
2.4. Quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer de mama	7
2.5. Efeitos secundários da quimioterapia	9
2.6. Fluorescência de raios X.....	10
2.6.1. Energia de corte de absorção.....	13
2.6.2. Rendimento da fluorescência	13
2.7. Quantificação por fluorescência de raios X	15
2.7.1. Equação fundamental.....	16
2.8. Microfluorescência de raios X	22
2.9. Radiação Síncrotron	23
2.10. Tecido ósseo.....	25
CAPÍTULO III	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Protocolo experimental.....	27
3.1.1. Animais	27
3.1.2. Administração dos poliquimioterápicos	28
3.1.3. Ovariectomia	28
3.2. Preparação das amostras para análise por μ XRF	28
3.3. Instrumentação	29
CAPÍTULO IV	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
4.1. Análise por SR- μ XRF.....	32
4.1.1. Análise dos mapas de distribuição elementar	32
4.1.2. Análise estatística dos resultados	41
CAPÍTULO V	47
5. CONCLUSÕES	47

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXO A.....	56
A.1. Metodologia para o cálculo da concentração usando PyMca [®]	57
A.1.1. PyMca [®]	58
ANEXO B.....	69
B.1. Análise de variância.....	70
B.1.1 Teste de Tukey para comparação das médias.	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 – Diferença entre tipos de neoplasias [INCA, 2011].	4
Figura 2.2 – Ilustração da emissão de raio X característico entre as camadas K e L.	10
Figura 2.3 – Esquema básico da espectroscopia de raios X.....	12
Figura 2.4 – Energia de ligação ou corte de absorção nos níveis K, L e M em função do número atômico [NASCIMENTO, 1999].....	13
Figura 2.5 – Ilustração da emissão de um elétron Auger entre as camadas K e L	14
Figura 2.6 – Rendimento da fluorescência das camadas K, L e M em função do número atômico (Z) [NASCIMENTO, 1999].....	15
Figura 2.7 – Representação esquemática da geometria de excitação para feixe monoenergético em fluorescência de raios X.....	16
Figura 2.8 – Exemplo de matriz utilizada para a análise por μ XRF em uma amostra da cabeça do fêmur de rata <i>Wistar</i>	22
Figura 2.9 – Esquema simplificado da análise por μ XRF. [MELO JÚNIOR, 2007].....	23
Figura 2.10 – Esquema de um acelerador síncrotron: (1) fonte de elétrons, (2) acelerador linear, (3) booster ou síncrotron injetor, (4) anel de armazenamento, (5) linha de luz e (6) estação experimental.	24
Figura 2.11 – Composição do osso (Adaptado de Netter, 2004).....	26
Figura 3.1 – a) cabeça do fêmur de rata <i>Wistar</i> , b) lâmina da cabeça do fêmur.	29
Figura 3.2 – Vista geral da estação experimental DO9B-XRF do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.....	30
Figura 3.3 – Esquema do arranjo experimental.....	30
Figura 4.1 – Fatia de uma amostra de cabeça do fêmur do grupo controle. A região delimitada representa a área analisada por SR- μ XRF.	33
Figura 4.2 – Amostra típica do grupo controle. (a) distribuição de Ca; (b) distribuição de Fe e; (c) distribuição de Ca (azul) e Fe (vermelho) sobrepostas.	34
Figura 4.3 – Amostra típica do grupo controle. (a) distribuição de Ca; (b) distribuição de Zn e; (c) distribuição de Ca (azul) e Zn (vermelho) sobrepostas.	35
Figura 4.4 – Amostra típica do grupo controle. (a) distribuição de K; (b) distribuição de Cu e; (c) distribuição de Sr.....	36

Figura 4.5 – Fatia de uma amostra de cabeça do fêmur do grupo G1. A região delimitada representa a área analisada por SR- μ XRF.	36
Figura 4.6 – Amostra típica do grupo G1. (a) distribuição de Ca; (b) distribuição de Fe; (c) distribuição de Zn; (d) distribuição de K; (e) distribuição de Cu e; (f) distribuição de Sr.	37
Figura 4.7 – Fatia de uma amostra de cabeça do fêmur do grupo G2. A região delimitada representa a área analisada por SR- μ XRF.	38
Figura 4.8 – Amostra típica do grupo G2. (a) distribuição de Ca; (b) distribuição de Fe; (c) distribuição de Zn; (d) distribuição de K; (e) distribuição de Cu e; (f) distribuição de Sr.	39
Figura 4.9 – Fatia de uma amostra de cabeça do fêmur do grupo G3.	40
Figura 4.10 – Amostra típica do grupo G3. (a) distribuição de Ca; (b) distribuição de Fe; (c) distribuição de Zn; (d) distribuição de K; (e) distribuição de Cu e; (f) distribuição de Sr.	40
Figura 4.11 – Concentração de Ca para os grupos G0, G1, G2 e G3. O símbolo [a]** significa diferença significativa ($P < 0,01$) em relação ao grupo controle e; o símbolo [a]*** significa diferença significativa ($P < 0,001$) em relação ao grupo controle.	42
Figura 4.12 – Concentração de K para os grupos G0, G1, G2 e G3. O símbolo [a]*** significa diferença significativa ($P < 0,001$) em relação ao grupo controle e; o símbolo [b]* significa diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo OVX.	43
Figura 4.13 – Concentração de Fe para os grupos G0, G1, G2 e G3.	44
Figura 4.14 – Concentração de Cu para os grupos G0, G1, G2 e G3. O símbolo [a]** significa diferença significativa ($P < 0,01$) em relação ao grupo controle.	44
Figura 4.15 – Concentração de Zn para os grupos G0, G1, G2 e G3. O símbolo [a]* significa diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle e; o símbolo [a]*** significa diferença significativa ($P < 0,001$) em relação ao grupo controle.	45
Figura 4.16 – Concentração de Sr para os grupos G0, G1, G2 e G3. O símbolo [a]* significa diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle.	46
Figura A.1 – Interface do programa <i>readcnfmca_v4.exe</i>	57
Figura A.2 – Interface do programa PyMca®	58
Figura A.3 – Abrindo <i>Data Source</i>	59
Figura A.4 – Abrindo a calibração.	59
Figura A.5 – Identificando os picos.	60

Figura A.6 – Gerando o arquivo de calibração (.calib)	60
Figura A.7 – Selecionando o arquivo de calibração	61
Figura A.8 – Abrindo o FIT	62
Figura A.5.9 – Tela McaAdvancedFit	62
Figura A.10 – Entrada de dados no arquivo de configuração.	63
Figura A.11 – Indicando elementos no arquivo de configuração.....	64
Figura A.12 – Análise da amostra padrão	65
Figura A.13 – Exemplo da determinação do fluxo para o Ca na amostra padrão.	66
Figura A.14 – Arquivo .cfg final para o Ca.....	67
Figura A.15 – Abrindo o PyMca batch fitting.....	67
Figura A.16 – Cálculo da concentração elementar pelo PyMca®	68

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

O câncer compreende um grupo heterogêneo de mais de 100 doenças com etiologias e prognósticos diferenciados que têm em comum a divisão desordenada das células neoplásicas. O câncer de mama é o tipo de câncer mais incidente em mulheres de todo o mundo, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos, e é o que mais leva as brasileiras à morte. Esse tipo de neoplasia acomete preferencialmente, mulheres por volta dos 50 anos de idade, sendo raro antes dos 30 anos. Todavia, nas últimas décadas tem sido observado, a nível mundial, um aumento da incidência dessa doença inclusive em faixas etárias mais jovens. [INCA, 2011, SANTOS JUNIOR *et al.*, 2012].

Existem hoje diversas formas de tratamento para o câncer de mama. Os três principais tipos de tratamento são: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. O objetivo de cada um destes tratamentos é erradicar o câncer, geralmente, por meio da terapia combinada, onde é associado mais de um tipo de tratamento. Com o uso dos tratamentos citados, um terço dos pacientes consegue ser curado através de medidas locais (cirurgia ou radioterapia), que são eficazes quando o tumor ainda não sofreu metástase. Todavia, nos demais casos, a neoplasia caracteriza-se pelo desenvolvimento precoce de micrometástases, indicando a necessidade de uma abordagem sistêmica, que pode ser efetuada na maioria dos casos, cerca de 60-70%, com a quimioterapia [BORGES, 2008].

O objetivo primário da quimioterapia é destruir as células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não específica, lesando tanto células malignas quanto normais. Essas lesões em células não cancerosas podem causar efeitos colaterais não desejados. Um dos efeitos secundários causados por alguns quimioterápicos é a indução de amenorreia, que pode ser temporária ou não, nas mulheres na pré-menopausa, com conseqüente diminuição da produção de estrogênio. Essa falta de estrogênio pode causar uma diminuição na absorção de Ca pelos ossos, ocasionando doenças relativas à perda óssea. [ALMEIDA *et al.*, 2005, GORDON *et al.*, 2011, SIEGEL *et al.*, 2012].

Estudos anteriores [SHAPIRO *et al.*, 2001, BJARNASON *et al.*, 2008, SHAPEERO *et al.*, 2009] mostram que 70% de mulheres na pré-menopausa que receberam tratamento quimioterápico adjuvante para o combate ao câncer de mama, desenvolveram falência ovariana. Essa falência ovariana foi associada a uma diminuição significativa na densidade mineral óssea femoral e da coluna vertebral no prazo de 12 meses de quimioterapia. Contudo, a maior parte dos estudos relacionados com alterações de densidade e de remodelamento ósseo foi realizada com o regime utilizando a combinação de ciclofosfamida, metotrexato e 5-fluorouracil (CMF), que não é muito usado atualmente. Poucos dados existem sobre regimes mais novos, como por exemplo, regimes que utilizam os taxanos, o que é um grande motivo de preocupação.

Nos últimos anos, técnicas que fazem uso de raios X, vem sendo utilizadas para a análise da matriz óssea. Entre elas, a fluorescência de raios X (XRF – do inglês: *X-ray fluorescence*) mostrou ser uma técnica eficiente para a análise multielementar nesse tipo de material. PIGA *et al.* (2011) usaram a técnica de XRF para a análise de elementos como Ca, Fe e Sr em ossos de dinossauros. PEMMER *et al.* (2013) analisaram 14 amostras de ossos de mulheres na pós menopausa para determinar a distribuição e acumulação de Zn, Sr e Pb em osso humano. Os autores concluíram que a distribuição destes elementos não é uniforme considerando todas as estruturas do tecido ósseo. Com o uso desta técnica, FUCHS *et al.* (2008) investigou os efeitos do Sr e a influencia de uma dieta rica em Ca sobre o esqueleto de ratas ovariectomizadas. Entretanto, a análise da matriz óssea a nível elementar nunca havia sido realizada para avaliação de efeitos secundários de quimioterápicos utilizados no tratamento de câncer de mama.

A XRF baseia-se na medida das intensidades dos raios X característicos emitidos pelos elementos químicos componentes da amostra, quando devidamente excitados. Esta técnica permite a determinação da concentração dos elementos presentes na amostra. A fluorescência de raios X é considerada uma técnica instrumental não destrutiva, pois não requer pré-tratamento químico das amostras ou separações químicas dos elementos a serem analisados, possibilitando a realização de ensaios repetitivos. A microfluorescência de raios X (μ XRF – *X-Ray Microfluorescence*) é uma variante da XRF que possibilita realizar o mapeamento ponto a ponto da concentração elementar da amostra, e também permite verificar a sua homogeneidade.

O objetivo deste trabalho foi utilizar a técnica de μ XRF para avaliar as alterações elementares no fêmur de ratas submetidas a procedimentos de quimioterapia. Para isso foram utilizadas 20 ratas *Wistar*, divididas em 4 grupos: Controle (G0), tratado com ciclofosfamida e doxorrubicina (G1), tratado com ciclofosfamida e docetaxel (G2), e ratas ovariectomizadas (OVX - G3).

No capítulo seguinte serão apresentadas as fundamentações teóricas nas quais os estudos realizados nesse trabalho foram baseados e justificados. No capítulo subsequente serão descritos os materiais e a metodologia utilizada. No capítulo VI, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos. E por fim, no capítulo V, serão expostas as conclusões e expectativas futuras.

CAPÍTULO II

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. Câncer

O câncer é uma das doenças que mais causam temor na sociedade por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor. A palavra câncer vem do grego *karkínos* (caranguejo), empregada em analogia ao modo de crescimento infiltrante, que pode ser comparado à forma que o crustáceo introduz as pernas na areia ou lama para se fixar e dificultar sua remoção. A palavra câncer foi utilizada pela primeira vez, para nomear a doença, por Hipócrates, o pai da medicina [INCA, 2011].

Atualmente, a definição científica de câncer refere-se ao termo neoplasia, especificamente para tumores malignos como sendo uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células transformadas. Existem hoje mais de 100 tipos de doenças que se assemelham por esse crescimento desordenado de células e pela capacidade de invadir tecidos e órgãos, vizinhos ou distantes [INCA, 2011].

2.1.1. Formação do câncer

O corpo humano é todo formado por células que se organizam em tecidos e órgãos. As células normais se dividem, amadurecem e morrem, renovando-se a cada ciclo. A neoplasia se desenvolve quando células normais sofrem algum tipo de mutação no DNA e deixam de seguir esse processo natural, e ocorre então uma proliferação anormal do tecido, que foge parcial ou totalmente ao controle do organismo. A neoplasia pode ser maligna ou benigna (Figura 2.1).

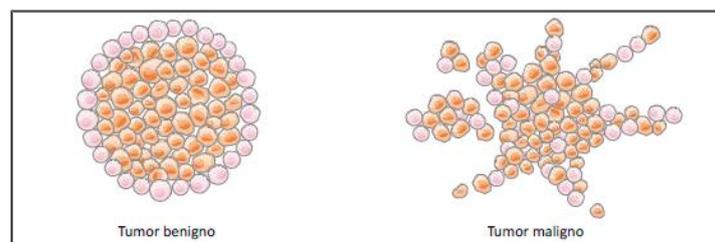


Figura 2.1 – Diferença entre tipos de neoplasias [INCA, 2011].

As neoplasias benignas ou tumores benignos têm seu crescimento de forma organizada, geralmente lento, expansivo e apresentam limites bem nítidos. Apesar de não invadirem os tecidos vizinhos, podem comprimir os órgãos e tecidos adjacentes.

Para que sejam formadas as neoplasias malignas, as alterações no DNA das células devem ocorrer em genes especiais denominados proto-oncogenes, que a princípio são inativos em células normais. Quando ativados, os proto-oncogenes transformam-se em oncogenes, responsáveis pela transformação (malignização) das células normais. Essas células alteradas, denominadas cancerosas, passam então a se comportar de forma anormal, multiplicando-se de maneira descontrolada. A manutenção e o acúmulo de massa dessas células formam os tumores malignos [ALMEIDA *et al.*, 2005]. Os tumores malignos (ou câncer) manifestam um maior grau de autonomia quando comparados aos tumores benignos e são capazes de invadir tecidos vizinhos e provocar metástases, podendo ser resistentes ao tratamento e causar a morte do hospedeiro.

2.2. Câncer de mama

De acordo com a Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil do Instituto Nacional de Câncer [FACINA, 2014], o número estimado para 2014/2015 é de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer no Brasil. Excluindo-se os casos de câncer de pele não melanoma, que é o tipo mais incidente para ambos os sexos, o tipo de câncer mais incidente entre as mulheres será o de mama (75 mil novos casos).

O CM é considerado um câncer de relativamente bom prognóstico, contudo, por causa do sistema de saúde precário e o consequente diagnóstico tardio da doença, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil. Na população mundial, a sobrevida média após cinco anos é de 61% [SILVA *et al.*, 2010].

2.3. Principais tratamentos para o câncer de mama

As principais metas do tratamento são: cura, prolongamento da vida útil e melhora da qualidade de vida do paciente. Os tratamentos tem mais chance de ser curativo quando o câncer é detectado precocemente e tratado de acordo com as melhores práticas clínicas.

Existem três formas principais de tratamento do câncer: cirurgia, radioterapia, e quimioterapia. Elas podem ser usadas em conjunto, variando apenas quanto à suscetibilidade dos tumores a cada uma das modalidades terapêuticas e à melhor sequência de sua administração.

2.3.1. Cirurgia

O procedimento cirúrgico tem por finalidade promover o controle local da doença, reduzir o risco de recorrência e em alguns casos, prevenir a disseminação do câncer. Durante décadas mulheres com câncer de mama foram submetidas a cirurgias radicais como a mastectomia total. Atualmente, a possibilidade de cirurgias mais conservadoras associadas à radioterapia serem empregadas em substituição de mastectomias radicais, favorece os resultados estéticos, psicológicos e curativos [RICCI *et al* 2003, Tiezzi, 2007].

2.3.2. Radioterapia

A radioterapia é um tratamento loco-regional que utiliza um feixe de radiação ionizante (raios X, raios gama, elétrons, nêutrons, entre outros) para destruir células tumorais. Seu emprego faz parte do tratamento conservador, em que se estima que 75 a 80% das mulheres com câncer de mama são candidatas à cirurgia conservadora e radioterapia pós-operatória. A indicação da radioterapia é variada, pode ser utilizada como curativa, no controle da doença e aumento da sobrevida, ou ainda como paliativa, no alívio dos sintomas e na melhora da qualidade de vida [CLARKE *et al.*, 2005, NATTINGER *et al.*, 2001].

2.3.3. Quimioterapia

A quimioterapia antineoplásica é a utilização de agentes químicos denominados quimioterápicos, isolados ou em combinação, com o objetivo de tratar os tumores malignos. Esse tipo de tratamento tem se tornado uma das mais importantes e promissoras maneiras de combater o câncer. Os objetivos do tratamento quimioterápico permite a classificação do tratamento em:

- Neoadjuvante: consiste na administração do quimioterápico antes do tratamento cirúrgico. Tem como objetivos: reduzir o tamanho do tumor, permitindo cirurgias conservadoras; tornar operáveis tumores localmente avançados; impedir o crescimento metastático após a remoção do tumor primário; entre outros [GOGAS *et al.*, 2003. FISHER *et al.*, 1995].
- Adjuvante: é baseada na combinação de drogas citotóxicas com a finalidade de diminuir o risco de recorrência local após a ressecção do tumor, reduzir o risco de metástases e aumentar a sobrevida [ABE *et al.*, 2005].
- Paliativa: usado em pacientes com metástase diagnosticada ou com recidiva do câncer, onde a possibilidade de cura é remota. O tratamento paliativo tem como objetivo promover alívio da dor e de outros sintomas que causam sofrimento, buscando a melhora da qualidade de vida do paciente; oferecer suporte para auxiliar os pacientes a terem uma sobrevida o mais útil possível, de preferência usufruindo do ambiente familiar [INCA, 2011].

2.4. Quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer de mama

Dentre os agentes quimioterápicos os mais utilizados no tratamento do câncer de mama são os agentes alquilantes, principalmente a ciclofosfamida (C); os antimetabólicos, como o 5-fluorouracil (F) e o metrotexato (M); os antracíclicos, como a epirrubicina (E) e doxorubicina (A) e, mais recentemente, os taxanos, como paclitaxel e docetaxel (T) [BARROS *et al.*, 2001].

Os antineoplásicos agem diretamente na célula, atuando nas diversas fases do ciclo celular. A doxorubicina é um fármaco citostático, ou seja, tem a capacidade de inibir o crescimento desordenado de células, alterar a divisão celular e destruir as células que se multiplicam rapidamente [KEIZER *et al.*, 1990]. O docetaxel é um agente citotóxico que estabiliza os microtúbulos celulares, tem propriedades anti-angiogénicas e também pode induzir a apoptose [CROWN *et al.*, 2000]. A ciclofosfamida é um agente antineoplásico imunossupressor e tem a capacidade de exterminar as células tumorais independentemente da fase do ciclo celular [PAI *et al.*, 2000].

Devido a essas diferentes características é que se opta por usar, mais frequentemente, a poliquimioterapia, na qual mais de dois tipos de medicamentos de

classificações farmacológicas diferentes são aplicados, buscando-se um efeito mais abrangente sobre as células tumorais [MARTIN *et al.*, 2003]. É importante, sempre que possível, a associação de medicações com diferentes ações, buscando o aumento do efeito antitumoral sem elevar o grau de toxicidade.

O Protocolo de quimioterapia é o termo empregado para definir as propostas de tratamento que combinam diferentes medicamentos e metodologias de administração programadas. Nesse caso ele estabelece os medicamentos a serem utilizados, determina suas doses em função do peso ou a superfície corpórea do paciente e propõe datas para sua administração [ASHP, 2002]. Algumas combinações de quimioterápicos usados em protocolos de quimioterapia estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 – Combinações de quimioterápicos utilizados para o tratamento do câncer de mama.

Combinações	Nomes dos medicamentos
CMF:	Ciclofosfamida, metotrexato e 5-fluorouracil
CAF (FAC):	Ciclofosfamida, doxorrubicina e 5-fluorouracil
AC:	Doxorrubicina e ciclofosfamida
TAC:	Docetaxel, doxorrubicina e ciclofosfamida
AC → T:	Doxorrubicina e ciclofosfamida, seguido por paclitaxel ou docetaxel
TC	Docetaxel e ciclofosfamida

A ciclofosfamida é incluída em aproximadamente 90% dos casos na quimioterapia adjuvante para o câncer de mama, sendo muito eficaz no tratamento do tumor, mas não na prevenção da recorrência, por isso é necessário associá-la sempre a outros fármacos, como o docetaxel ou a doxorrubicina [KONDO *et al.*, 2010, MUNZONE *et al.*, 2012].

Por muitos anos, o protocolo padrão para quimioterapia adjuvante foi o uso da doxorrubicina combinada com ciclofosfamida (AC) em quatro ciclos. Até então, nenhum regime quimioterápico de quatro ciclos tinha provado ser superior ao regime AC. Porém, com a evolução dos taxanos no início dos anos 90, o uso do docetaxel combinado com ciclofosfamida (TC) se tornou cada vez mais promissor para o tratamento do câncer de mama [JONES *et al.*, 2006].

Muitas combinações estão em uso no momento, porém, não é clara qual combinação é a melhor. Os estudos clínicos continuam comparando os tratamentos atualmente mais eficazes com algo que possa ser melhor, sempre pesando o efeito antitumoral dos fármacos com seu grau de toxicidade e efeitos secundários para o organismo.

2.5. Efeitos secundários da quimioterapia

A quimioterapia constitui uma das modalidades de maior escolha para produzir cura, controle e palição do câncer. As principais toxicidades causadas pelos quimioterápicos são: supressão da medula óssea, imunossupressão, toxicidade renal, cardiotoxicidade, neurotoxicidade, entre outras [SAWADA *et al.*, 2009]. Outro efeito colateral causado por alguns quimioterápicos é a indução de amenorreia, que pode ser temporária ou não, nas mulheres na pré-menopausa, com conseqüente diminuição da produção de estrogênio. Efeitos tóxicos das drogas nas células ósseas, déficit de vitamina D, cálcio e outros nutrientes também são resultados da ação deletéria dos quimioterápicos no organismo [BJARNASON *et al.*, 2008].

Mulheres na pré-menopausa submetidas à quimioterapia adjuvante para o tratamento de câncer de mama apresentam significativa perda óssea a partir do primeiro ano após o início do tratamento [SHAPEERO *et al.*, 2009]. Esta alta taxa de perda de densidade mineral óssea pode levar ao aumento do risco de fraturas na pós-menopausa. Dados do Instituto *Women`s Health Initiative* (WHI) mostram que mulheres na pós-menopausa, que sobreviveram ao CM, têm um risco 15% maior de sofrerem fraturas, de uma forma geral, que mulheres sem histórico de câncer de mama [HERSHMAN, *et al.* 2010].

A maior parte dos estudos relacionados com alterações de densidade e de remodelamento ósseo foi realizada com o regime CMF, que não é muito usado

atualmente. Poucos dados existem sobre regimes mais novos, como o regime AC, o que é um grande motivo de preocupação.

2.6. Fluorescência de raios X

A Fluorescência de raios X (XRF – do inglês: *X-ray fluorescence*) é uma técnica não destrutiva utilizada para análise qualitativa e quantitativa multielementar de uma ampla variedade de amostras. É uma técnica baseada na medida das intensidades (números de raios X detectados por unidade de tempo) dos raios X característicos emitidos pelos elementos que constituem a amostra quando devidamente excitada por fontes de radiação como tubos de raios X, radiação síncrotron, entre outras.

Quando um átomo é irradiado por um fóton incidente de energia igual ou superior à energia de ligação do elétron de uma determinada camada (nível energético) do material alvo, este fóton pode interagir com o elétron dessa camada e ao quebrar a barreira de potencial do elétron naquele nível de energia, o retira do orbital produzindo uma vacância. O átomo fica então num estado excitado e tende a se estabilizar naturalmente. No rearranjo eletrônico, um elétron de um orbital mais externo realiza um salto quântico para preencher a vacância oriunda da ejeção do elétron. Ao realizar a transição eletrônica o elétron perde energia, essa energia é então emitida na forma de um fóton de raios X de energia igual à diferença entre as energias dos orbitais. Esta energia é característica e bem definida para cada elemento, por esse motivo são chamados de raios X característicos. A figura 2.2 ilustra o mecanismo para as emissões de raios X característicos.

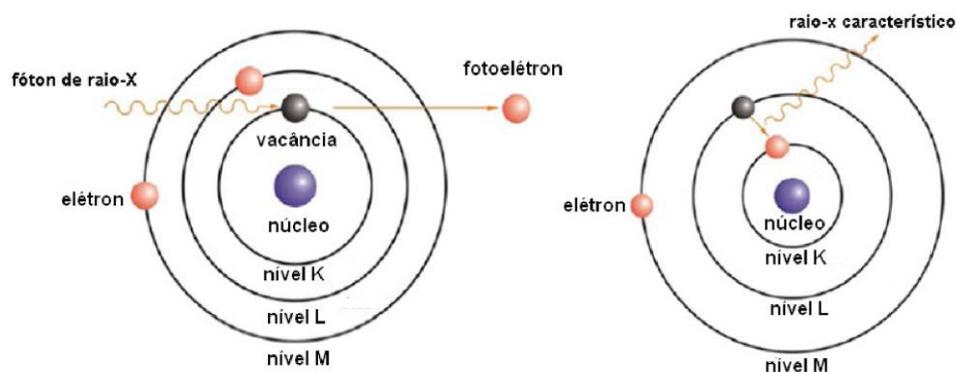


Figura 2.2 – Ilustração da emissão de raio X característico entre as camadas K e L.

A energia dos raios X característicos emitidos pelos elementos pode ser calculada de modo aproximado pela equação 2.1 [SIMABUCO, 1993]:

$$E = 13,65 \cdot (Z - b)^2 \cdot \left(\frac{1}{n_f^2} - \frac{1}{n_i^2} \right) \quad (1)$$

Onde:

E = energia dos raios X (medida em eV);

n_i , n_f = número quântico principal do nível inicial e final do salto quântico, respectivamente;

Z = número atômico do elemento emissor dos raios X;

b = constante de Moseley, com valores iguais a 1 e 7,4, para as camadas K e L, respectivamente.

Pela equação (1), tem-se que a energia dos raios X emitida é diretamente proporcional ao quadrado do número atômico Z do elemento excitado. Esta equação é importante para se compreender o conceito da proporcionalidade entre a energia (ou amplitude do pulso produzido no detector) e o elemento a ser analisado em equipamentos de fluorescência de raios X que fazem uso da dispersão de energia com detectores semicondutores.

De modo resumido, na XRF, a fluorescência emitida pelos elementos presentes na amostra incide em um detector, que possui uma eletrônica associada, capaz de resolver a energia dos fótons incidentes com precisão suficiente para fornecer uma distribuição espectral de intensidades versus energia. Analisadores multicanais computadorizados são utilizados para adquirir, mostrar o espectro (diferenciando as energias) e realizar a análise dos dados.

A figura 2.3 ilustra os processos básicos da XRF. São eles: excitação dos elementos que constituem a amostra, produção e detecção dos raios X característicos, resolução das informações detectadas pela eletrônica associada e por fim a informação da composição elementar da amostra através da análise do espectro dos raios X característicos.

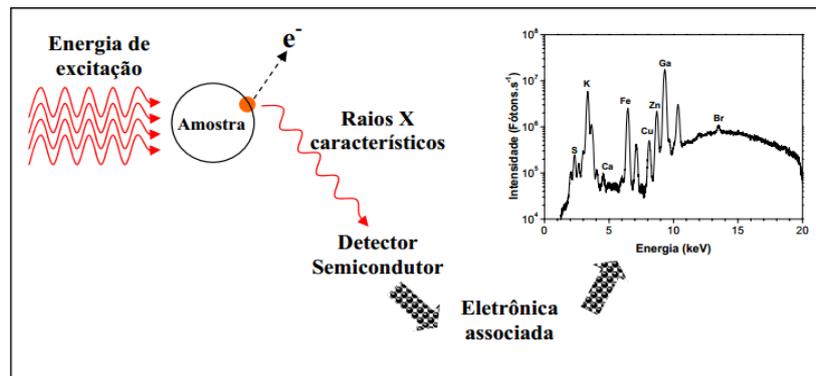


Figura 2.3 – Esquema básico da espectroscopia de raios X.

A intensidade de qualquer pico no espectro de raios X é proporcional ao número de átomos que emitem fótons de energias atribuídas a esta linha. Porém vários fatores devem ser levados em conta numa quantificação como métodos de correção e efeito matriz. O efeito matriz é causado basicamente por fenômenos de absorção e de intensificação (reforço) do sinal de emissão, por parte dos outros elementos que compõem a matriz amostral.

A fração da radiação incidente que leva à emissão de uma determinada linha de raios X característicos é determinada pela probabilidade de excitação (P_{E_i}), que é o produto de três outras probabilidades [LACHANCE *et al.*, 1995]

$$P_{E_i} = P_{nível} \cdot P_{linha} \cdot P_{fluorescência} \quad (2)$$

Onde:

$P_{nível}$ é a probabilidade da radiação incidente retirar elétrons de um dado nível quântico. Pode ser o nível K, L, M, N, etc.;

P_{linha} é a probabilidade que uma determinada energia seja emitida dentro de sua série. Para um elétron retirado do nível K podemos ter as seguintes transições do nível L: K-L2 e K-L3;

$P_{fluorescência}$ é a probabilidade de ocorrer emissão de fluorescência de raios X ao invés do processo Auger, a partir de uma transição realizada entre dois estados quânticos.

A probabilidade da radiação incidente retirar elétrons de um determinado nível está fortemente ligada com a fração da radiação que é absorvida no mesmo nível [LACHANCE *et al.*, 1995]

2.6.1. Energia de corte de absorção

Como mencionado anteriormente, para que ocorra uma transição entre dois estados quânticos é necessário que um elétron seja liberado do átomo. Para que isso ocorra, a energia de excitação mínima deve ser igual ou superior à energia de ligação do elétron ao orbital de origem. Essa energia de ligação eletrônica é denominada energia de corte de absorção. A figura 2.4 representa o corte de absorção (ou energia de ligação) dos elétrons nos níveis K, L e M em função do número atômico.

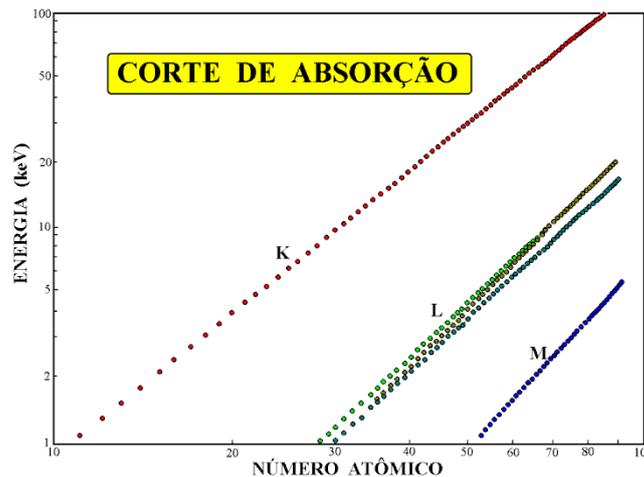


Figura 2.4 – Energia de ligação ou corte de absorção nos níveis K, L e M em função do número atômico [NASCIMENTO, 1999].

Em geral, a energia crítica de excitação refere-se à energia de ligação, visto que essa representa a menor energia necessária para que elétrons possam ser ejetados de um átomo. Sendo assim, para que ocorra emissão de raios X característicos é necessário que a energia da radiação incidente seja igual ou superior a estas energias críticas.

2.6.2. Rendimento da fluorescência

Algumas vezes a radiação característica é absorvida dentro do próprio átomo por outro elétron do mesmo, ou de outra camada em que ocorreu a emissão de energia

característica e, ao invés de serem emitidos raios X característicos, são emitidos elétrons, denominados elétrons Auger.

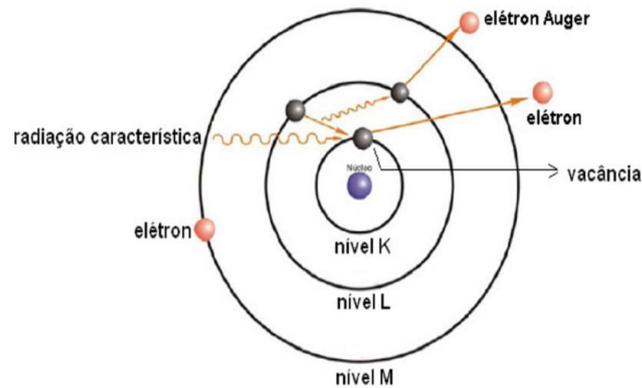


Figura 2.5 – Ilustração da emissão de um elétron Auger entre as camadas K e L

O rendimento de fluorescência ω é definido como a probabilidade do fóton produzido ser liberado do átomo sem ser reabsorvido. Assim, ω pode ser representado como:

$$\omega = \frac{n_s}{n_p} \quad (3)$$

$$n_p = n_s + n_A \quad (4)$$

Onde:

n_s é o número de fótons produzidos como fluorescência de raios X;

n_p é o número de fótons que são produzidos devido às vacâncias nos níveis e sub níveis atômicos;

n_A é o número de fótons que são reabsorvidos dentro do átomo.

O rendimento de fluorescência para a linha K (ω_K) é dado pelo número de eventos de ionização da camada k que dão origem aos raios X (n_K), para todas as linhas K, dividido pelo total de eventos de ionização da camada k (N_K) devido às transições entre os estados quânticos. Assim, tem-se:

$$\omega_K = \frac{n_{K-L3} + n_{K-L2} + \dots}{N_K} = \sum \frac{n_K}{N_K} \quad (5)$$

O rendimento de fluorescência pode ser definido como sendo o número de raios X efetivamente emitidos em relação ao número de vacâncias produzidas em uma dada camada [NASCIMENTO, 1999], representado na figura 2.6.

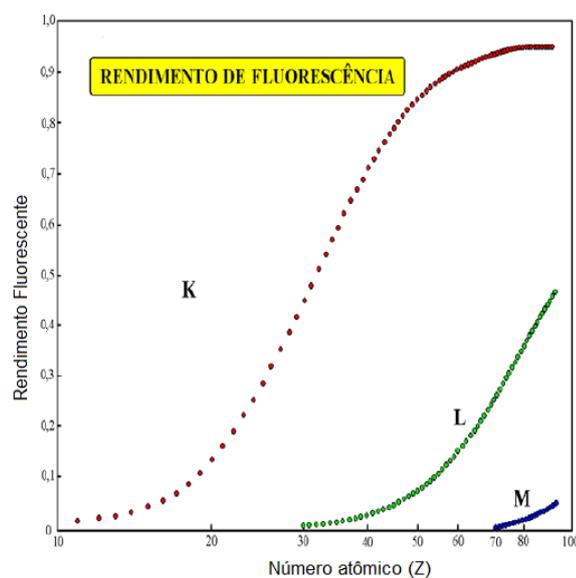


Figura 2.6 – Rendimento da fluorescência das camadas K, L e M em função do número atômico (Z) [NASCIMENTO, 1999].

Nota-se que há um baixo rendimento de fluorescência no nível K para elementos leves (de número atômico abaixo de 20), no nível L o rendimento ainda é baixo para os elementos de número atômico abaixo de 60 e no nível M para praticamente todos os elementos [NASCIMENTO, 1999].

2.7. Quantificação por fluorescência de raios X

Para a análise quantitativa por XRF, é necessário relacionar as intensidades fluorescentes dos elementos medidos na amostra com suas respectivas concentrações. Cada átomo de um determinado elemento i tem a mesma probabilidade de ser excitado por um feixe primário de fótons, por isso, para íons ou átomos isolados é esperada uma relação linear entre a intensidade dos raios X característicos. Para este caso é considerada a equação (6).

$$I_i = K_i \cdot W_i \quad (6)$$

Onde: I_i é a medida da intensidade da radiação fluorescente do elemento i ; W_i corresponde a fração do elemento na amostra e; K_i é a constante de proporcionalidade.

A constante de proporcionalidade K_i depende de fatores como: intensidade e energia do feixe primário, a probabilidade do átomo de emitir radiação característica e, a probabilidade dos fótons emitidos pelo átomo serem detectados. Com isso, quando as características da fonte do feixe primário permanecem constantes, a concentração do elemento i pode ser determinada através da medida da intensidade dos raios X fluorescentes provenientes de uma amostra contendo somente elemento i . Entretanto, na maioria das vezes lidamos com amostras onde os átomos de diferentes componentes então arranjados [VAN GRIEKEN *et al.*, 2002]. Por esse motivo, a intensidade fluorescente de um elemento i em uma amostra composta por varios elementos, não é linear com as concentrações devido aos chamados efeitos de matriz.

2.7.1. Equação fundamental

Para excitação monoenergética, há uma relação simples entre a intensidade de uma linha característica (K_α e L_α) e a concentração de um elemento na amostra. A figura 2.7 mostra uma representação esquemática da geometria de excitação em XRF.

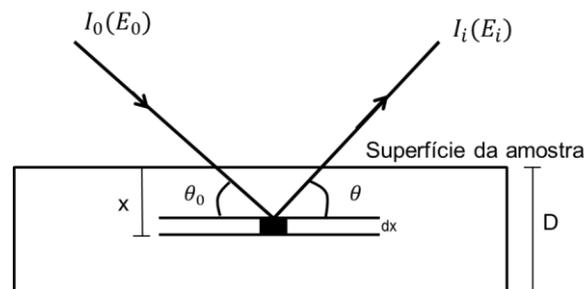


Figura 2.7 – Representação esquemática da geometria de excitação para feixe monoenergético em fluorescência de raios X.

Sendo: $I_0(E_0)$ representa a intensidade do feixe que incide na amostra; θ_0 é o ângulo pelo qual o feixe incide na amostra; $I_i(E_i)$ representa a intensidade da radiação

característica emitida pelo elemento i ; θ é o ângulo pelo qual o feixe sai da amostra; x é a profundidade que o feixe incide na amostra; dx espaço infinitesimal onde ocorre a fluorescência de raios X e D é a espessura da amostra.

Assumindo uma amostra homogênea com espessura uniforme D e desprezando efeitos de reforço (*enhancement*), a intensidade da linha $K\alpha$ de um elemento de interesse produzida numa camada dx a uma profundidade x (Figura 2.7) é produto de três probabilidades [NASCIMENTO, 1999]:

1. A probabilidade P_1 da radiação de excitação atingir a camada dx a uma profundidade x :

$$P_1 = e^{-\frac{\mu_0 \cdot \rho_0 \cdot x}{\sin \theta_0}} \quad (7)$$

Onde:

μ_0 = coeficiente de absorção de massa da matriz ($\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) na energia dos fótons incidentes,

ρ_0 = densidade da matriz ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)

θ_0 = ângulo de incidência (entre a direção do feixe incidente e a superfície da amostra).

O valor de μ_0 pode ser calculado como a somatória dos produtos dos coeficientes de absorção de massa pela fração em massa de todos os elementos presentes na amostra.

2. A probabilidade P_2 da radiação de excitação produzir uma vacância nos átomos de um elemento de interesse contidos na camada dx , com consequente produção de raios X característicos:

$$P_2 = \tau \cdot w \cdot \left(1 - \frac{1}{j}\right) \cdot f \cdot \rho \cdot dx \quad (8)$$

Onde:

τ = coeficiente de absorção de massa para efeito fotoelétrico do elemento de interesse ($\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) na energia de excitação,

w = rendimento de fluorescência da camada K,

j = razão de salto (*jump ratio*) $K \rightarrow L$,

f = fração de fótons K emitidos como raios $K\alpha$ característicos, e

ρ = “densidade” ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$) ou concentração do elemento de interesse em base de volume na camada dx .

O coeficiente de absorção para o efeito fotoelétrico exatamente na energia do corte de absorção tem dois valores: um superior, que indica a probabilidade de se retirar elétrons de todas as camadas K, L, M, etc., e um inferior, que indica a probabilidade de se retirar elétrons de todas as camadas, com exceção da camada K (ou seja, camadas L, M, etc.). Desse modo, a razão entre os valores superior e inferior, denominada de razão de salto ou *jump ratio* (j), indica a probabilidade de se retirar elétrons de todas as camadas em relação à probabilidade das camadas L, M, etc. O termo $(1-1/j)$ representa probabilidade de se ionizar a camada K em relação a todas as camadas K, L, M, etc., e assim o termo $\tau \cdot (1-1/j)$ representa o número de ionizações ocorridas na camada K. Os parâmetros fundamentais τ , w , j e f para um dado elemento dependem unicamente da energia de excitação e podem ser agrupados em um único termo K , denominado de constante dos parâmetros fundamentais, e assim a equação (8) pode ser reescrita como:

$$P_2 = K \cdot \rho \cdot dx \quad (9)$$

onde:

$$K = \tau \cdot w \cdot \left(1 - \frac{1}{j}\right) \cdot f \quad (10)$$

3. A probabilidade P_3 dos raios X característicos produzidos na camada dx não serem absorvidos na espessura x e atingirem o detector, produzindo um pulso eletrônico, é dada por:

$$P_3 = e^{-\frac{\mu \cdot \rho_0 \cdot x}{\text{sen}\theta}} \cdot \varepsilon \quad (11)$$

Onde:

μ = coeficiente de absorção de massa da matriz ($\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$),

ε = eficiência do detector na energia dos fótons característicos, e

θ = ângulo de emergência (entre a superfície da amostra e a direção do feixe emergente).

Assim, a intensidade fluorescente dI_i (ou a taxa de contagem) produzida pelo elemento de interesse contido na camada dx pode então ser escrita como:

$$dI_i = G \cdot e^{-\frac{\mu_0 \cdot \rho_0 \cdot x}{\text{sen}\theta_0}} \cdot \tau \cdot w \cdot \left(1 - \frac{1}{j}\right) \cdot f \cdot \rho \cdot dx \cdot e^{-\frac{\mu \cdot \rho_0 \cdot x}{\text{sen}\theta}} \cdot \varepsilon \quad (12)$$

Onde a variável G é dado por:

$$G = \frac{d\Omega_1 d\Omega_2}{4\pi \cos\theta_n} \quad (13)$$

Sendo: $\Omega_1 \Omega_2$ os ângulos sólidos de incidência e emergência do feixe, respectivamente e; θ_n o ângulo de incidência relativo à normal da superfície da amostra.

G é denominado “fator de geometria”, é uma constante de proporcionalidade e depende da geometria do sistema de excitação-detecção, da corrente do tubo ou da atividade da fonte, etc., e não depende do elemento de interesse.

Reescrevendo a equação (12):

$$dI_i = G \cdot e^{-\left(\frac{\mu_0}{\text{sen}\theta_0} + \frac{\mu}{\text{sen}\theta}\right) \cdot \rho_0 \cdot x} \cdot \tau \cdot w \cdot \left(1 - \frac{1}{j}\right) \cdot f \cdot \rho \cdot \varepsilon \cdot dx \quad (14)$$

Definindo-se o coeficiente de absorção de massa total χ como:

$$\chi = \frac{\mu_0}{\text{sen}\theta_0} + \frac{\mu}{\text{sen}\theta} \quad (15)$$

E utilizando as equações (10) e (15), pode-se rescrever a equação (14) na forma:

$$dI_i = G \cdot \varepsilon \cdot K \cdot \rho \cdot e^{-(\chi \cdot \rho_0 \cdot x)} \cdot dx \quad (16)$$

Integrando a equação acima sob a espessura total \mathbf{D} da amostra, obtém-se a intensidade fluorescente \mathbf{I} (contagens/s) para um dado elemento de interesse:

$$I_i = G \cdot \varepsilon \cdot K \cdot \rho \cdot \frac{1 - e^{-(\chi \cdot \rho_0 \cdot D)}}{\chi \cdot \rho_0} \quad (17)$$

A razão ρ/ρ_0 representa a “densidade” do elemento de interesse (massa em grama do elemento/cm³ da amostra) em relação à densidade da matriz (massa em grama da amostra/cm³ da amostra) e, portanto, é a própria concentração \mathbf{C}_i do elemento de interesse na amostra (massa em grama do elemento/massa em grama da amostra), ou seja, a concentração fracional do elemento em base de massa. Sendo assim:

$$I_i = G \cdot \varepsilon \cdot K \cdot C_i \cdot \frac{1 - e^{-(\chi \cdot \rho_0 \cdot D)}}{\chi} \quad (18)$$

Tomando-se:

$$S = G \cdot \varepsilon \cdot K \quad (19)$$

Como \mathbf{S} depende de fatores relativos ao sistema utilizado, \mathbf{S} representa então a sensibilidade do espectrômetro de raios X para o elemento de interesse, a equação (18) pode ser reescrita como:

$$I_i = S \cdot C_i \cdot \frac{1 - e^{-(\chi \cdot \rho_0 \cdot D)}}{\chi} \quad (20)$$

A razão apresentada na equação (20) é denominada de fator de absorção A para o elemento de interesse:

$$A = \frac{1 - e^{-(\chi \cdot \rho_0 \cdot D)}}{\chi} \quad (21)$$

Desse modo, a equação (20) pode ser reescrita na forma:

$$I_i = S \cdot C_i \cdot A \quad (22)$$

Onde:

I_i é a intensidade produzida pelo elemento i ; S representa a sensibilidade do sistema; C_i é a concentração do elemento i na amostra e A representa o fator de absorção da amostra para o elemento i .

Outro método para o cálculo da concentração elementar usando XRF faz uso das chamadas curvas de calibração, que relacionam as intensidades fluorescentes dos elementos com suas respectivas concentrações. Deste modo os efeitos de matriz são eliminados ou medidos. Para a construção da curva de calibração é necessário um conjunto de amostras certificadas (padrões) de composição na mesma faixa de concentração da amostra desconhecida.

Supondo uma amostra certificada (com concentrações elementares conhecidas), com uma matriz semelhante à amostra que se deseja estudar, de acordo com a equação (22) pode-se escrever:

$$I_{i,p} = S \cdot C_{i,p} \cdot A \quad (23)$$

Sendo: $I_{i,p}$ a intensidade produzida pelo elemento i no padrão; S representa a sensibilidade do sistema; $C_{i,p}$ é a concentração do elemento i no padrão e A representa o fator de absorção do padrão para o elemento i ;

Como dito anteriormente, a sensibilidade depende do sistema no qual foram realizadas as medidas, com isso a sensibilidade S permanece a mesma tanto para o cálculo da concentração do elemento i na amostra analisada quanto para o cálculo de

concentração do mesmo elemento no padrão. Para um padrão com uma matriz semelhante à amostra que se deseja estudar, o termo de absorção A também é o mesmo para ambos os casos. Fazendo a razão entre as equações (22) e (23), tem-se:

$$\frac{I_i}{I_{i,p}} = \frac{C_i}{C_{i,p}} \quad (24)$$

Pode-se então obter a concentração do elemento i na amostra usando a equação (23).

$$C_i = \frac{I_i}{I_{i,p}} \cdot C_{i,p} \quad (25)$$

2.8. Microfluorescência de raios X

A Microfluorescência de raios X (μ XRF) é uma variante da XRF diferenciando-se principalmente nas dimensões e geometria do feixe. É baseada na excitação localizada de uma área microscopicamente pequena (na ordem de μm) na superfície de uma amostra, fornecendo informações da distribuição espacial de elementos majoritários e minoritários no material de estudo. Por esse motivo a μ XRF é uma técnica bastante atrativa para a análise local e para o mapeamento elementar em vários tipos de materiais [BERNASCONI et al., 1994].

O mapeamento elementar é realizado dividindo-se a área a ser analisada em pixels (figura 2.8), e em cada pixel, obtém-se um espectro de fluorescência de raios X [PRINS et al., 1984].

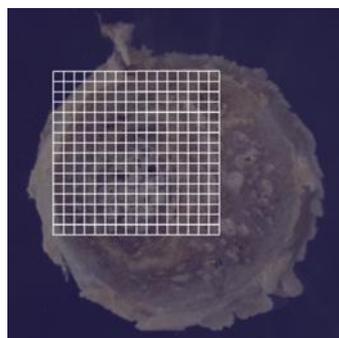


Figura 2.8 – Exemplo de matriz utilizada para a análise por μ XRF em uma amostra da cabeça do fêmur de rato *Wistar*.

Basicamente, um micro feixe primário de raios X irradia uma área (aproximadamente 20 μ m) de uma amostra e induz a emissão de raios X fluorescentes desta área. Um detector semiconductor coleta a radiação fluorescente que transporta informações sobre a composição local da amostra (figura 2.9). Esta amostra então é movida por motores controlados por um computador, permitindo assim obtenção de informações do próximo ponto. Este procedimento é realizado de forma a varrer toda a amostra em análise.

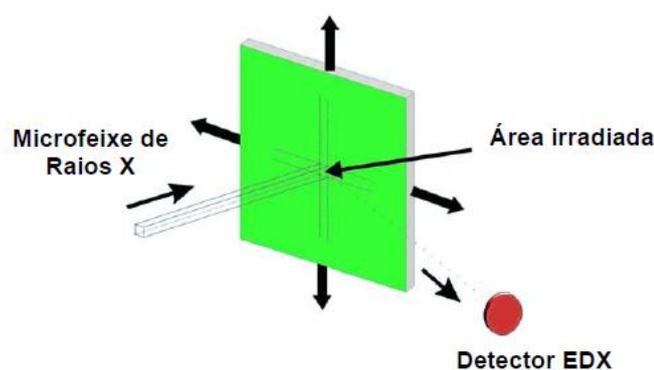


Figura 2.9 – Esquema simplificado da análise por μ XRF. [MELO JÚNIOR, 2007]

As dificuldades na exploração deste método estão relacionadas com a produção de feixes de raios X suficientemente intensos e de dimensões micrométricas para que se obtenham microanálises sensíveis. Há poucos anos atrás se considerava muito difícil focalizar um feixe de raios X de pequenas dimensões e a solução deste problema somente apareceu recentemente com o uso da radiação síncrotron.

A μ XRF é um poderoso método para a análise de amostras biológicas, tendo as vantagens de um baixo limite de detecção (0,01 μ g/g), pequeno dano térmico e as medidas podem ser realizadas no ar [EKTESSABI *et al.*, 1999]. A μ XRF associada a radiação síncrotron (SR- μ XRF) permite maior sensibilidade para a análise de concentrações muito baixas e possibilita estudar amostras da ordem de micrômetros.

2.9. Radiação Síncrotron

Como sabemos da teoria clássica da eletricidade e magnetismo, carga elétrica acelerada emite radiação eletromagnética. No caso da radiação síncrotron, elétrons

relativísticos são acelerados em uma órbita circular e emitem radiação eletromagnética em uma ampla faixa do espectro [CASTILHO, 2006].

O processo de produção de luz síncrotron é iniciado por um canhão de elétrons de um acelerador linear. Os aceleradores lineares são aceleradores de partículas carregadas como elétrons, prótons ou íons pesados. As partículas carregadas são aceleradas por um campo elétrico, entram em tubo de corrente onde são protegidas do campo elétrico e o atravessam com velocidade constante até a próxima abertura. Neste ponto, as partículas são novamente aceleradas e a cada abertura recebem mais e mais energia.

Em seguida, o feixe de elétrons é injetado em um anel de armazenamento, onde há três dispositivos básicos:

- Dipolos magnéticos formados por ímãs dipolares que produzem um campo magnético homogêneo no sentido vertical. Eles são responsáveis pela deflexão do feixe e consequentemente pela produção de luz síncrotron;

- Quadripolos ou sextupolos que estão situados nos trechos retos do anel e servem para focalizar os elétrons e reduzir as aberrações cromáticas;

- Cavidade de rádio frequência que está situada em um ou mais trechos retos e é responsável por acelerar os elétrons injetados a baixa energia até o final. É também responsável por fornecer aos elétrons, em cada passagem pelo seu interior, a energia perdida em cada volta devido à radiação produzida nas partes curvas de suas trajetórias aumentando, assim, o tempo de vida do feixe [MARGARITONDO, 1995].

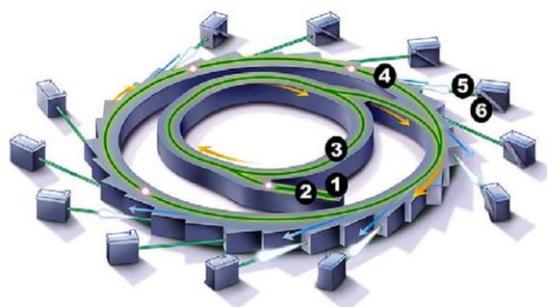


Figura 2.10 – Esquema de um acelerador síncrotron: (1) fonte de elétrons, (2) acelerador linear, (3) booster ou síncrotron injetador, (4) anel de armazenamento, (5) linha de luz e (6) estação experimental.

Os feixes de raios X obtidos em uma máquina de luz síncrotron são extremamente intensos, colimados e dotados de um elevado grau de coerência longitudinal (espacial). Além disso, com a utilização de cristais monocromadores é possível obter feixes praticamente monocromáticos com energia selecionável dentro de um amplo espectro de energia [ARFELLI et al, 2000].

2.10. Tecido ósseo

A medida de elementos a nível traço ou até mesmo de maior composição em materiais biológicos humanos é uma importante ferramenta na detecção de doenças. O estudo do tecido ósseo é particularmente interessante, pois sua formação é estabelecida ao longo de um período de tempo, sendo constantemente renovado, porém lentamente substituído. Entretanto, o osso é um material complexo e o conhecimento de sua composição é de fundamental importância na aplicação e interpretação de análises elementares [ROBERTS *et al.*,1996]. Por esse motivo, será feita uma breve introdução sobre o tecido ósseo.

Os ossos são compostos por materiais orgânicos, minerais (ou inorgânicos) e água. A parte orgânica tem muitas funções, dentre elas determinar a estrutura e as propriedades mecânicas ósseas e é composta da matriz óssea e de células próprias do tecido ósseo. A matriz óssea é formada principalmente por colágeno tipo I e outras proteínas. O restante do material ósseo é formado pelas células ósseas: os *osteoblastos*, que são responsáveis pela formação da matriz óssea, os *osteócitos*, que são osteoblastos não funcionais que ficaram aprisionados pela matriz óssea mineralizada, e os *osteoclastos*, que são células multinucleadas responsáveis pela reabsorção óssea [WANG, 2005].

Macroscopicamente, este tecido geralmente é classificado em dois tipos: osso cortical e osso medular (ou trabecular), distintos não apenas na forma estrutural, mas também nos aspectos funcionais. O osso cortical é mais compacto e tem maior resistência mecânica, o que permite atuar na proteção dos órgãos internos do corpo, é encontrado nas diáfises dos ossos longos e na superfície externa dos ossos chatos. Entretanto, o osso medular atua nas funções metabólicas, delimita espaços

intertrabeculares e a cavidade medular. Ele é encontrado na porção interna dos ossos [ROLIM, 2010].

O tecido ósseo é um tipo de tecido especializado. Diferente do que se imagina, ele é dinâmico e vital, e é necessário para manter a integridade mecânica necessária para a locomoção [WANG, 2005]. Além disso, o tecido ósseo funciona como um reservatório para muitos minerais do corpo, dentre estes, 99% do Ca do organismo [ROLIM, 2010].

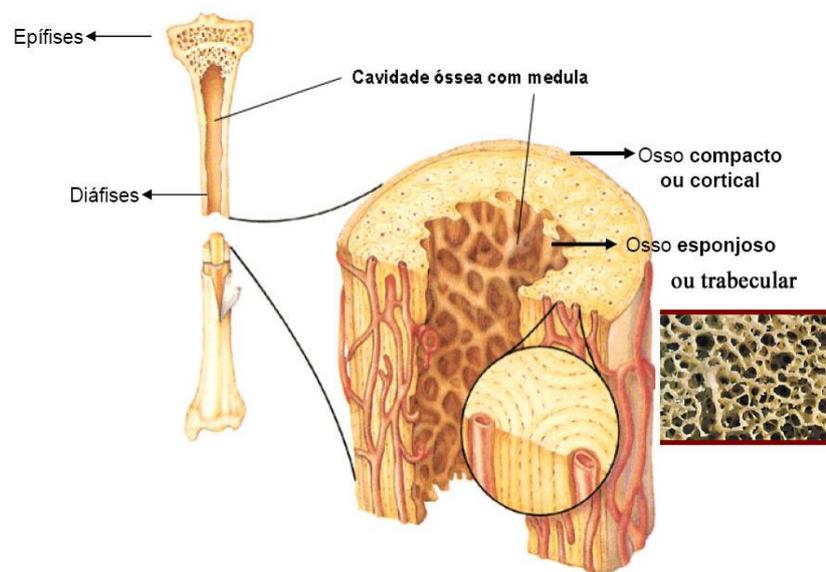


Figura 2.11 – Composição do osso (Adaptado de Netter, 2004)

CAPÍTULO III**3. MATERIAIS E MÉTODOS****3.1. Protocolo experimental**

3.1.1. Animais

Para a realização deste trabalho 20 ratas *Rattus norvegicus albinus* da linhagem *Wistar*, clinicamente saudáveis, com idade aproximada de três meses e pesando entre 190 e 210 gramas, foram mantidas no biotério do Laboratório de Ciências Radiológicas (LCR) localizado na Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Os animais permaneceram em gaiolas de plástico apropriadas, contendo serragem, e receberam água potável e ração (Nuvilab ® CR1) *ad libitum*. Durante todo o procedimento, os animais foram submetidos a ciclos de luminosidade (ciclo 12 horas dia/12 horas noite) e temperatura (22°C) controlada. As ratas foram divididas em 4 grupos, de forma randômica, de acordo com o tratamento no qual foram submetidas, conforme pode ser observado na tabela 2. Os animais do grupo denominado G0 não foram submetidos a nenhum tratamento, sendo o grupo controle.

Tabela 2 – Distribuição dos animais, de acordo com o tratamento realizado.

Grupos	Número de animais	Tratamento
G0	5	-
G1	5	Quimioterapia (ciclofosfamida + doxorubicina)
G2	5	Quimioterapia (ciclofosfamida + docetaxel)
G3	5	Ovariectomia

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da UERJ, através do processo de número CEA/248/2008.

3.1.2. Administração dos poliquimioterápicos

Nos respectivos grupos, os poliquimioterápicos ciclofosfamida + doxorubicina (AT) e ciclofosfamida + docetaxel (AC) foram administrados em 4 ciclos, com intervalo de 7 dias entre eles, por via intraperitoneal. No Grupo G1 cada animal recebeu 50mg/kg de ciclofosfamida e 2,5mg/kg de doxorubicina, por ciclo. No Grupo G2 cada animal recebeu 50mg/kg de ciclofosfamida e 12,5 mg/kg de docetaxel, por ciclo. A dose administrada para cada uma das drogas, em cada ciclo, foi equivalente à dose por ciclo de quimioterapia em humanos [REAGAN-SHAW *et al.*, 2008]. O Grupo G0, controle, recebeu volume de solução NaCl 0,9% equivalente ao volume de quimioterápico, também em 4 ciclos espaçados por 7 dias. A administração de NaCl nas ratas do grupo controle teve como objetivo simular o estresse causado pela manipulação dos animais, para que assim as possíveis alterações encontradas sejam efetivamente causadas pelos quimioterápicos.

3.1.3. Ovariectomia

Para a realização da ovariectomia, os animais foram previamente anestesiados com xilasina e ketamina (2mg/kg e 40mg/kg, respectivamente). Os flancos direito e esquerdo foram tricotomizados e assepsiados. Com o animal em decúbito lateral, fez-se uma pequena incisão através da pele e da musculatura abdominal entre o bordo superior da coxa e a última costela. Através desse orifício, o ovário foi identificado e exteriorizado. Realizou-se um ponto de ligadura das tubas uterinas e artérias ováricas a fim de evitar sangramentos excessivos, e então foi feita a remoção dos ovários. As tubas uterinas foram reposicionadas dentro do abdômem, e então, foi realizada a sutura local. Os animais foram transferidos para uma gaiola individual e foram mantidos em observação até a total recuperação.

3.2. Preparação das amostras para análise por μ XRF

Os animais foram mantidos sob observação constante até a data da eutanásia, que ocorreu 5 meses após o fim dos tratamentos, com 9 meses de idade. Para a realização da eutanásia, os animais foram anestesiados com xilasina e ketamina (2mg/kg e 40mg/kg, respectivamente). Depois de anestesiados, a caixa torácica dos animais foi aberta e uma

injeção de cloreto de potássio foi aplicada diretamente no coração. Foram coletados os fêmures dos animais sendo retirado todo o tecido mole dos mesmos, e então, colocados para secar. Para a realização da análise por μ XRF, a cabeça do fêmur foi cortada em lâminas com espessura de aproximadamente 0,1 cm (Figura 3.1). As amostras foram presas em plástico filme, sendo este último preso a um suporte vazado de alumínio.



Figura 3.1 – a) cabeça do fêmur de rata *Wistar*, b) lâmina da cabeça do fêmur.

3.3. Instrumentação

As medidas de μ XRF foram realizadas na linha de Fluorescência de raios X D09B-XRF no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas, SP, Brasil [PÉREZ *et al.* 1999] (Projeto XAFS1-14447). A linha XRF (Figura 3.2) destina-se à análise da composição química multielementar ($Z \geq 13$), em aplicações científicas na determinação de elementos traços em ciências ambientais, biológicas e de materiais, perfil de profundidade química de filmes finos e mapeamento químico [RIOS *et al.*, 2006, RUBIO *et al.*, 2008, PEREIRA *et al.*, 2010, GUERRA *et al.*, 2010].



Figura 3.2 – Vista geral da estação experimental DO9B-XRF do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.

Para aquisição dos espectros, utilizou-se um feixe branco de radiação com uma faixa de energia de 4 a 24 keV e dimensão de $20 \times 10 \mu\text{m}$ para excitar as amostras. Para a detecção dos raios X fluorescentes emitidos pelas amostras, foi utilizado um espectrômetro de alta resolução, baseado em um detector Silicon Drift com janela de berílio de $8 \mu\text{m}$ de espessura, e área ativa de 7mm^2 . Todas as medidas foram feitas sobre condições normais de pressão e temperatura com uma geometria de excitação padrão (Figura 3.3).

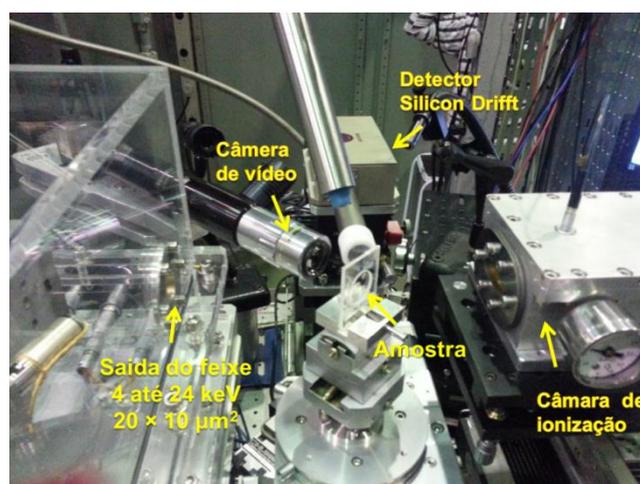


Figura 3.3 – Esquema do arranjo experimental

Como os cortes dos fêmures eram de dimensões bem reduzidas (aprox. 2 a 3 mm), obtiveram-se matrizes de aproximadamente 51 x 51 pixels (considerando que a amostra não foi varrida por inteira para análise) num total de 2601 espectros por amostra.

Para o ajuste dos espectros dos raios X característicos, determinação dos elementos e suas respectivas intensidades fluorescentes e concentrações elementares, foi utilizado o programa PyMca[®] [SOLÉ et al., 2007]. Os passos necessários para utilização do PyMca[®] estão completamente descritos no Anexo A. As informações experimentais listadas abaixo foram incluídas no arquivo de configuração:

- Filtros utilizados: 16 folhas de Al (15 μ m cada)
- Composição (matriz) do material: osso cortical – densidade 1,92 g/cm³
- Espessura da amostra: 0,1 cm
- Área ativa do detector: 7 mm²
- Distância entre amostra e detector: 25 mm
- Tempo de medida para cada espectro: 2s

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos pelas medidas de SR- μ XRF para as amostras de fêmures de ratas para os grupos controle (G0), tratado com docetaxel e ciclofosfamida (G1), tratado com doxorubicina e ciclofosfamida (G2) e para o grupo OVX (G3).

Para analisar todas os fêmures de ratas por SR- μ XRF, as amostras utilizadas foram preparadas como descritas no capítulo 3. Os fundamentos da análise quantitativa por SR- μ XRF estão descritos no capítulo 2. As concentrações elementares foram obtidas de acordo com o Anexo A.

4.1. Análise por SR- μ XRF

Os resultados deste trabalho foram divididos em duas partes: na primeira parte serão apresentados os mapas de distribuição das concentrações elementares presentes nos fêmures das ratas dos grupos G0, G1, G2 e G3. Na segunda etapa serão apresentadas as análises estatísticas para os resultados obtidos. Foram analisados os elementos: K, Ca, Fe, Cu, Zn e Sr em todos os grupos. Todas as concentrações elementares foram obtidas em $\mu\text{g/g}$, exceto o Ca (%).

4.1.1. Análise dos mapas de distribuição elementar

As imagens apresentadas são formadas por um mapeamento ponto a ponto da região selecionada da amostra (matriz 51 x 51 pixels), de maneira que cada ponto representa a concentração do elemento em questão. As diferentes concentrações elementares nas imagens estão representadas em escala de cores. Todos os mapas tem dimensões de 1 x 1 mm² e foram gerados pelo programa *ImageJ*[®] [SCHNEIDER *et al.*, 2012].

- **Grupo G0 (controle):**

A figura 4.1 representa uma fatia de uma amostra de cabeça do fêmur de uma rata do grupo G0. A região delimitada em vermelho representa a área analisada por SR- μ XRF.

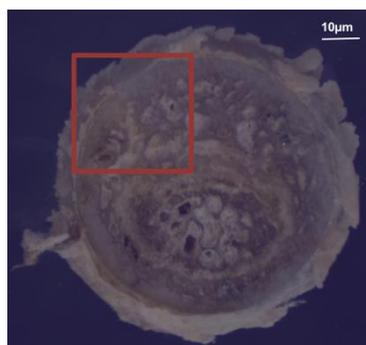


Figura 4.1 – Fatia de uma amostra de cabeça do fêmur do grupo controle. A região delimitada representa a área analisada por SR- μ XRF.

Os mapas de distribuição elementar proporcionam a análise do comportamento dos elementos no tecido. A partir dos mapas dos diferentes elementos no grupo controle, podem-se destacar algumas particularidades do comportamento elementar na cabeça do fêmur de ratas *Wistar*.

As figuras 4.2 (a), (b) e (c) mostram o comportamento típico dos elementos Ca e Fe e a sobreposição desses dois elementos, respectivamente, em uma amostra da cabeça do fêmur de ratas do grupo controle. O cálcio é o elemento mais abundante no osso, com o mapa de distribuição é possível observar que esse elemento está presente em praticamente toda a amostra. Já a concentração de ferro reduzida no osso quando comparada com a concentração de Ca. Na figura 4.2 (c) a distribuição de Ca está representada pela cor azul e a distribuição de Fe está representada pela cor vermelha. É possível observar que ocorre quase uma disputa entre localização de Fe e a localização de Ca. A localização do Fe se dá principalmente no local onde a concentração do Ca é reduzida.

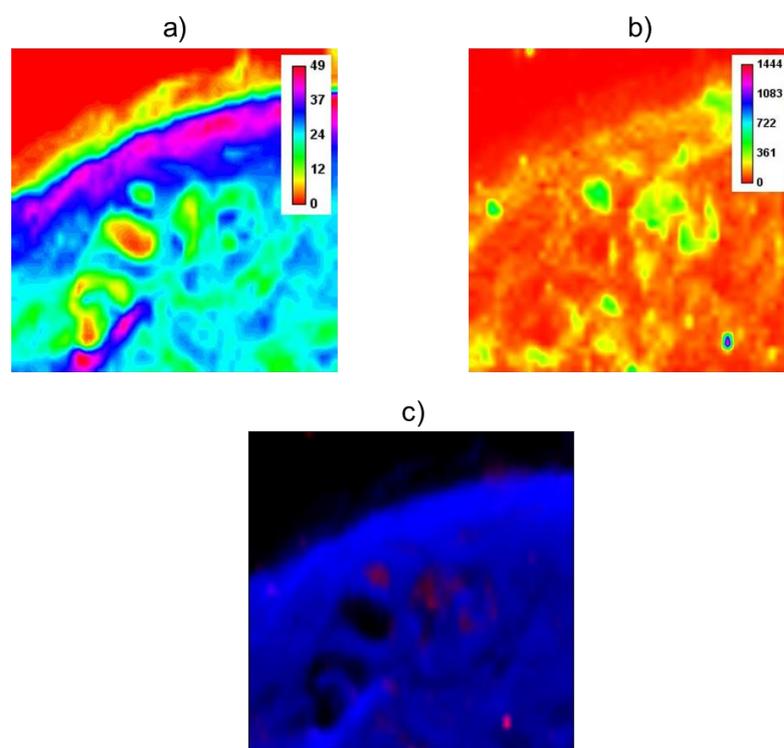


Figura 4.2 – Amostra típica do grupo controle. (a) distribuição de Ca; (b) distribuição de Fe e; (c) distribuição de Ca (azul) e Fe (vermelho) sobrepostas.

As figuras 4.3 (a), (b) e (c) mostram o comportamento típico dos elementos Ca e Zn e a sobreposição desses dois elementos, respectivamente. Na figura 4.3 (c) a distribuição de Ca está representada pela cor azul e a distribuição de Zn está representada pela cor vermelha. A distribuição de Zn é similar à distribuição do Ca na amostra, os dois elementos estão presentes por toda a amostra.

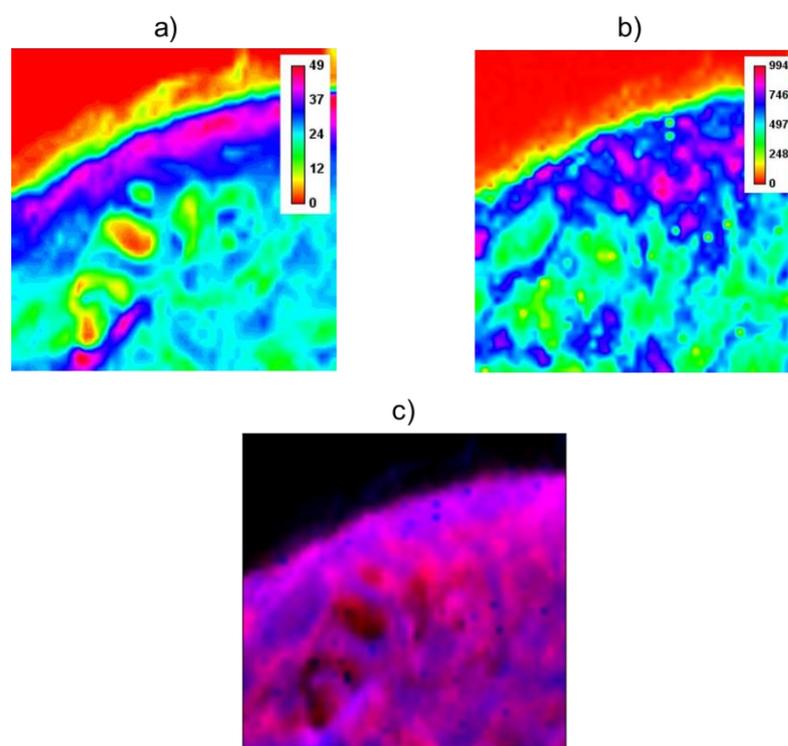


Figura 4.3 – Amostra típica do grupo controle. (a) distribuição de Ca; (b) distribuição de Zn e; (c) distribuição de Ca (azul) e Zn (vermelho) sobrepostas.

As figuras 4.4 (a), (b) e (c) mostram o comportamento típico dos elementos K e Cu e Sr, respectivamente. Devido a limitações do programa *ImageJ*® a escala do elemento Cu foi apresentada em ng/g.

De acordo com a distribuição de K, Cu e Sr (figura 4.4), é possível verificar que esses elementos estão presentes em toda a amostra. Entretanto, o K e o Cu se encontram em maior concentração na parte externa do osso, na parte cortical, enquanto o Sr é localizado em maior concentração na parte interna no osso, na parte trabecular.

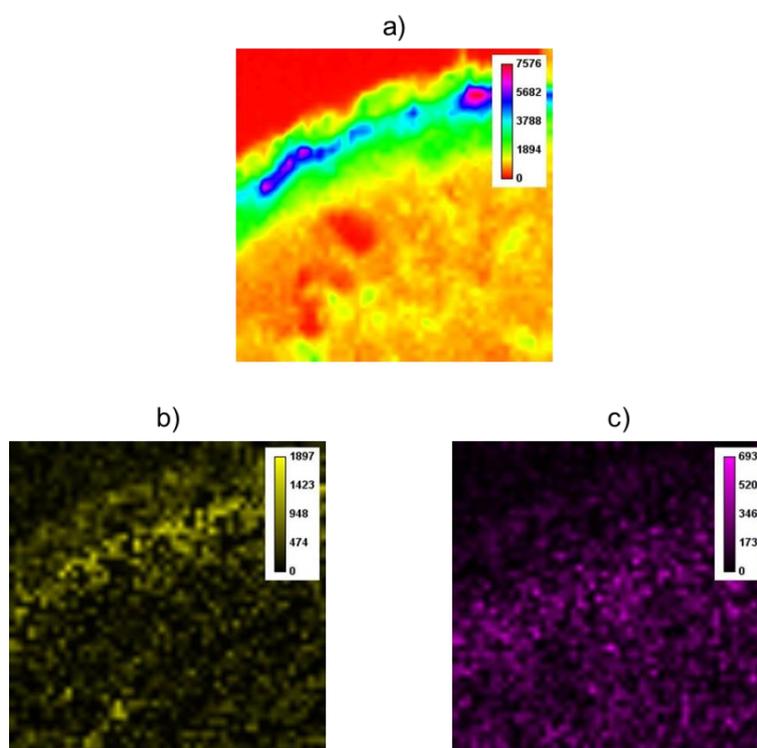


Figura 4.4 – Amostra típica do grupo controle. (a) distribuição de K; (b) distribuição de Cu e; (c) distribuição de Sr.

- **Grupo G1 (Doxorrubicina + ciclofosfamida):**

A figura 4.5 representa uma fatia de uma amostra de cabeça do fêmur de uma rata do grupo G1. A região delimitada em vermelho representa a área analisada por SR- μ XRF.



Figura 4.5 – Fatia de uma amostra de cabeça do fêmur do grupo G1. A região delimitada representa a área analisada por SR- μ XRF.

As figuras 4.6 (a), (b), (c), (d), (e) e (f) mostram o comportamento elementos Ca, Fe, Zn, K, Cu e Sr, respectivamente, em uma amostra típica da cabeça do fêmur de ratas tratadas com doxorubicina associada à ciclofosfamida. Analisando a figura 4.6, pode-se verificar que o poliquimioterápico utilizado no tratamento deste grupo não altera a distribuição preferencial dos elementos. Entretanto, pôde-se observar que a combinação de doxorubicina com ciclofosfamida causou uma evidente degradação, formando buracos nas amostras do grupo G1. São considerados buracos onde há ausência de elementos. Os buracos presentes no grupo G1 estão destacados com círculos na figura 4.6.

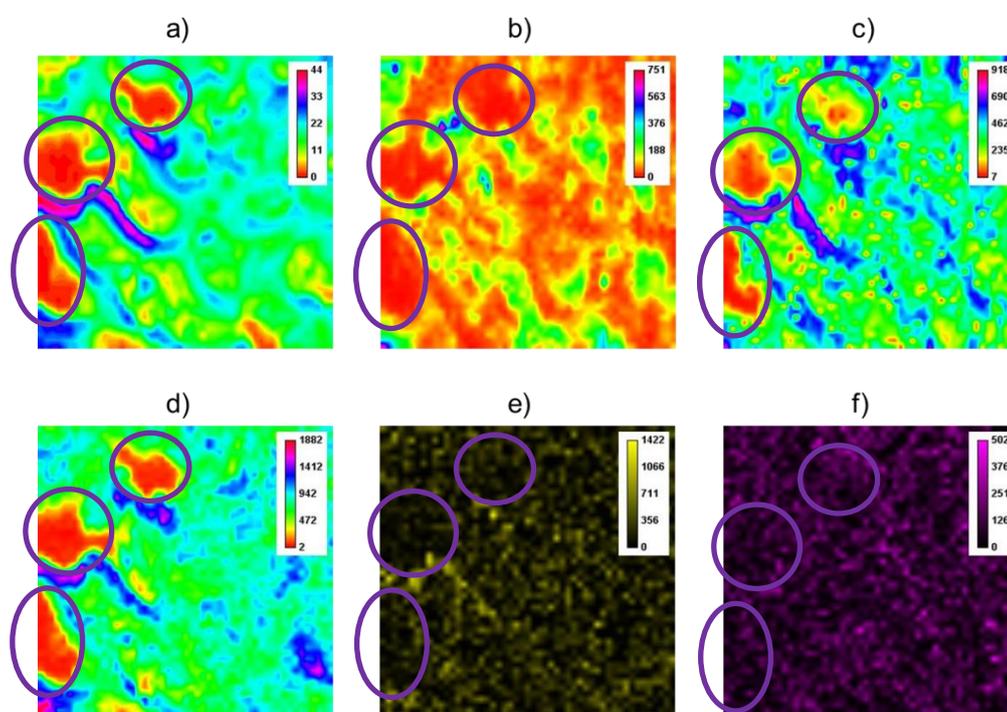


Figura 4.6 – Amostra típica do grupo G1. (a) distribuição de Ca; (b) distribuição de Fe; (c) distribuição de Zn; (d) distribuição de K; (e) distribuição de Cu e; (f) distribuição de Sr.

- **Grupo G2 (Docetaxel + ciclofosfamida):**

A figura 4.7 representa uma fatia de uma amostra de cabeça do fêmur de uma rata do grupo G2. A região delimitada em vermelho representa a área analisada por SR- μ XRF.



Figura 4.7 – Fatia de uma amostra de cabeça do fêmur do grupo G2. A região delimitada representa a área analisada por SR- μ XRF.

As figuras 4.8 (a), (b), (c), (d), (e) e (f) mostram o comportamento elementos Ca, Fe, Zn, K, Cu e Sr, respectivamente, em uma amostra típica da cabeça do fêmur de ratas tratadas com docetaxel combinado com ciclofosfamida. Não foi possível observar nenhuma alteração causada pelos quimioterápicos nas distribuições dos elementos, nenhuma degradação e nenhum buraco pôde ser observado. Os mapas de distribuição elementar das amostras do grupo G2 são qualitativamente similares aos mapas do grupo controle.

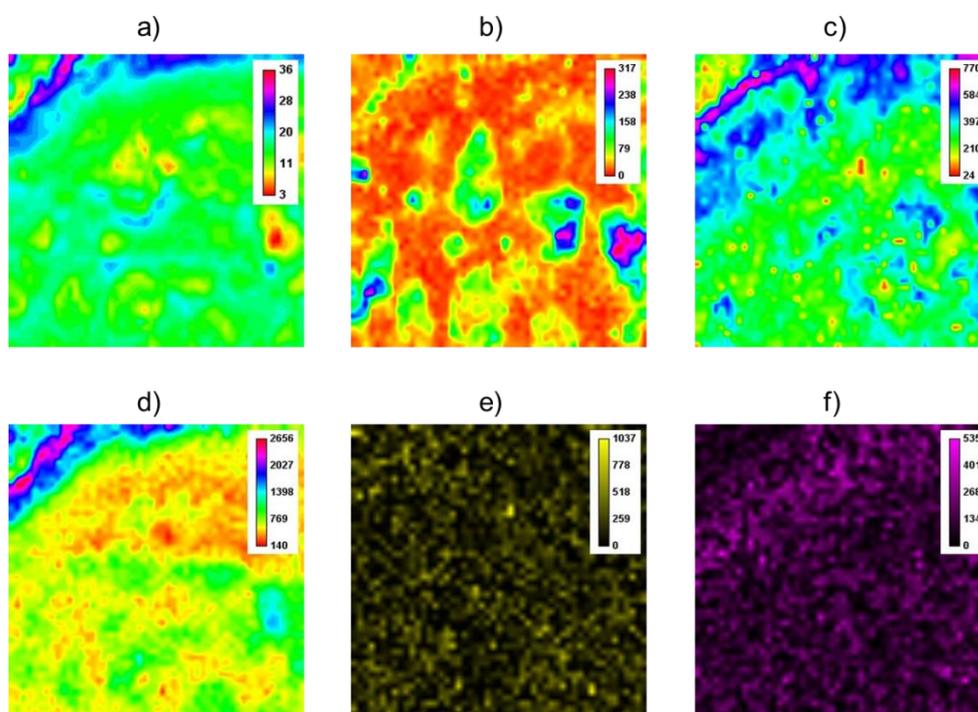


Figura 4.8 – Amostra típica do grupo G2. (a) distribuição de Ca; (b) distribuição de Fe; (c) distribuição de Zn; (d) distribuição de K; (e) distribuição de Cu e; (f) distribuição de Sr.

- **Grupo G3 (OVX):**

O grupo G3, composto por ratas ovariectomizadas, foi analisado a fim de ser um controle positivo para a perda óssea. Sabe-se que ratas que passam pelo processo de ovariectomia são animais modelo para o estudo de efeitos causados pela baixa de estrogênio no organismo como, por exemplo, a perda óssea [KALU, 1991, CARDOSO NETTO et al., 2006]. A figura 4.9 representa uma fatia de uma amostra de cabeça de fêmur de uma rata do grupo G3. A região delimitada em vermelho representa a área analisada por SR- μ XRF.

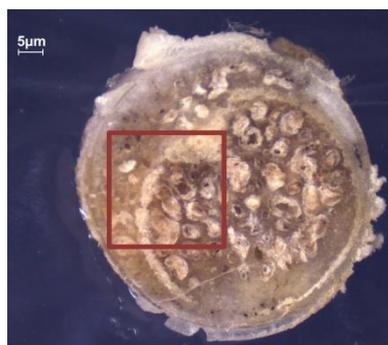


Figura 4.9 – Fatia de uma amostra de cabeça do fêmur do grupo G3.

As figuras 4.10 (a), (b), (c), (d), (e) e (f) mostram o comportamento dos elementos Ca, Fe, Zn, K, Cu e Sr, respectivamente, em uma amostra típica da cabeça do fêmur de ratas tratadas ovariectomizadas. Como era de se esperar, pôde-se observar alguns efeitos causados pelo processo de ovariectomia. Os mapas de distribuição elementares do grupo G3 apresentaram alguns buracos nas amostras desse grupo. Os buracos presentes neste grupo estão destacados com círculos na figura 4.10.

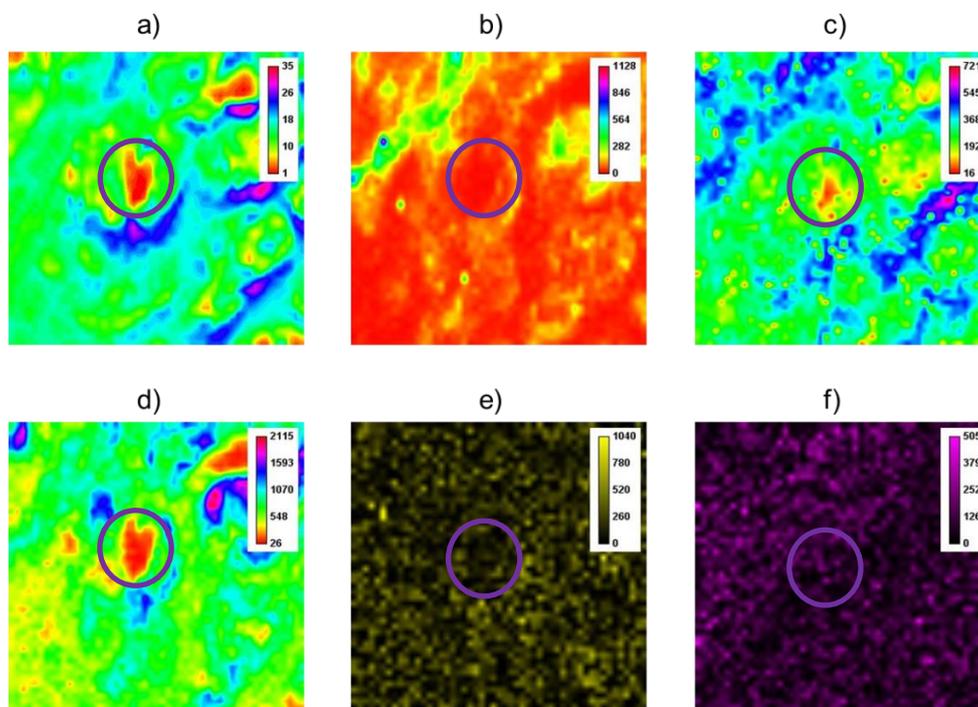


Figura 4.10 – Amostra típica do grupo G3. (a) distribuição de Ca; (b) distribuição de Fe; (c) distribuição de Zn; (d) distribuição de K; (e) distribuição de Cu e; (f) distribuição de Sr.

4.1.2. Análise estatística dos resultados

O teste utilizado para a análise estatística foi o *one-way* ANOVA (análise de variância com um fator) com o teste *post-hoc* Tukey. O teste ANOVA é um método para se testar a igualdade de três ou mais médias populacionais através da análise das variâncias amostrais. Para isso, o teste calcula a variabilidade dos resultados, fazendo a razão (F) entre variância que ocorre entre os grupos e a variância proveniente dos componentes do próprio grupo. A resposta gerada para esse teste estatístico é se existe diferença significativa entre os grupos analisados. Os testes *post-hoc* são testes usados para mostrar onde estão essas diferenças, após o cálculo de F da ANOVA [ANJOS, 2009]. O teste estatístico ANOVA encontra-se descrito no Anexo B.

A composição elementar do osso sofre variações dependendo de alguns fatores como: idade, dieta, ou até mesmo da presença de doenças. A medida do conteúdo mineral do osso é geralmente bem aceita como uma apropriada estimativa da força óssea [TZAPHLIDOU, 2008]. Alguns autores avaliaram, utilizando diversas técnicas, a concentração de determinados elementos e suas funções no metabolismo do osso, tanto em humanos [ROBERTS *et al.*, 1996, ZAICHICK, 2007, ARAS *et al.*, 1999, BRODZIAK-DOPIERALA *et al.*, 2009] quanto em animais [GOULDING *et al.*, 1983, YAMAGUCHI *et al.*, 1986, NIE *et al.*, 1999, HUNTINGTON *et al.*, 2008]. Entretanto, esse tipo de estudo nunca havia sido realizado para avaliação dos efeitos secundários de quimioterápicos.

O cálcio é o elemento mais abundante no osso. Um homem adulto possui, em média, cerca de 1 kg de Ca no corpo e mais de 99% está localizado nos ossos e dentes. No osso, esse mineral está presente na forma de hidroxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$]. O Ca influencia na força estrutural do osso através de seu efeito sobre a massa óssea, permitindo que os ossos suportem o peso do corpo [ZHU *et al.*, 2012]. A monitoração desse elemento pode ajudar a entender as mudanças que ocorrem em ossos normais e em ossos com algum tipo de perda óssea. A figura 4.11 mostra as concentrações de Ca obtidas para o grupo G0, G1, G2 e para o grupo G3.

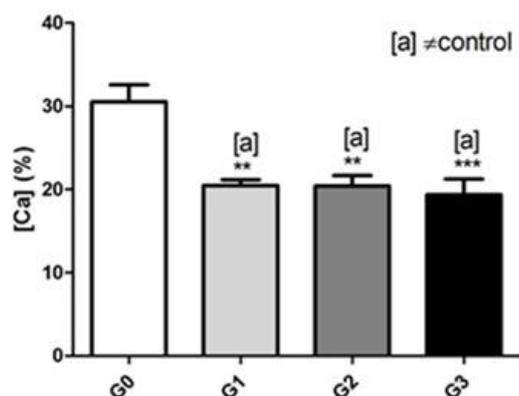


Figura 4.11 – Concentração de Ca para os grupos G0, G1, G2 e G3. O símbolo [a]** significa diferença significativa ($P < 0,01$) em relação ao grupo controle e; o símbolo [a]*** significa diferença significativa ($P < 0,001$) em relação ao grupo controle.

Os resultados mostraram que os tratamentos causaram uma diminuição significativa de aproximadamente 30 % da concentração de Ca nos fêmures das ratas. Essa alteração causada pelos dois protocolos de quimioterapia utilizados é comparável aos danos causados pelo processo de ovariectomia. Essa variação da concentração de Ca sugere uma maior fragilidade nos ossos das ratas tratadas com quimioterápicos. Não houve diferença significativa quando comparados os dois grupos tratados com quimioterápicos.

A principal importância do K é baseada em sua influência na homeostase do Ca. A ingestão de baixas doses de K pode aumentar a perda de Ca por meio urinário e alguns estudos mostram que existe relações entre a ingestão de potássio e a densidade óssea [NIEVES, 2005]. Contudo, a função do potássio para o desenvolvimento ósseo e o comportamento desse elemento no tecido não está elucidado na literatura. A figura 4.12 mostra as concentrações de K obtidas para todos os grupos analisados.

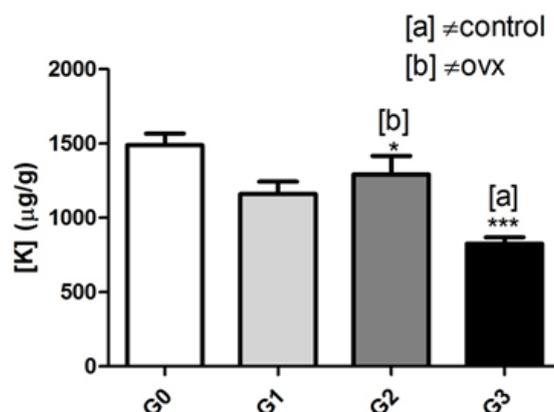


Figura 4.12 – Concentração de K para os grupos G0, G1, G2 e G3. O símbolo [a]*** significa diferença significativa ($P < 0,001$) em relação ao grupo controle e; o símbolo [b]* significa diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo OVX.

Comparando os grupos G1 com o grupo controle (G0) foi observada uma diminuição de aproximadamente 20% na concentração de K, mas de acordo com o teste estatístico utilizado essa diferença não foi significativa. Comparando o grupo G2 com o grupo controle foi observada uma diferença não significativa de menos 6% da concentração de K. Entretanto, houve uma diferença significativa da concentração desse elemento no grupo G3 de aproximadamente metade da concentração quando comparada ao grupo controle. Os resultados sugerem que a concentração de K não foi alterada pelo uso dos quimioterápicos.

Ferro pode desempenhar um importante papel na formação do osso, atuando como um cofator para enzimas envolvidas na síntese de colágeno. Estudos mostram que a força necessária para quebrar o osso é menor em ratos com deficiência de Fe, o que sugere que a deficiência desse elemento tem um importante papel no que diz respeito à fragilidade óssea [ILICH *et al.*, 2000].

A figura 4.13 mostra as concentrações de Fe obtidas para todos os grupos analisados. Não houve variação significativa da concentração de Fe para nenhum dos grupos estudados.

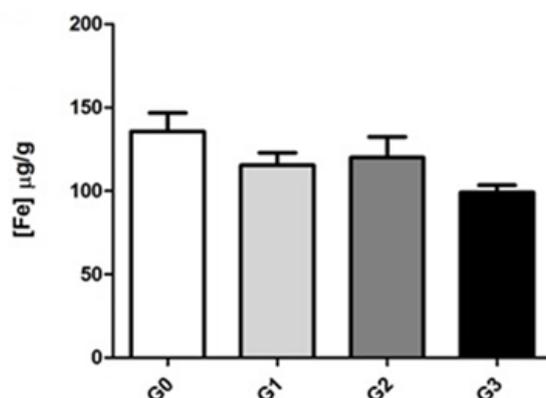


Figura 4.13 – Concentração de Fe para os grupos G0, G1, G2 e G3.

O corpo humano contém de 75 a 100 mg de Cu em média, acumulado no organismo principalmente durante o crescimento. O cobre influencia na formação do osso, na mineralização óssea e na integridade do tecido conjuntivo [PALACIOS, 2006]. A deficiência de Cu pode inibir o crescimento ósseo e promover mudanças patológicas características da osteoporose. Ossos de animais com deficiência desse elemento mostraram um aumento na fragilidade [BEATTIE *et al.*, 1992]. A figura 4.14 mostra as concentrações de Cu obtidas para todos os grupos analisados.

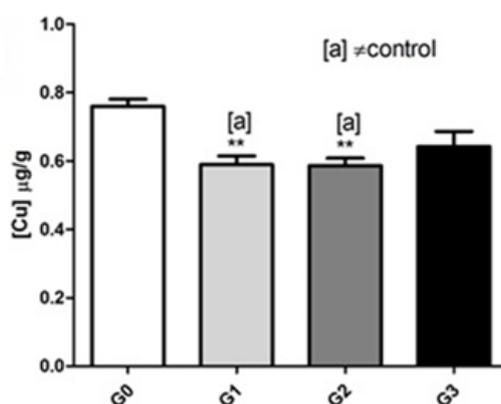


Figura 4.14 – Concentração de Cu para os grupos G0, G1, G2 e G3. O símbolo [a]** significa diferença significativa ($P < 0,01$) em relação ao grupo controle.

Os resultados para concentração de Cu mostraram uma diminuição significativa de aproximadamente 20% dos grupos G1 e G2 quando comparadas as concentrações

obtidas para o grupo controle. Não houve variação significativa quando comparado o grupo G3 com o grupo G0.

Zinco é um mineral essencial que compõem mais de 200 enzimas e é um elemento necessário para síntese de colágeno. O Zn age no metabolismo do osso como um cofator, estimulando a síntese de proteínas necessárias para a formação da matriz orgânica. Esse elemento desempenha um importante papel como indicador para a mineralização do osso como: conteúdo mineral ósseo, densidade mineral óssea, tamanho e peso. O Zn também está envolvido na regulação da formação e crescimento ósseo e, além disso, tem um importante papel no sistema imune [MOLOKWU *et al.*, 2006]. A figura 4.15 mostra as concentrações de Zn obtidas para todos os grupos analisados.

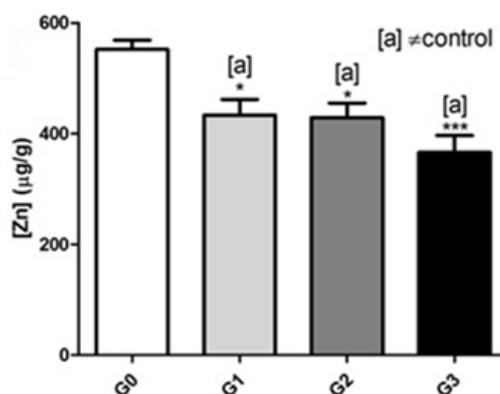


Figura 4.15 – Concentração de Zn para os grupos G0, G1, G2 e G3. O símbolo [a]* significa diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle e; o símbolo [a]*** significa diferença significativa ($P < 0,001$) em relação ao grupo controle.

Houve uma diminuição significativa de aproximadamente 20% da concentração de Zn nos grupos tratados com quimioterápicos (G1 e G2), e uma redução de aproximadamente 30% no grupo de ratas ovariectomizadas (G3), quando comparados ao grupo controle. Não houve variação significativa desse elemento entre os tratamentos quimioterápicos.

A deficiência de Zn prejudica a síntese do DNA e o metabolismo de proteínas, que podem gerar efeitos negativos sobre a formação óssea. O papel do Zn na formação

óssea é bem estabelecido na literatura [YAMAGUCHI, 1998] e alguns trabalhos relatam baixos níveis de Zn em humanos com doenças relacionadas à perda óssea, como a osteoporose [ILICH *et al.*, 2000].

O estrôncio encontrado no corpo é proveniente da alimentação. Em animais com alimentação normal cerca de 99% do Sr absorvido pelo organismo é depositado nos ossos. O estrôncio possui muitas semelhanças com o Ca, como por exemplo, a absorção intestinal, a incorporação no tecido ósseo e também possui alta afinidade com a hidroxiapatita [CABRERA *et al.* 1999]. A figura 4.16 mostra as concentrações de Sr obtidas para todos os grupos analisados.

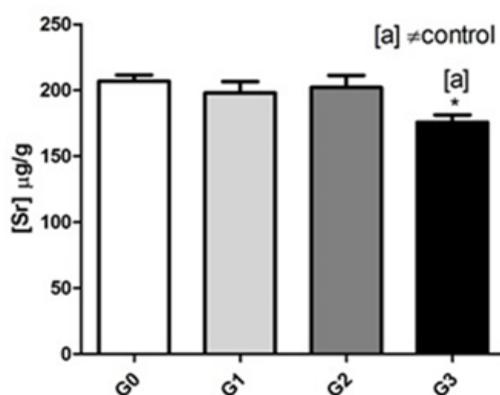


Figura 4.16 – Concentração de Sr para os grupos G0, G1, G2 e G3. O símbolo [a]* significa diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle.

Os protocolos de quimioterapia utilizados não causaram nenhuma alteração na concentração de Sr nos fêmures das ratas tratadas. Somente pode ser observada uma diminuição significativa (aproximadamente 15%) desse elemento no grupo de ratas ovariectomizadas.

O estrôncio tem um efeito benéfico sobre o osso. Estudos do uso desse elemento como uma droga para o combate da osteoporose demonstram vários efeitos benéficos capazes de prevenir a perda da massa óssea em animais, mantendo a formação óssea a nível elevado e impedindo a reabsorção [DAHL *et al.* 2001].

CAPÍTULO V

5. CONCLUSÕES

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais comum nas mulheres. Tendo em vista o grande impacto dessa patologia sobre a sociedade, grandes esforços vêm sendo feitos com o objetivo de encontrar novas alternativas terapêuticas. Além da eficácia no tratamento do câncer, que é o principal objetivo, outra avaliação que deve ser considerada para o uso de determinados quimioterápicos refere-se ao estudo de seus efeitos secundários para o organismo.

Pouco existe na literatura sobre modificações ósseas causadas por efeitos secundários após o uso de quimioterápicos, principalmente no que diz respeito à distribuição e concentração de elementos importantes para a saúde dos ossos.

Neste trabalho, pode-se demonstrar a aplicabilidade e as vantagens de se usar a técnica SR- μ XRF para mapear e quantificar alterações elementares mínimas (da ordem de ppm), na cabeça do fêmur de ratas, causadas por diferentes tratamentos quimioterápicos.

Com esse estudo foi possível concluir que há uma diminuição da concentração de elementos importantes para a formação e manutenção do tecido ósseo, tais como, Ca, Cu e Zn, após os tratamentos quimioterápicos. A diminuição da concentração de elementos como Ca e Zn nos animais tratados com os dois protocolos quimioterápicos utilizados, foram comparáveis às mudanças causadas pelo processo de ovariectomia.

Foi verificada uma diminuição da concentração dos elementos K e Sr no grupo de ratas ovariectomizadas quando comparadas com o grupo controle. Entretanto, os quimioterápicos utilizados no estudo não causaram variações significativas na concentração destes elementos quando comparados aos animais do grupo controle.

Quantitativamente, de acordo com o teste estatístico utilizado, não houve nenhuma diferença significativa na concentração de nenhum dos elementos estudados quando comparados o tratamento com doxorrubicina combinado com ciclofosfamida com o tratamento utilizando docetaxel e ciclofosfamida. Entretanto, qualitativamente, com os mapas de distribuição elementares obtidos através da SR- μ XRF, foi possível verificar que o tratamento quimioterápico utilizando a doxorrubicina combinada à ciclofosfamida causou uma maior redução na homogeneidade da distribuição elementar

e maior formação de buracos (ausência de elementos em determinadas áreas), tornando a cabeça do fêmur frágil e mais susceptível a fraturas nesse grupo.

Pode-se concluir com este estudo que o tratamento que utiliza a doxorrubicina combinada à ciclofosfamida (ciclo AC) pode causar mais danos ósseos do que o protocolo que utiliza docetaxel e ciclofosfamida (ciclo TC).

Algumas das vantagens e desvantagens de um tratamento podem ser reconhecidas através da avaliação dos efeitos secundários causados pelo quimioterápico utilizado. Este trabalho abre uma nova linha de pesquisa para a avaliação de agentes já utilizados e de possíveis novos agentes para o tratamento do câncer de mama.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, O., ABE, R., ENOMOTO, K., et al. “Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials”, *Lancet*, v. 365, pp. 1687-1717, 2005.
- ALMEIDA, V.L., LEITÃO, A., REINA, L.C.B., et al. “Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução”, *Quimica Nova*, v. 28, n. 1, pp. 118-29, 2005.
- AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEM. “ASHP Guidelines on preventing medication errors with antineoplastic agents”, *American Journal of Health-System Pharmacy*, v. 59, n. 17, pp.1648-1668, 2002.
- ANJOS, A. *Estatística II*. Fevereiro, 2009. Disponível em: <<http://www.est.ufpr.br/ce003/material/apostilace003.pdf>>. Acesso em: 15 janeiro. 2015.
- ARAS, N.K., YILMAZ, G., ALKAN, S., KORKUSUZ, F. “Trace elements in human bone determined by neutron activation analysis”, *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry*, v. 239, n. 1, 79-86, 1999.
- ARFELLI, F. “Synchrotron light and imaging systems for medical radiology”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, v. 454, n. 1, pp. 11-25, 2000.
- BARROS, A.C.S.D., BARBOSA, E.M., GEBRIM, L.H., et al. *Diagnóstico e tratamento do câncer de mama*, 2001. Disponível em: <http://www.connectmed.com.br/amb/novo/projeto_diretrizes/cancer_mama.pdf>. Acesso em: 15 novembro. 2014.
- BEATTIE, J.H., AVENELL, A. “Trace element nutrition and bone metabolism”, *Nutrition research reviews*, v. 5, n. 01, p. 167-188, 1992.
- BERNASCONI, G., HASELBERGER, N., MARKOWICZ, A., VALKOVIC, V. “Applications of a capillary based X-ray microfluorescence system”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, v. 86, n. 3, 333-338, 1994.

- BJARNASON, N.H., HITZ, M., JORGENSEN, N.R., VESTERGAARD, P. “Adverse bone effects during pharmacological breast cancer therapy”, *Acta Oncologica*, v. 47, n. 4, pp. 747-754, 2008.
- BORGES, F.V, 2008, Avaliação *in vitro* da atividade antitumoral de compostos de coordenação de ferro. Dissertação de M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil.
- BRODZIAK-DOPIERALA, B., KWAPULINSKI, J., KUSZ, D., GAJDA, Z., SOBCZYK, K. “Interactions between concentrations of chemical elements in human femoral heads”, *Archives of environmental contamination and toxicology*, v. 57, n. 1, 203-210, 2009.
- CABRERA, W.E., SCHROOTEN, I., DE BROE, M.E., D'HAESE, P.C. “Strontium and bone”, *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 14, n. 5, pp. 661-668, 1999.
- CARDOSO NETTO, C., FRANCO, M., CUNHA, M.S.C.A.D., MIYASAKA, C.K. “Efeitos da ovariectomia experimental no metabolismo ósseo de ratas Wistar adultas: um modelo para estudo da osteoporose”, *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 5, n. 3, pp. 231-238, 2006.
- CASTILHO, R.B., 2006, Fotoionização de produtos naturais voláteis utilizando luz síncrotron e técnicas de tempo de voo. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- CLARKE, M., COLLINS, R., DARBY, S., et al. “Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials”, *Lancet*, v. 366, n. 9503, pp. 2087-2106, 2005.
- CROWN, J., O'LEARY, M. “The taxanes: an update”, *The Lancet*, v. 355, n. 9210, p. 1176-1178, 2000.
- DAHL, S.G., ALLAIN, P., MARIE, P.J., et al. "Incorporation and distribution of strontium in bone", *Bone*, v. 28, n. 4, pp. 446-453, 2001.
- EKTESSABI, A., YOSHIDA, S., TAKADA, K. “Distribution of Iron in a Single Neuron of Patients with Parkinson’s Disease”, *X-ray Spectrometry*, v. 28, n. 6, p. 456-460, 1999.
- FACINA, T. *Incidência do Câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância*. Março, 2014. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>>. Acesso em: 24 novembro. 2014.

- FISHER, B., MAMOUNAS, E.P. "Preoperative chemotherapy: a model for studying the biology and therapy of primary breast cancer", *Journal of clinical oncology*, v. 13, n. 3, pp. 537-540, 1995.
- FUCHS, R.K., ALLEN, M.R., CONDON, K.W., et al. "Strontium ranelate does not stimulate bone formation in ovariectomized rats", *Osteoporosis International*, v. 19, n. 9, pp. 1331-1341, 2008.
- GOGAS, H., FOUNTZILAS, G. "The role of taxanes as a component of neoadjuvant chemotherapy for breast cancer", *Annals of oncology*, v. 14, n. 5, pp. 667-674, 2003.
- GORDON A.M., HURWITZ S., SHAPIRO C.L., LEBOFF M.S. "Premature ovarian failure and body composition changes with adjuvant chemotherapy for breast cancer", *Menopause*, v. 18, n. 11, pp. 1244-1248, 2011.
- GOULDING, A., CAMPBELL, D. "Dietary NaCl loads promote calciuria and bone loss in adult oophorectomized rats consuming a low calcium diet", *The Journal of nutrition*, v. 113, n. 7, pp. 1409-1414, 1983.
- GUERRA, C.S., GERLACH, R.F., PINTO, N.G.V., et al. "X-ray fluorescence with synchrotron radiation to elemental analysis of lead and calcium content of primary teeth", *Applied Radiation and Isotopes*, v. 68, n. 1, pp. 71-75, 2010.
- HERSHMAN, D.L., MCMAHON, D.J., CREW, K.D., et al. "Prevention of bone loss by zoledronic acid in premenopausal women undergoing adjuvant chemotherapy persist up to one year following discontinuing treatment", *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 95, n. 2, pp. 559-566, 2010.
- HUNTINGTON, C.E., CARLETON, S.M., MCBRIDE, D.J., et al. "Multi-element analysis of bone from the osteogenesis imperfecta model (OIM) mouse using thermal and fast neutron activation analysis", *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 276, n. 1, pp. 65-69, 2008.
- ILICH, J.Z., KERSTETTER, J.E. "Nutrition in bone health revisited: a story beyond calcium", *Journal of the American College of Nutrition*, v. 19, n. 6, pp. 715-737, 2000.
- INCA, *ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer*. 2011, 1ed. Rio de Janeiro, Instituto Nacional de Câncer.
- JONES, S.E., SAVIN, M.A., HOLMES, F.A., et al. "Phase III trial comparing doxorubicin plus cyclophosphamide with docetaxel plus cyclophosphamide as

- adjuvant therapy for operable breast cancer", *Journal of Clinical Oncology*, v. 24, n. 34, pp. 5381-5387, 2006.
- KALU, D.N. "The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss", *Bone and mineral*, v. 15, n. 3, pp. 175-191, 1991.
- KEIZER, H.G., PINEDO, H.M., SCHUURHUIS, G.J., JOENJE, H. "Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity", *Pharmacology & therapeutics*, v. 47, n. 2, pp. 219-231, 1990.
- KONDO, N., TAKAHASHI, A., ONO, K., OHNISHI, T. "DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways", *Journal of nucleic acids*, v. 2010, 2010.
- LACHANCE, G.R., CLAISSE F. Quantitative X-ray Fluorescence Analysis: Theory and Application. New York. *John Willey & Sons*. 1.ed. 1995.
- MARGARITONDO, G. "A Primer in Synchrotron Radiation: Everything You Wanted to Know About SEX (Synchrotron Emission of X-Rays) But Were Afraid to Ask". *Journal of Synchrotron Radiation*, v. 2, n. 3, p. 148-154, 1995.
- MARTIN, M., VILLAR, A., SOLE-CALVO, A., et al. "Doxorubicin in combination with fluorouracil and cyclophosphamide (iv FAC regimen, day 1, 21) versus methotrexate in combination with fluorouracil and cyclophosphamide (iv CMF regimen, day 1, 21) as adjuvant chemotherapy for operable breast cancer: a study by the GEICAM group", *Annals of Oncology*, v. 14, n. 6, pp. 833-842, 2003.
- MELO JÚNIOR, A.S., 2007, Análise quantitativa do material particulado na região de campinas através das técnicas de microfluorescência de raios x e reflexão total usando radiação síncrotron. Tese de D.Sc., UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.
- MOLOKWU, C.O., LI, Y.V. "Zinc homeostasis and bone mineral density", *Obio Research and Clinical Review Fall*, v. 15, pp. 7-15, 2006.
- MUNZONE, E., CURIGLIANO, G., BURSTEIN, H.J., et al. "CMF revisited in the 21st century", *Annals of oncology*, v. 23, n. 2, pp. 305-311, 2012.
- NASCIMENTO, V. *Técnicas analíticas nucleares de fluorescência de raios X por dispersão de energia (ED-XRF) e por reflexão total (TXRF)*. Julho, 1999. Disponível em: <http://www.raiosx.ufc.br/site/wpcontent/uploads/downloads/2012/10/EDXRF_TXRF.pdf>. Acesso em: 29 setembro. 2014.
- NATTINGER, A.B., KNEUSEL, R.T., HOFFMANN, R.G., GILLIGAN, M.A. "Relationship of distance from a radiotherapy facility and initial breast cancer

- treatment”, *Journal of the National Cancer Institute*, v. 93, n. 17, pp. 1344-1346, 2001.
- NETTER, F.H., 2004, *Atlas de Anatomia Humana*. 3ª ed. Porto Alegre, Artmed.
- NIE, H., QIN, L., TIAN, W., et al. “Preliminary study on the relationship between osteoporosis and trace elements with rat models”, *Biological trace element research*, v. 71, n. 1, pp. 623-628, 1999.
- NIEVES, J.W. “Osteoporosis: the role of micronutrients”, *The American journal of clinical nutrition*, v. 81, n. 5, pp. 1232S-1239S, 2005.
- PAI, V.B., NAHATA, M.C. “Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents”, *Drug Safety*, v. 22, n. 4, pp. 263-302, 2000.
- PALACIOS, C. "The role of nutrients in bone health, from A to Z", *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 46, n. 8, pp. 621-628, 2006.
- PEMMER, B., ROSCHGER, A., WASTL, A., et al. “Spatial distribution of the trace elements zinc, strontium and lead in human bone tissue”, *Bone*, v. 57, n. 1, pp. 184-193, 2013.
- PEREIRA, F.M.V., MILORI, D.M.B.P. “Investigation of the stages of citrus greening disease using micro synchrotron radiation X-ray fluorescence in association with chemometric tools”, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 25, n. 3, pp. 351-355, 2010.
- PÉREZ, C.A., RADTKE, M., SÁNCHEZ, H.J., et al. “Synchrotron radiation X-ray fluorescence at the LNLS: beamline instrumentation and experiments”, *X-Ray Spectrometry*, v. 28, n. 5, pp. 320-326, 1999.
- PIGA, G., SANTOS-CUBEDO, A., BRUNETTI, A., et al. “A multi-technique approach by XRD, XRF, FT-IR to characterize the diagenesis of dinosaur bones from Spain”, *Palaeogeography*, v. 310, n. 1, pp. 92-107, 2011.
- PRINS, M., DAVIES, S.T., BOWEN, D.K. “Trace element analysis and element mapping by scanning X-ray fluorescence at daresbury SRS”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, v. 222, n. 1, pp. 324-328, 1984.
- REAGAN-SHAW, S., NIHAL, M., AHMAD, N. “Dose translation from animal to human studies revisited”, *The FASEB Journal*, v. 22, n. 3, pp. 659-661, 2008.

- RICCI, M. D., PINOTTI, J. A., CARVALHO, F. M., et al. "Influência da Preservação de Pele em Cirurgia Conservadora por Câncer de Mama sobre as Taxas de Recorrência Local e a Distância", *RBGO*, v. 25, n. 6, 2003.
- RIOS, F. J., ALVES, J. V., PÉREZ, C. A., et al. "Combined investigations of fluid inclusions in opaque ore minerals by NIR/SWIR microscopy and microthermometry and synchrotron radiation X-ray fluorescence", *Applied geochemistry*, v. 21, n. 5, pp. 813-819, 2006.
- ROBERTS, N.B., WALSH, H.P.J., KLENERMAN, L., et al. "Determination of elements in human femoral bone using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 11, n. 2, pp. 133-138, 1996.
- ROLIM, A.E.H., 2010, Avaliação de microesferas de hidroxiapatita, dopadas ou não com estrôncio, no reparo de defeito ósseo crítico, em calvária de rato. Dissertação de M.Sc., Faculdade de Odontologia/ Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil.
- RUBIO, M., PEREZ, R.D., PEREZ, C.A., et al. "Synchrotron microscopic X-ray fluorescence analysis of the effects of chronic arsenic exposure in rat brain", *Radiation Physics and Chemistry*, v. 77, n. 1, pp. 1-8, 2008.
- SANTOS JUNIOR, J.C., SOARES, L.F.M., "Câncer de Mama". In: SABAS C.V., et al. (eds), *Oncologia básica*, 1 ed., capítulo 3, Teresina, PI: Fundação Quixote, 2012.
- SAWADA, N.O., NICOLUSSI, A.C., OKINO, L., et al. "Avaliação da qualidade de vida de pacientes com câncer submetidos à quimioterapia." *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, v. 43, n. 3, pp. 581-587, 2009.
- SCHNEIDER, C.A., RASBAND, W.S., ELICEIRI, K.W. "NIH image to imageJ: 25 years of image analysis", *Nature methods*, v. 9, n. 7, pp. 671-675, 2012.
- SHAPEERO, L.G., DE VISSCHERE, P.J.L., VERSTRAETE, K.L., et al. "Post-treatment complications of soft tissue tumours", *European journal of radiology*, v. 69, n. 2, pp. 209-221, 2009.
- SHAPIRO, C.L., MANOLA, J, LEBOFF, M. "Ovarian failure after adjuvant chemotherapy is associated with rapid bone loss in women with early-stage breast cancer", *Journal of Clinical Oncology*, v. 19, n. 14, pp. 3306-3311, 2001.
- SIEGEL, R., NAISHADHAM, D., JEMAL, A. "Cancer statistics, 2012", *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 62, n. 1, pp. 10-29, 2012.

- SIMABUCO, S. M., 1993, Emprego da fluorescência de raios X por Dispersão de energia no estudo da dinâmica da vinhaça no solo. Tese de D.Sc., IPEN/CNEN, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.
- SOLÉ, V.A., PAPILLON E., COTTE M., et al. “A multiplatform code for the analysis of energy dispersive X-ray fluorescence spectra”, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, v. 62, n. 1, pp. 63-68, 2007.
- TIEZZI, D.G. “Cirurgia conservadora no câncer de mama”, *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 29, n. 8, pp. 428-34, 2007.
- TZAPHLIDOU, M. “Bone architecture: collagen structure and calcium/phosphorus maps”, *Journal of biological physics*, v. 34, n. 1-2, pp. 39-49, 2008.
- VAN GRIEKEN, R., MARKOWICZ A., 2002, *Handbook of X-ray Spectrometry*. 2 ed. New York, Basel.
- WANG, C.C., 2005, Efeito da simpatectomia química sobre as vértebras de ratas osteopênicas induzidas pela ovariectomia. Dissertação de M.Sc., Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.
- YAMAGUCHI, M. "Role of zinc in bone formation and bone resorption", *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, v. 11, n. 2-3, pp. 119-135, 1998.
- YAMAGUCHI, M., INAMOTO, K., SUKETA, Y. “Effect of essential trace metals on bone metabolism in weanling rats: Comparison with zinc and other metals' actions”, *Research in experimental medicine*, v. 186, n. 5, pp. 337-342, 1986.
- ZAICHICK, V. "Application of INAA in the assessment of selected elements in cancellous bone of human iliac crest", *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry*, v. 271, n. 3, pp. 573-576, 2007.
- ZHU K., PRINCE R.L. “Calcium and bone”, *Clinical biochemistry*, v. 45, n. 12, pp. 936-942, 2012.

ANEXO A

A.1.1. PyMca[®]

A figura A.2 mostra a interface do programa PyMca[®].

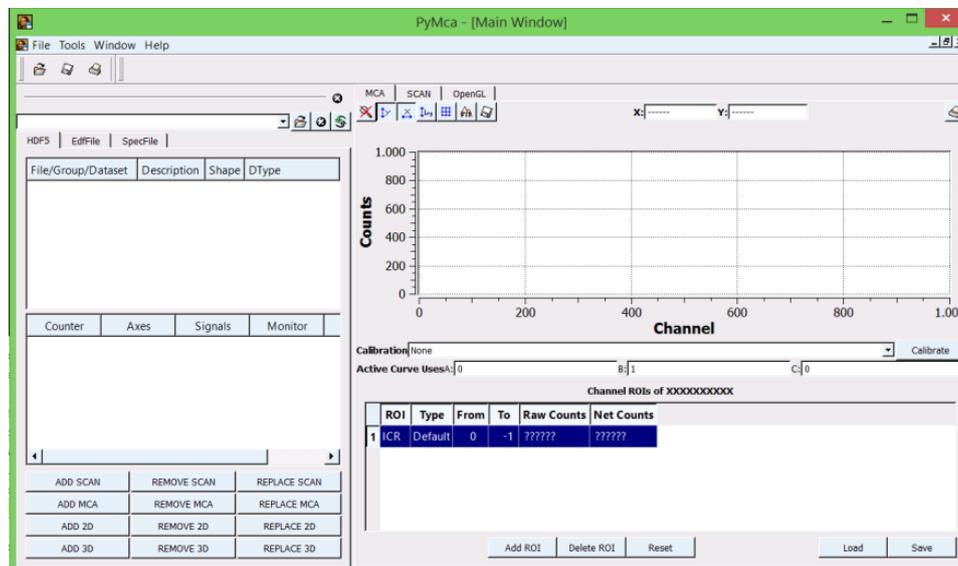


Figura A.2 – Interface do programa PyMca[®]

Alguns arquivos são necessários para que sejam fornecidas as informações sobre o setup e amostra, para que então o programa seja capaz de realizar os cálculos das concentrações elementares presentes nas amostras estudadas. São eles: arquivo de calibração (.calib) e o arquivo de configuração (.cfg).

1. Gerando o arquivo de calibração:

O arquivo de calibração é necessário para que o programa discrimine as energias dos picos do espectro analisado. Quando abrimos o espectro pela primeira vez, o que se tem é uma distribuição de intensidade (contagens) x canal. Uma vez realizada a calibração, ou seja, determinar qual canal corresponde cada energia coletada pelo detector, obtém-se então um espectro de intensidade x energia. Com isso, é possível distinguir os elementos e suas respectivas intensidades dentro da amostra.

Para gerar o arquivo de calibração:

- ✓ Clicar em *File* → *Open* → *Data Source* (Figura A.3).

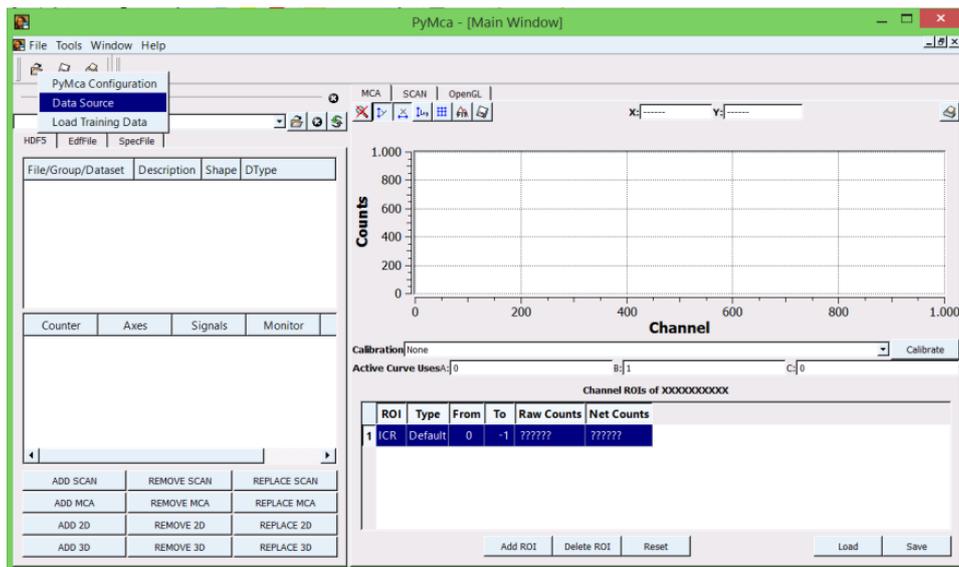


Figura A.3 – Abrindo *Data Source*

- ✓ Na pasta em que se encontram os arquivos, selecionar o arquivo *.spe* da amostra a ser analisada.
- ✓ Depois de selecionado o arquivo, clicar em *Calibrate* → *Compute*, como mostra a figura A.4

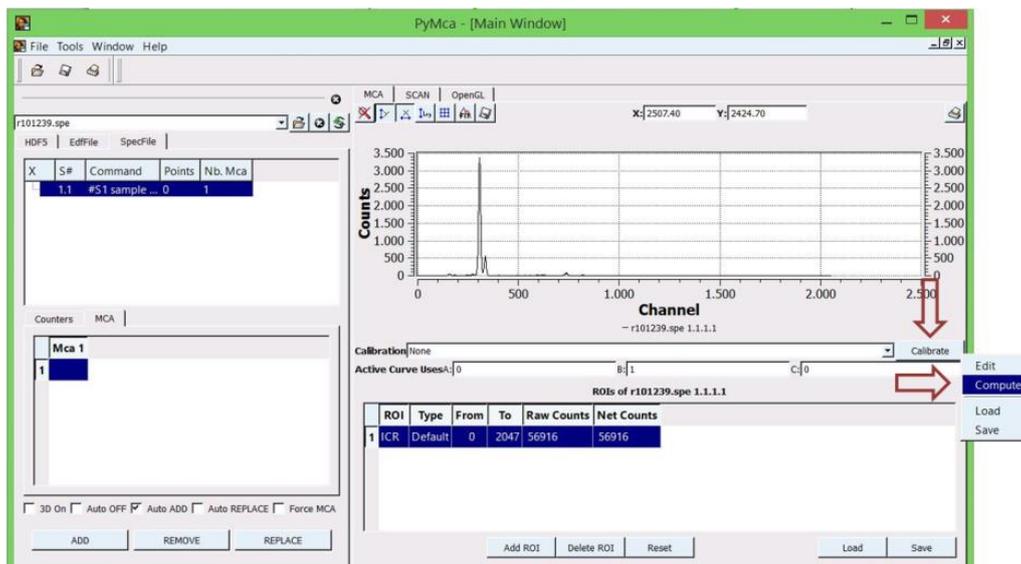


Figura A.4 – Abrindo a calibração

- ✓ Ao clicar em *Search* o programa irá marcar os picos característicos do espectro (Figura A.5).

- ✓ Ao selecionar uma das linhas irá aparecer um novo quadro, e então deverá ser marcado o elemento correspondente ao pico selecionado (Figura A.5). Essa etapa deve ser repetida para todos os elementos presentes no espectro.

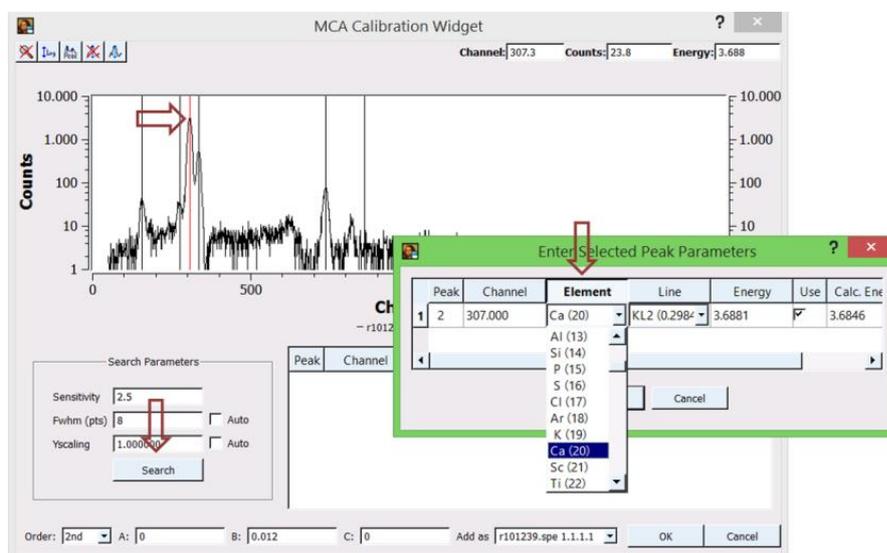


Figura A.5 – Identificando os picos

- ✓ Após fazer a identificação de todos os picos e clicar em OK, a tela irá se fechar e voltará para a tela inicial.
- ✓ Para salvar o arquivo de calibração (.calib): *Calibrate* → *Save*, como mostra a figura A.6.

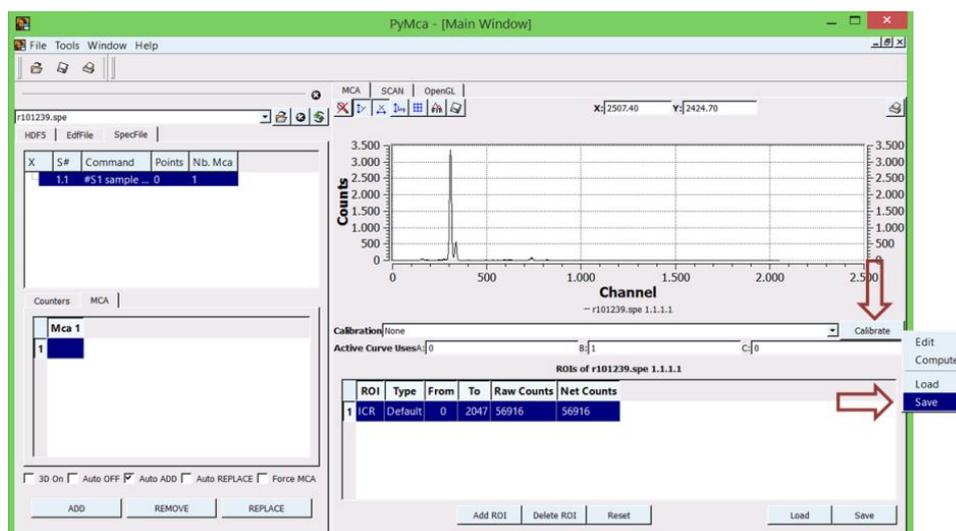


Figura A.6 – Gerando o arquivo de calibração (.calib)

O arquivo de calibração (.calib) gerado será utilizado para a análise de todos os espectros.

2. Gerando o arquivo de configuração:

O arquivo de configuração é necessário para fornecer informações relativas às características do setup utilizado e às características da amostra analisada.

Para gerar o arquivo de configuração:

- ✓ Clicar em *File* → *Open* → *Data Source* (Figura A.3).
- ✓ Novamente selecionar algum arquivo .spe da amostra a ser analisada.
- ✓ Depois de selecionado o arquivo, clicar em *Calibrate* → *load*, como mostra a figura A.7. E então selecionar o arquivo de calibração (.calib) gerado na etapa anterior.

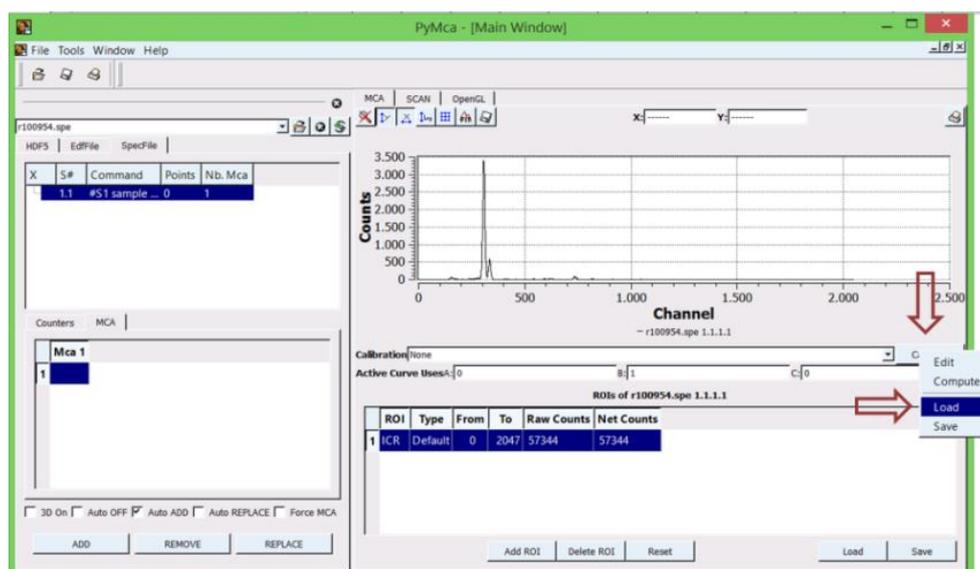


Figura A.7 – Selecionando o arquivo de calibração

- ✓ Como mostra a figura A.8, clicar em *Fit Active Curve* → *Advanced*

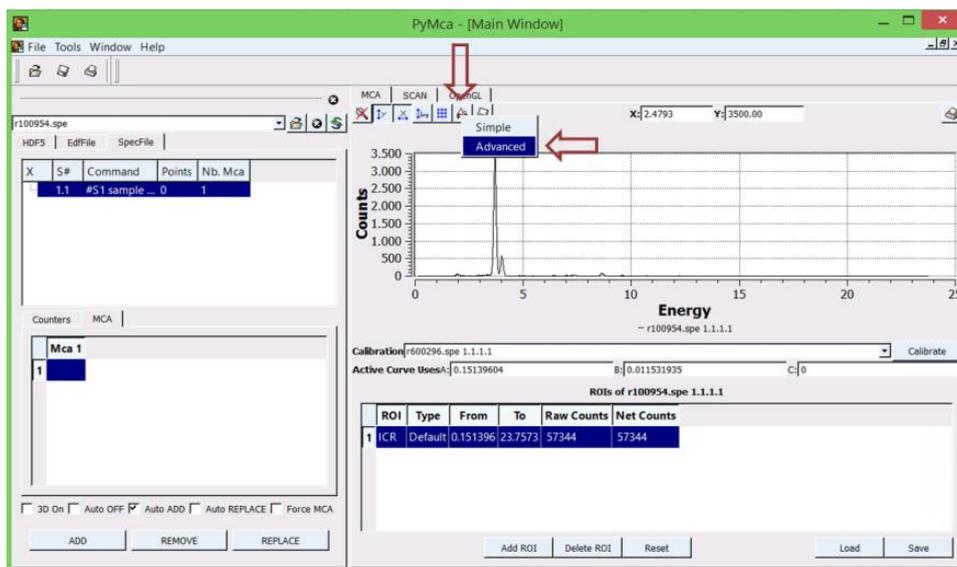


Figura A.8 – Abrindo o FIT

- ✓ Em seguida irá abrir a janela *McaAdvancedFit*. Nessa janela, clicar em *configure* (Figura A.9).

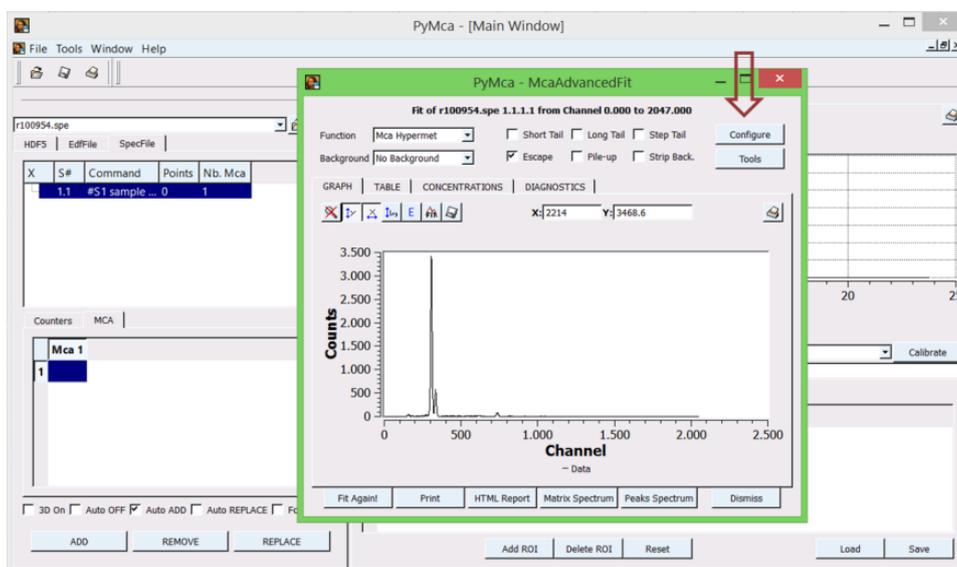


Figura A.5.9 – Tela McaAdvancedFit

Nessa etapa (figura A.10) são informados todos os dados necessários para o cálculo da concentração elementar das amostras que serão analisadas. Foi fornecido pela linha D09B-XRF do LNILS um arquivo de configuração com informações prévias sobre o feixe, detector e outras informações relevantes.

- ✓ Para carregar o arquivo de configuração fornecido pela linha clicar em *load* (figura A.10).

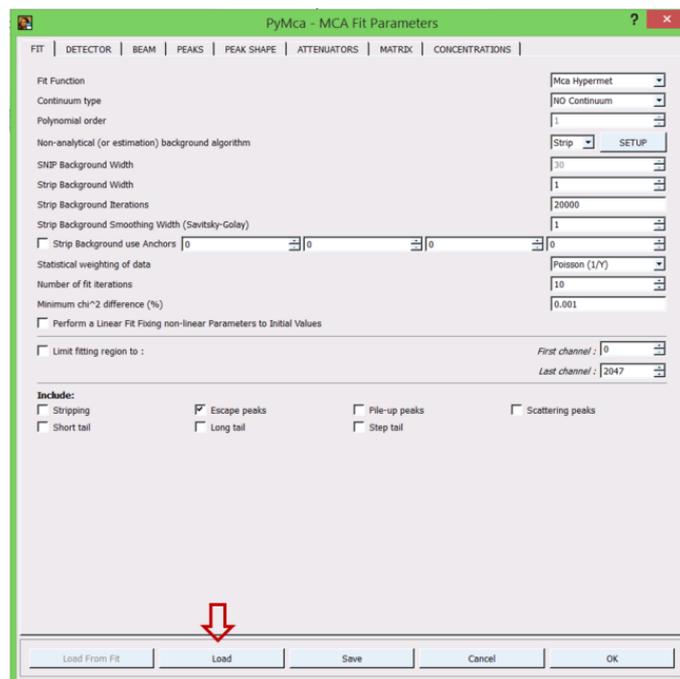


Figura A.10 – Entrada de dados no arquivo de configuração.

Para o presente estudo, além dos dados já informados pela linha, foram acrescentados ao arquivo de configuração os seguintes dados experimentais:

- Filtros utilizados: 16 folhas de Al (15 μ m cada)
- Composição (matriz) do material: osso – densidade 1,92 g/cm³
- Espessura da amostra: 0,1 cm
- Área ativa do detector: 7 mm²
- Distância entre amostra e detector: 25 mm
- Tempo de medida para cada espectro: 2s

- ✓ Além dos dados já descritos, no arquivo de configuração é necessário informar também quais elementos estão presentes no espectro (Figura A.11). Após todos os parâmetros serem descritos no arquivo de configuração, basta salvar em *Save*, gerando o arquivo na extensão *.cfg*.

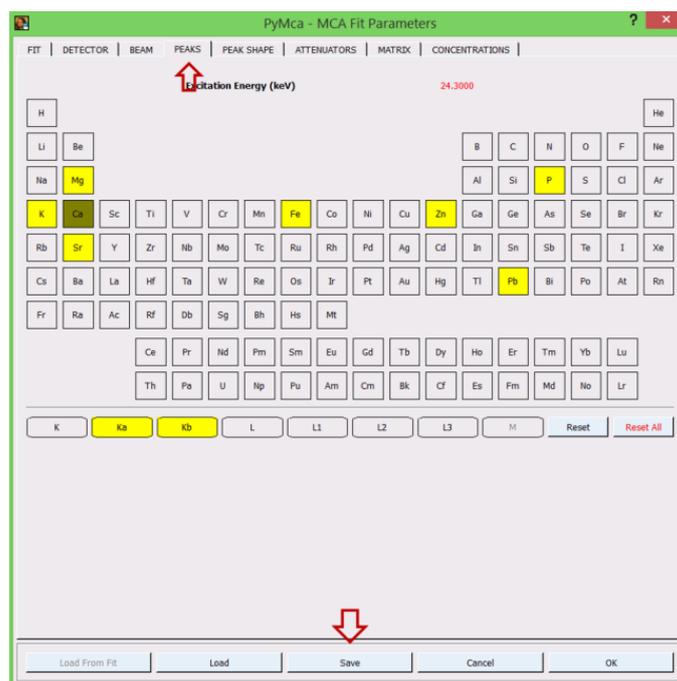


Figura A.11 – Indicando elementos no arquivo de configuração

3. Análise do padrão:

As concentrações elementares nas amostras da cabeça do fêmur de ratas foram determinadas utilizando uma amostra de referência certificada, *Standard Reference Material* (SRM) 1486 – “*Bone Meal*”, produzida por NIST/USA (*National Institute of Standard and Technology*). Os valores certificados e seus respectivos intervalos de confiança são apresentados na tabela 3.

Tabela 3 – Concentrações elementares presentes no padrão de osso humano.

Valor Certificado ($\mu\text{g/g}$)	
Ca*	$26,58 \pm 0,24$
Fe	99 ± 8
Zn	147 ± 16
Cu	0,8
Sr	264 ± 7
K	412 ± 4

*cg/g (%)

Antes do cálculo da concentração dos elementos no material de interesse, é preciso uma análise do comportamento da amostra padrão em relação ao sistema utilizado para a realização das medidas de SR- μ XRF.

- ✓ Primeiro é necessário abrir o espectro a ser analisado. Clicar em *File* → *Open* → *Data Source* (Figura A.3). Então abrir o espectro (.spe) gerado a partir da medida da amostra padrão.
- ✓ Carregar o arquivo de calibração (.calib), como mostrado na figura figura A.7.
- ✓ Abrir a janela *McaAdvancedFit* clicando em *Fit Active Curve* → *Advanced* (figura A.8)
- ✓ Carregar o arquivo de configuração (.cfg) como mostrado na figura figura A.10.
- ✓ Novamente na aba *McaAdvancedFit* clicar em *Fit Again!* como ilustra a figura figura A.12.

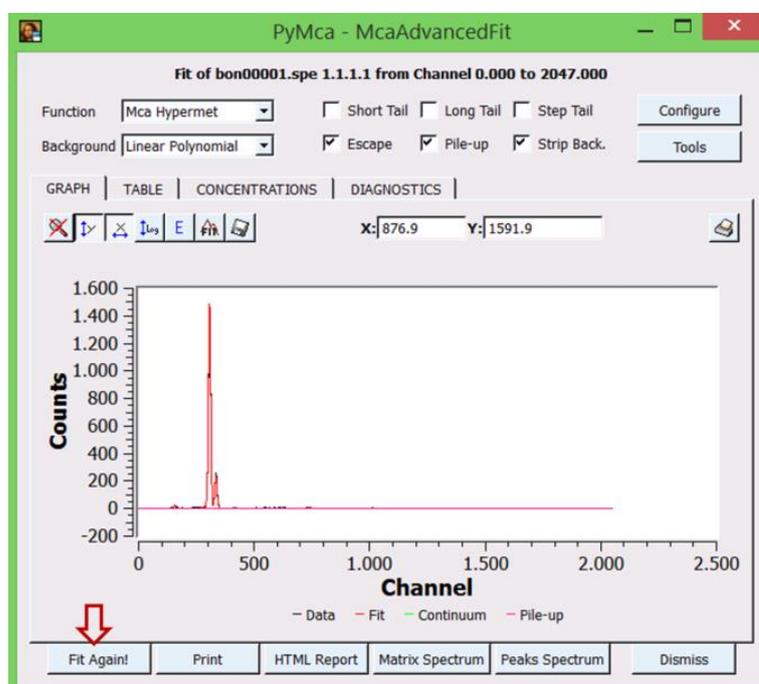


Figura A.12 – Análise da amostra padrão

Após o Fit, o programa utiliza todos os parâmetros pré-estabelecidos pelos arquivos de configuração no espectro a ser analisado. Como foi descrito no item 2.7, a intensidade ($I_i(E_i)$) que sai da amostra depende de parâmetros como: feixe, setup utilizado, matriz da amostra, do elemento que sofreu fluorescência, entre outros.

O interesse para o posterior cálculo da concentração elementar pelo PyMca[®] utilizando um padrão, é o fluxo de fótons (photons/s) que saem da amostra e são coletados pelo detector. Como a amostra padrão possui valores de referência estabelecidos de concentrações elementares, é possível determinar o valor do fluxo (figura A.13). Esse valor é diferente para cada elemento presente na amostra.

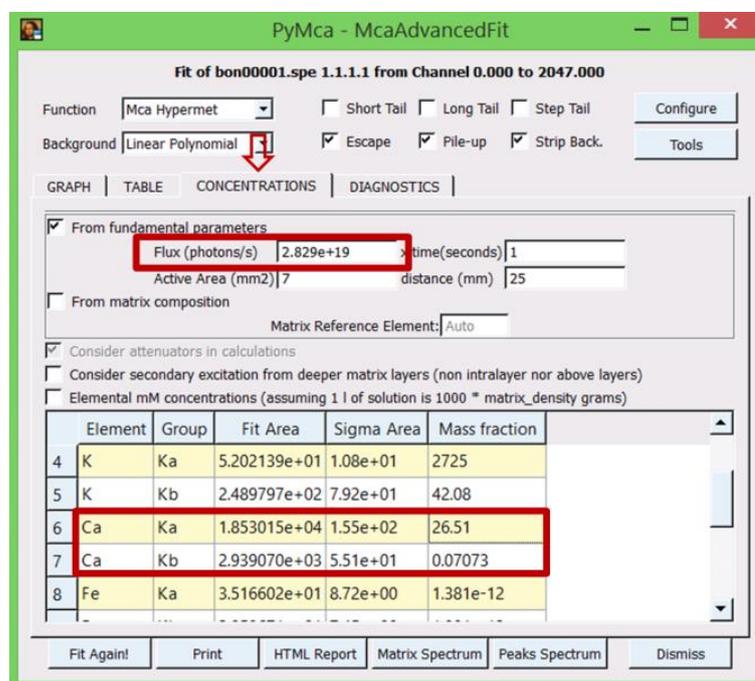


Figura A.13 – Exemplo da determinação do fluxo para o Ca na amostra padrão.

4. Cálculo da concentração elementar:

Para o cálculo da concentração elementar, é necessária a atualização do arquivo de configuração (.cfg) informando o fluxo de fótons obtidos pela análise da amostra padrão, como mostra a figura A.14. Como dito anteriormente, o fluxo irá variar dependendo do elemento de interesse. Com isso, torna-se necessário um arquivo .cfg diferente para cada elemento que se deseja quantificar.

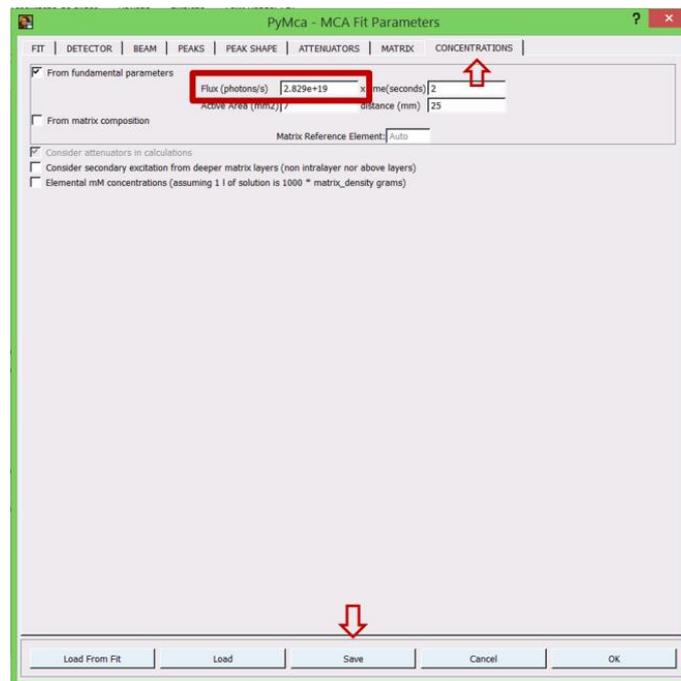


Figura A.14 – Arquivo .cfg final para o Ca.

Após a geração do arquivo de configuração final para cada elemento presente no padrão utilizado (com valores de fluxo), para a obtenção dos valores de concentração seguir os passos descritos abaixo:

- ✓ Na tela inicial do PyMca®: *Tools* → *Batch Fitting* (figura A.15)

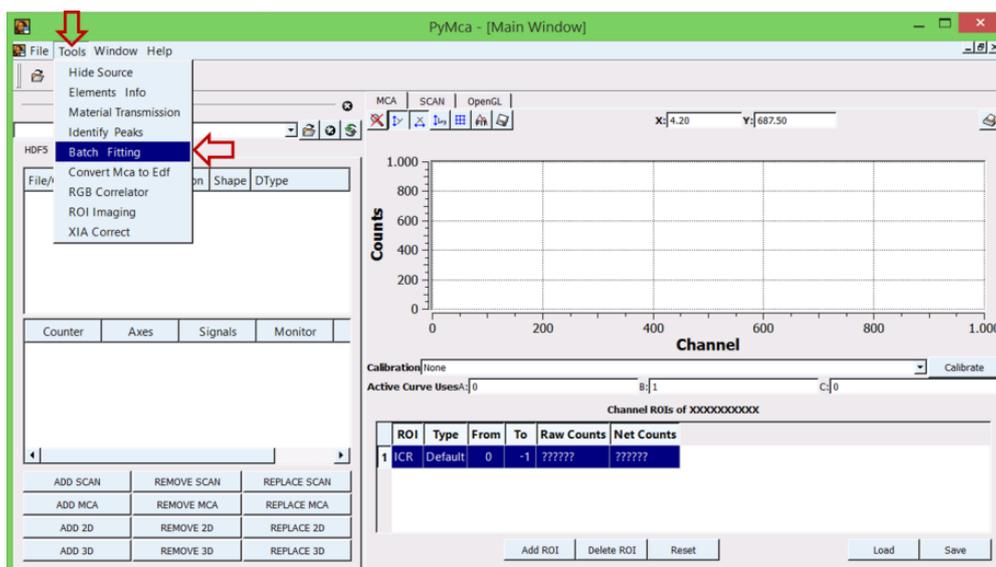


Figura A.15 – Abrindo o PyMca batch fitting.

Nessa etapa são selecionados todos os espectros da amostra a ser analisada. Os espectros são selecionados em *Input File List*. Em *Fit Configuration file*, seleciona-se o arquivo de configuração (.cfg) que irá ser utilizado. Em *Output dir* é determinada a pasta de armazenamento para os arquivos de saída. É necessário ainda marcar as opções *Generate .fit Files* e *Concentrations*, como mostra a figura A.16.

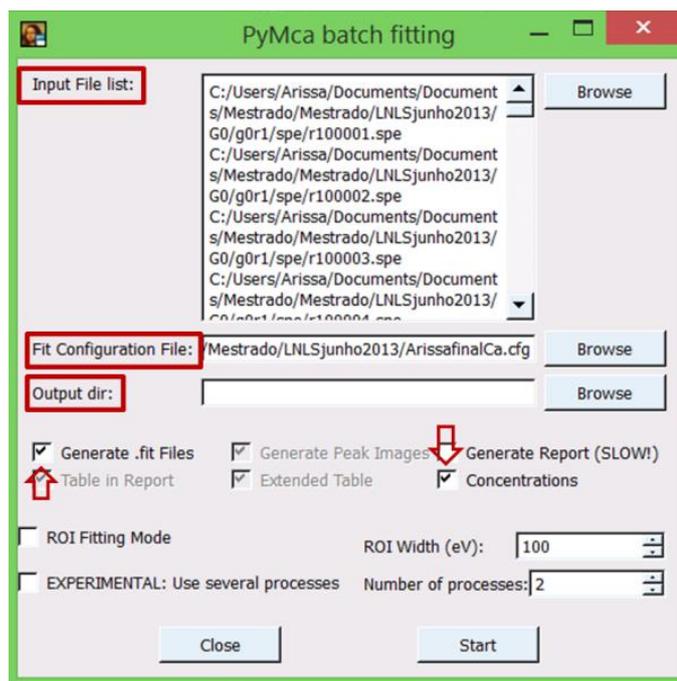


Figura A.16 – Cálculo da concentração elementar pelo PyMca[®].

Após o processamento dos dados da amostra, o software gera alguns arquivos de saída. Entre eles o arquivo na extensão .txt com as concentrações elementares em todos os espectros analisados. Esse processo deve ser feito para todos os elementos que se deseja quantificar.

ANEXO B

B.1. Análise de variância.

O objetivo principal da análise de variância (*analysis of variance* - ANOVA) é a comparação de mais de dois grupos no que diz respeito à localização. Para exemplificar, considerando a situação em que se pretende avaliar a eficácia de um novo medicamento no tratamento de uma determinada doença através da administração de quatro tratamentos diferentes: o novo medicamento, outros dois já existentes no mercado para tratar a doença em causa e um placebo. Os diferentes tratamentos são usados em indivíduos que sofrem daquela doença distribuída aleatoriamente por quatro grupos. A análise de variância é capaz de verificar, através da comparação das localizações dos diferentes grupos, se os tratamentos têm resultados diferentes ou ainda se o novo medicamento é mais eficaz do que os já existentes do mercado. Esta comparação é feita a partir da análise da dispersão presente no conjunto de dados, por esse motivo a designação de análise de variância.

No exemplo acima descrito, as observações provêm de grupos classificados através de um só fator (a doença em causa), neste caso, fala-se em análise de variância com um fator *one-way* ANOVA.

Os pressupostos exigidos para o uso desse tipo de teste são:

- Possuir g grupos de observações independentes, sendo os grupos independentes entre si.
- Cada grupo de observações deve provir de uma população com distribuição normal.
- A variância das g populações deve ser a mesma (homogeneidade das variâncias).

Nas situações práticas descritas por este tipo de modelo interessa fundamentalmente testar se as médias m_1, m_2, \dots, m_g das g populações associadas às g amostras são significativamente diferentes umas das outras.

As hipóteses do teste fundamental da ANOVA podem então ser especificadas do seguinte modo:

H_0 : *não existe diferença entre as médias*

H_1 : *Pelo menos uma das médias é diferente das demais*

A ideia de base para testar estas hipóteses é a seguinte: estima-se a variância σ^2 por dois métodos diferentes, um que não depende da veracidade de H_0 e outro que depende da veracidade de H_0 . Depois são comparadas as duas estimativas. Se H_0 é verdadeira, então as duas estimativas devem ser próximas; caso contrário, devem diferir significativamente.

Sendo:

$$N = \sum_{i=1}^g n_i \quad (\text{número total de observações})$$

$$\bar{X}_i = \frac{1}{n_i} \sum_{j=1}^{n_i} X_{ij} \quad (\text{média das observações do grupo } i)$$

$$\bar{X} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^g \sum_{j=1}^{n_i} X_{ij} \quad (\text{média de todas as observações})$$

A variabilidade total das observações é dada pela soma dos quadrados das distâncias de cada observação à média global

$$SST = \sum_{i=1}^g \sum_{j=1}^{n_i} (X_{ij} - \bar{X})^2$$

Verifica-se a seguinte igualdade:

$$\underbrace{\sum_{i=1}^g \sum_{j=1}^{n_i} (X_{ij} - \bar{X})^2}_{SST} = \underbrace{\sum_{i=1}^g n_i (\bar{X}_i - \bar{X})^2}_{SSE} + \underbrace{\sum_{i=1}^g \sum_{j=1}^{n_i} (X_{ij} - \bar{X}_i)^2}_{SDD}$$

Onde:

SST é a variabilidade total das observações X_{ij} em relação à média global \bar{X} ; SSE é a variabilidade das observações entre grupos - corresponde à soma ponderada das

variações das médias de cada grupo, \bar{X}_i , em torno da média global, \bar{X} (a ponderação é feita pelo número de observações de cada grupo, n_i) e, SDD é a variabilidade das observações dentro dos grupos - corresponde à soma das variações das observações X_{ij} dentro de cada um dos diferentes grupos (para cada grupo i , a variação das observações é calculada relativamente à média desse grupo, \bar{X}_i).

Definindo ainda:

$$MSE = \frac{SSE}{g - 1} : \text{média da soma dos quadrados entre grupos.}$$

$$MSD = \frac{SSD}{N - g} : \text{média da soma dos quadrados dentro dos grupos.}$$

Os valores de MSD e MSE são as duas estimativas de σ^2 anteriormente referidas (sendo MSE aquela que depende da veracidade de H_0). Assim, quando a hipótese H_0 é verdadeira, estes valores devem ser próximos e, conseqüentemente, a razão $\frac{MSE}{MSD}$ terá um valor próximo de 1. Se H_0 não for verdadeira, então o valor de MSE será significativamente superior ao de MSD. Assim, a hipótese H_0 é rejeitada para valores elevados de $\frac{MSE}{MSD}$.

$F = \frac{MSE}{MSD}$ é precisamente a estatística de teste usada para efetuar o teste de

$$H_0 : m_1 = m_2 = \dots = m_g = m \quad \text{contra} \quad H_1 : \text{nem todos os } m_i \text{ são iguais}$$

B.1.1 Teste de Tukey para comparação das médias.

Um ANOVA permite estabelecer se as médias das populações em estudo são ou não estatisticamente iguais. No entanto, esse tipo de análise não permite detectar quais são as médias estatisticamente diferentes das demais. O teste Tukey permite estabelecer a diferença mínima significativa, ou seja, a menor diferença de médias de amostras que deve ser tomada como estatisticamente significativa. Essa diferença (d.m.s.) é dada por:

$$d.m.s. = q \sqrt{\frac{QMR}{r}}$$

Onde q é um valor dado em tabela, QMR é o quadrado médio do resíduo da análise de variância e r é o número de amostras em cada tratamento.