

ANÁLISE FRACTAL DA CROMATINA NA IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS

Amanda Iumatti Santos Firmo Xavier¹ Thiago de Salazar e Fernandes¹

¹Estudante do Curso de Biomedicina - CCB –UFPE; E-mail: amandaiumatti@gmail.com,

²Docente/pesquisador do Depto de Biofísica . –CCS–UFPE. E-mail: thiagosalazar@hotmail.com

Sumário: Os sistemas vivos são sistemas complexos, e como tal, o estudo de modificações estruturais e de sua fisiologia por vezes requer o uso de ferramentas de análise não-linear. Uma das formas de se avaliar o grau de complexidade de uma estrutura, ou de suas possíveis modificações, é com base na sua geometria fractal. O objetivo de nosso projeto é avaliar as dimensões fractais de núcleos de células leucêmicas, escolhida como modelo em nosso trabalho, comparado-as à de linfócitos normais, de modo a oferecer uma ferramenta computacional que vise auxiliar os profissionais da área da saúde no diagnóstico e prognóstico do câncer. Foi realizada captura de imagem de linfócitos normais e de linfoblastos provenientes da leucemia linfocítica aguda, sobe iluminação adequada, a fim de ressaltar as características da cromatina. As células foram submetidas ao processo de segmentação e colocadas em escala de cinza, como auxílio do programa “ImageJ”. O programa também foi utilizado para o cálculo da dimensão fractal (DF) dos núcleos pelo método “*Box-counting*”, os valores obtidos por este método serão representativos da textura irregular da cromatina. Foi encontrada diferença significativa entre as DF entre os dois grupos estudados, assim foi encontrada uma média de 2,5394 para os núcleos de células de LLA e 2,5053 para o grupo controle.

Palavras-chave: Fractal; LLA; Neoplasia.

INTRODUÇÃO

O método comumente empregado para identificar alterações celulares induzidas por agentes físicos, químicos e biológicos, é por meio da quantificação de alterações cromossômicas em linfócitos do sangue periférico humano. Este método requer um tempo de cultivo celular, em geral de 48 horas, e a análise laboriosa dos 46 cromossomos humanos. Uma das alterações mais amplamente investigadas é a translocação cromossômica, que pode ser tanto um bioindicador de exposição à radiação quanto de Leucemias. No acidente nuclear de Chernobyl, por exemplo, observou-se uma incidência maior de Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) em indivíduos expostos a doses superiores a 10 mSv. Estudos recentes têm demonstrado que a análise fractal da textura da cromatina em núcleos em interfase (G0) do ciclo celular permitiria diferenciar se a célula está em processo neoplásico, sem requerer o cultivo celular e a análise individual dos cromossomos. Deste modo, este método seria útil principalmente quando o “tempo” é um fator crucial para o planejamento de terapias para os pacientes. Com isso, o objetivo desta pesquisa foi calcular as dimensões fractais de núcleos de linfócitos em interfase de pacientes portadores de LLA, comparando-as às dimensões obtidas de linfócitos normais, de modo a observar se é possível a identificação de células contendo alterações cromossômicas de forma rápida e menos laboriosa.

MATÉRIAS E MÉTODOS

Foi realizada a captura de imagens de 100 linfócitos normais e de 100 linfoblastos de pacientes com LLA, utilizando a iluminação de 75% a fim de ressaltar melhor as características da cromatina. As imagens das células foram submetidas ao processo de segmentação, otimização e convertidas em escala de cinza. Com o auxílio do programa “ImageJ” foi realizado o cálculo da dimensão fractal (DF) das imagens dos núcleos celulares pelo método de “*Box-counting*”. Os valores obtidos por este método são representativos do grau de rugosidade da cromatina. Desta forma, o valor da DF é diretamente proporcional à sua irregularidade. Para realizar a análise dos dados, foi utilizado o teste estatístico de análise da variância (ANOVA) e o teste de tukey, a um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Os valores de dimensão fractal (DF) para 100 núcleos de células do grupo controle variaram de 2,4727 a 2,5931 (média de $2,5053 \pm 0,019$), enquanto que para as 100 células da amostra de LLA variaram de 2,4955 a 2,6388 (média de $2,5394 \pm 0,027$). Sendo comprovada a diferença estatísticas entre os dois grupos, LLA e controle, com significância de 5% .

DISCUSSÃO

As células da leucemia linfocítica aguda apresentam sua cromatina com aspecto diferenciado das células normais. Tais diferenças são decorrentes de alterações genéticas ocasionadas por mediadores químicos, genéticos ou físicos. Os pacientes mais afetados por esta neoplasia são as crianças, principalmente quando expostas a radiação ionizante. Este tipo de correlação pode ser comprovada após acidentes nucleares, tal como o de Chernobyl, onde o risco de leucemia linfocítica aguda (LLA) após a exposição à radiação foi significativamente maior nos indivíduos que foram expostos a uma dose > 10 mSv.

Ao contrário de alguns outros softwares de análise fractal no qual imagem é convertida para binária antes de cálculo, o método Box-Counting realiza a análise das imagens em tons de cinza, o que o torna mais adequado para o uso na área da biologia e histologia, pois conserva as nuances das imagens, preservando sua textura e propriedades originais da imagem. Devido ao amplo espectro da escala de cinza, a intensidade de cada pixel é considerada como a altura daquele ponto da imagem, permitindo ao programa a análise da imagem em 3D.

Os dados obtidos neste estudo puderam reafirmar a teoria de Lieberman(2009) de que a cromatina obedece a um padrão organizacional fractal, onde os cromossomos apresentam-se regionalizados e suas proximidades geográficas facilitam a atividade dos genes e o estado funcional da célula, estabelecendo assim um padrão de organização que impede a formação de nós em seus filamentos durante o processo de condensação e descondensação da cromatina durante o ciclo celular. Sendo assim, é possível observar a partir dos resultados da atual pesquisa que quando há um dano na cromatina celular, como apresentado na LLA por deleções ou translocações, a estrutura normal da cromatina é comprometida, o que leva à célula a assumir um novo tipo de organização, uma vez que a molécula de DNA não restaura sua conformação original, fenômeno muitas vezes tido por “instabilidade genômica”. Quando analisadas e comparadas as DFs de núcleos de células normais e de células alteradas, houve portanto um aumento no valor de sua média, passando de 2,5053 dos núcleos de células controle para 2,5394 para células com LLA, o que induz a ideia de que a textura da superfície da cromatina de células que sofreram processos de instabilidade genômica tende a assumir um aspecto mais rugoso.

O método comumente empregado para identificar alterações celulares induzidas por agentes físicos, químicos e biológicos, é por meio da quantificação de alterações cromossômicas (dicêntricos e fragmentos acêntricos) ou de subprodutos destas alterações ou de perdas de cromossomos inteiros (micronúcleos) em linfócitos do sangue periférico humano. O método proposto neste trabalho não se restringe ao reducionismo molecular do gene, nem de trocas de segmentos cromossômicos, e sim enfoca na estrutura global do núcleo da célula numa abordagem mais sistêmica do dano geral ocorrido à célula. O fato de analisar as células em G₀ do ciclo celular elimina a necessidade do tempo de cultivo celular, o que torna mais rápida a identificação de células com instabilidade genômica.

CONCLUSÃO

O cálculo da dimensão fractal (DF) dos núcleos de células em interfase mostrou ser um método promissor na identificação de células contendo alterações cromossômicas, a exemplo da Leucemia Linfocítica Aguda utilizada como modelo no presente estudo. Com isso, a possibilidade de novas aplicações emerge a partir destes resultados, tal como o uso deste método como um novo biomarcador de exposição às radiações ionizantes, assim como um método para identificação de células neoplásicas.

AGRADECIMENTOS

Aos professores: Mariana Brayner Cavalcanti Freire Bezerra, Edvane Borges da Silva, Ademir de Jesus Amaral e Marcos Andre Cavalcanti Bezerra, ao grupo GERAR/LAMBDA e ao apoio financeiro da PIBIC/PROPESQ/UFPE.

REFERÊNCIAS

- FARIAS; M. G; CASTRO, S. M. diagnóstico Laboratorial das Leucemias Linfóides Agudas. J. Bras. Patol.Med. Lab. v. 40 n. 2 p. 91-8, 2004
- BASSAN R., GATTA G., TONDINI C. , WILLEMZE R. Adult acute lymphoblastic leukaemia. **CriticalReviews in Oncology/Hematology** 50 (2004) 223–261
- PANTIC, I.; HARHAJI-TRAJKOVIC, L.; PANTOVIC, A.; MILOSEVIC, N. T.; TRAJKOVIC, V. Changes in fractal dimension and lacunarity as early markers of UV-induced apoptosis. **Journal of Theoretical Biology**, v. 303, p. 87-92, 2012.
- BACKER, A. R., Estudos de métodos de análise de complexidade em. 2010. 181f. Doutorado(Doutorado em Ciências de Computação e Matematica Computacional)- Universidade de São Paulo, São Carlos.
- LIEBERMAN-AIDEN, E.; BERKUM, N. L.; WILLIAM, L.; IMAKAEV, M.; RAGOCZY, T.; TELLING, A.; et al. Comprehensivemapping of long-range interactions reveals foldingprinciples of the human genome.**Science**, v. 326, p. 289-293, 2009.
- MATTA M. C.; DÜMPELMANN M.; FERNANDES T. S.; LEMOS-PINTO M. M. P.; AMARAL A. Processamento de imagens em Biodosimetria: Influência da qualidade das preparações cromossômicas.**Scientia plena**.vol. 9, n. 8, 2013.