

PLÍNIO GASPERIN JÚNIOR

CARACTERIZAÇÃO DAS MODIFICAÇÕES  
MORFONUCLEARES, INDUZIDAS PELA  
RADIOTERAPIA, EM TUMOR MAMÁRIO.  
Modelo murino

Dissertação apresentada no curso de Pós-Graduação de Clínica Cirúrgica, do Setor de Ciências da Saúde da UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, como requisito parcial à obtenção do grau acadêmico de Mestre.  
Coordenador: Prof. Dr. Osvaldo Malafaia

CURITIBA  
1995

PLÍNIO GASPERIN JÚNIOR

CARACTERIZAÇÃO DAS MODIFICAÇÕES  
MORFONUCLEARES, INDUZIDAS PELA  
RADIOTERAPIA, EM TUMOR MAMÁRIO.  
Modelo murino

Dissertação apresentada no curso de Pós-Graduação de Clínica Cirúrgica, do Setor de Ciências da Saúde da UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, como requisito parcial à obtenção do grau acadêmico de Mestre.  
Coordenador: Prof. Dr. Osvaldo Malafaia

CURITIBA  
1995

PLÍNIO GASPERIN JÚNIOR

CARACTERIZAÇÃO DAS MODIFICAÇÕES  
MORFONUCLEARES, INDUZIDAS PELA  
RADIOTERAPIA, EM TUMOR MAMÁRIO.  
Modelo murino

Dissertação apresentada no curso de Pós-Graduação de Clínica Cirúrgica, do Setor de Ciências da Saúde da UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, como requisito parcial à obtenção do grau acadêmico de Mestre.  
Coordenador: Prof. Dr. Osvaldo Malafaia

CURITIBA  
1995

PLÍNIO GASPERIN JÚNIOR

CARACTERIZAÇÃO DAS MODIFICAÇÕES  
MORFONUCLEARES, INDUZIDAS PELA  
RADIOTERAPIA, EM TUMOR MAMÁRIO.  
Modelo murino

Dissertação aprovada com conceito “A” e equivalência de nota “10” como requisito parcial para obtenção do grau acadêmico de Mestre no curso de Pós-Graduação de Clínica Cirúrgica, do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Prof. Dr. Almir Urbanetz.

Dep. de Tocoginecologia, Universidade Federal do Paraná.

Prof. Dr. Flavio Bortolozzi.

Dep. de Informática, Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná.

Prof. Dr. Jurandir Marcondes Ribas Filho.

Dep. de Cirurgia, Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná.

Curitiba, 02 de fevereiro de 1995.

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Milani Budel

Coorientador: Prof. Dr. Robert Kiss

Scientia vincere tenebras

Universidade Livre de Bruxelas

À minha esposa Jaína e filha Anaí Caroline.

Aos meus pais e irmãos.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Vinicius Milani Budel que, mais que amigo, me orientou como irmão, tanto neste dissertar como em toda a minha pós-graduação. Com habilidade mantém, há dez anos, o Convênio de Cooperação entre a Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná e a Universidade Livre de Bruxelas, e soube estender a todos os seus alunos, a quem motiva e entusiasma, a possibilidade de desfrutar deste privilégio. Pelo seu ensino e procedimento exemplar de homem e profissional, tem a minha admiração.

Ao Prof. Dr. Robert Kiss que, com os seus fabulosos conhecimentos de Análise de Imagem, não teme ensiná-la com exatidão e paciência, a minha profunda gratidão pelos seus incansáveis ensinamentos científicos e a minha admiração pela sua capacidade de trabalho.

Ao Prof. Dr. Paul Van Houtte, que me acolheu no seu Serviço em Bruxelas, sempre disposto a ensinar cancerologia, e que muito me incentivou e orientou nos árduos caminhos da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Osvaldo Malafaia que, pela sua dedicação em coordenar os Cursos de Mestrado e Doutorado, contribui para melhorar a ciência do nosso País.

Ao Prof. Dr. Wilhelm L. Schack por me ter acolhido no seu Serviço e pelo seu incentivo na minha formação.

Ao Prof. Dr. Ulrich A. Dietz, pelo seu incentivo e ajuda na correção desta dissertação.

Ao Prof. Virgilio Josué Balestro, abalizado tradutor e corretor de teses: com os seus fabulosos conhecimentos da língua pátria, corrigiu com esmero a sintaxe e a ortografia desta dissertação. O meu especial reconhecimento pelo seu exemplo de extrema dedicação na virtuosa profissão de ensinar.

À Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná, local da minha graduação, pelo incentivo à realização da minha pós-graduação.

À Universidade Federal do Paraná, que possibilitou candidatar-me ao grau de Mestre.

Ao Laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina da Universidade Livre de Bruxelas, onde deixei vários amigos que muito me auxiliaram na realização deste trabalho.

À Universidade Livre de Bruxelas, escola de “livres pensadores”, que funda os seus ensinamentos e pesquisas sobre o princípio do “livre exame”, isto é, preconiza em todas as matérias, a rejeição do argumento de autoridade e a independência do julgamento.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xiii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 GENERALIDADES.....	2
1.2 CITOFOTOMETRIA.....	2
1.3 MODELO DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO MXT EM CAMUNDONGOS FÊMEOS.....	4
1.4 SISTEMA ESPECIALISTA PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA RADIOTERAPIA NO NÍVEL MORFONUCLEAR.....	5
1.5 OBJETIVO DO TRABALHO.....	6
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>7</b>
2.1 MODELO BIOLÓGICO, DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	8
2.1.1 Tumor MXT e animais.....	8
2.1.2 Controles histológicos.....	9
2.1.3 Delineamento experimental.....	9
2.1.4 Técnica de irradiação e avaliação do crescimento tumoral.....	10
2.1.5 Técnica de esfregaço das células tumorais em lâminas histológicas.....	10
2.1.6 Coloração de Feulgen.....	11
2.1.6.1 Preparação do reativo de Schiff.....	11
2.1.6.2 Processo de coloração.....	11
2.2 ANÁLISE COMPUTARIZADA DA IMAGEM NUCLEAR PELO SISTEMA ESPECIALISTA SAMBA 2005.....	13
2.2.1 Organização funcional do sistema especialista SAMBA 2005..	13

2.2.1.1	Microscópio.....	14
2.2.1.2	Câmera de vídeo.....	14
2.2.1.3	Computador.....	14
2.2.1.4	Impressora.....	14
2.2.2	Matriz numérica.....	15
2.2.3	Parâmetros analisados pelo sistema especialista para os núcleos corados segundo o método de Feulgen.....	17
2.2.3.1	Parâmetro morfométrico.....	17
2.2.3.2	Parâmetros densitométricos.....	17
2.2.3.3	Parâmetros texturais.....	18
2.2.4	Análises estatísticas.....	20
2.2.4.1	Análises monovariadas.....	20
2.2.4.2	Análise multivariada.....	21
<b>3</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
3.1	Crescimento tumoral.....	25
3.2	Resultados da análise monovariada dos 15 parâmetros estudados.....	25
3.3	Resultados da análise multivariada.....	27
3.4	Modificações morfonucleares induzidas pela radioterapia nos núcleos tumorais MXT, descritas por análise monovariada dos <b>bancos de dados morfonucleares</b> .....	32
3.5	Determinação do histograma de ADN para estudo do ciclo celular.....	33
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>43</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>45</b>

## LISTA DE FIGURAS

1 Delineamento experimental.....	9
2 Fotomicrografia de campo microscópico com núcleos celulares corados pelo método de Feulgen.....	12
3 Ilustração do sistema SAMBA 2005.....	13
4 Exemplo de matriz numérica binária de dois núcleos.....	15
5 Ilustração do processo de numerização de imagem em níveis de cinza de um dos núcleos celulares apresentados na Figura 4.....	16
6 Curvas de crescimento do tumor mamário MXT.....	26
7 Análise multivariada de componentes principais, aplicada em 1000 núcleos, selecionados aleatoriamente, dos grupos de animais com tumores MXT, tratados por 8Gy e analisados no 28º, 39º e no 49º dia após o transplante tumoral, isto é, 7-18-28 dias após a irradiação.....	29
8 Evolução diacrônica da distribuição nuclear fatorial. Determinação dos <b>bancos de dados morfonucleares</b> .....	31
9 Influência das irradiações de 2Gy e 8Gy sobre seis parâmetros morfonucleares durante o crescimento tumoral MXT.....	35
10 Histogramas de ADN dos <b>bancos de dados morfonucleares</b> descritos na Figura 8.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
B6D2F1	Camundongos fêmeos utilizados para o transplante tumoral MXT.
C	“Contrast”: contraste, parâmetro 15.
CT	Grupo de tumores MXT experimentais <b>controles</b> .
CV	“Coefficient of variance of the co-occurrence matrix”: variância dos coeficientes da matriz, parâmetro 14.
E	“Energy”: segundo momento ou energia, parâmetro 13.
GLD	"Gray level distribution": distribuição dos níveis de intensidade, parâmetro 10.
IOD	“Integrated optical density”: densidade óptica integrada, parâmetro 2.
K	"Kurtosis": coeficiente de Curtose, parâmetro 6.
LM	"Local mean": média local, parâmetro 12.
LRL	"Long run length emphasis": frequência de longas secções da cromatina, parâmetro 8.
MOD	“Mean optical density”: densidade óptica média, parâmetro 3.
MXT	Adenocarcinoma mamário experimental.
NA	“Nuclear area”: área nuclear, parâmetro 1.
RLD	"Run length distribution": distribuição dos comprimentos de secção da cromatina, parâmetro 11.

RLP	"Run length percentage": porcentagem de secções da cromatina, parâmetro 9.
SAMBA	"Système d'analyse microscopique à balayage automatique" (Sistema de Análise Microscópica de Busca Automática).
SK	Índice de "Skewness", parâmetro 5.
SRL	"Short run length emphasis": frequência de curtas secções da cromatina, parâmetro 7.
VOD	"Variance of optical density": variância das densidades ópticas, parâmetro 4.
2Gy	Grupo de tumores MXT experimentais <b>irradiados</b> com uma dose de <b>2 Grays</b> .
8Gy	Grupo de tumores MXT experimentais <b>irradiados</b> com uma dose de <b>8 Grays</b> .

## RESUMO

É conhecido que o ácido desoxirribonucleico (ADN) representa o principal alvo da irradiação ionizante, porém são poucas as informações sobre as modificações morfonucleares que a radioatividade induz no núcleo. O objetivo deste trabalho é quantificar as modificações morfológicas induzidas pela radioterapia sobre os núcleos celulares do tumor experimental MXT/BOG.I, um adenocarcinoma mamário de camundongos fêmeos, mediante o uso da análise computacional de imagens nucleares coradas segundo o método de Feulgen e avaliar o efeito radioterápico no crescimento tumoral. Utilizaram-se 30 camundongos fêmeos B6D2F1, nos quais o tumor MXT foi transplantado na região subcutânea do flanco esquerdo, e foram distribuídos, de maneira aleatória, em 3 grupos de 10 animais. O primeiro grupo foi designado grupo controle, indene de tratamento. Os outros dois grupos foram tratados com uma dose de irradiação respectivamente de 2Gy e 8Gy. Punções de agulha fina foram realizadas em todos os tumores, no 7º, 18º e 28º dia após a irradiação. Com o material das punções foram realizados esfregaços citológicos, seguidos por fixação pelo AFA (álcool, formol e ácido acético) e corados segundo o método de Feulgen, que é quantitativamente específico para o ADN nuclear. Os núcleos assim corados foram submetidos à análise de imagem por computador no sistema SAMBA 2005 (Alcatel TITN, Grenoble, França), o que possibilitou estudar 15 parâmetros morfonucleares, analisados estatisticamente de forma monovariada e multivariada. Os resultados mostram que, após a irradiação, houve aumento da área nuclear, dos grandes agrupamentos da cromatina e da uniformidade dos níveis de intensidade da cromatina. Em contrapartida, houve diminuição dos pequenos agrupamentos da cromatina e da condensação global da cromatina. Essas modificações morfonucleares, ocorridas após a irradiação, apresentaram características dependentes da dose e do tempo. A dose de irradiação de 8Gy retardou o crescimento do tumor MXT, o que não foi observado com a dose de irradiação de 2Gy. A análise de imagem nuclear mostra-se útil quanto ao controle dos efeitos induzidos pela radioterapia nos núcleos celulares tumorais. Isto poderá permitir tratamento mais específico de cada tipo de tumor: monitora-se o tratamento mediante a punção de agulha fina e análise dos núcleos por computador, para caracterizar, de forma mais precisa, a resposta imediata do tumor ao tratamento instituído.

## ABSTRACT

It is known that the DNA represents the main target of ionizing radiation, but there are a few information about the morphonuclear modifications that radiation can induce upon a nucleus. The aim of this study is to measure the morphological modifications induced by radiotherapy on cell nucleus of the experimental tumor MXT / BOG.I (mouse mammary cancer), by using digital cell image analysis, of stained nucleus in accordance with the Feulgen method and to observe the radiotherapy effects on the tumor growth. Utilizing 30 female B6D2F1 mice, in which a tumor MXT was transplanted subcutaneously in the left flank, and later randomized in 3 groups of 10 mice. The first group was designated as the control group, without any treatment. The second group of mice received a single dose of radiation 2Gy, and the third group received a single dose of radiation 8Gy. Fine needle aspirations were performed in all of the tumors, 7, 18 and 28 days after irradiation. With the material collected from aspirations, the biological material was smeared on histological slides, and were immediately fixed by EFA (ethanol, formol and acetic acid), and stained following the Feulgen method, which allows the selective and quantitative staining of the nuclear DNA. The stained nucleus were submitted to image analysis by computer using the SAMBA 2005 system (Alcatel - TITN, Grenoble, France), which permitted to study 15 morphonuclear parameters, statistically compared on the basis of the monovariate (one-way variance analysis) and multivariate analysis. The results show that after the irradiation, there were an increase in the nuclear area, in the frequency of the long dense chromatin clumps and in the uniformity of optical density of the chromatin. In contrast, there were a decrease of the frequency of the small dense chromatin clumps and in the overall chromatin condensation level. The morphological modifications after the radiation appear in a dose-dependent and time-dependent manner. The irradiation with 8Gy was capable to slowed down the MXT tumor growth, but the 2Gy dose wasn't show the apparent effects. Computerized cell image analysis appears to be a useful tool to monitor the induced effects of radiotherapy on the tumor nucleus cells. It could permit a more specific treatment for each kind of a tumor: monitoring the treatment by means of fine needle aspirations and analysis of the nuclei by computer, to characterize the most precise form, to obtain an immediate response of the tumor in the treatment applied.

# **1 INTRODUÇÃO**

## 1.1 GENERALIDADES

É conhecido que o ácido desoxirribonucleico (ADN) representa o principal alvo da irradiação ionizante, muito embora a membrana celular possa também ter o seu papel dentro da mortalidade celular induzida pela radioterapia. Em estudos relativos à radiobiologia, **HALL, E.J.; ASTOR, M.; BEDFORD, J.; BOREK, C.; CURTIS, S.B.; FRY, M.; GEARD, C.; HEI, T.; MITCHELL, J.; OLEINICK, N.; RUBIN, J.; TU, A.; ULLRICH, R.; WALDREN, C.; WARD, J., 1988**, relatam que a maneira como o ADN interage com as histonas e as outras proteínas cromossomiais, dentro dos núcleos eucarióticos, pode influenciar na distribuição das lesões ao longo das cadeias nucleotídicas. Em outros termos, parece que a *radiossensibilidade* das células eucarióticas podem depender em parte da textura da cromatina. **CHIU, S.M.; OLEINICK, N.L.; FRIEDMAN, L.R.; STAMBROOK, P., 1982** e **OLEINICK, N.L.; CHIU, S.M.; FRIEDMAN, L.R., 1984**, demonstraram, além disso, que as regiões do ADN que apresentam seqüências transcricionais ativas são duas a cinco vezes mais sensíveis à irradiação do que aquelas desprovidas de tais seqüências.

Em microscopia óptica, **AUBELE, M.; JUTTING, U.; RODENACKER, K.; GAIS, P.; BURGER, G.; HACKER-KLOM, U., (1990)** estudaram as características da cromatina e descreveram que as alterações da homogeneidade da distribuição da cromatina do esperma podem ser utilizadas para quantificar os efeitos da irradiação sobre as células germinativas. Esses mesmos autores observaram também que as alterações moleculares, mesmo mínimas, podem exprimir-se no nível celular pela modificação da estrutura da cadeia genômica, ou seja, pelas modificações da estrutura da cromatina.

## 1.2 CITOFOTOMETRIA.

O presente estudo baseia-se na utilização da citofotometria, que se desenvolveu de maneira espetacular depois dos primeiros trabalhos de **CASPERSSON, T. (1936, 1950)**. Este autor utilizou a coloração específica e quantitativa do ADN que **FEULGEN & ROSENBECK** desenvolveram em 1924. Essa permite quantificar o ADN nuclear por meio do microfotômetro com luz visível (**CASPERSON, T. 1950; PASTEELS, J. & LISON, L. 1950; ATKIN, N.B. & RICHARDS, B.M. 1956**). O problema principal, que ofereceu dificuldades aos investigadores no decênio de 1960 a 1970, foi em grande parte o custo proibitivo de tais aparelhos; ademais, a informática apenas iniciava o

caminho: os princípios da aplicação do computador de von Neuman estavam nos seus vacilantes começos. Do ponto de vista prático, os microprocessadores eram então inexistentes; utilizavam-se ampolas de duração limitada, que deveriam ser freqüentemente substituídas; cada análise celular era realizada manualmente.

No início dos anos 80, novas técnicas computarizadas e de captação de imagem apareceram, permitindo o abandono das metodologias analógicas em benefício de captação e armazenamento numérico da imagem. Para cada *ponto de imagem* (em inglês "pixel"), a quantidade de luz absorvida (densidade óptica) é convertida em número; a imagem é então representada por seqüência de números: imagem numérica.

A revolução da informática destes dez últimos anos está na base dos progressos efetuados no domínio da análise de imagens microscópicas. Foi possível desenvolver, dentro dos limites de preços razoáveis, a automatização da obtenção da imagem e, paralelamente, aumentar a velocidade desta obtenção. A precisão deste método não cessou de aumentar. Hoje é possível descrever, por exemplo, o núcleo celular por meio da matriz de 1024 x 1024 *pontos de imagem*, ou seja, mais de um milhão de *pontos de imagem*. No começo dos anos 80, descrevia-se o núcleo com a matriz de 64 x 64 *pontos de imagem*, isto é, 4096 *pontos de imagem*. Assim, o poder de descrição da imagem nuclear foi aumentado pelo fator 250.

Essa tecnologia possibilitou igualmente estudar parâmetros ligados à densitometria dos núcleos, permitindo o acesso aos parâmetros de cinética celular e ploidia, assim como os parâmetros de morfometria e da textura da cromatina nuclear (HARALICK, R.M.; SHANMUGAUM, K.; DINSTEIN, I. 1973; GALLOWAY, M.N. 1975; PRESSMAN, N.J. 1976). Assim, foi possível mostrar que existe estreita correlação entre esses parâmetros e a situação das células dentro do ciclo celular: a cromatina dos núcleos em fase S (fase do ciclo celular de síntese do ADN) é freqüentemente mais difusa que a dos núcleos em fase G1 (fase do ciclo celular em que a célula deixa a fase de repouso ou G0, para iniciar o ciclo celular) (PEDERSON, T. 1972; KIEFER, G.; KIEFER, R.; MOORE, G.W.; SALM, R.; SANDRITTER, W. 1974; SANDRITTER, W.; KIEFER, G.; KIEFER, R.; SALM, R.; MOORE, G.W.; GRIMM, H. 1974; GIARETTI, W.A.; GAIS, P.; JUTTING, U.; RODENACKER, K.; DORMER, P. 1983a). Certos autores tentaram mesmo diferenciar as células G0 das células G1 (NICOLINI C., GIARETTI W., DE SAIVE C.; KENDALL F., 1977; GIARETTI W.A., ABMAYR W.; DORMER P. 1983B). Salientar-se-á, em muitas retomadas, no decorrer deste

trabalho, o interesse dos estudos morfonucleares e, mais particularmente, dentro do domínio dos efeitos da radioterapia sobre os parâmetros morfonucleares do modelo MXT, descrito no próximo tópico.

### 1.3 MODELO DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO MXT EM CAMUNDONGOS FÊMEOS.

O tumor MXT é modelo de câncer mamário de camundongos fêmeos B6D2F1, que foi induzido por carcinogênese do etilcarbamato e, como promotor, a prolactina. Esse modelo foi estabelecido por **WATSON, C.S.; MEDINA, D.; CLARK, J.H. (1977)** no "Baylor College" (Houston, Texas).

O modelo MXT foi particularmente estudado pela equipe do Professor Pasteels do Laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina da Universidade Livre de Bruxelas, quanto às suas propriedades de sensibilidade aos hormônios. A partir destes estudos, pode-se demonstrar que o estradiol (**KISS, R.; PARIDAENS, R.; LECLERCQ, G.; DANGUY, A. 1986a; KISS, R.; DANGUY, A.; HEUSON, J.C.; PARIDAENS, R. 1986b**), a progesterona (**KISS, R.; PARIDAENS, R.; HEUSON, J.C.; DANGUY, A. 1986c ; KISS, R.; DANGUY, A.; HEUSON, J.C.; PARIDAENS, R. 1987a**), o fator de liberação das gonadotrofinas (**de LAUNOIT, Y.; KISS, R.; DANGUY, A.; PARIDAENS, R. 1987**), a prolactina (**KISS, R.; de LAUNOIT, Y.; L'HERMITE-BALERIAUX, M.; L'HERMITE, M.; PARIDAENS, R.; DANGUY, A.; PASTEELS, J.L. 1987b; KISS R., de LAUNOIT Y., DANGUY A., PARIDAENS R.; PASTEELS J.L. 1989a**), os andrógenos (**de LAUNOIT, Y. & KISS, R. 1989a ; KISS, R.; de LAUNOIT, Y.; WOUTERS, W.; DESLYPERE, J.P.; LESCRAINIER, J.P.; PARIDAENS, R.; VOKAER, A.; DECOSTER, R.; PASTEELS, J.L., 1989b**) e os hormônios tireoidianos (**de LAUNOIT, Y. & KISS, R. 1989b**) alteram de maneira precisa os parâmetros de cinética celular deste modelo tumoral.

Este modelo foi igualmente utilizado em estudos de imagens (**SCHEIBER, C.; KISS, R.; de LAUNOIT, Y.; FRUHLING, J. 1988**) e em ressonância nuclear magnética (**SCHEIBER, C.; KISS, R.; de LAUNOIT, Y.; FRUHLING, J. 1990**) para estudar os efeitos induzidos pela hormonoterapia e a quimioterapia sobre o metabolismo do fósforo-31 no tumor.

O modelo MXT, desenvolvido e estudado "in vitro" (**KISS, R.; DEVLEESCHOUWER, N.; PARIDAENS, R.; DANGUY, A.; HEUSON,**

**J.C.; ATASSI, G. 1986d)** foi igualmente utilizado no Laboratório de Histologia da Universidade Livre de Bruxelas, para os estudos de quimioterapia (**KISS, R.; de LAUNOIT, Y.; GRAS, S.; THIBAUT, S.; ATASSI, G., 1988; PAUWELS, O.; KISS, R. 1991**).

#### 1.4 SISTEMA ESPECIALISTA PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA RADIOTERAPIA NO NÍVEL MORFONUCLEAR.

Muitos diagnósticos repousam na observação e análise visual da imagem radiológica, ecográfica, tomográfica etc... mas é no domínio da citologia que a análise da imagem encontrou a sua plenitude, graças ao desenvolvimento de métodos específicos. Efetivamente, a objetivação do diagnóstico citológico com o computador tem como finalidade diminuir, talvez eliminar as divergências entre os diagnósticos, mesmo aqueles feitos por especialistas (**DELIDES, G.S.; GARAS, G.; GEORGOULI, G.; JIORTZIOTIS, D.; LECCA, J.; LIVA, T.; ELEMENOGLOU, J. 1982; ROSAI, J. & CARCANGIU, M.L. 1984**). Existem problemas inerentes à citologia quantitativa, devidos à variabilidade biológica entre os diversos tumores, assim como às variações metodológicas, que proporcionam sérios problemas de interpretação (**BARTELS, P.H.; WEBER, J.E.; BIBBO, M. 1985**).

Os sistemas especialistas tiveram particular importância para ajudar no diagnóstico de anatomopatologia, pois oferecem perspectivas muito estimulantes ao transferir os conhecimentos do diagnóstico humano para a máquina (**BARTELS, P.H. & WEBER, J.E. 1989**). Numerosas definições de sistemas especialistas foram propostas. Como exemplo, **JACKSON, P. (1986)** definiu o sistema especialista como "sistema informático capaz de representar e de raciocinar, dentro do domínio caracterizado pela riqueza dos conhecimentos... com a perspectiva de resolver os problemas e mesmo de dar conselhos". **WIED, G.L.; BARTELS, P.H.; BIBBO, M.; DYTCH, H. (1989)** relatam, que a introdução dos métodos quantitativos permitirá contemplar, dentro de futuro próximo, a obtenção da "verdade no diagnóstico patológico".

No presente trabalho, o sistema especialista define-se como sistema informático no qual o especialista introduz anteriormente um banco de dados relativos ao problema estudado, (neste trabalho os efeitos induzidos pela irradiação nos núcleos celulares), e no qual oferece meios para tratar esses dados com raciocínio objetivo, em que o sistema deve considerar pré-requisitos e determinações. Assim que o sistema especialista recebe novos dados

desconhecidos, deve ser capaz de tratá-los como os teria tratado o especialista ou qualquer outro utilizador, se tivesse seguido os mesmos critérios de classificação e as mesmas ordens de prioridade.

## 1.5 OBJETIVO DO TRABALHO

O objetivo é observar e quantificar as modificações morfológicas induzidas pela radioterapia sobre os núcleos celulares do tumor experimental MXT/BOG.I, adenocarcinoma mamário de camundongos fêmeos, mediante o uso da análise computarizada de imagens nucleares, coradas segundo o método de Feulgen e avaliar o efeito radioterápico no crescimento tumoral.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

## 2.1 MODELO BIOLÓGICO, DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.

### 2.1.1 Tumor MXT e animais.

Este estudo foi realizado no Laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina da Universidade Livre de Bruxelas. Utilizou-se a cepa "BOG.I" do adenocarcinoma mamário MXT (**DANGUY, A.; KISS, R.; LECLERCQ, G.; HEUSON, J.C.; PASTEELS, J.L. 1986**). Esta cepa MXT/BOG.I corresponde a um adenocarcinoma pouco diferenciado de ductos galactóforos. O tumor mamário MXT foi obtido pelo Dr. M. Scheider da Universidade Livre de Bruxelas e os seus exemplares são mantidos em "bancos de tumores" no Laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina da Universidade Livre de Bruxelas, por meio de transplantes feitos de maneira regular, mensalmente, em camundongos fêmeos C57BL x DBA/2f/F1 (B6D2F1), oriundos de IFFA-CREDO, Lião, França, com idade de 8 a 12 semanas. Em cada transplante, 10 tumores de volume aproximado de 1 cm<sup>3</sup> cada são divididos de maneira estéril em partes de 10 mm<sup>3</sup>, e então são transplantados na região subcutânea, com auxílio de trocáter, segundo o procedimento inicialmente descrito por **WATSON et al. (1977)** em camundongos fêmeos B6D2F1.

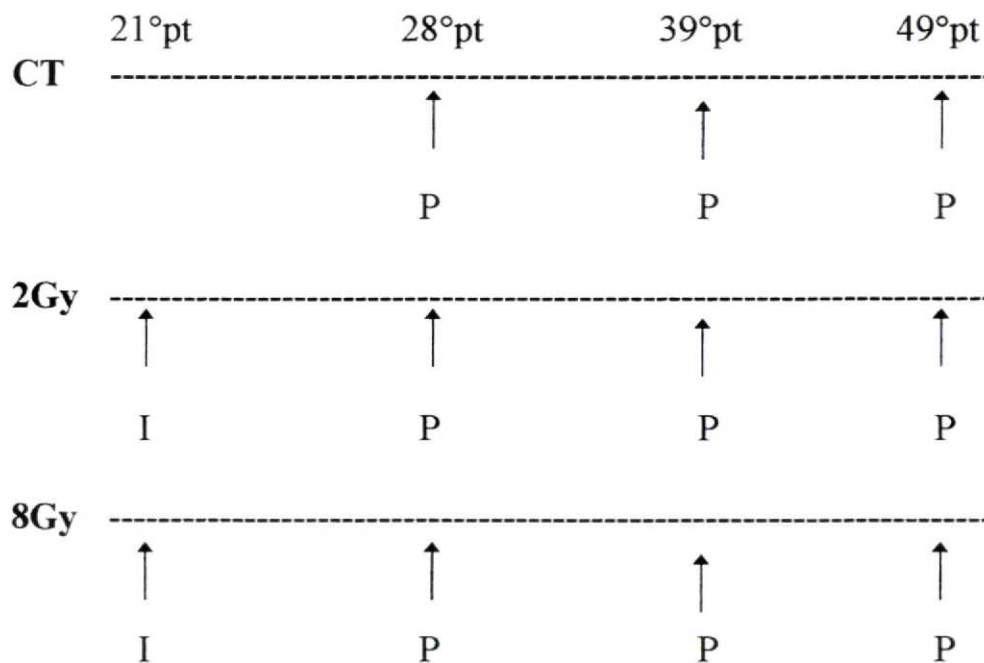
Para a experiência aqui realizada foram utilizados 30 camundongos fêmeos B6D2F1, com idade de 8 semanas, com peso entre 20 e 22 gramas, provenientes de IFFA-CREDO, Lião, França. Os animais foram mantidos em condições semelhantes de temperatura (22° +/- 1° C.) e luminosidade, à razão de 14 h. de luz e 10 h. de obscuridade, por nictêmero. A alimentação e a água foram dispensadas *ad libitum* (alimentação com ração padronizada, IFFA-CREDO, Lião, França). Os animais foram distribuídos de maneira aleatória em gaiolas de 30 cm de comprimento por 15 cm de largura e 12 cm de altura, que permitiam a convivência de 5 animais. Para o transplante tumoral (região subcutânea do flanco esquerdo) e as punções tumorais de agulha fina (13 X 4,5 - 26G ½, Becton Dickinson), os animais eram trazidos à sala de experimentação na gaiola, apanhados com a mão direita do experimentador, fixada sobre o seu dorso, os seus membros craniais imobilizados contra a parede torácica pela pressão exercida pelos dedos polegar e indicador, com a cauda presa pela mão oposta. Em seguida, os dedos mínimo e anular prendiam a cauda do animal de maneira que ficasse imobilizado na mão direita do experimentador; assim, a mão esquerda ficava livre para o transplante ou para as punções tumorais.

### 2.1.2 Controles histológicos.

Como controle do tumor foram realizados cortes histológicos de 5 $\mu$ m de espessura, em seguida, corados pelo método hematoxilina-eosina para o exame histológico. Os tumores foram provenientes de animais excedentes ao presente estudo: transplantados na mesma época e nas mesmas condições experimentais. Esses animais serviram somente como controle do tipo histológico, uma vez que os animais pertencentes aos grupos de estudo não poderiam ser sacrificados com tal objetivo.

### 2.1.3 Delineamento experimental

O presente estudo realizou-se conforme o esquema da figura abaixo:



**FIGURA 1:** Delineamento experimental realizado no presente trabalho. 21°pt, 28°pt, 39°pt e 49°pt = respectivamente 21, 28, 39 e 49 dias após o transplante tumoral; **pt** = pós-transplante; **CT** = grupo controle; **2Gy** = grupo de tumores irradiados com 2 Grays; **8Gy** = grupo de tumores irradiados com 8 Grays; **I** = irradiação; **P** = punção tumoral com agulha fina.

Após 21 dias do transplante tumoral subcutâneo no flanco esquerdo dos camundongos fêmeos, procedeu-se à distribuição aleatória em 3 grupos de

10 animais transplantados, assim divididos: o primeiro grupo, o grupo controle (CT), cujos tumores não foram tratados por radioterapia; o segundo grupo, grupo 2Gy, correspondente aos animais irradiados com uma sessão de 2 Grays (2 Gy), no 21º dia após o transplante tumoral; e o terceiro grupo, o grupo 8Gy, cujos tumores foram irradiados com uma sessão de 8 Grays (8 Gy), também no 21º dia após o transplante tumoral. No 28º, 39º e 49º dia após o transplante tumoral (respectivamente 7, 18 e 28 dias após a irradiação), foram realizadas punções tumorais e subseqüentes esfregaços do material em lâminas histológicas, descritas com detalhes adiante.

#### 2.1.4 Técnica de irradiação e avaliação do crescimento tumoral.

Os grupos de estudo 2Gy e 8Gy representam os animais, cujos tumores foram tratados por uma dose de 2 Grays e 8 Grays respectivamente. O tratamento foi realizado no “Institut Jules Bordet”, Serviço de Radioterapia (Prof. Responsável, Dr. Paul Van Houtte), Centro de Tumores da Universidade Livre de Bruxelas. Para o tratamento foram utilizados os raios X de 250 KeV de fabricação da Phillips holandesa. A dimensão do campo de irradiação foi de 3cm por 3cm com feixe de raios X centrado sobre o tumor; uma lâmina maleável de chumbo de 0,5 cm de espessura com orifício circular, por onde se exteriorizava apenas o tumor, permitia irradiar apenas a região do animal que continha o tumor. Antes da sessão de irradiação, as fêmeas controles e irradiadas eram anestesiadas por meio de injeção intraperitoneal (0.2 ml), de solução de hidrato de cloral (7mg/1 de solução salina). Essa dose de anestésico proporcionou anestesia geral durante 45 min. A irradiação foi realizada 21 dias após o transplante tumoral. Seguiu-se semanalmente a evolução do crescimento macroscópico tumoral por meio do paquímetro: a medida de área foi expressa em milímetros quadrados ( $\text{mm}^2$ ) e corresponde à multiplicação do maior diâmetro do tumor e a sua perpendicular.

#### 2.1.5 Técnica de esfregaço das células tumorais em lâminas histológicas.

O material biológico, submetido à análise de imagem, proveio de punções de agulha fina (13 X 4,5 - 26G ½, Becton Dickinson). Com esse material procedeu-se ao esfregaço citológico sobre a lâmina de vidro (histológica). As lâminas com as células foram imediatamente imersas, durante 15 minutos, em líquido fixador AFA (álcool desnaturado 96º - 75 vol., formol

neutro 40% - 20 vol., ácido acético - 5 vol.) e submetidas ao processo de coloração.

### 2.1.6 Coloração de Feulgen.

Utilizou-se a coloração que é quantitativamente específica para o ADN: a reação nuclear de Feulgen, que possui como corante o reativo de Schiff.

#### 2.1.6.1 Preparação do reativo de Schiff.

O corante reativo de Schiff é preparado da seguinte maneira:

- a) 1g de Fuchsin básica (Pararosanilina cloride - C.I., 42500 - Aldrich n° de referência 21.559-7) é misturado vigorosamente com 200ml de água destilada fervente;
- b) assim que a solução está preparada e a 50°C positivos, acrescentam-se e misturam-se 20ml de ácido clorídrico 1 normal. Em seguida, deixa-se repousar a solução até que ela tenha atingido a temperatura ambiente; nesse momento adiciona-se e mistura-se vigorosamente 1g de metabissulfito de sódio;
- c) após 24h de repouso em câmara escura, misturam-se, durante 5 minutos, 2g de carbono ativado (Noritt PN5, BDH);
- d) o corante é submetido então a três filtrações sucessivas, antes de ser conservado a +4°C, até o momento da utilização.

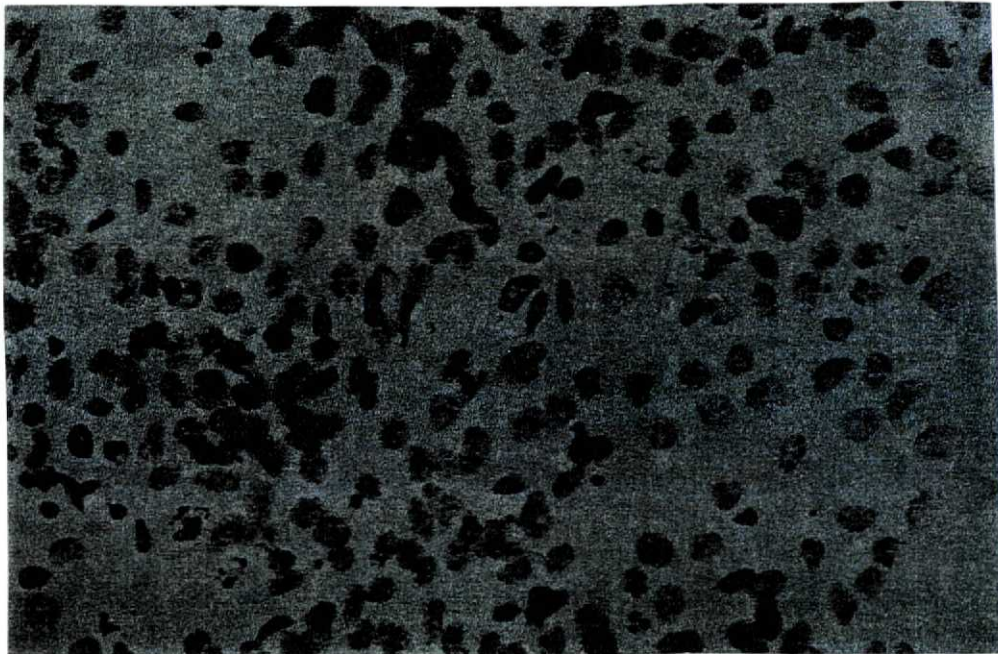
#### 2.1.6.2 Processo de coloração.

As lâminas, com os esfregaços citológicos na temperatura ambiente, são submetidas à coloração nuclear, nesta seqüência:

- a) 2 banhos por imersão de água destilada (5min)
- b) 1 banho por imersão de ácido clorídrico 6 normais (1 h);
- c) 1 banho por imersão de água destilada (1 min);
- d) 1 banho por imersão de reativo de Schiff (1 h);

- e) 3 banhos por imersão de solução de água sulfurosa (5 min), a qual é composta de 100ml de água destilada, 5ml de ácido clorídrico 1 normal e 5 ml de metassulfito de potássio a 10%;
- f) 1 banho de água corrente (10 min);
- g) as lâminas são então desidratadas com banhos de imersão sucessivos em etanol de 70%, etanol de 99%, isopropanolol (2 banhos) e toluol (3 banhos). Em seguida as lâminas são montadas (lamínulas), e estocadas em câmara escura, na temperatura de +4°C, até a análise.

Depois que as lâminas com os esfregaços citológicos tumorais são submetidas à coloração de Feulgen, os núcleos celulares ficam coloridos de vermelho magenta, como ilustra a Figura 2, abaixo.



**FIGURA 2:** Fotomicrografia de campo microscópico com núcleos celulares corados pelo método de Feulgen.

## 2.2 ANÁLISE COMPUTARIZADA DA IMAGEM NUCLEAR PELO SISTEMA ESPECIALISTA SAMBA 2005.

A análise computacional de imagem consiste no estudo e tratamento numérico de imagens do mundo físico. Esta numerização é realizada, na prática, por meio de captadores associados a sistemas de procura automática; é o denominado sistema de obtenção de imagens numéricas.

### 2.2.1 Organização funcional do sistema especialista SAMBA 2005 .

O sistema especialista que se utilizou foi o “Système d’analyse microscopique à balayage automatique” (Sistema de Análise Microscópica de Busca Automática): o SAMBA 2005 (Alcatel TITN, Grenoble, França). Esse sistema é composto por quatro subunidades: uma câmera de vídeo, acoplada a um microscópio (para a obtenção de imagens a partir de lâminas com o esfregaço citológico), uma unidade de comando (PC 486, Compac, França) do programa de tratamento dos dados obtidos (software, SAMBA 2005) e por impressora para a saída dos resultados desejados, conforme ilustra a Figura 3, abaixo.

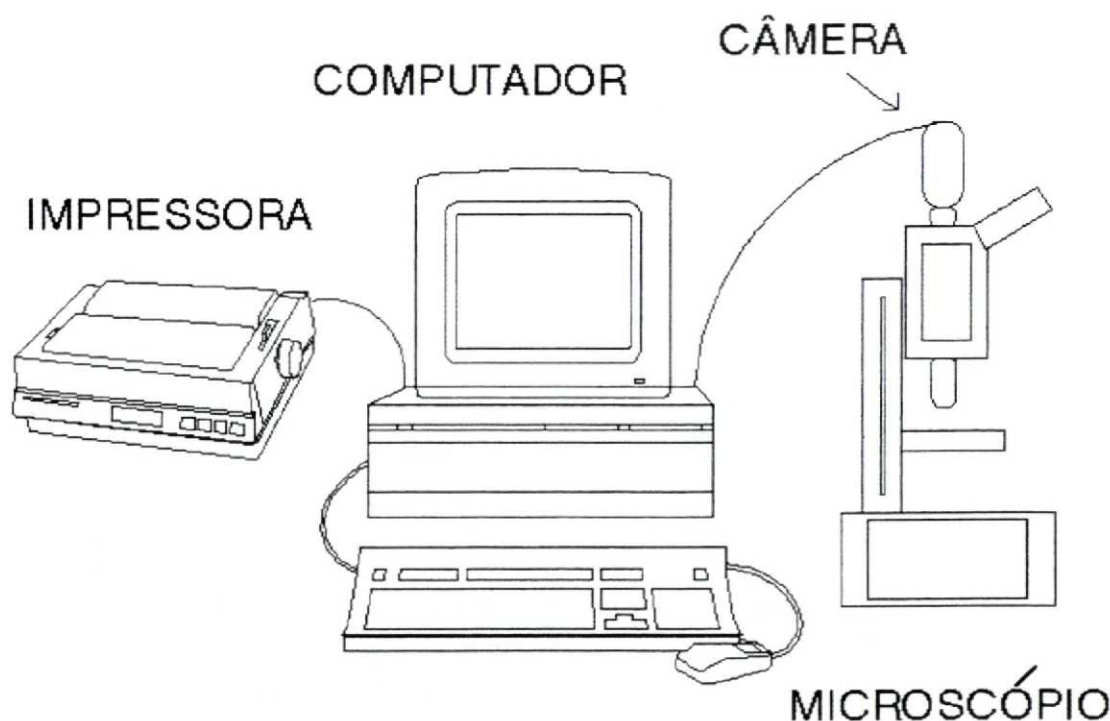


FIGURA 3: Ilustração do sistema SAMBA 2005.

### 2.2.1.1 Microscópio

O microscópio utilizado é o aparelho tipo "LEITZ Diaplan", Alemanha. O fluxo luminoso, oriundo da lâmpada, é inicialmente filtrado mediante filtro de luz verde, para eliminar os componentes vermelhos da luz. Ele atravessa em seguida o condensador, a lâmina e a objetiva, após é separado em duas partes: a via destinada a permitir a observação visual por meio da ocular, e a via de captação da imagem por meio da câmera.

### 2.2.1.2 Câmera de vídeo.

A captura das imagens são feitas através de uma câmera em preto e branco do tipo Sony CCD, japonesa, equipada com 256 fotodiodos, que permitem descrever, em 256 níveis de cinza, o objeto a ser analisado (núcleos celulares). Como se trabalhou em luz monocromática, isto é, a cor vermelha (coloração de Feulgen) e como se utilizou filtro de cor verde para complemento óptico da cor vermelha, o resultado é imagem em preto e branco, analisada em níveis da cor cinzenta.

### 2.2.1.3 Computador.

Um microcomputador através do sistema de comando e de tratamento visa preencher as seguintes funções: comando e controle das imagens obtidas pela câmera, obtenção e tratamento das imagens, tratamento dos dados, com cuja possibilidade de desenvolvimento se responde às questões específicas da pesquisa. As imagens captadas pela câmera de vídeo são lidas no nível dos fotodiodos (*pontos de imagem*) sob forma de 512 linhas e 512 colunas. Assim que a imagem é lida, o seu endereço em memória é comunicado ao segundo processador, que começa a tratá-la. O papel do processador de tratamento é fundamentalmente processar os cálculos. Os programas correspondentes a certa aplicação, na memória ram do processador, são encarregados de tratar os dados; a escolha do processador muda segundo a complexidade desses dados. Por fim, o processador externo permite desenvolver programas, arquivar dados, tratar dados, anteriormente arquivados, e formular as perguntas necessárias a determinada pesquisa.

### 2.2.1.4 Impressora.

Utilizada para impressão dos resultados.





### 2.2.3 Parâmetros analisados pelo sistema especialista para os núcleos corados segundo o método de Feulgen.

Trata-se de calcular, a partir da imagem numérica nuclear individual de cada núcleo, 15 parâmetros, com que se exprimem, de maneira sintética, as diferenças entre os objetos que deverão ser reconhecidos.

Em cada *ponto de imagem* (“pixel”) da composição do objeto estudado é associado um valor de densidade óptica (DO). O valor da DO é função da intensidade do corante, isto é, da absorção do *ponto de imagem* analisado. A distribuição dos valores de DO do núcleo é definido como a lei de probabilidade da variação da DO da imagem nuclear, isto é, ao longo de todos os *pontos de imagem* que ocupam o núcleo estudado. Essa distribuição é altamente reveladora da característica da imagem: se os valores de DO forem semelhantes, trata-se de imagem de baixa dinâmica; se, pelo contrário, os valores de DO variarem, o fato implica a existência de regiões de luminosidades diferentes. A seguir, descrevem-se os parâmetros usados.

#### 2.2.3.1 Parâmetro morfométrico.

**Parâmetro 1** O parâmetro morfométrico permite calcular o tamanho do núcleo representado em área (“nuclear area”: NA). Este parâmetro corresponde à somatória do número de pontos (“pixels”) ocupados pela imagem nuclear.

#### 2.2.3.2 Parâmetros densitométricos.

Estes são em número de cinco:

**Parâmetro 2** O valor integrado de todas as densidades ópticas de cada *ponto de imagem* (DO) do núcleo ou densidade óptica integrada (“integrated optical density”: IOD). Esse parâmetro representa a quantidade de ADN do núcleo. Quando os seus valores são expressos em histograma, é possível então calcular a porcentagem de células tumorais em cada fase do ciclo celular (G0-G1, S-G2-M).

**Parâmetro 3** Valor médio de todas as densidades ópticas pontuais do núcleo ou densidade óptica média (“mean optical density”: MOD).

**Parâmetro 4** Variância das densidades ópticas (“variance of optical density”: VOD). O parâmetro mede a heterogeneidade da distribuição dos diferentes graus de condensação da cromatina, qualquer que seja o grau de condensação da cromatina e a sua organização.

**Parâmetro 5** Índice de “Skewness” (SK), ou coeficiente de assimetria, que corresponde ao cociente do momento de ordem 3 pelo desvio padrão elevado ao cubo. Esse coeficiente é medido em relação ao pico maior de densidade. Durante o ciclo celular, a diminuição dos valores de SK traduzem a descondensação da cromatina.

**Parâmetro 6** Coeficiente de Curtose (“Kurtosis” = K), que corresponde ao cociente do momento de ordem 4 pelo desvio padrão elevado à quarta potência. Ajuda na determinação do aplainamento do histograma e mede a altura e a largura do pico maior do histograma. O seu valor amplia-se consoante a grandeza do pico do histograma e a pequenez da base, o que traduz o aumento da homogeneidade nos graus de condensação da cromatina.

#### 2.2.3.3 Parâmetros texturais.

Estes parâmetros estudam a textura da cromatina.

a) Parâmetros derivados dos comprimentos de secções da cromatina.

**Parâmetro 7** Frequência de curtas secções (“short run length emphasis”: SRL).

Este parâmetro é tanto mais elevado quanto maior a probabilidade de se encontrarem as curtas secções de *pontos de imagem* com alta densidade (maior que 128). Ele é revelador da presença de texturas finas, isto é, mede a frequência de pequenos agrupamentos da cromatina na imagem nuclear.

**Parâmetro 8** Frequência de longas secções (“long run length emphasis”:LRL).

Este parâmetro é tanto mais elevado quanto maior a probabilidade de se encontrarem as longas secções de *pontos de imagem* com alta densidade e agrupados (maior que 128). Este parâmetro é revelador da presença de texturas grosseiras (longas secções). Ele mede a frequência de grandes agrupamentos da cromatina na imagem nuclear.

**Parâmetro 9** Porcentagem de secções ("run length percentage" RLP).

Este parâmetro é correlacionado ao SRL e ao LRL; mede o número de secções por unidade de área, número tanto mais baixo quanto mais longas forem as secções.

**Parâmetro 10** Distribuição dos níveis de intensidade ("gray level distribution": GLD).

O parâmetro GLD tem valor tanto mais baixo quanto o histograma de repartição de secções dentro dos diferentes níveis seja mais uniforme. A repartição heterogênea induz valor elevado de GLD, tanto mais elevado quanto as secções sejam predominantes para o nível de intensidade dada. Trata-se, por consequência, de medida da "não uniformidade" da distribuição dos níveis de intensidade, dentro da imagem.

**Parâmetro 11** Distribuição dos comprimentos de secção ("run length distribution": RLD).

O RLD mede igualmente a "não uniformidade" da distribuição dos comprimentos de secção, tal qual o GLD, porém independente do seu nível de intensidade.

b) Parâmetros derivados das Matrizes de *Coocorrência* ("co-occurrence").

Pode-se calcular várias matrizes correspondentes a distâncias e direções diferentes. Quatro parâmetros representativos da distribuição de pares de pontos pertencentes à matriz são calculados:

**Parâmetro 12** Média local ("local mean": LM).

Este parâmetro mede o nível de intensidade média do objeto ou da região. Ele não está ligado às características propriamente texturais, mas mede o grau global de condensação da cromatina. Ele é inversamente correlacionado com o parâmetro MOD.

**Parâmetro 13** Segundo momento ou Energia ("energy": E).

**Parâmetro 14** Variância dos coeficientes da matriz (“coefficient of variance of the co-occurrence matrix”: CV).

Os dois parâmetros E e CV são fortemente correlacionados, em parte pelos seus métodos de cálculo, e traduzem a uniformidade da distribuição dos pares de pontos da matriz. Revelam-se, no nível da imagem, pela uniformidade dos níveis de intensidade.

**Parâmetro 15** Contraste (“contrast”: C).

Mede a importância da fronteira entre as regiões nucleares com diferentes valores de intensidade. Aumenta em geral com o aumento do número de agrupamentos de cromatina densa e bem individualizada.

## 2.2.4 Análises estatísticas

### 2.2.4.1 Análises monovariadas

Os resultados (apresentados sob a forma de médias mais ou menos os seus erros padrões), foram comparados entre si pelo teste de análise das variâncias com critério de classificação por duas populações (**DAGNELIE, P. 1973, 1975a**). Verificam-se as seguintes condições de aplicação:

- as amostras devem ser extraídas de maneira aleatória e independente;
- as amostras devem ser divididas segundo a distribuição normal: comparando-se a distribuição de cada amostra e a distribuição teórica da normal, o teste do Chi quadrado permite verificar se elas não são estatisticamente diferentes. Se as condições de aplicabilidade deste teste não estão falsamente preenchidas por número suficiente de graus de liberdade, é então utilizado o teste de Kolmogorov - Smirnov, que é menos exigente;
- as variâncias devem ser iguais e duas possibilidades se apresentarão: ou as amostras são iguais, caso em que se utiliza o teste de Hartley, que divide as duas variâncias; ou as amostras são diferentes, caso em que se utiliza o teste de Bartlett.

Os resultados serão apresentados da maneira seguinte:

Não significativa =  $p > 0.05$

Significante =  $p < 0.05$  \*

Muito significativa =  $p < 0.01$  \*\*

Extremamente significativa =  $p < 0.001$  \*\*\*

Se essas condições não são encontradas, utilizam-se os testes não paramétricos menos exigentes, mas de menor desempenho, de Kruskal - Wallis ou de Mann - Withney. Esses últimos classificam primeiramente as amostras pela disposição (classes) e, após, comparam as disposições de cada população. (SIEGEL, S. & CASTELMAN, J. 1988)

Todos os testes descritos acima foram realizados com o software "STATGRAPHICS" (Statistical Graphics Corporation, versão 2.1, número de série 249072).

#### 2.2.4.2 Análise multivariada.

Essa análise oferece ao pesquisador a possibilidade de estudar todos os parâmetros calculados por computador, isto em uma única etapa de cálculo. Utilizaram-se as análises de componentes principais, com suas transformações canônicas, as quais permitem visualizar no plano bidimensional, chamado plano fatorial, os resultados calculados em 15 planos (informações dadas pelos 15 parâmetros morfonucleares) e a análise discriminante.

As análises multivariadas são formadas por conjunto de métodos estatísticos que tem por objetivo o estudo das relações existentes entre muitas variáveis dependentes e interdependentes (DAGNELIE, P. 1975b). Entre o conjunto de análises possíveis, foi utilizada a análise de componentes principais do tipo fatorial e análise discriminante. A análise de componentes principais tem por objetivo:

1. substituir as variáveis iniciais, geralmente correlacionadas entre si, pelas variáveis não correlacionadas;
2. reduzir o número de variáveis consideradas, isto é, o número de dimensões do espaço no qual as variações devem ser estudadas.

O seu objetivo principal é condensar o essencial das informações dadas pelos 15 parâmetros morfonucleares interdependentes, observados diretamente, em número mais restrito de variáveis, que possa ser observado diretamente. O “software CLUSTER”, do sistema SAMBA 2005, foi utilizado com este objetivo. Não serão descritos em detalhes os cálculos matemáticos pertinentes a essa análise. Informa-se simplesmente que os cálculos são baseados em cálculos matriciais: considera-se a matriz inicial de **a** indivíduos multiplicada por **b** variáveis, em que se obtêm as matrizes de variância - covariância e as matrizes de correlação associada. Pesquisam-se em seguida os valores próprios, que são as soluções da equação matricial de 15 graus. A esses valores numéricos próprios são associados os seus respectivos vetores. Consideram-se várias populações entre cujas médias há diferenças. Encontra-se freqüentemente o problema de disposição de uma ou outra dessas populações de indivíduos e, então, em princípio, não se sabe a qual população estes indivíduos pertencem (DAGNELIE, P. 1975b).

O “software DISCRI” (integrante do sistema SAMBA 2005) que foi utilizado permite classificar ou dispor os indivíduos dentro de uma ou outra das séries previamente definidas pelo emprego da análise discriminante, análise que tem por princípio definir duas populações com **N** variáveis, com função linear **K**, a qual permite identificar, em uma das duas populações, qualquer indivíduo caracterizado por valor negativo de **K** e, em outra população, qualquer indivíduo caracterizado por valor positivo de **K**, de tal maneira que o risco de classificação errônea (classificação de indivíduo pertencente a uma população dentro da outra população) seja o menor possível. Dois tipos de análise discriminante podem ser utilizados: o método supervisionado (que impõe parâmetros), e o método não supervisionado (sem impor parâmetros). Os métodos de classificação, geralmente utilizados no campo da análise de imagens citológicas, são do tipo supervisionado. Tais métodos supervisionados necessitam de etapa preliminar, dita de aprendizagem, pela qual o lote de células utilizado foi previamente rotulado pelo investigador. Seguida esta etapa de aprendizado, os indivíduos desconhecidos são classificados no tipo celular que lhes é mais semelhante.

Na análise discriminante, os parâmetros são considerados etapa por etapa e classificados dos mais discriminantes até os menos discriminantes, pela utilização dos testes de análise de variância. Os resultados obtidos por esta análise são apresentados sob a seguinte forma.

- 1) Lista por ordem decrescente dos parâmetros mais discriminantes.
- 2) Matriz de dupla entrada, que apresenta para cada arquivo-teste a porcentagem de núcleos reconhecidos no **banco de dados** morfonucleares.

Desde que o valor associado ao poder discriminante do vetor seja superior a 6, a taxa de significância estatística associada ao poder discriminante é de  $p < 0,05$ ; se for superior a 11,  $p < 0,01$ ; se superior a 30,  $p < 0,001$  e se superior a 60,  $p < 0,0001$ . Tais valores são obtidos pelos testes estatísticos de Fischer-Snedecor.

### **3 RESULTADOS**

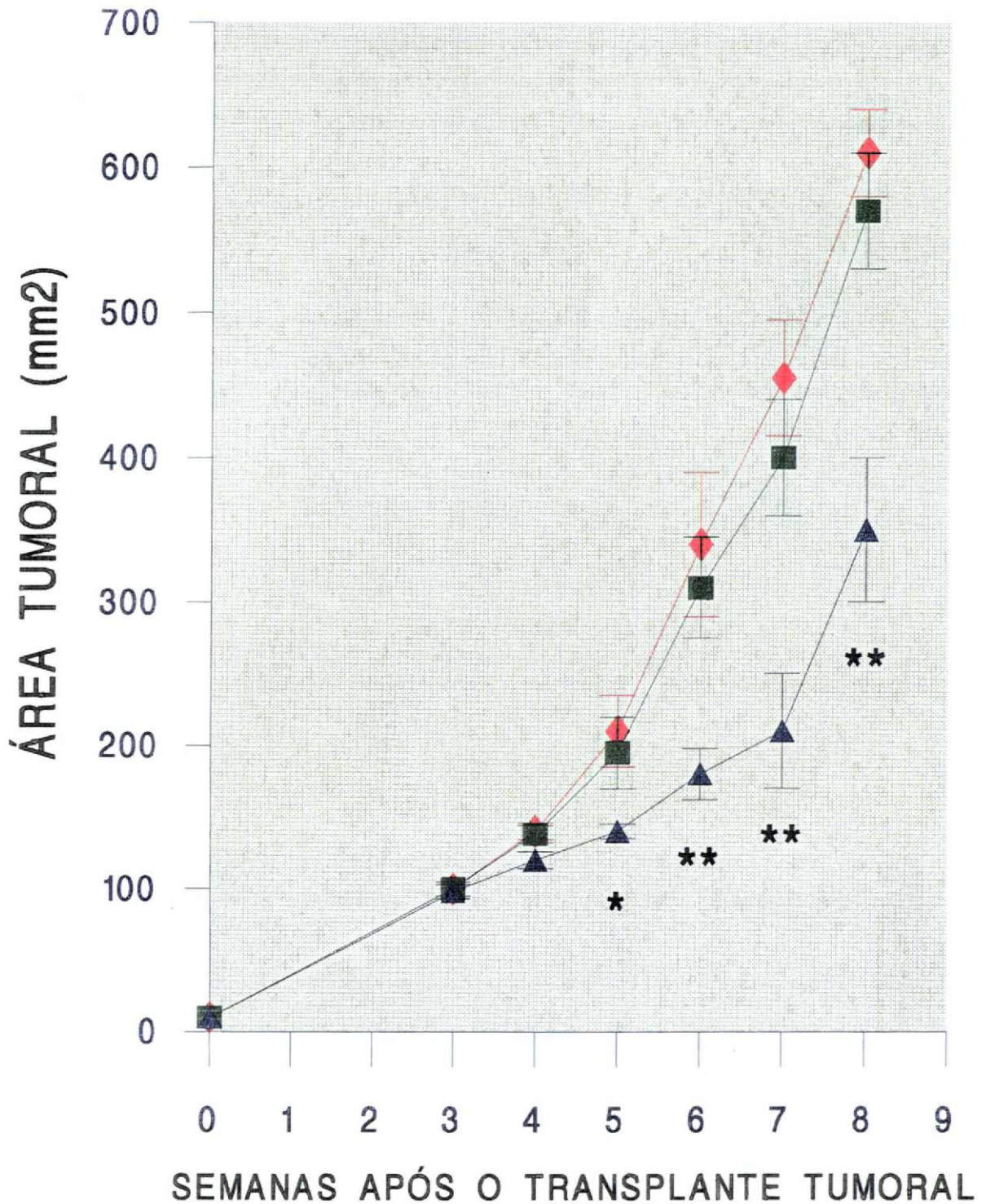
Os resultados das análises obtidas neste experimento serão expressos sob forma de gráficos legendados e com prévio comentário de cada um deles.

### 3.1 Crescimento tumoral

A dose de irradiação do grupo de animais que receberam 8 Gy foi capaz de retardar o crescimento tumoral MXT, porém o grupo que recebeu a dose de 2Gy não sofreu alteração do crescimento tumoral de forma significativa. O gráfico da Figura 6 apresenta os resultados obtidos pelo cálculo da área tumoral MXT. Em vermelho estão representadas as médias mais ou menos os seus erros padrões do grupo controle, em verde os resultados do grupo irradiado com 2Gy, e em azul os resultados do grupo irradiado com 8Gy. Observa-se que o grupo de animais que recebeu a dose de 8Gy retardou, de maneira muito significativa ( $p < 0.01$ ), o crescimento dos tumores MXT. Tal efeito não foi observado com o grupo de animais que recebeu a dose de 2Gy.

### 3.2 Resultados da análise monovariada dos 15 parâmetros estudados.

Analisaram-se os resultados dos 15 parâmetros isolados, estudados em cada tumor dos diferentes grupos, com base na análise estatística monovariada, comparado cada grupo (CT, 2Gy e 8Gy). Não houve diferença significativa nessa análise.



**FIGURA 6:** Curvas de crescimento do tumor mamário MXT. Trinta fêmeas foram dispostas em três grupos com 10 animais, que correspondem ao grupo controle, ao grupo de animais irradiados com 2Gy e ao grupo de animais irradiados com 8Gy. As doses de irradiação de 2Gy e 8Gy foram realizadas 21 dias (3 semanas) após o transplante do tumor. Os tumores foram medidos com o paquímetro e expressos em área (mm<sup>2</sup>). Os resultados estão expressos em médias mais ou menos os seus erros padrões: ♦(vermelho) = grupo controle; ■(verde) = grupo irradiado com 2Gy; ▲(azul) = grupo irradiado com 8Gy. Esses valores médios foram comparados pelo teste de Fisher (\* = p < 0.05; \*\* = p < 0.01).

### 3.3 Resultados da análise multivariada.

A Figura 7 ilustra como foi realizada a análise multivariada no estudo das características morfonucleares dos tumores MXT no grupo 8Gy. Utilizaram-se os softwares “CLUSTER” e “DISCRI”, disponíveis no sistema SAMBA 2005, para realizar essas análises.

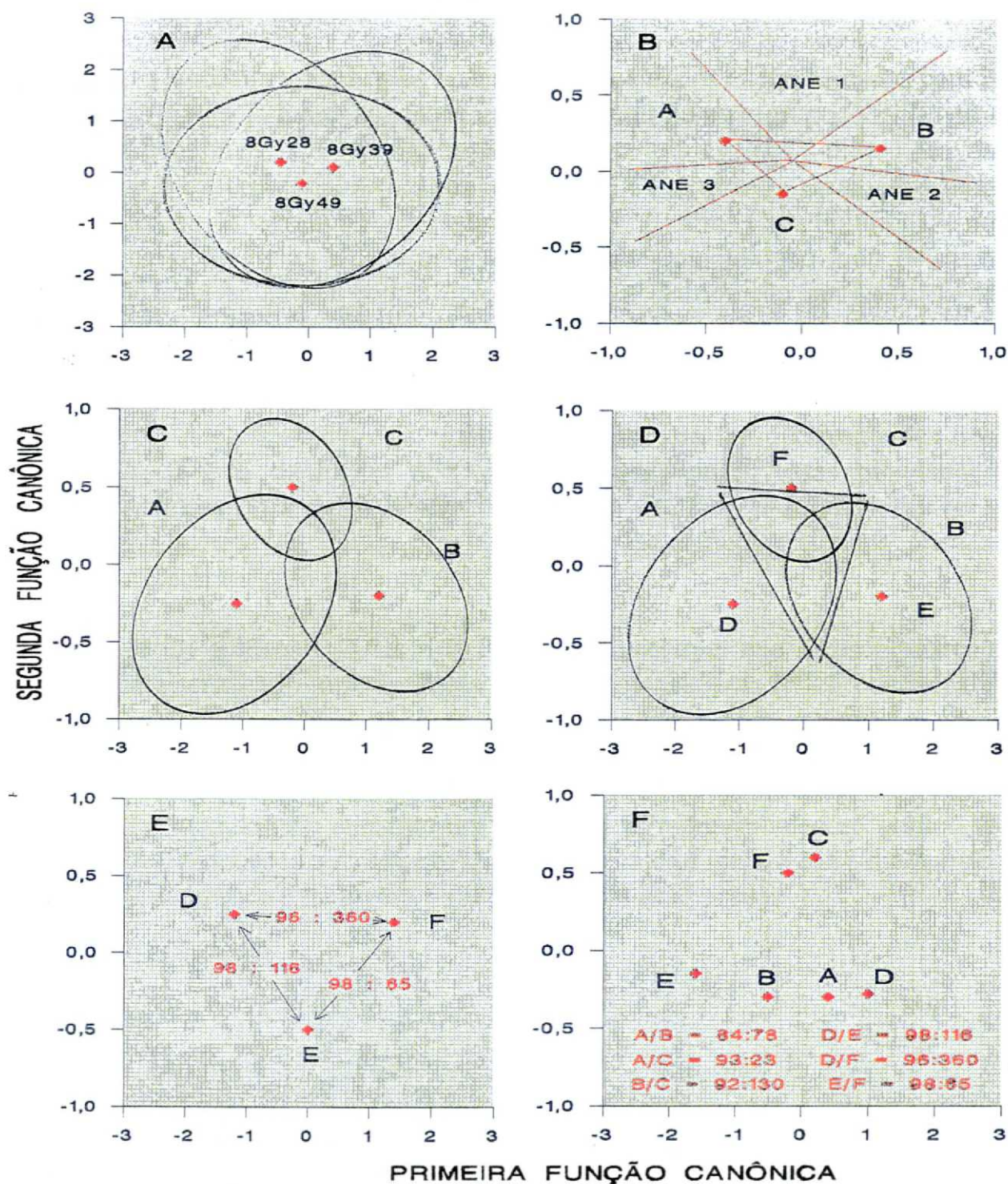
Os gráficos A a F da Figura 7 foram representados segundo as duas primeiras funções canônicas, chamadas também combinações lineares dos 15 parâmetros utilizados. Tal tratamento canônico dos dados permite projetar no espaço bidimensional (plano fatorial), os resultados da análise multivariada disposta no espaço de 15 dimensões. As grandes elipses representam o intervalo de confiança em 95% da distribuição nuclear fatorial, enquanto os pontos vermelhos representam o intervalo de confiança em 95% da posição média dessa distribuição nuclear fatorial. Cada elipse foi calculada para uma população de 1000 núcleos, escolhidos aleatoriamente nos 10 arquivos numéricos contidos em cada grupo de estudo; cada arquivo compreende imagens numerizadas de 200 núcleos celulares de 1 tumor MXT.

O grupo experimental representado na Figura 7 corresponde aos tumores que receberam dose de irradiação de 8Gy; as punções de agulha fina foram realizadas no 28° (elipses 8Gy28), no 39° (elipses 8Gy39) e no 49° (elipses 8Gy49) dia após o transplante tumoral, ou seja, 7, 18 e 28 dias após a irradiação. Percebe-se claramente, no gráfico A, que as três distribuições nucleares fatoriais estão fortemente sobrepostas. Utilizou-se modelo matemático para filtrar cada distribuição nuclear fatorial. Os pontos vermelhos, representados no gráfico B da Figura 7, correspondem aos intervalos de confiança em 95%, que circundam a posição média das três distribuições nucleares fatoriais, representadas no gráfico A da Figura 7, ou seja, o gráfico B apresenta os mesmos resultados do gráfico A, porém com outra escala gráfica. Definindo o baricentro do triângulo, correspondente às três posições médias das distribuições nucleares fatoriais, foi possível separar o plano fatorial em seis partes por meio de retas (vermelhas), representadas no gráfico B da Figura 7. Definiram-se, então, as áreas A, B, e C do plano fatorial como correspondentes à parte específica da distribuição nuclear fatorial das populações celulares, respectivamente 8Gy28, 8Gy39, e 8Gy49. Em contrapartida, as áreas ANE1, ANE2, e ANE3 do plano fatorial foram definidas como áreas não específicas. Por exemplo, a área ANE1 representa a parte do plano fatorial que é comum ao grupo 8Gy28 (elipse A) e 8Gy39 (elipse B). A mesma observação pode ser feita com relação às áreas ANE2 e ANE3 (gráfico B da Figura 7).

Em seguida, comandou-se ao software "CLUSTER" que isolasse os núcleos celulares das áreas específicas A, B, e C do plano fatorial. Essas três áreas, assim isoladas matematicamente, foram submetidas a nova análise de componentes principais, a fim de se visualizarem os novos resultados, como ilustra a transformação canônica do gráfico C da Figura 7. As grandes elipses, que representam o intervalo de confiança em 95% das distribuições nucleares fatoriais, correspondem às áreas A, B e C (gráfico B da Figura 7), e são agora relativamente bem separadas entre si, em comparação daquelas do gráfico A da Figura 7; entretanto continua existindo sobreposição entre as três elipses. O gráfico D da Figura 7 representa a maneira como se procedeu na eliminação dessas áreas de sobreposição; com o auxílio de novas retas, individualizaram-se os núcleos realmente específicos de cada grupo de estudo. Assim, a área D é a parte específica do plano fatorial que contém agora a população nuclear oriunda da distribuição nuclear fatorial A, e que não contém ou contém muito poucos núcleos das distribuições fatoriais B e C. A parte D da distribuição nuclear fatorial está à esquerda da reta que separa a população nuclear *típica* A. Procedeu-se da mesma maneira para determinar a área E, que é a população nuclear *típica* B; F corresponde à população nuclear *típica* C.

O gráfico E da Figura 7 demonstra os resultados estatísticos, realizados com o software "DISCRI", da análise multivariada dos núcleos das populações D, E e F, que revelam discriminação extremamente significativa entre as três populações celulares *típicas*. Os valores **a:b**, que estão demonstrados entre as flechas, representam o nível de discriminação obtida após a análise discriminante linear (**a** = porcentagem de núcleos diferentes entre os grupos) em função do poder de discriminação do parâmetro mais discriminante (**b** em unidades arbitrárias). Quando o valor **b** é > que 6 corresponde ao nível de significância estatística de  $p < 0.05$ ; se **b** > 11,  $p < 0.01$ ; se **b** > 30,  $p < 0.001$ ; se **b** > 60,  $p < 0.0001$ . Esses valores estatísticos são obtidos na Tabela Estatística de Fisher-Snedecor. Os valores **a** são então diretamente correlacionados com os de **b**.

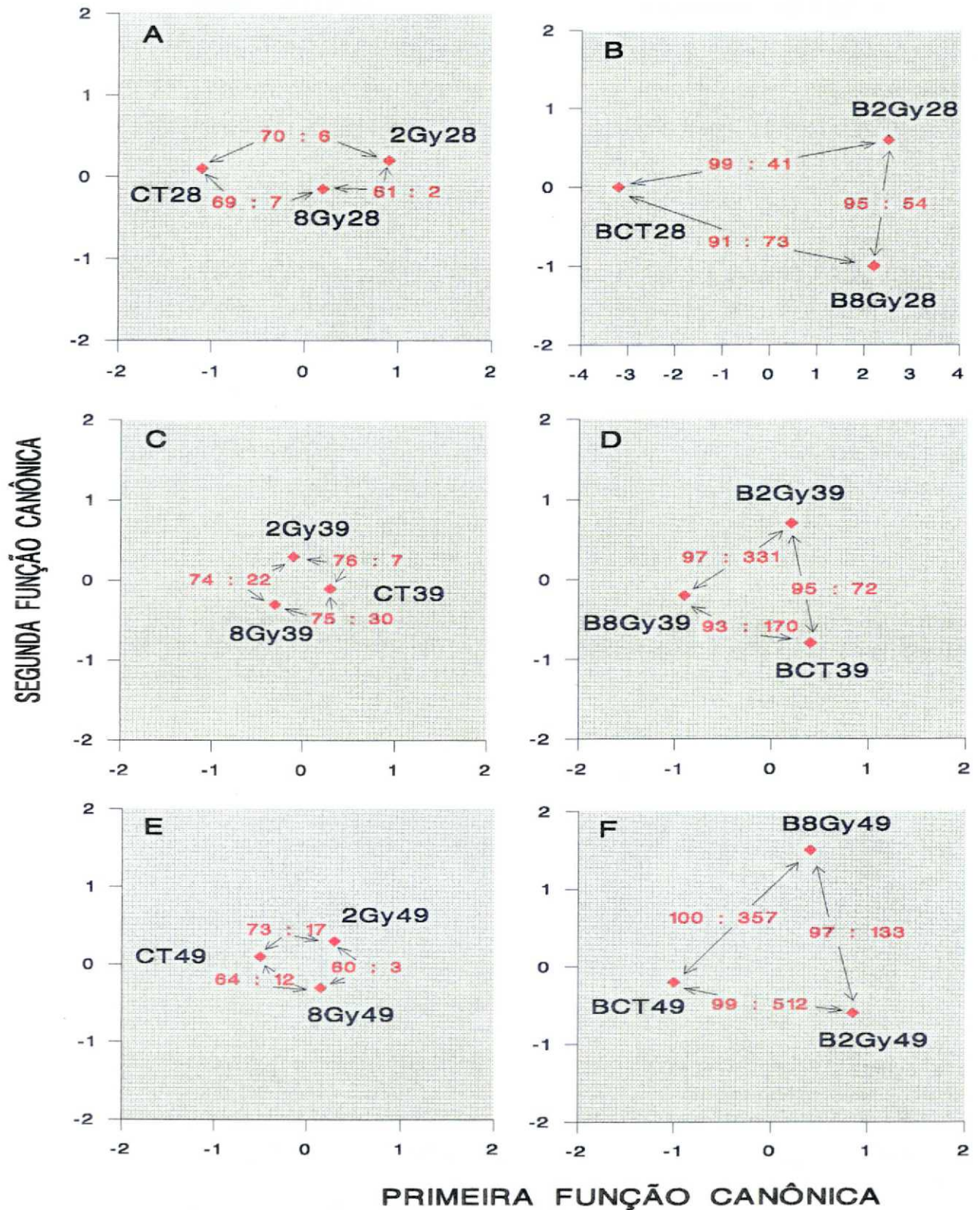
Em seguida, no gráfico F da Figura 7 representaram-se os resultados obtidos nos gráficos C e E da Figura 7. Observa-se assim que o segundo tratamento matemático dos dados, ilustrado no gráfico D da Figura 7, aumentou significativamente a especificidade nuclear tumoral em cada grupo estudado, em comparação dos resultados obtidos no gráfico C da Figura 7.



**FIGURA 7:** Análise multivariada de componentes principais, aplicada em 1000 núcleos por elipse do gráfico A, selecionados aleatoriamente, dos grupos de animais com tumores MXT, tratados por 8Gy e analisados no 28º (8Gy28, gráfico A), 39º (8Gy39, gráfico A) e no 49º (8Gy49, gráfico A) dia após o transplante tumoral, isto é, 7-18-28 dias após a irradiação. Os núcleos foram corados segundo o método de Feulgen, submetidos à numerização descrita em 15 parâmetros, e estudados pela análise de componentes principais com transformação canônica. Cada elipse representa o intervalo de confiança em 95% da distribuição nuclear fatorial. Os valores **a:b**, demonstrados entre as flechas (gráficos E e F), representam o nível de discriminação obtida após análise discriminante linear (**a** = valor em porcentagem) em função do poder de discriminação do parâmetro mais discriminante (**b** em unidades arbitrárias). Quando o valor **b** é > 6, corresponde ao nível de significância estatística de  $p < 0.05$ ; se  $b > 11$ ,  $p < 0.01$ ; se  $b > 30$ ,  $p < 0.001$ ; se  $b > 60$ ,  $p < 0.0001$ . ANE = área não específica.

Todos os tratamentos matemáticos dos dados exemplificados para o grupo 8Gy (Figura 7) foram aplicados ao grupo controle e ao grupo 2Gy (Figura 8). Os gráficos A, C e E da Figura 8 representam a evolução diacrônica da distribuição nuclear fatorial *total*, dos tumores MXT controle e irradiados com 2Gy ou 8Gy, no 28° (gráfico A da Figura 8), no 39° (gráfico C da Figura 8), e no 49° (gráfico E da Figura 8) dia após o transplante tumoral. Ao lado de cada distribuição nuclear fatorial *total*, representou-se a distribuição nuclear fatorial *filtrada matematicamente*, segundo a metodologia descrita nos gráficos A a F da Figura 7. As populações nucleares tumorais, *filtradas matematicamente* e representadas nos gráficos B, D e F da Figura 8, são provenientes das distribuições nucleares fatoriais *totais*, representadas respectivamente nos gráficos A, C e E da Figura 8. Consideraram-se, então, essas populações nucleares tumorais, *filtradas matematicamente*, (BCT28, B2Gy28, B8Gy28 etc...) como **bancos de dados morfonucleares** específicos, relativos a cada condição experimental do presente estudo.

Os gráficos B, D e F da Figura 8 demonstram que a discriminação entre as características morfonucleares dos núcleos celulares MXT controles e irradiados por 2Gy ou 8Gy aumenta durante o tempo. Efetivamente, o nível estatístico da discriminação entre as características morfonucleares dos três grupos experimentais deste estudo aumentou significativamente durante o tempo. Isso foi demonstrado pelo aumento dos valores **a:b**, representados no gráfico B da Figura 8 (7° dia após a irradiação); no gráfico D da Figura 8 (18° dia após a irradiação); no gráfico F da Figura 8 (28° dia após a irradiação).



**FIGURA 8:** Os gráficos A, C e E representam a evolução diacrônica da distribuição nuclear fatorial *total* dos grupos de tumores controles e irradiados por 2Gy e 8Gy, no dia 28<sup>o</sup> (gráfico A), 39<sup>o</sup> (gráfico C) e 49<sup>o</sup> (gráfico E) após o transplante tumoral. À direita de cada distribuição nuclear fatorial *total* (gráficos A, C e E) representou-se a distribuição nuclear fatorial *filtrada matematicamente* (gráficos B, D e F). Denominaram-se essas populações celulares *filtradas* de BCT28, B2Gy28, B8Gy28, etc... As novas populações celulares assim *filtradas* correspondem aos **bancos de dados morfonucleares** específicos de cada condição experimental do presente estudo.

### 3.4 Modificações morfonucleares induzidas pela radioterapia nos núcleos tumorais MXT, descritas por análise monovariada dos **bancos de dados morfonucleares**.

Realizada a *filtragem matemática* dos núcleos tumorais das populações nucleares *totais* de cada grupo estudado, como se demonstra nas figuras 7 e 8, procedeu-se à análise monovariada dos **bancos de dados morfonucleares** (BCT, B2Gy e B8Gy), no 28° e 49° dia após o transplante tumoral (7 e 28 dias após a irradiação), como ilustra a Figura 9. As linhas vermelhas representam os resultados depois de 7 dias da irradiação, enquanto as linhas verdes representam os resultados depois de 28 dias da irradiação. Cada símbolo (◆ ou ■) representa a média, mais ou menos o seu erro padrão, dos valores dos respectivos parâmetros calculados em aproximadamente 200 núcleos celulares. Representaram-se os seis parâmetros mais discriminantes.

O gráfico NA da Figura 9, que representa os resultados do cálculo da área nuclear no 7° dia após a irradiação, ou seja, 28 dias após o transplante tumoral (linha vermelha), o tratamento 2Gy não induziu modificações significantes ( $p > 0.05$ ), em relação ao grupo controle. Em contrapartida, o tratamento 8Gy aumentou, de forma significativa ( $p < 0.01$ ), a média dos valores da área nuclear, em comparação do grupo controle (gráfico NA da Figura 9). No 28° dia após a irradiação, ou seja, 49 dias após o transplante tumoral (linha verde), observa-se aumento extremamente significativo ( $p < 0.001$ ) da média dos valores de NA, induzidos pelos dois tratamentos 2Gy e 8Gy, e o aumento da área nuclear induzida por 2Gy foi superior ( $p < 0.05$ ), em comparação do grupo 8Gy. (gráfico NA da Figura 9).

A média do conteúdo em ADN nuclear, calculado pela densidade óptica integrada (IOD), aumentou de forma extremamente significativa ( $p < 0.001$ ) após o 7° dia da irradiação de 2Gy e de 8Gy (gráfico IOD da Figura 9). Após o 28° dia da irradiação, o fenômeno inverso é observado; verificou-se diminuição extremamente significativa ( $p < 0.001$ ) da média dos valores de IOD, após os dois tratamentos radioterápicos. Não se observou diferença significativa dos valores médios de IOD entre os grupos 2Gy e 8Gy.

No gráfico SRL da Figura 9, que representa os valores médios da frequência de pequenos agrupamentos da cromatina (SRL), diminuíram, de forma extremamente significativa ( $p < 0.001$ ), após o 7° dia da irradiação com 8Gy, enquanto a irradiação com 2Gy não induziu efeito aparente. Os dois tratamentos de 2Gy e 8Gy diminuíram, de forma extremamente significativa

( $p < 0.001$ ), os valores médios de SRL, após o 28° dia da irradiação; o efeito do tratamento de 2Gy foi mais pronunciado ( $p < 0.01$ ) em comparação daquele de 8Gy.

A evolução inversa à anterior foi observada no que concerne ao parâmetro que mede a frequência de grandes agrupamentos de cromatina, no gráfico LRL da Figura 9. O tratamento de 8Gy aumentou, de forma extremamente significativa, ( $p < 0.001$ ) a média dos valores de LRL, após o 7° dia do tratamento, enquanto o grupo 2Gy não apresentou modificações estatisticamente relevantes. A partir do 28° dia da irradiação, os dois tratamentos induziram aumento extremamente significativo ( $p < 0.001$ ) dos valores médios de LRL; o efeito de 2Gy foi significativamente ( $p < 0.01$ ) mais pronunciado do que aquele de 8Gy.

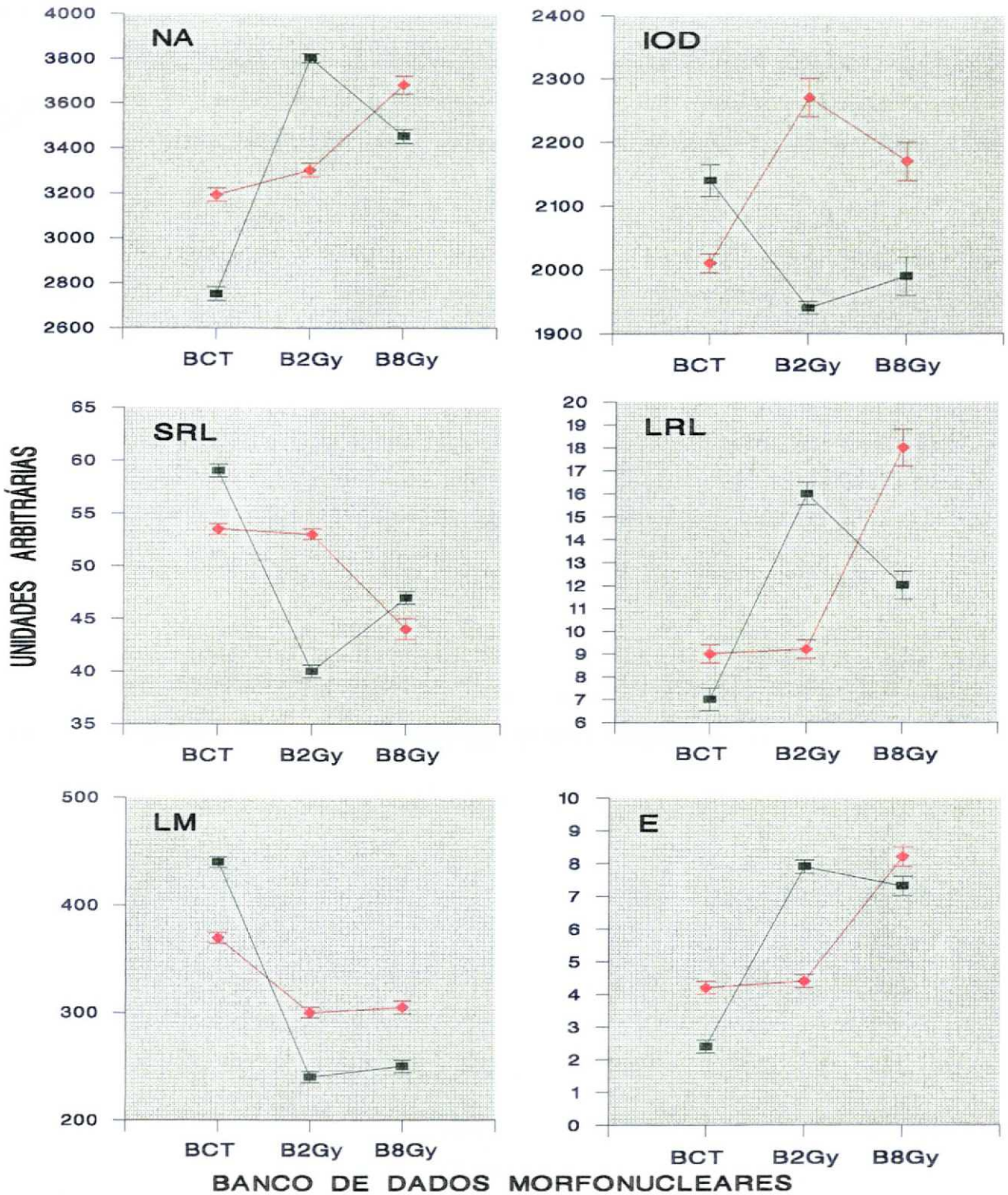
O parâmetro LM, no gráfico LM da Figura 9, que mede a média local da condensação da cromatina, diminuiu, de forma extremamente significativa ( $p < 0.001$ ), após os dois tratamentos de 2Gy e 8Gy. Os resultados foram observados tanto no 7° quanto no 28° dia da irradiação; não houve diferença entre os tratamentos de 2Gy e 8Gy.

A energia (E) da matriz de *coocorrência*, no gráfico E da Figura 9, que traduz a uniformidade dos níveis de intensidade dos *pontos de imagem*, aumentou, de forma extremamente significativa ( $p < 0.001$ ), após o 7° dia do tratamento, somente para o grupo 8Gy. Após o 28° dia do tratamento, os dois grupos 2Gy e 8Gy manifestaram aumento extremamente significativo ( $p < 0.001$ ) do valor médio de E, sem diferença entre os grupos 2Gy e 8Gy.

### 3.5 Determinação do histograma de ADN para estudo do ciclo celular.

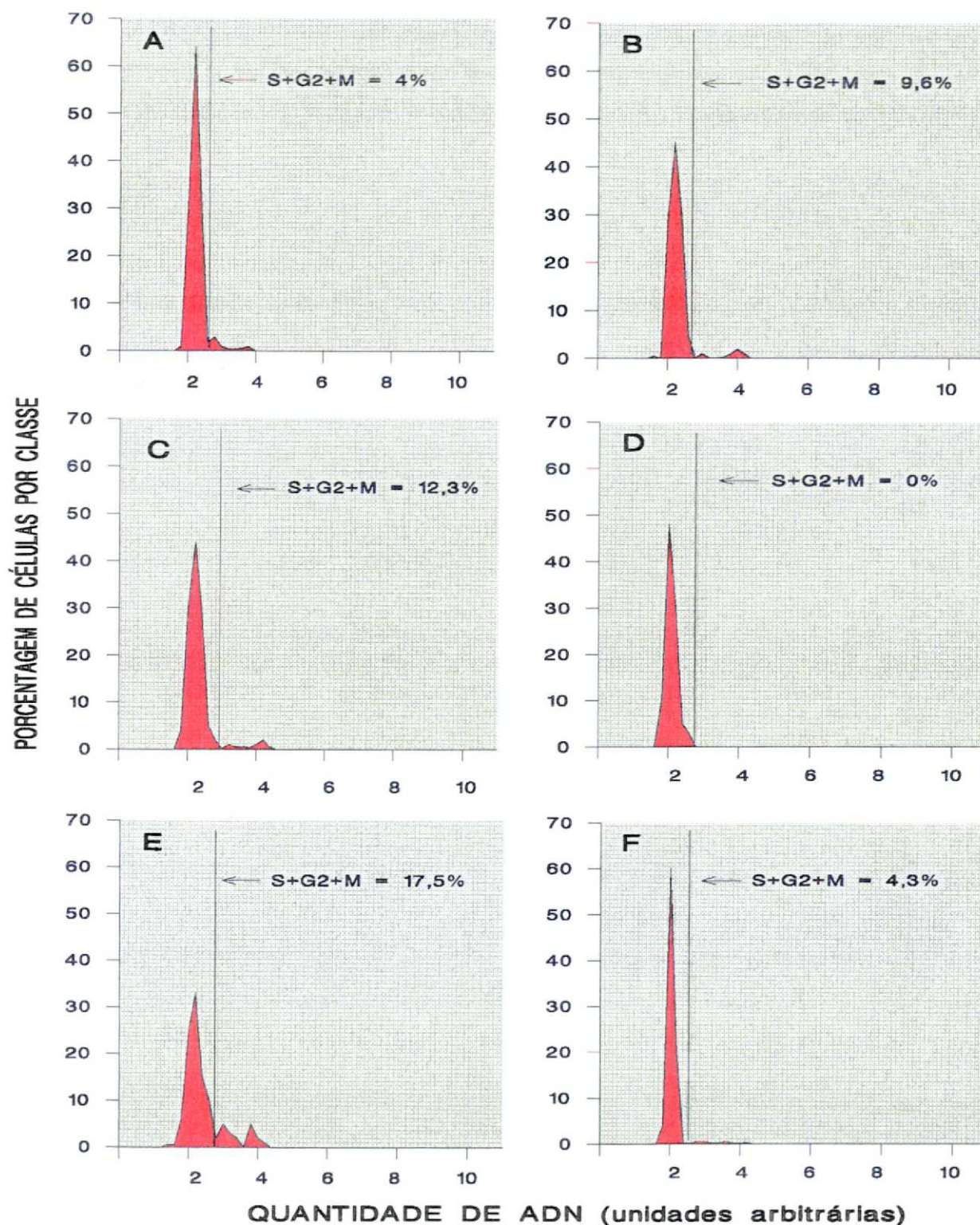
A Figura 10 ilustra a determinação do histograma de ADN dos **bancos de dados morfonucleares**. Os gráficos foram obtidos através dos resultados da densidade óptica integrada, expressos em forma de histogramas. Os histogramas A, C e E correspondem aos resultados, 28 dias após o transplante tumoral (7 dias após a irradiação), enquanto os histogramas B, D e F correspondem aos resultados verificados 49 dias após o transplante tumoral (28 dias após a irradiação). Os histogramas A e B são referentes ao grupo controle; C e D, ao grupo irradiado com 2Gy; os histogramas E e F correspondem ao grupo irradiado com 8Gy. A partir do 28° dia da irradiação, houve diminuição da proliferação celular, consideradas as fases **S**, **G2** e **M** do ciclo celular, como

ilustram os histogramas D (2Gy = 0%) e F (8Gy = 4,3%) da Figura 10, em comparação dos efeitos observados após o 7º dia de irradiação, observados nos histogramas C (2Gy = 12,3%) e E (8Gy = 17,5%). No grupo controle, o fenômeno inverso foi observado, com aumento das fases **S**, **G2** e **M** ao longo do tempo, como ilustram os histogramas A (4%) e B (9,6%) da Figura 10.



**BANCO DE DADOS MORFONUCLEARES**

**FIGURA 9:** Influência das irradiações de 2Gy e 8Gy sobre seis parâmetros morfonucleares, durante o crescimento tumoral MXT. Cada símbolo (◆ ou ■) representa a média (mais ou menos o seu erro padrão), calculada em aproximadamente 200 núcleos celulares oriundos dos **bancos de dados morfonucleares** de cada grupo tumoral. Os pontos ligados por linha vermelha representam as análises morfonucleares realizadas no 7º dia após a irradiação; os pontos ligados por linha verde representam as análises morfonucleares realizadas no 28º dia após a irradiação. BCT corresponde ao grupo controle, enquanto B2Gy e B8Gy correspondem aos grupos tratados por 2Gy e 8Gy respectivamente. Essas populações nucleares descrevem os núcleos *típicos* das figuras 7 e 8. Os seis parâmetros descritos são: a área nuclear (NA), a densidade óptica integrada (IOD), a frequência de pequenos agrupamentos de cromatina (SRL), a frequência de grandes agrupamentos da cromatina (LRL), a média local da condensação da cromatina (LM) e a uniformidade da distribuição dos pares de pontos da matriz (E).



**FIGURA 10:** Histogramas de ADN dos bancos de dados morfonucleares, descritos na Figura 8. Os histogramas A e B correspondem à população nuclear controle, no 28° e 49° dia após o transplante tumoral. Os histogramas C e D correspondem às populações nucleares irradiadas por 2Gy, enquanto os histogramas E e F correspondem às populações nucleares irradiadas por 8Gy, (representadas igualmente no 28° e 49° dia após o transplante tumoral, ou seja, no 7° e 28° dia após a irradiação). A proliferação celular tumoral MXT corresponde às fases S+G2+M do ciclo celular, está ilustrada à direita da linha vertical de cada histograma.

## **4. DISCUSSÃO**

O presente trabalho tem como objetivo caracterizar as modificações morfológicas, induzidas pela irradiação nos núcleos celulares do tumor mamário experimental, tumor MXT de camundongo fêmeo B6D2F1.

Escolheu-se o modelo MXT para este estudo, visto ser o modelo que se poderia aproximar do padrão histológico do câncer ductal. Descrevem-se a seguir algumas propriedades biológicas do tumor MXT em face do seu homólogo humano. O tumor MXT deriva dos canais galactóforos, como a maioria dos cânceres invasores da mama ditos NOS (Not Otherwise Specified, não especificados de outra maneira), que correspondem de 65 a 80% dos tumores malignos mamários humanos (HARRIS, J.R.; HELLMAN, S.; HENDERSON, I.C.; KINNE, D.W. 1991). Já a maioria dos outros cânceres experimentais mamários derivam dos ácinos glandulares. A biologia desses dois grupos de tumores são fundamentalmente diferentes: os tumores derivados dos canais galactóforos são em geral *esteroídossensíveis*, enquanto os tumores derivados dos ácinos glandulares são em geral *prolactinossensíveis* (PARIDAENES, R.; LECLERCQ, G.; PICCART, M.; KISS, R.; MATTHEIEM, W.; HEUSON, J.C. 1986; KISS et al. 1987b). Assinala-se ainda que a cepa tumoral MXT, utilizada no presente trabalho, era relativamente homogênea do ponto de vista da sua composição celular, correspondente à cepa BOG. I (DANGUY et al. 1986). A cepa do tumor MXT, aqui utilizada, é fracamente *hormonossensível*; contém receptores de estrogênio (RE), mas não receptores de progesterona, fenômeno esse combinado com histopatologia pouco diferenciada (DANGUY et al. 1986; KISS et al. 1989a).

Do ponto de vista patológico, o grau histopatológico dos cânceres mamários humanos NOS é fortemente correlacionado aos valores médios dos parâmetros morfonucleares descritos no presente trabalho (LARSIMONT, D.; KISS, R.; D'OLNE, D.; de LAUNOIT, Y.; MATTHEIEM, W.; PARIDAENS, R.; PASTEELS, J.L.; VERHEST, A. 1989b). Em outros termos, as características morfonucleares dos cânceres mamários humanos dependem fortemente dos seus tipos histopatológicos.

Em relação às propriedades bioquímicas, foi demonstrado que os cânceres mamários humanos que não possuem receptores de estrogênio (RE) apresentam células com quantidade maior de ADN nuclear comparativamente aos tumores ricos em RE. Além disto, a textura da cromatina nuclear celular dos tumores RE negativos, ou fracamente positivos, são diferentes dos tumores ricos em RE. Efetivamente, a cromatina dos tumores RE negativos é significativamente mais condensada que os tumores RE positivos (LARSIMONT, D.; KISS, R.;

**D'OLNE, D.; de LAUNOIT, Y.; MATTHEIEM, W.; PARIDAENS, R.; PASTEELS, J.L.; GOMPEL, C. 1989a).** Em contrapartida, o tumor MXT mostrou ser homogêneo em relação a diferentes estímulos hormonais (ooforectomia, estradiol, androstenodiona, dehidrotestosterona, aminoglutetimide), o que possibilita o estudo morfonuclear induzido por cada grupo de estudo (**de LAUNOIT, Y. & KISS, R. 1989a**). Todas essas experiências anteriores, efetuadas no mesmo laboratório, no qual se realizou o presente trabalho, conduziram à escolha do tumor MXT, ao invés de outro tumor humano primitivo heterogêneo, para a execução deste primeiro estudo das modificações especificamente induzidas pela radioterapia no núcleo celular tumoral. Do ponto de vista prático, o tumor MXT é de fácil manipulação, desde o momento do transplante tumoral; a grande maioria dos transplantes são bem sucedidos. Em torno do 21º dia após o transplante, o tumor mede aproximadamente 1 centímetro no seu maior diâmetro; é de fácil acesso e individualização na região subcutânea do flanco esquerdo do animal, o que torna as punções extremamente precisas.

Os parâmetros morfonucleares foram calculados a partir de células provenientes de punção aspirativa de agulha fina; como fixador utilizou-se o AFA, baseado nas pesquisas realizadas no laboratório em que foi desenvolvida esta experiência, as quais demonstraram, entre os vários fixadores utilizados em anatomia patológica, que o líquido AFA permitiu a melhor descrição da textura da cromatina (**de LAUNOIT, Y.; KISS, R.; DANGUY, A. 1990**).

As lâminas com os esfregaços citológicos tumorais foram coradas segundo o método de Feulgen, método introduzido há mais de 70 anos por **FEULGEN & ROSENBECK (1924)**. Nos dias de hoje, ainda não se conhecem exatamente as bases físico-químicas desta reação, porém considera-se que seja ela quantitativamente específica do ADN (**SWIFT, H. 1956**). Tais preparações celulares foram em seguida submetidas ao analisador de imagens, para quantificar, de forma mais precisa, o ADN. Os pesquisadores do grupo em que foi realizado este trabalho validaram a aplicação de tal metodologia sobre núcleos celulares de tumores mamários humanos, provenientes igualmente de esfregaços celulares obtidos por punções de agulha fina (**SALMON, I.; COIBION, M.; LARSIMONT, D.; BADR-EL-DIN, A.; VERHEST, A.; PASTEELS, J.L.; KISS, R. 1991**).

Para realizar esta experiência, duas doses de irradiação foram escolhidas: 2Gy e 8Gy. Essas doses são relativamente fracas em comparação da dose total utilizada em clínica radioterápica (**ARRIAGADA, R.; MOURIESSE,**

H.; SARRAZIN, D.; CLARK R.M.; DEBOER G. 1985); entretanto, como se utilizou a microscopia óptica para determinar as modificações morfonucleares induzidas pela radioterapia, prescreveram-se doses únicas de irradiação que provocassem lesões celulares subletais, isto é, sem eliminar completamente a população celular. As doses de 2Gy e 8Gy são conhecidas por induzirem tais efeitos (BARENDSSEN, G.W. 1982; WITHERS, H.R. & ELKIND, M.M. 1970).

Os resultados mostram que a dose de 2Gy não modificou significativamente o crescimento do tumor MXT; no entanto a dose de 8Gy retardou, de forma significativa, o crescimento tumoral (Figura 6). A análise estatística monovariada dos 15 parâmetros estudados não revelou resultados significantes, talvez porque as modificações morfonucleares espontâneas, que ocorreram durante o crescimento tumoral, poderiam tornar aleatória a interpretação dos efeitos sobrevivendo especificamente do tratamento pela radioterapia. Em outras palavras, a relação *senal radioterápico / ruído biológico* (SR/RB) necessita ser considerada, a fim de se determinarem os efeitos induzidos pela radioterapia nos tais núcleos neoplásicos; eis a razão pela qual se descreveu, neste trabalho, o modelo matemático, que permite *filtrar* o *ruído biológico* em relação ao *senal* especificamente induzido pela radioterapia. Para esse fim, utilizaram-se as análises dos componentes principais com transformações canônicas que, em uma única etapa, permitiram calcular todos os 15 parâmetros aqui investigados, o que possibilita extrair apenas os resultados mais significantes. Eliminaram-se as populações nucleares ANE1, ANE2 e ANE3 (Figura 7) das análises estatísticas finais, uma vez que as células não foram todas necessariamente afetadas pela irradiação; essas células poderiam ser consideradas semelhantes às pertencentes ao grupo controle. Pode-se imaginar que algumas células do grupo de irradiação 8Gy poderiam ser pouco afetadas pela irradiação e assemelhem-se mais ao grupo *típico* 2Gy que ao grupo *típico* 8Gy. Assim, embora se tenha desprezado parte das populações celulares, realizaram-se comparações estatísticas entre o *perfil nuclear médio* dos grupos irradiados com 2Gy e 8Gy, contrastados com o grupo controle.

Dois fatores influenciaram fortemente as modificações morfonucleares induzidas pela radioterapia: o período entre a irradiação e a análise numerizada das imagens nucleares (7dias versus 28 dias) e a dose utilizada (Figura 9). A dose de 8Gy quase sempre induziu modificações morfonucleares mais significantes que a dose de 2Gy, no 7º dia após a irradiação. Em contrapartida, o fenômeno inverso foi observado no 28º dia após a irradiação, quando as características morfológicas dos núcleos celulares MXT

do grupo 8Gy se assemelharam mais às células controles em comparação do grupo 2Gy (Figura 9). Isto pode parecer curioso à primeira vista, mas se poderia explicar da maneira seguinte: a dose de 8Gy retardou o crescimento tumoral MXT, enquanto a dose de 2Gy não teve efeito macroscópico aparente (Figura 6). Isto pode significar que o tratamento de 8Gy eliminou proporção significativa das células neoplásicas que eram, por definição, *radiossensíveis* a essa dosagem. Inversamente, o tratamento de 2Gy não foi suficientemente eficaz para eliminar fração celular significativa do tumor. Então, a primeira hipótese consiste em pensar que, no 7º dia após a irradiação, a maioria das células eram ainda sobreviventes no tumor; entretanto, nesse momento, já é possível evidenciar as modificações morfonucleares dose-dependentes induzidas pela radioterapia. Em contrapartida, no estágio final da experiência, isto é, no 28º dia após a irradiação, a maioria das células *radiossensíveis* foram eliminadas dos tumores tratados por 8Gy. Parece que essa é a razão pela qual o tratamento com 2Gy foi aparentemente mais eficaz que aquele de 8Gy, no que toca às modificações morfonucleares no 28º dia após a irradiação; podem esses resultados estar relacionados ao fato de que as células tratadas por 2Gy não foram eliminadas e estão em fase de reparação do ADN nuclear. Esses resultados mostram então a importância da dose e do tempo utilizado, para investigar os efeitos das radiações ionizantes nos núcleos celulares tumorais.

Os resultados mostram ainda que as modificações morfonucleares acima mencionadas, induzidas pela radioterapia, são relativas aos parâmetros morfométricos, densitométricos e à textura da cromatina. Efetivamente, a irradiação aumenta, de maneira significativa, a média da área nuclear, qualquer que seja a dose ou o tempo escolhido (Figura 9). A densidade óptica integrada (IOD), que mede o conteúdo do ADN nuclear, aumenta já aos 7 dias após a irradiação, qualquer que seja a dose utilizada. No 28º dia após a irradiação, o fenômeno inverso é observado (Figura 9).

O aumento da média dos valores do IOD, no 7º dia após a irradiação, pode corresponder ao mecanismo de reparação do ADN, que pode ser ativado após o tratamento radioterápico (RYDBERG, B. 1984) ou quimioterápico (SORENSEN, C.M.; BARRY, M.A.; EASTMAN, A. 1990). No 28º dia após 2Gy ou 8Gy de irradiação, não se observou tal fenômeno; isto pode corresponder ao fato de que as células lesadas estavam mortas. De fato, os histogramas de ADN (Figura 10), mostram que existe diminuição da porcentagem de células nas fases S, G2 e M do ciclo celular no 28º dia após a irradiação (histogramas D e F da Figura 10), em comparação ao 7º dia após a irradiação (histogramas C e E da Figura 10). Comparando-se as fases S, G2 e M

do grupo controle em relação aos grupos irradiados, no 7º dia após a irradiação, existe o aumento dessas fases do ciclo celular nos grupos irradiados. As constatações acima estão correlacionadas aos resultados do gráfico IOD da Figura 9, em que há o aumento da densidade óptica integrada já aos 7 dias da irradiação e diminuição aos 18 dias da irradiação, em comparação do ocorrido no grupo controle. Tais resultados estão de acordo com os publicados por Tubiana (TUBIANA, M. 1982a; TUBIANA, M. & FRIENDEL, E. 1982b).

No referente às características texturais da cromatina, a irradiação ionizante induziu a diminuição da frequência de pequenos agrupamentos da cromatina nuclear (SRL), enquanto a frequência de grandes agrupamentos da cromatina aumenta nas mesmas condições experimentais. Esses resultados mostram igualmente diminuição da condensação global da cromatina. Isto significa que a porcentagem do desaparecimento dos pequenos agrupamentos de cromatina é maior que a porcentagem de aumento do número dos grandes agrupamentos de cromatina, em termos de condensação global da cromatina (Figura 9).

A análise de imagem nuclear mostra-se útil quanto ao controle dos efeitos induzidos pela radioterapia nos núcleos celulares tumorais. Isto poderá permitir tratamento mais específico de cada tipo de tumor: monitora-se o tratamento mediante a punção de agulha fina e análise dos núcleos por computador, para caracterizar, de forma mais precisa, a resposta imediata do tumor ao tratamento instituído.

## **5. CONCLUSÕES**

A dose de irradiação de 8Gy retardou o crescimento do tumor MXT, o que não foi observado com a dose de irradiação de 2Gy.

A radioterapia induziu modificações morfonucleares específicas neste modelo experimental de tumor mamário MXT. Tais modificações morfonucleares dependem da dose e do tempo de execução do tratamento radioterápico.

Essas modificações morfonucleares induzidas pela radioterapia correspondem

- (1) ao aumento da área nuclear;
- (2) à diminuição dos pequenos agrupamentos da cromatina;
- (3) ao aumento dos grandes agrupamentos da cromatina;
- (4) à diminuição da condensação global da cromatina
- (5) e ao aumento da uniformidade dos níveis de intensidade da cromatina.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ARRIAGADA, R.; MOURIESSE, H.; SARRAZIN, D.; CLARK, R.M., DEBOER, G. Radiotherapy alone in breast cancer. Analysis of tumor parameters, tumor dose and local control: the experience of the Gustave-Roussy Institut and the Princess Margaret Hospital. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v. 11, p. 1751-1757, 1985.
- ATKIN, N.B. & RICHARDS, B.M. Deoxyribonucleic acid in human tumors as measured by microspectrophotometry of Feulgen stain: a comparison of tumors arising at different sites. **Brit. J. Cancer**, v. 10, p. 769-786, 1956.
- AUBELE, M.; JUTTING, U.; RODENACKER, K.; GAIS, P.; BURGER, G.; HACKER-KLOM, U. Quantitative evaluation of radiation-induced changes in sperm morphology and chromatin distribution. **Cytometry**, v. 11, p. 586-594, 1990.
- BARENDSSEN, G.W. Dose fractionation, dose rate and iso-effect relationship for normal tissue responses. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v. 8, p. 1981-1997, 1982.
- BARTELS, P.H.; WEBER, J.E.; BIBBO, M. Ploidy pattern analysis. Statistical considerations. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, v. 7, p. 126-130, 1985.
- BARTELS, P.H. & WEBER, J.E. Expert system in histopathology: introduction and overview. **Anal. Quant. Cytol. Histol.** v. 11, p. 1-7, 1989.
- CASPERSSON, T. Ueber des chemischen Aufbau des Zellkernes. **Skand. Arch. Physiol.** v. 73 (suppl 8), p. 1-151, 1936.
- CASPERSSON, T. A universal ultramicrospectrograph for the optical range. **Exp. Cell Res.** v. 1, p. 595-612, 1950.
- CHIU, S.M.; OLEINICK, N.L.; FRIEDMAN, L.R.; STAMBROOK, P. Hypersensitivity of DNA in transcriptionally active chromatin to ionizing radiation. **Biophys. Acta** v. 699, p. 15-21, 1982.
- DAGNELIE, P. Théorie et méthodes statistiques. Applications agronomiques. **Presses Agronomiques de Gembloux**, v. 1, 1973.
- DAGNELIE, P. Théorie et méthodes statistiques. Applications agronomiques. **Presses Agronomiques de Gembloux**, v. 2, 1975a.

- DAGNELIE, P. Analyses statistiques à plusieurs variables. **Presses Agronomiques de Gembloux**, 1975b.
- DANGUY, A.; KISS, R.; LECLERCQ, G.; HEUSON, J.C.; PASTEELS, J.L. Morphology of MXT mouse mammary tumors. Correlation with growth characteristics and hormone sensitivity. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.** v. 22, p. 69-76, 1986.
- de LAUNOIT, Y.; KISS, R.; DANGUY, A.; PARIDAENS, R. Effect of ovariectomy, hypophysectomy and/or GnRH analog (HRF) administration on the cell proliferation of the MXT mouse hormone-dependent mammary tumor. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.** v. 23, p. 1443-1450, 1987.
- de LAUNOIT, Y. & KISS, R. In vivo influence of androgens on the cell kinetics and chromatin pattern of the MXT mouse mammary tumor treated or not by aminogluthetimide. **Cancer Res. Clin. Oncol.** v. 115, p. 129-138, 1989a
- de LAUNOIT, Y. & KISS, R. Influence of L-thyroxine, L-Triiodothyronine, Thyroid stimulating hormone or estradiol on the cell kinetics of cultured mammary cancer cells. **In Vitro Cell Dev Biol.** v. 25, p. 585-591, 1989b.
- de LAUNOIT, Y.; KISS, R.; DANGUY, A. Influence of smears preparation and fixatives on DNA ploidy and morphonuclear features of the MXT mouse mammary tumor and normal tissues in the mouse. **Cytometry.** v. 11, p. 691-699, 1990.
- DELIDES, G.S.; GARAS, G.; GEORGOULI, G.; JIORTZIOTIS, D.; LECCA, J.; LIVA, T.; ELEMENOGLOU, J. Intralaboratory variations in the grading of breast carcinoma. **Arch. Pathol. Lab. Med.** v. 106, p. 126-128, 1982.
- FEULGEN, R. & ROSENBECK, H. Mikroskopisch-chemischer nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende Elektive Färbung von Sellhernen in mikroskopischen Präparaten. **Z. Physiol. Chem.** v. 135, p. 203-248, 1924.
- GALLOWAY, M.N. Texture analysis using gray level run lengths. **Computer graphics and Image Processing.** v. 4, p. 72-179, 1975.

- GIARETTI, W.A.; GAIS, P.; JUTTING, U.; RODENACKER, K.; DORMER, P. Correlation between chromatin morphology as derived by digital image analysis and autoradiographic labeling pattern. **Anal. Quant. Cytol.** v. 5, p. 79-89, 1983a.
- GIARETTI, W.A.; ABMAYR, W.; DORMER, P. Multiparametric nuclear morphology of the G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> transition. **Anal. Quant. Cytol.** v. 5, p. 90-98, 1983b.
- HALL, E.J.; ASTOR, M.; BEDFORD, J.; BOREK, C.; CURTIS, S.B.; FRY, M.; GEARD, C.; HEI, T.; MITCHELL, J.; OLEINICK, N.; RUBIN, J.; TU, A.; ULLRICH, R.; WALDREN, C.; WARD, J. Basic radiobiology. **Am. J. Clin. Oncol.** v. 11, p. 220-252, 1988.
- HARALICK, R.M.; SHANMUGAUM, K.; DINSTEIN, I. Textural features for image classification. *IEEE transactions on systems, man, and cybernetics.* **SMC-3.** p. 610-621, 1973.
- HARRIS, J.R.; HELLMAN, S.; HENDERSON, I.C.; KINNE, D.W. The pathology of invasive breast carcinoma. In: ROSEN, P.P. **Breast Diseases.** Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1991.
- JACKSON P. **Introduction to expert systems.** In: \_\_\_\_\_ Wokingham, UK, : Adisson-Wesley, p. 1, 1986.
- KIEFER, G.; KIEFER, R.; MOORE, G.W.; SALM, R.; SANDRITTER, W. Nuclear images of cells in different functional states. **J. Histochem. Cytochem.** v. 22, p. 569-576, 1974.
- KISS, R.; PARIDAENS, R.; LECLERCQ, G.; DANGUY, A. Sensitivity of the hormone dependent MXT mouse mammary carcinoma to estradiol during tumoral growth. An autoradiographic study. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.** v.22, p. 849-856, 1986a.
- KISS, R.; DANGUY, A.; HEUSON, J.C.; PARIDAENS, R. Effect of estradiol on proliferation and on cell loss in the MXT mouse mammary tumor. **Anticancer Res.** v. 6, p. 1321-1328, 1986b.

- KISS, R.; PARIDAENS, R.; HEUSON, J.C.; DANGUY, A. Effect of progesterone on cell proliferation in the MXT mouse hormone sensitive mammary neoplasm. **J. Natl. Cancer Inst.** v. 77, p. 173-178, 1986c.
- KISS, R.; DEVLEESCHOUWER, N.; PARIDAENS, R.; DANGUY, A.; HEUSON, J.C.; ATASSI, G. Phenotypic change of the transplantable MXT mammary adenocarcinoma into mixed bone producing sarcoma-like tumors. **Anticancer Res.** v. 6, p. 753-760, 1986d.
- KISS, R.; DANGUY, A.; HEUSON, J.C.; PARIDAENS, R. Synergism or antagonism between estradiol and progesterone on the cell kinetic parameters of the MXT mouse mammary tumor. **J. Natl. Cancer Inst.** v. 78, p. 573-579, 1987a.
- KISS, R.; de LAUNOIT, Y.; L'HERMITE-BALERIAUX, M.; L'HERMITE, M.; PARIDAENS, R.; DANGUY, A.; PASTEELS, J.L. Effect of prolactin and estradiol on cell proliferation in the uterus and the MXT mouse mammary neoplasm. **J. Natl. Cancer Inst.** v. 78 p. 993-998, 1987b.
- KISS, R.; de LAUNOIT, Y.; GRAS, S.; THIBAUT, S.; ATASSI, G. A new assay to evaluate cell growth and drug sensitivity in culture using cell image processor. **Anticancer Res.** v. 8, p. 765-774, 1988.
- KISS, R.; de LAUNOIT, Y.; DANGUY, A.; PARIDAENS, R.; PASTEELS, J.L. Influence of pituitary grafts or prolactin administration on the hormone sensitivity of ovarian-hormone-independent mouse mammary MXT tumors. **Cancer Res.** v. 49, p. 2945-2951, 1989a.
- KISS, R.; de LAUNOIT, Y.; WOUTERS, W.; DESLYPERE, J.P.; LESCRAINIER, J.P.; PARIDAENS, R.; VOKAER, A.; DECOSTER, R.; PASTEELS, J.L. Inhibitory action of androstenedione on the proliferation and cell cycle kinetics of aromatase-free MXT and MCF-7 mammary tumor cell lines. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.** v. 25, p. 837-843, 1989b.
- LARSIMONT, D.; KISS, R.; D'OLNE, D.; de LAUNOIT, Y.; MATTHEIEM, W.; PARIDAENS, R.; PASTEELS, J.L.; GOMPEL, C. Correlation between nuclear cytomorphometric parameters and estrogen receptor levels in breast cancer. **Cancer** v.63, p. 2162-2168, 1989a.

- LARSIMONT, D.; KISS, R.; D'OLNE, D.; de LAUNOIT, Y.; MATTHEIEM, W.; PARIDAENS, R.; PASTEELS, J.L.; VERHEST, A. Relationship between computerized morphonuclear image analysis and histopathologic grading of breast cancer. **Anal. Quant. Cytol. Histol.** v. 11, p. 433-439, 1989b.
- NICOLINI, C.; GIARETTI, W.; DE SAIVE, C.; KENDALL, F. The GO-G1 transition of W138 cells. II. Geometric and densitometric texture analyses. **Exp. Cell Res.** v.106, p. 119-125, 1977.
- OLEINICK, N.L.; CHIU, S.M.; FRIEDMAN, L.R. Gamma-radiation as a probe of chromatin structure: damage to and repair of active chromatin in the metaphase chromosome. **Radiat. Res.** v. 98, p. 629-641, 1984.
- PARIDAENES, R.; LECLERCQ, G.; PICCART, M.; KISS, R.; MATTHEIEM, W.; HEUSON, J.C. Comments on the treatment of breast cancer. In: Hormones of Cancer: 90 years after Beatson (Bulbrook RD, ed). **Cancer Surveys.** v. 5, p. 447-461, 1986.
- PASTEELS, J. & LISON, L. La teneur en acide désoxyribonucléique des noyaux au repos. **C.R. Assoc. Anat.** v.37, p. 375-380, 1950.
- PAUWELS, O. & KISS, R. Digital morphonuclear analyses of sensitive versus resistant neoplastic cells to vinca-alkaloid, alkylating and intercalating drugs. **Cytometry.** v.12, p. 388-397, 1991.
- PEDERSON, T. Chromatin structure and the cell cycle. **Proc. Nat. Acad. Sci.** v.69, p. 2224-2228, 1972.
- PRESSMAN, N.J. Markovian analysis of cervical cell images. **J. Histochem. Cytochem.** v.24, p. 138-144, 1976.
- ROSAI, J. & CARCANGIU, M.L. Pathology of thyroid tumors: some recent and old questions. **Hum. Pathol.** v.15, p. 1008-1016, 1984.
- RYDBERG, B. Repair of DNA double-strand breaks in calcemid-arrested mitotic Chinese hamster cells. **Int. J. Radiat. Biol.** v.46, p. 299-304, 1984.

- SALMON, I.; COIBION, M.; LARSIMONT, D.; BADR-EL-DIN, A.; VERHEST, A.; PASTEELS, J.L.; KISS, R. Fine-needle aspirations of breast cancers compared to imprint smears by means of digital cell image analysis. **Anal. Quant. Cytol. Histol.** v.13, p. 193-200, 1991.
- SANDRITTER, W.; KIEFER, G.; KIEFER, R.; SALM, R.; MOORE, G.W.; GRIMM, H. DNA heterochromatin cytophotometric pattern recognition image analysis among cell nuclei in duct epithelium and in carcinoma of the human breast. **Beitr. Pathol. Bd.** v. 151, p. 87-96, 1974.
- SCHEIBER, C.; KISS, R.; de LAUNOIT, Y.; FRUHLING, J. MXT mammary tumor treated by low dose chemotherapy. A <sup>31</sup>P-NMR and <sup>1</sup>H-MRI study. **Anticancer Res.** v. 8, p. 403-408, 1988.
- SCHEIBER, C.; KISS, R.; de LAUNOIT, Y.; FRUHLING, J. Influence of hormono-and/or chemotherapy on the MXT mouse mammary tumor as monitored by <sup>31</sup>P-MRS. **Eur. Cancer Clin. Oncol.** v. 26, p. 241-251, 1990.
- SIEGEL, S. & CASTELMAN, J. **Non parametrics statistics for the behaviorial sciences.** In: \_\_\_\_\_ New York : McGraw Hill 2ème édition 1988.
- SORENSEN, C.M.; BARRY, M.A.; EASTMAN, A. Analysis of events associated with cell cycle arrest at G2 phase and cell death induced by cisplatin. **JNCI.** v. 82, p. 749-755, 1990.
- SWIFT H. Cytochemical technique for nucleic acids. III. The Feulgen reaction. Dans: **The nucleic acids, vol. II. Eds. Chargaff E. & Davidson J.N., Academic Press, New-York, p 65-77, 1956.**
- TUBIANA M. Cell kinetics and radiation oncology. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.** v. 8, p. 1471-1489, 1982a.
- TUBIANA, M. & FRIENDEL, E. Regulation of pluripotent stem cell proliferation and differentiation: the role of long range humoral factors. **J. Cell. Physiol.** v.1, p. 13-21, 1982b.
- WATSON, C.S.; MEDINA, D.; CLARK, J.H. Estrogen receptor characterization in a transplantable mouse mammary tumor. **Cancer Res.** v. 37, p. 3344-3348, 1977.

WIED, G.L.; BARTELS, P.H.; BIBBO, M.; DYTCH, H. Image analysis in quantitative cytopathology and histopathology. **Hum. Pathol.** v.20, p. 549-571, 1989.

WITHERS, H.R. & ELKIND, M.M. (1970) Microcolony survival assay for cells of mouse intestinal mucosa exposed to radiation. **Int. J. Radiat. Biol.** v. 17, p. 261-267, 1970.