



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Curso

JONAS SÉRGIO DE OLIVEIRA FILHO

**IDENTIFICAÇÃO DE NÚCLEOS INTERFÁSICOS DE LINFÓCITOS IRRADIADOS E
NÃO IRRADIADOS POR MEIO DA ANÁLISE FRACTAL**

RECIFE
2021

JONAS SÉRGIO DE OLIVEIRA FILHO

**IDENTIFICAÇÃO DE NÚCLEOS INTERFÁSICOS DE LINFÓCITOS IRRADIADOS E
NÃO IRRADIADOS POR MEIO DA ANÁLISE FRACTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia do Centro de Biociência da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de mestre em Morfotecnologia.

Área de concentração: Biofísica e Radiobiologia

Orientador: Prof^a. Dr^a. Isvânia Maria Serafim da Silva Lopes

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Ivone Antônia de Souza

Coorientador: Prof. Dr. Thiago de Salazar e Fernandes

RECIFE
2021

Catálogo na Fonte:
Elaine C Barroso CRB-4/1728

Oliveira Filho, Jonas Sérgio de
Identificação de núcleos interfásicos de linfócitos irradiados e não irradiados por meio da análise fractal / Jonas Sérgio de Oliveira Filho– 2021.

66 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Isvânia Maria Serafim da Silva Lopes
Coorientadores: Ivone Antônia de Souza e Thiago de Salazar e Fernandes

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia, Recife, 2021.
Inclui referências.

1. Linfócitos 2. Radiação 3. Fractais I. Lopes, Isvânia Maria da Silva (orient.) II. Souza, Ivone Antônia de (coorient.) III. Fernandes, Thiago de Salazar e (coorient.) IV. Título

616.079

CDD (22.ed)

UFPE/CB-2022-034

JONAS SÉRGIO DE OLIVEIRA FILHO

**“IDENTIFICAÇÃO DE NÚCLEOS INTERFÁSICOS DE LINFÓCITOS IRRADIADOS
E NÃO IRRADIADOS POR MEIO DA ANÁLISE FRACTAL”**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Morfotecnologia da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial para a obtenção do
título de mestre em Morfotecnologia.

Aprovada em: 30/12/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Isvânia Maria Serafim da Silva Lopes
(Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Eliete Cavalcante da Silva
(Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Dijanah Cota Machado
(Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Leandro Álvaro de Alcantara Aguiar
(Examinador Externo)
Centro de Estudos Superiores de Pinheiros - CESP/UEMA

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por estar sempre presente em minha caminhada, contemplando-me com saúde, força de vontade, sabedoria e conhecimento.

A minha amada mãe, Ednilce Teixeira de Souza, pelas lições de vida, educação, compreensão, amizade, carinho, amor e apoio. Palavras nunca serão suficientes para agradecer por tudo que fez e sacrificou por mim.

A minha querida irmã, Jennife Nicoli de Souza Oliveira, sempre pelo apoio, incentivo e carinho em mais uma conquista.

A meu querido esposo e companheiro de jornada Manoel Sérgio de Oliveira Neto, pela compreensão, carinho, amor, confiança, ajuda e apoio, principalmente quando estive aflito na busca dessa conquista.

Meu muito obrigado por tudo. As minhas amigas Anna Beatriz de Oliveira Barbosa e Maria Eduarda Beatriz, pelo apoio e toda ajuda. Meu muito obrigado por tudo.

A minha Orientadora Professor Dr. Isvânia Maria da Silva Lopes pela oportunidade de fazer parte do LBCM, pelo apoio, amizade, compreensão e ensinamentos, quando das minhas diversas atribuições vivenciadas nesta conquista.

Ao meu Coorientador Professor Dr. Thiago de Salazar e Fernandes, por sua verdadeira amizade e incentivo diário tanto na graduação como também no mestrado. Pela confiança, ensinamentos tanto no campo científico como no pessoal.

A Unidade de laboratório (ULAB) do hospital das clínicas (HC) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) pela infra-estrutura disponibilizada para a realização deste trabalho.

A Alexsandro Pedro da Silva e Madi Veiga Diniz por todo apoio e ajuda. Meu muito obrigado.

A todos os professores do Programa de pós-graduação em Morgfotecnologia (PPGM) na construção da minha formação, pelo incentivo diário e pelas amizades consolidadas.

A todos os amigos do mestrado que dividiram momentos variados de descontração e preocupação na busca do conhecimento.

Ao Departamento de Biofísica e Radiobiologia e a todos seus funcionários, pelo acolhimento e a estrutura disponibilizada. Meu muito obrigado.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho: o meu muito obrigado!

Se só fizer o que sabe, nunca será mais do
que é agora.

Mestre Shifu, 2016

RESUMO

O uso da dimensão fractal, como parâmetro para análises de imagens biológicas, vem aumentando continuamente, sendo a análise de células uma das principais aplicações, devido a sua natureza fractal. O presente trabalho, teve como objetivo desenvolver um *software*, capaz de estimar a dimensão fractal do núcleo de linfócitos em interfase e, posteriormente, analisar as mudanças na dimensão, após a irradiação nas doses de 3Gy e 4Gy. A pesquisa usou amostras de sangue periférico humano de quatro voluntários do sexo masculino, que foram irradiadas com radiação gama proveniente de uma fonte de cobalto-60. Em seguida foi feito o esfregaço sanguíneo dessas amostras e das amostras controle (não irradiadas). Os esfregaços foram levados ao microscópio e foram feitas fotomicrografias dos linfócitos. Posteriormente, foi desenvolvido um *software* na linguagem de programação Python. O programa foi capaz não só de estimar a dimensão fractal dos núcleos dos linfócitos, como também os identificou nas fotomicrografias, cortou a região de interesse e realizou o processamento das imagens. Os resultados apresentaram diferença estatística significativa entre as dimensões de núcleos de linfócitos irradiados e não irradiados, para a 75% dos voluntários, utilizando o método de box counting clássico. O método se mostrou eficaz e reprodutível para a análise fractal do núcleo de células. Mais estudos são necessários para se investigar se há outros tipos de alterações, por agentes físicos, químicos ou mesmo de células com alterações genéticas, que possam ter a dimensão fractal como ferramenta para mensurar tais danos.

Palavras-chave: Fractal; Linfócitos; Radiação.

ABSTRACT

The use of fractal dimension as a parameter for analysis of biological images has been increasing continuously. One of the main applications is cell analysis, due to their fractal nature. The present work aimed to develop a software capable of estimating the fractal dimensions of lymphocytes nuclei in interphase and, later, analyze the changes in those dimensions after irradiation at doses of 3Gy and 4Gy. The research used human peripheral blood samples from four male volunteers, irradiated with gamma radiation from a cobalt-60 source. Then, blood smears of these samples and non-irradiated control samples were made. The smears were taken under a microscope and photomicrographs of the lymphocytes were taken. Subsequently, a software was developed in the Python programming language. The program was able not only to estimate the fractal dimensions of the lymphocytes nuclei, but also to identify them in the photomicrographs, cut the region of interest and process the images. The results showed a statistically significant difference between the dimensions of irradiated and non-irradiated lymphocytes nuclei for 75% of the volunteers, using the classic box counting method. This method proved to be efficient and reproducible for fractal analysis of cell nuclei. More studies are necessary to investigate whether there are other types of alterations caused by physical and chemical agents or even cells with genetic alterations that may have fractal dimension analysis as a tool to measure such damage.

Key-words: Fractals; Lymphocytes; Radiation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação de um fractal natural (couve-flor).	19
Figura 2 - Curva de Peano 2D e 3D.	19
Figura 3 - Circunferência em diferentes escalas.	20
Figura 4 - Curva de koch é um exemplo de autossimilaridade exata.	20
Figura 5 - Fractal com autossemelhança estatística.	21
Figura 6 - Divisão de uma reta em cinco seções iguais.	23
Figura 7 - Divisão de um quadrado com fator $r = 1/5$	23
Figura 8 - Divisão de um cubo com fator $r = 1/5$	24
Figura 9 - Obtenção do parâmetro N por meio do método o de box counting.....	26
Figura 10 - Linfócito em esfregaço de sangue periférico 1000X.	27
Figura 11 - Estrutura do glóbulo fractal	27
Figura 12 - Esquema do desenho experimental para cada voluntário.	31
Figura 13 - Irradiador gama fonte Cobalto-60	32
Figura 14 - Equipamento módulos Yumizen SPS e Yumizen H2500.....	33
Figura 15 - Realização do hemograma para confirmação do status de saúde.	33
Figura 16 - Captura de micrografias de linfócitos.	34
Figura 17 - Representação de uma matriz bidimensional e sua respectiva equivalência em pixels de imagem.....	35
Figura 18 - Esquema da função de rastreo para linfócitos.	36
Figura 19 - Demonstração das funções de rastreo e corte do algoritmo: (a) a imagem bruta com várias células; (b) o primeiro aumento de brilho evidenciando (setas) diversos eventos (objetos); (c) novo aumento no brilho, menos eventos encontrados; (d) mais um aumento de brilho, número mínimo de eventos encontrados; (e) corte da imagem baseado nas coordenadas do maior evento encontrado.....	37
Figura 20 - Imagem de revisão gerada pelo algoritmo de correção de erros.	38
Figura 21 - Listas com valores obtidos pela função de contagem de caixas.....	39
Figura 22 - Plotagem dos valores extraídos da função: contagem de caixas.....	39
Figura 23 - Reta dos mínimos quadrados: a inclinação é a dimensão fractal estimada.	40
Figura 24 - Esfregaços sanguíneo.	41
Figura 25 - Fotomicrografia estirado sanguíneo com linfócito	42

Figura 26 - Linfócitos não identificados corretamente.	43
Figura 27 - Etapa de verificação.....	44
Figura 28 - Correção de erro, corte manual	44
Figura 29 - Correção do erro de identificação: (a) imagem dos linfócitos 27 e 28 antes da correção, (b) imagem dos linfócitos 27 e 28 após o corte manual.....	45
Figura 30 - Linfócitos em tons de cinza. As setas evidenciam a diferença na intensidade.	46
Gráfico 1 - Diferença entre as amostras controle, 3Gy e 4Gy do voluntário 2.....	50
Gráfico 2 - Diferença entre as amostras controle, 3Gy e 4Gy do voluntário 3.....	51
Gráfico 3 - Diferença entre as amostras controle, 3Gy e 4Gy do voluntário 4.....	52
Gráfico 4 - Diferença da amostra controle entre os voluntários 1, 2, 3 e 4.....	54
Gráfico 5 - Diferença da amostra irradiada 3Gy entre os voluntários 1, 2, 3 e 4.....	55
Gráfico 6 - Diferença da amostra irradiada 4Gy entre os voluntários 1, 2, 3 e 4.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 2 - Dimensão fractal de objetos conhecidos	47
Tabela 3 - Dimensão fractal: valores máximos, mínimos e médios, com desvio padrão e valor de p, em dois <i>software</i> de estatística distintos, para o voluntário 1.	48
Tabela 4 - Dimensão fractal: valores máximos, mínimos e médios, com desvio padrão e valor de p, em dois <i>software</i> de estatística distintos, para o voluntário 2.	49
Tabela 5 - Dimensão fractal: valores máximos, mínimos e médios, com desvio padrão e valor de p, em dois <i>software</i> de estatística distintos, para o voluntário 3.	50
Tabela 6 - Dimensão fractal: valores máximos, mínimos e médios, com desvio padrão e valor de p, em dois <i>softwares</i> de estatística distintos, para o voluntário 4.	52
Tabela 7 - Condição de amostra controle entre os voluntários.	53
Tabela 8 - Relação entre os voluntários para amostra controle.	54
Tabela 9 - Diferença da amostra irradiada 3Gy entre os voluntários 1, 2, 3 e 4.....	55
Tabela 10 - Relação entre os voluntários para amostra controle.	56
Tabela 11 - Diferença da amostra irradiada 4Gy entre os voluntários 1, 2, 3 e 4.....	56
Tabela 12 - Relação entre os voluntários para amostra irradiada 4Gy.	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 PROBLEMATIZAÇÃO.....	16
1.2 OBJETIVOS.....	17
1.2.1 Objetivo Geral	17
1.2.2 Objetivos Específicos.....	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 GEOMETRIA EUCLIDIANA	17
2.2 GEOMETRIA FRACTAL	18
2.2.1 Classificação dos fractais.....	18
2.2.1.1 Autossimilaridade	19
2.2.1.2 Complexidade infinita	21
2.2.1.3 Dimensão fractal.....	22
2.2.2 Estimativa da dimensão fractal	23
2.2.3 Métodos computacionais para estimar dimensão fractal	25
2.3 LINFÓCITOS: NATUREZA E CARACTERÍSTICAS	26
2.3.1 Análise fractal da cromatina	28
2.3.2 Linfócitos e irradiação.....	29
2.4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	30
2.4.1 Aspectos éticos	30
2.4.2 Desenho experimental.....	31
2.4.3 Coleta de amostras.....	32
2.4.4 Irradiação.....	32
2.4.5 Preparo do esfregaço e coloração	33
2.4.6 Análise micrografia.....	33
2.4.7 Desenvolvimento do software para estimar a dimensão fractal	34
2.4.7.1 Carregando e abrindo imagens	34
2.4.7.2 Processamento, rastreamento e corte	35
2.4.7.3 Correção de erros.....	37
2.4.7.4 Redimensionamento.....	38
2.4.7.5 Contagem das caixas	38
2.4.7.6 Dimensão fractal.....	39
2.4.7.7 Validação	40

2.4.7.8 Análise estatística.....	40
3 ANÁLISE DOS RESULTADOS	41
3.1 ESFREGAÇO E HEMOGRAMA	41
3.2 OBTENÇÃO DAS FOTOMICROGRAFIAS	41
3.3 CARREGAMENTO DE IMAGENS.....	42
3.4 IDENTIFICAÇÃO E CORTE	42
3.5 CORREÇÃO DE ERRO DE IDENTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS.....	43
3.6 REDIMENSIONAMENTO E TONS DE CINZA	45
3.7 DIMENSÃO FRACTAL.....	46
3.7.1 Validação	46
3.7.2 Dimensão dos linfócitos, controle, irradiado 3Gy e Irradiado 4Gy por voluntário.	47
3.7.3 Dimensão dos linfócitos, controle, irradiado 3Gy e Irradiado 4Gy, por condição de amostra.	53
4 DISCUSSÃO	57
5 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62
APÊNDICE A – AMOSTRA 4GY DO VOLUNTARIO 3, APÓS A CONVERSÃO EM ESCALA DE CINZA	66

1 INTRODUÇÃO

A geometria fractal é a geometria de objetos que possuem formas complexas e dessa forma não podem ser descritas pela geometria euclidiana, sendo comumente encontrada na natureza, seja em suas composições ou em seus fenômenos, fazendo parte de uma das mais importantes vertentes da ciência, a do estudo do caos, formalizada por Benoît Mandelbrot na década de 1960. Mandelbrot usou o adjetivo “fractal” para indicar objetos cuja geometria complexa não pode ser caracterizada por uma dimensão integral. (Benoit B. Mandelbrot, 1983; LOPES; BETROUNI, 2009). Essa abordagem, compõe atualmente uma gama de aplicações e estudos nas diversas áreas do conhecimento, sendo algumas dessas áreas a medicina e biologia, que se utilizam dessa geometria de forma extensiva (PANIGRAHY et al., 2019).

Um dos principais parâmetros abordados na geometria fractal é a sua dimensão. Na geometria clássica são compreendidas dimensões físicas representadas por valores inteiros: zero (0) representa um ponto; um (1), uma reta; dois (2), um quadrado; e três (3), um cubo (SILVA e SOLZA, 2010). Entretanto, na geometria fractal, o conceito de dimensão é expandido e, podemos ter dimensões representadas por números não inteiros que estão diretamente relacionados ao grau de complexidade da estrutura ou objeto (ASSIS et al., 2008).

Os núcleos das células são um exemplo de estruturas que possuem geometria fractal em especial os linfócitos, estas células fazem parte do tecido conjuntivo sanguíneo, compondo junto com outras células, o sistema imunológico. Uma das principais características dessas células é sua morfologia peculiar, com uma relação núcleo-citoplasma elevada, chegando o núcleo a ocupar 90% da área da célula (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013). O núcleo dos linfócitos, é composto por DNA condensado. Quando esses estão na fase G0 do ciclo celular – conhecida como interfase – não possuem morfologia uniforme, apresentando uma distribuição heterogênea da cromatina, conhecida como territórios cromossômicos (CREMER e CREMER, 2002).

Apesar da aparente desordem da cromatina do núcleo interfásico de linfócitos, existem fatores que atribuem a esse uma determinada arquitetura. Lieberman-Aiden e colaboradores (2009), esclarece que os territórios cromossômicos estudados por Cremer e Cremer (2002), compõe uma estrutura complexa, e traz a confirmação que a geometria do núcleo dos linfócitos é fractal, sendo esta, denominada de glóbulo

fractal. Com isso, além das análises clássicas de parâmetros morfométricos como tamanho da célula, intensidade da coloração, entre outros, podemos obter também sua dimensão fractal. Uma outra característica importante dos linfócitos é sua sensibilidade a radiação ionizante, apesar de ser um tipo de célula bem diferenciada (BERGONIÉ; TRIBONDEAU, 1906).

A radiação ionizante é uma forma de energia capaz de arrancar elétrons da matéria, causando danos a estrutura atômica da mesma. No organismo humano, altas doses de radiação podem ser letal. Entretanto, tem importantes aplicações na medicina, na indústria de energia, nas pesquisas e em diversos setores (OKUNO, 1982; BUSHONG, 2012). O uso contínuo e crescente da radiação, traz consigo a necessidade de um controle extensivo. Sendo assim, foram desenvolvidos diversos métodos para determinar, seja de forma qualitativa ou quantitativa, se um indivíduo recebeu uma dose além do normal de radiação (FERNANDES et al., 2006).

Dentre os métodos de identificação de indivíduos expostos à radiação ionizante, podemos identificar a biodosimetria. Esta técnica se baseia na capacidade dos linfócitos em armazenar o dano da radiação ionizante, uma vez que, quando estes são irradiados, seu DNA é danificado, ocorrendo assim, falhas na replicação que são evidenciadas após as células se dividirem em cultura, produzindo as chamadas aberrações cromossômicas (IAEA, 2011). Contudo, a biodosimetria é uma metodologia cara, e que necessita de mão de obra altamente especializada, o que pode vir a ser uma dificuldade operacional em caso de uma alta demanda, como ocorrido em diversos incidentes e acidentes radiológicos, já que a mesma não seria suficiente para um rastreio em larga escala, como ocorrido no ataque das bombas atômicas de Hiroshima e Nagasaki, o acidente nuclear de Chernobyl, e o acidente do césio-137 no Brasil (ROCCA et.al,1988; GRACIOTTI, 1989; LOGANOVSKY e YURYEV, 2001; KERR et.al, 2015).

Uma alternativa que vêm emergindo é o estudo da cromatina ainda em interfase, sem a necessidade de cultivo celular nem de análise dos cromossomos individuais, como mostrado por Xavier e colaboradores (2018), que conseguiram evidenciar diferença significativamente estatística entre as células irradiadas e não irradiadas.

1.1 PROBLEMATIZAÇÃO

A radiação ionizante tem a capacidade de quebrar as moléculas de DNA presentes no núcleo das células, podendo causar efeitos imediatos, tais como: radiodermite, vômito, náuseas ou tardios como desenvolvimento de câncer e dependendo da dose recebida pode vir a ser fatal (OKUNO, 2013). Muitos métodos para estabelecer o nível de exposição à radiação foram desenvolvidos, motivados pelo crescente uso desta tecnologia e pelo histórico de acidentes e incidentes radiológicos: os métodos podem ser físicos ou biodosimétricos. Os métodos biodosimétricos costumam ser usados em casos de exposições ocupacionais ou acidentes radiológicos, pois nem sempre os indivíduos expostos estão portando dosímetros físicos (FERNANDES, 2006).

Entretanto, o método biodosimétrico padrão ouro, consiste na quantificação de aberrações cromossômicas em linfócitos do sangue periférico humano. Essa metodologia, requer que as células atinjam a fase de metáfase do ciclo celular, ou seja, 48 horas, sendo o tempo um fator crucial para a equipe médica, em casos de vítimas exposta à radiação ionizante. Além disso, este método é laborioso, pois exige a contagem de aberrações cromossômicas em milhares de células, a fim de confirmar se houve exposição humana à radiação ionizante (IAEA, 2011).

Apesar de Xavier e colaboradores (2018) apresentarem uma alternativa promissora usando a dimensão fractal como um possível indicador de exposição humana à radiação ionizante, os procedimentos realizados para a obtenção dos resultados que envolvem a identificação dos linfócitos e a aplicação da dimensão fractal, se deu de forma manual, sendo avaliada apenas uma dose de 3Gy. Isso é um fator limitante para uma avaliação de exposição humana em grande escala, uma vez que, seriam necessários vários profissionais treinados e a validação do método para seu respectivo uso. Assim, o problema da pesquisa foi delimitado: é possível identificar mudanças na dimensão fractal no núcleo de linfócitos interfásicos irradiados, em doses de 3Gy e 4Gy, a partir de processo automatizado?

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um *software* capaz de diferenciar linfócitos irradiados e não irradiados, utilizando como parâmetro a dimensão fractal da fotomicrografia de seus núcleos, na intérfase.

1.2.2 Objetivos Específicos

- a) Desenvolver algoritmo capaz de identificar linfócitos em uma fotomicrografia;
- b) Elaborar e validar algoritmo capaz de determinar a dimensão fractal de fotomicrografias de linfócitos;
- c) Analisar se existe diferença entre as dimensões fractais de linfócitos irradiados e não irradiados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 GEOMETRIA EUCLIDIANA

Embora a geometria plana só tenha sido formalizada por Euclides no século III a.C, o seu surgimento tem origens muito mais remoto. Historicamente, os egípcios já usavam uma forma de geometria plana para delimitar áreas de terras que eram periodicamente inundadas pelo rio Nilo. Fica claro o surgimento da geometria pela necessidade de mensurar o mundo. Entretanto, mesmo os povos antigos com sua perspectiva limitada, a geometria plana era suficiente para satisfazer suas necessidades (OLIVEIRA e BELLO, 2019; BICUDO, 2009).

Euclides formaliza a geometria clássica na Grécia em 300 a.C, por meio de cinco postulados básicos. Contudo, ao longo da história, diversos matemáticos discutiram a veracidade do quinto postulado de Euclides. O quinto postulado é verdadeiro para figuras planas, mas não para duas situações, em especial a esfera e superfície curvas, sendo necessário o surgimento da geometria não euclidiana, a qual tratava dos casos em que os postulados não eram válidos (SYLVA e YONEZAWA, 2017; VITORIO e PRIMO, 2020).

2.2 GEOMETRIA FRACTAL

Mesmo antes do surgimento da geometria fractal, a geometria euclidiana já não era suficiente para descrever a natureza em sua totalidade, sendo necessário o surgimento da geometria não euclidiana. Entretanto, esta também possui limitações, pois não é capaz de descrever formas complexas (SILVA e SOUZA, 2010). Foi nessa perspectiva que Benoît Mandelbrot introduz o conceito de fractais e de dimensão fractal com base na dimensão de Hausdorff (1886-1942) na década de 1960. Mandelbrot usou o adjetivo “fractal” para indicar objetos cuja geometria complexa não pode ser caracterizada por uma dimensão integral. A principal atração da geometria fractal advém de sua capacidade de descrever a forma irregular ou fragmentada de recursos naturais (LOPES e BETROUNI, 2009).

Segundo Mandelbrot (1983, p. 1),

Por que a geometria é frequentemente descrita como "fria" e "seca"? Uma razão está na sua incapacidade de descrever a forma de uma nuvem, uma montanha, um litoral ou uma árvore. As nuvens não são esferas, as montanhas não são cones, as linhas costeiras não são círculos e a casca não é lisa, nem os relâmpagos viajam em linha reta.

2.2.1 Classificação dos fractais

Um fractal é definido por três características básicas: a autossimilaridade, a complexidade infinita e a dimensão fractal. Os fractais apresentam duas categorias: as geométricas (determinísticas) e as não lineares (aleatórias e da natureza). Os fractais da natureza são elementos da natureza que possuem a característica da autossimilaridade, isto é, cada parte, em escala menor, é semelhante ao todo. São considerados fractais da natureza: nuvens, rochas, couve-flor, árvores e o brócolis, como se pode observar na figura 1 (VITORIO e PRIMO, 2020).

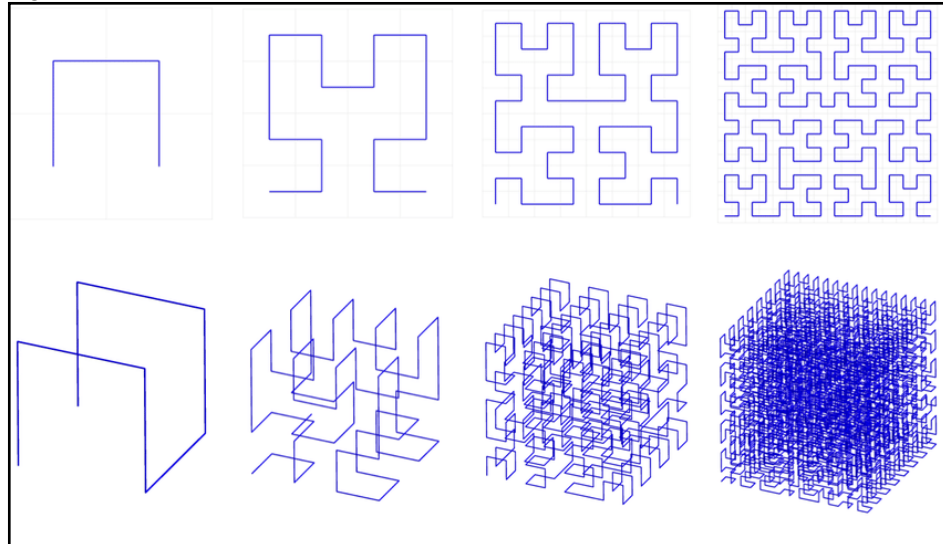
Os Fractais Geométricos caracterizam-se pelos modelos fractais construídos a partir de figuras geométricas em que se repetem padrões continuamente, por um método conhecido por iteração. Como exemplo de fractais geométricos tem-se: a Curva de Koch; o Triângulo e Tapete de Sierpinski; e a curva de Peano Figura 2 (NASCIMENTO et al., 2012; BORREL et al., 2018).

Figura 1 - Representação de um fractal natural (couve-flor).



Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Romanesco> (2021).

Figura 2 - Curva de Peano 2D e 3D.



Fonte: BORRELL et al. (2018)

2.2.1.1 Autossimilaridade

A autossimilaridade é uma das características mais importantes dos fractais. Ela expressa que cada parte de uma determinada imagem em escala menor é igual ou similar a parte inicial, ou seja, não importa o quanto a imagem seja ampliada mudando de escala, esta sempre será semelhante à sua estrutura original (ASSIS et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2012).

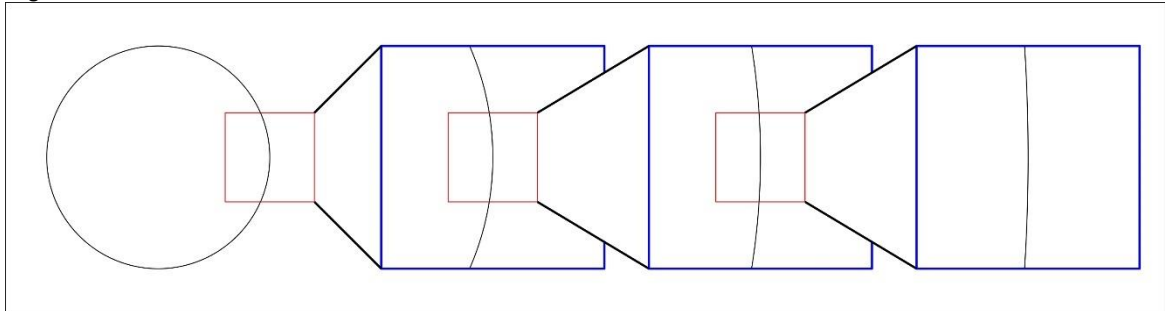
Segundo Capra (1996, p. 118),

A propriedade mais notável dessas formas "fractais" é que seus padrões característicos são repetidamente encontrados em escala descendente, de modo que suas partes, em qualquer escala, são, na forma, semelhantes ao

todo. Mandelbrot ilustra essa propriedade da "auto-similaridade" arrancando um pedaço de uma couve-flor e indicando que, por si mesmo, esse pedaço se parece exatamente com uma pequena couve-flor.

O mesmo não ocorre com uma circunferência, por exemplo, que ao ser ampliada tende a diminuir sua curvatura (figura 3). Os fractais ainda podem expressar dois tipos de autossimilaridade: exata ou estatística (NASCIMENTO et al., 2012).

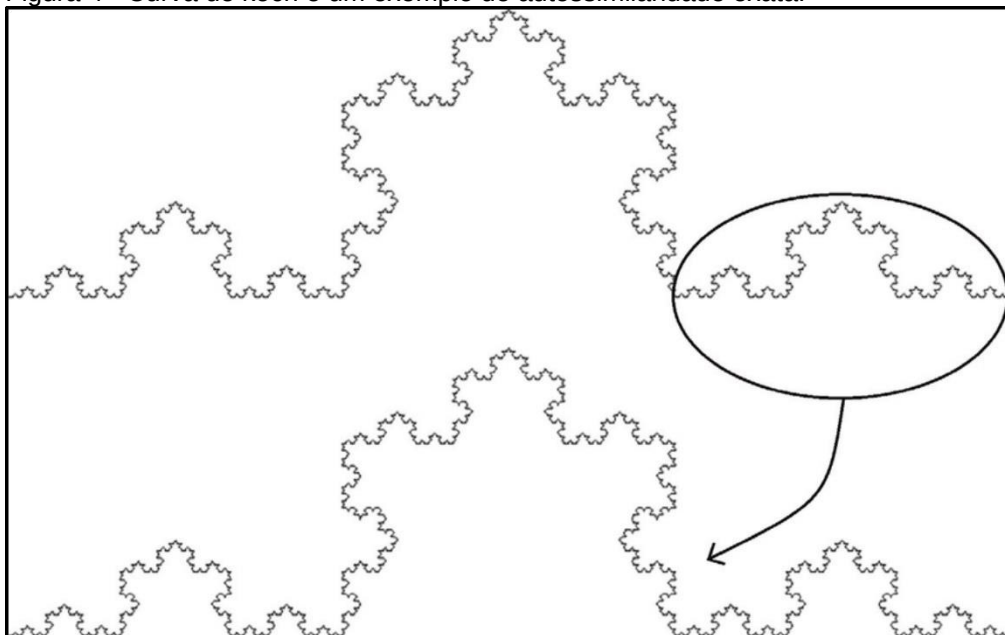
Figura 3 - Circunferência em diferentes escalas.



Fonte: O Autor (2021).

Na autossimilaridade exata (figura 4), as mudanças no comprimento da escala do fractal, resultam em sucessivas configurações idênticas a conformação inicial, ou seja, mesmo ampliado várias vezes, cada parte é idêntica à original, não importando quantas ampliações sejam efetuadas (CAPRA, 1996; ASSIS et al., 2008; PILGRIM e TAYLOR, 2018).

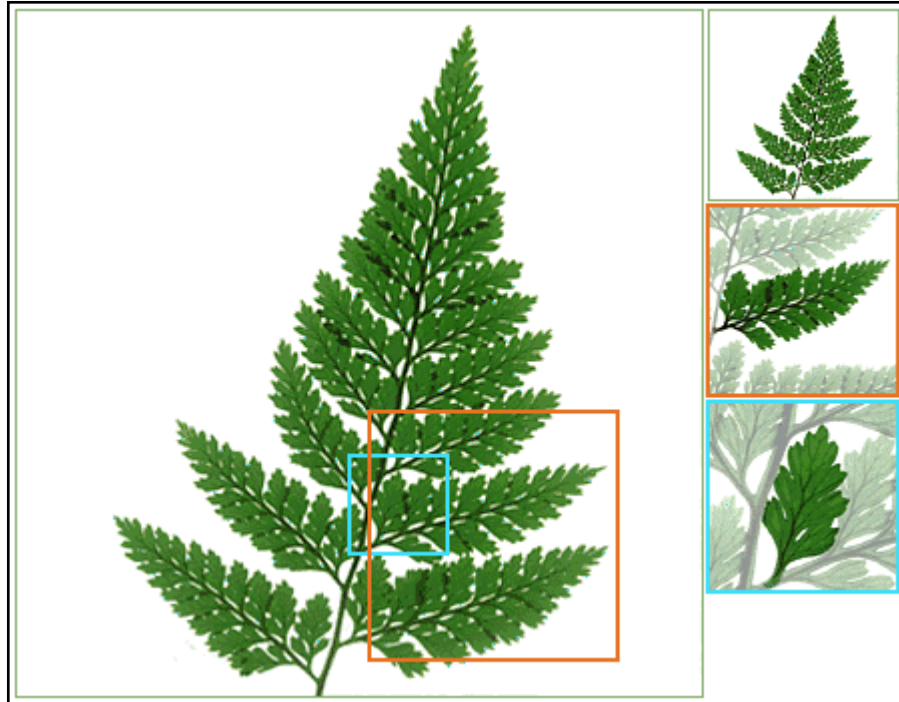
Figura 4 - Curva de koch é um exemplo de autossimilaridade exata.



Fonte: PILGRIM e TAYLOR (2018).

Na autossimilaridade estatística (figura 5), a mudança de escala não será exatamente igual. Assim, ela conserva suas propriedades numéricas ou estatística em diferentes escalas. Este é o tipo de fractal que encontramos na natureza: autossemelhança estatística (NASCIMENTO et al., 2012).

Figura 5 - Fractal com autossemelhança estatística.



Fonte: <https://medium.com/reflex%C3%B5es/recurs%C3%A3o-09-fractais-e-a-explora%C3%A7%C3%A3o-da-recursividade-282d5c1d9c7f> (2021).

2.2.1.2 Complexidade infinita

A complexidade infinita está ligada ao processo iterativo. Significa que um determinado fenômeno se repete infinitamente. Cada objeto fractal em sua formação sofre um número infinito de iterações que culminam na sua forma complexa (NUSSENZVEIG, 2003. p. 57; NASCIMENTO et al., 2012).

Segundo Capra (1996, p. 119),

Para modelar as formas fractais que ocorrem na natureza, podem ser construídas figuras geométricas que exibem auto-similaridade precisa. A técnica principal para se construir essas fractais matemáticas é a iteração — isto é, a repetição incessante de uma certa operação geométrica. O processo da iteração, que nos leva à transformação do padeiro (a característica matemática subjacente aos atratores estranhos), revela-se dessa forma como o aspecto matemático central que liga a teoria do caos à geometria fractal.

Nesse contexto, fica evidente a ideia de que a geometria fractal é aquela que melhor representa a natureza e seus fenômenos, afinal, o que é uma costa de um país, ou a superfície de uma rocha, ou até mesmo os vasos sanguíneos que irrigam os pulmões, senão o resultado de sucessivos eventos que ocorrem ao longo do tempo guiados por atratores físicos como o vento, a chuva, temperatura, pressão, gravidade dentre outros.

2.2.1.3 Dimensão fractal

Segundo Nussenzveig (2003, p. 56), dimensão é “o número de informações (no caso, dadas pelas coordenadas) necessárias para se localizar um ponto no espaço: falamos que o espaço possui três dimensões.”

Na geometria euclidiana, as formas, além de possuírem medidas e ângulos bem definidos, estão imersos dentro de dimensões espaciais representadas por números inteiros, sendo o ponto representado pela dimensão 0, a reta por 1, o plano por 2 e o cubo por 3 (ELEUTÉRIO, 2021).

Entretanto, um objeto fractal não pode ser expresso por uma dimensão inteira, levando em consideração que uma linha irregular ocupa mais espaço que uma linha reta que possui dimensão 1 e menos que um plano que possui dimensão 2, semelhantemente um pedaço de papel amassado ocupa mais espaço que um plano e menos espaço que uma esfera com dimensão 3 (CAPRA, 1996, p. 118).

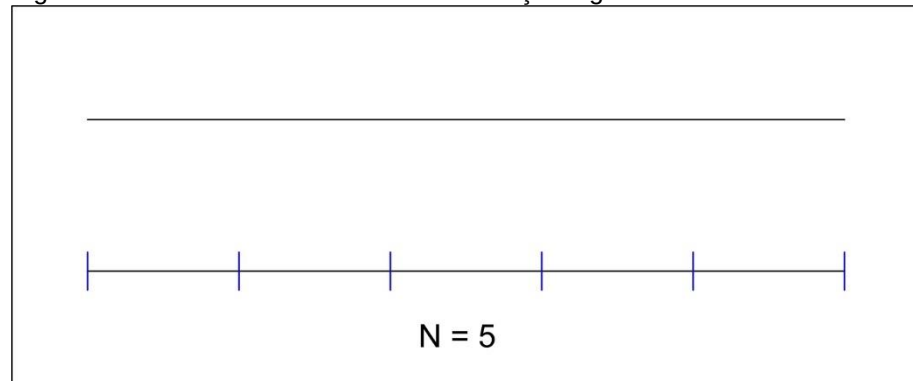
Dessa forma, existem várias noções de dimensão, alguma ligadas ao espaço métrico e outras não. Uma ideia de dimensão simples que permite caracterizar os fractais é a concepção de capacidade elaborada por Kolmogorov, que consiste em medir o quanto o conjunto de pontos que compõem um dado objeto, preenche o espaço (NUSENZVEIG, 2003. p. 56).

Diante disso, a dimensão fractal pode ser expressa por um valor não inteiro. Hausdorff, em 1919, desenvolve uma forma de calcular n dimensões. Baseado nessas ideias, esse método possibilitou o cálculo da dimensão de objetos fractais, assim como, o desenvolvimento de inúmeras metodologias para este fim (NUSENZVEIG, 2003. p. 56).

2.2.2 Estimativa da dimensão fractal

Baseado no conceito de Hausdorff, podemos calcular a dimensão de qualquer objeto, seja ele fractal ou não. O princípio do método de Hausdorff é determinar quanto espaço é ocupado pelo objeto analisado (NUSSENZVEIG, 2003. p. 56; ELEUTÉRIO, 2021). Tomemos uma reta, e em seguida vamos subdividi-la em cinco partes iguais, como mostra a Figura 6.

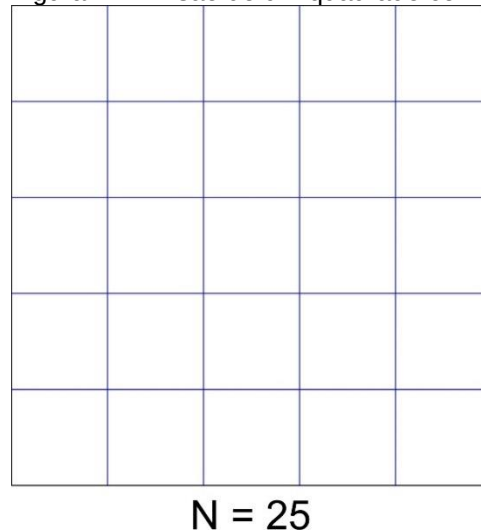
Figura 6 - Divisão de uma reta em cinco seções iguais.



Fonte: O Autor (2021).

Cada seção da reta representa $1/5$ do todo. Dessa forma, o nosso fator de redução é $r = 1/5$. Vamos analisar o que acontece em um quadrado com o mesmo fator de $r = 1/5$ (figura 7).

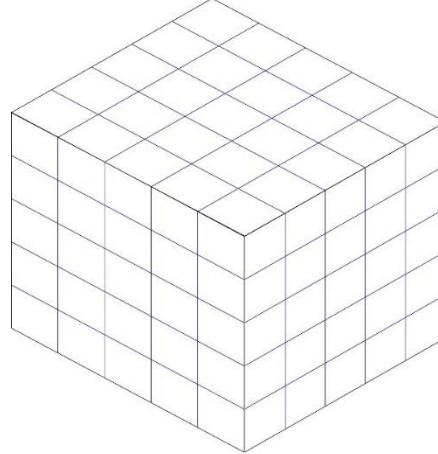
Figura 7 - Divisão de um quadrado com fator $r = 1/5$.



Fonte: O Autor (2021).

Agora, a figura 7 foi dividida em 25 partes iguais. Logo, podemos representar o valor de N como $N = 25^2$. Seguindo o raciocínio vamos agora dividir um cubo, ainda utilizando $r = 1/5$ (figura 8).

Figura 8 - Divisão de um cubo com fator $r = 1/5$.



$N = 125$

Fonte: O Autor (2021).

Temos agora 125 partes iguais. Podemos, então, representar o N como $N = 5^3$. Observe que podemos variar o fator r , alterando o número de partes em que o objeto é dividido. Em todos os casos, atribuindo a N a quantidade de partes obtidas após a divisão, e r o fator de redução, podemos obter o valor D da dimensão, como o expoente que relaciona N e r .

N é quantidade de partes obtidas e está relacionado a capacidade do objeto de preencher o espaço. O r é o fator de redução e D a dimensão dos segmentos, como mostra a equação 1, esta mesma equação pode ser reescrita, como mostra a equação 2.

$$N = 1/r^D \quad (\text{Eq. 1})$$

$$N = (1/r)^D \quad (\text{Eq. 2})$$

Entretanto, para obtermos a dimensão de um objeto, é necessário isolar o D por meio da função logarítmica desenvolvendo conforme demonstrado nas equações 3 e 4. Sendo assim, obtemos a equação 5:

$$\log N = \log(1/r)^D \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\log N = D \cdot \log(1/r) \quad (\text{Eq. 4})$$

$$D = \log N / \log(1/r) \quad (\text{Eq. 5})$$

Assim, podemos obter a dimensão para qualquer objeto, sejam eles fractais ou euclidianos. Observe que no caso da reta, quadrado e cubo, aplicando a equação de dimensão, obtemos dimensões inteiras 1, 2 e 3, respectivamente.

2.2.3 Métodos computacionais para estimar dimensão fractal

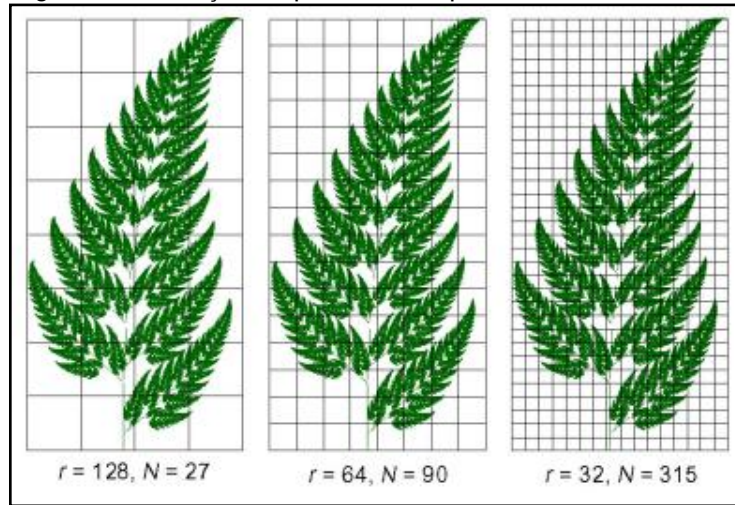
A geometria fractal tem sido constantemente usada na análise de imagens, da mesma forma que o desenvolvimento da computação foi um fator essencial para que Mandelbrot pudesse desenvolvê-la. Hoje, a computação e suas tecnologias são ferramentas essenciais, para estimativa e análise da dimensão fractal (CAPRA, 1996).

Existem diversos métodos para o cálculo da dimensão fractal, cada um com suas bases teóricas. No entanto, nem todos os métodos podem ser aplicados a qualquer tipo de estrutura (BACKES e BRUNO, 2005).

Como cada metodologia se baseia num tipo de medição distinta do objeto analisado, estes geram resultados diferentes para um mesmo objeto. Dentre os vários métodos podemos citar: Massa-Raio, Análise intersecção acumulativa, Dividers, Bouligand-Minkowski, Box Counting e Box Counting diferencial (BACKES e BRUNO, 2005).

O método de Box Counting (contagem de caixas) é um dos primeiros métodos a surgir para estimar a dimensão fractal de imagens computacionais. Esse método foi definido primeiramente por Russel et al. (1980), e consiste em cobrir uma imagem com grades de diferentes tamanhos de caixas. Em seguida são contabilizadas quantas dessas caixas possuem imagens. Dessa forma, obtemos o parâmetro N . O fator de redução r é dado pelo tamanho do lado das caixas de cada grade utilizada, como mostra a figura 9 (GRASSBERGER, 1983; LOPES e BETROUNI, 2009).

Figura 9 - Obtenção do parâmetro N por meio do método o de box counting.



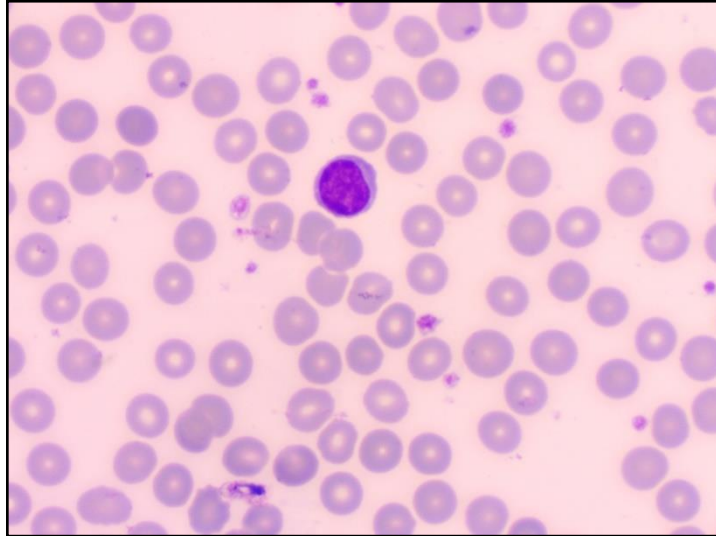
<http://www.theomparticle.com/HomogeneityAndFractality.html>

Ao usar diferentes grades é obtido uma lista de valores de N e r , logo para estimar a dimensão fractal devemos traçar a reta dos mínimos quadrados da relação $\log(N)$ por $\log(1/r)$, uma vez que a reta é uma função afim na forma $f(x) = ax + b$, a constante de inclinação a é justamente uma relação fracionaria dos valores de x e y . Dessa forma a inclinação da reta equivale a equação de Hausdorff (LOPES e BETROUNI, 2009).

2.3 LINFÓCITOS: NATUREZA E CARACTERÍSTICAS

Os linfócitos (figura 10) são células mononucleadas, que compõem a série branca do tecido sanguíneo e fazem parte do sistema imune. Apesar de existir linfócitos que desempenham diferentes funções, estes compartilham características morfológicas semelhantes, das quais se destacam: uma elevada relação núcleo-citoplasma, com o núcleo chegando a ocupar 90% da área da célula, citoplasma escasso, núcleo esférico e de tonalidade azul-arroxeadada (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013).

Figura 10 - Linfócito em esfregaço de sangue periférico 1000X.

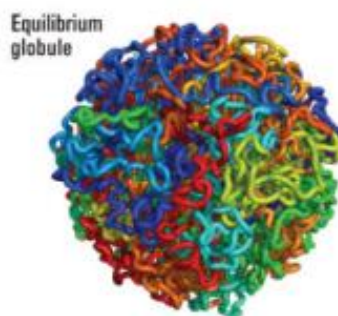


Fonte: O Autor (2021).

Na figura 10, é possível visualizar a morfologia nuclear do linfócito: regiões de maior e menor densidade, que corresponde às regiões de heterocromatina (regiões mais condensadas da cromatina) e eucromatina (regiões menos condensadas), associadas à organização e integridade do genoma (CREMER e CREMER, 2002).

A presença de territórios cromossômicos não ocorre ao acaso. Esses, compõem uma estrutura complexa, com características fractais, o que ficou conhecido como glóbulo fractal, mostrado esquematicamente na Figura 11. O modelo fractal da cromatina, tem sido aceito como sendo o padrão de organização do DNA em cromossomos, no núcleo das células (LIEBERMAN-AIDEN et al., 2009).

Figura 11 - Estrutura do glóbulo fractal



Fonte: LIEBERMAN-AIDEN, et al. (2009)

Lieberman-Aiden (2009) demonstrou pela técnica de Hi-C, que a cromatina se enovela de maneira que se assemelha a pequenos glóbulos, que dão origem as chamadas regiões cromossômicas. A estrutura resultante desses glóbulos se

assemelha a um fractal matemático conhecido por “curva de Peano” (figura 13), que consiste em uma trajetória fractal preenchendo um espaço 3D, sem que haja formação de nós, nos finos filamentos da cromatina durante o seu processo de condensação e descondensação (FERNANDES et al., 2013).

A estrutura da cromatina está relacionada à sua função de um modo dinâmico. Se a região é rica em genes, ela assume uma configuração menos condensada, conhecida por eucromatina. A heterocromatina é uma região menos ativa em transcrição gênica e, portanto, é mais condensada. Em células eucarióticas, o DNA está enrolado em nucleossomos de aproximadamente 10 nm (ZIMMER e FABRE, 2010).

Sendo assim, além de características morfométricas, como tamanho, intensidade da coloração, formato, dentre outros parâmetros que são comumente usados ao se avaliar a morfologia do linfócito, podemos, também, obter um parâmetro que correlaciona a estrutura resultante da organização do DNA na célula, sua dimensão fractal (XAVIER et al., 2018).

2.3.1 Análise fractal da cromatina

Estudos têm demonstrado que a dimensão fractal da heterocromatina associada ao envelope nuclear (NEHC), possui uma dimensão menor que a da heterocromatina de outras regiões, tal como a heterocromatina nuclear dispersa no nucleoplasma (NHC) e da heterocromatina associada ao nucléolo (NUHC). Isso significa que o menor valor de dimensão fractal corresponde a um maior grau de condensação, o que é consistente com o fato desta região conter sequências repetitivas dos telômeros, ao contrário das demais (NHC e NUHC) em que ocorre transcrição de mRNAs e rRNAs, respectivamente (MARINELLI et al., 1997).

Genes altamente transcritos e genes coregulados durante o ciclo celular tendem a associar-se, quando ativados (TANIZAWA et al., 2010). Certos grupos de cromossomos tendem a se localizar próximos uns dos outros, e seus centrômeros e telômeros tendem a ocupar as regiões vizinhas. Entretanto, os princípios e forças que levam a essa organização espacial não-randômica – conhecido por “territórios cromossômicos” – são, em grande parte, desconhecidos (ZIMMER e FABRE, 2010).

A textura da cromatina no núcleo das células, vista ao microscópio de luz visível, permite investigar estados fisiológicos e alterações das células. Por exemplo, por meio da medida da dimensão fractal da cromatina de linfócitos normais, e da mesma medida em células leucêmicas ou de linfomas, pode-se mensurar um aumento ou decréscimo de sua complexidade, o que permite por esta medida morfométrica, e não somente pelo olho humano, identificar uma célula neoplásica (MASHIAH et al., 2008; METZE, 2013).

Um aumento da dimensão fractal da cromatina de células alteradas tem sido associado com cânceres mais agressivos, que passam a expressar uma maior complexidade da arquitetura da cromatina. Esse parâmetro tem sido utilizado de forma promissora no prognóstico de melanomas (BENDIN et al., 2010). A medida da textura fractal da cromatina também já foi utilizada para o diagnóstico citológico do câncer de mama (EINSTEIN et al., 1998).

O aumento da dimensão fractal da cromatina em células irradiadas é uma evidência de que danos no DNA induzidos pela radiação, podem alterar a configuração da cromatina em interfase. Provavelmente, a interação da radiação ionizante com o núcleo da célula leva à modificação da topologia física da arquitetura global da cromatina, o que leva à expressão aumentada de uma rede de genes, e a distribuição da heterocromatina pode ser consequentemente modificada, localizando-se mais à periferia do nucleoplasma (ALMASSALHA et al., 2016).

2.3.2 Linfócitos e irradiação

A radiação ionizante é uma forma de energia capaz de ejetar elétrons dos átomos, gerando par de íons (OKUNO, 1982, BUSHONG, 2010). Ao nível biológico, essa ionização causa efeitos deletérios, pois ao ionizar a matéria orgânica, desestrutura moléculas essenciais à vida, como por exemplo, o DNA. Danos à estrutura do DNA têm repercussões indesejadas, uma vez que, este carrega a informação genética. Dessa forma, quando o DNA é irradiado, a molécula pode ter suas informações alteradas (OKUNO, 1982).

Acidentes envolvendo radiação ionizante são uma preocupação global, tendo em vista, o histórico das bombas atômicas de Hiroshima e Nagasaki, o acidente nuclear de Chernobyl, e o acidente do Césio-137 no Brasil (LOGANOVSKY E YURYEV, 2001; ROCCA et.al,1988; GRACIOTTI, 1989; KERR et.al, 2015).

Quando ocorreu o acidente do Césio-137, uma vasta área da região foi contaminada. Para que tenhamos uma ideia da extensão da contaminação, foi isolada uma das alas do 3º andar do Hospital Geral de Goiânia, a fim de abrigar os pacientes expostos (ROCCA et.al,1988; GRACIOTTI, 1989). A identificação de quem foi exposto ou não, antes dos sintomas da irradiação surgirem, foi crucial.

A radiosensibilidade de uma célula é diretamente proporcional ao seu metabolismo e inversamente proporcional à sua diferenciação celular. Isso implica dizer que, quanto mais imatura for a célula, mais radiosensível ela é, e quanto mais diferenciada, mais radiorresistente (BERGOI & TRIBONDEAU, 1906). No entanto, há exceções à regra, como os linfócitos, que apesar de ser um tipo de célula bem diferenciada, e que normalmente não está em divisão, apresentam-se como radiosensíveis (IAEA, 2011).

Esta característica de armazenar o dano permitiu a criação de um método que, até hoje, é padrão-ouro para identificar exposições humanas às radiações ionizantes, por meio da quantificação de aberrações cromossômicas em linfócitos do sangue periférico humano. No entanto, esta metodologia requer que as células atinjam a fase de metáfase do ciclo celular, ou seja, 48 horas, sendo o tempo um fator crucial para a equipe médica, em casos de vítimas exposta à radiação ionizante. Além disso, este método é laborioso, pois exige a contagem de aberrações cromossômicas em milhares de células, a fim de confirmar se houve exposição humana à radiação ionizante (IAEA, 2011).

Uma alternativa que vêm emergindo é o estudo da cromatina ainda em interfase, sem a necessidade de cultivo celular, nem de análise dos cromossomos individuais, isso por meio da natureza fractal do núcleo dos linfócitos. Neste contexto, a dimensão fractal pode ser um parâmetro viável no rastreamento de indivíduos expostos à radiação ionizante (XAVIER, 2018).

2.4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

2.4.1 Aspectos éticos

Cumprindo os preceitos éticos, o Projeto de Pesquisa, juntamente com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), foram submetidos ao Comitê de Ética

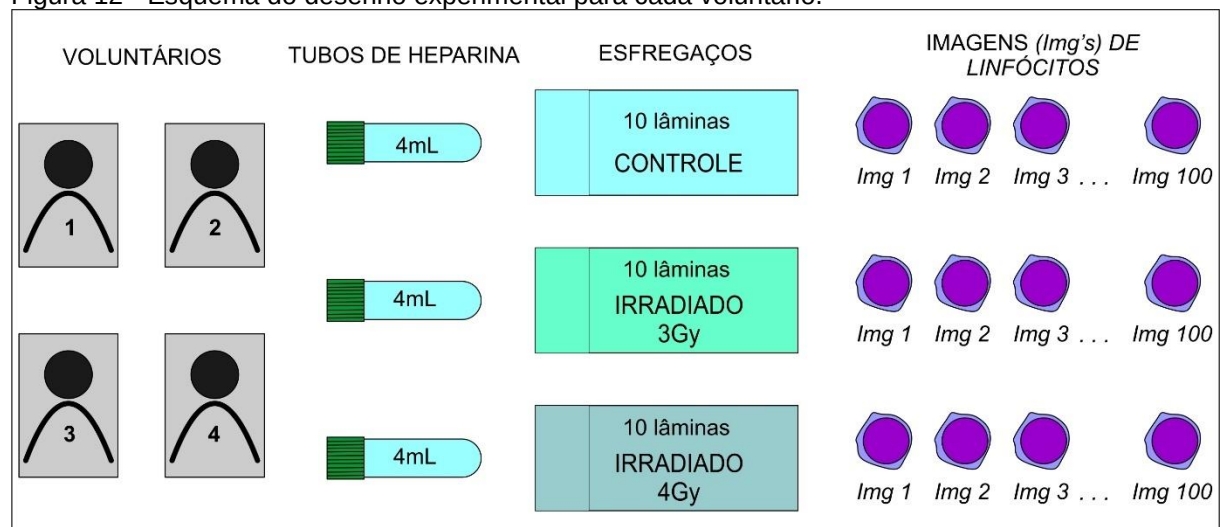
em Pesquisa – CEP, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CAAE: 10194919.0.0000.5208) e ao Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, do Hospital das Clínicas da mesma Universidade (CAAE: 10194919.0.3001.8807). O Projeto de Pesquisa foi submetido, também, à Chefia da Unidade de Laboratório do Hospital das Clínicas ULAB – HC, que autorizou o uso das dependências do laboratório de análises clínicas, assim como, dos equipamentos necessários.

2.4.2 Desenho experimental

Para este trabalho, foram utilizadas amostras de sangue venoso de voluntários saudáveis do sexo masculino, com idades entre 18 e 30 anos. Avaliamos os linfócitos de cada voluntário, sob três condições distintas: controle, irradiado 3Gy e irradiado 4Gy.

Ao todo, foram recrutados quatro voluntários. Em cada voluntário, por meio de punção venosa, foram coletados três tubos de sangue contendo heparina como anticoagulante, totalizando um volume de 12 mL de sangue. De cada tubo foram confeccionadas dez lâminas hematológicas, e de cada lâmina foram micrografados dez linfócitos, totalizando trezentas células por voluntário, para compor as três condições estabelecidas, como mostra a figura 12.

Figura 12 - Esquema do desenho experimental para cada voluntário.



Fonte: O Autor (2021).

2.4.3 Coleta de amostras

As amostras foram coletadas no Laboratório de Biofísica Celular e Molecular - LBCM, usando tubos de heparina de 4 ml (figura 12). A heparina é um anticoagulante que mantém as células viáveis, e é muito utilizada na cultura de células. Após a coleta, os tubos foram colocados em garrafa térmica a 36°C para mimetizar as condições fisiológicas de temperatura.

2.4.4 Irradiação

Vinte minutos, após a coleta, as amostras testes foram irradiadas com uma fonte de Cobalt-60 – Gammacell 220 Excel – taxa de dose 1,407 kGy.h⁻¹ (figura 13), para receber 3Gy e 4Gy o tempo de exposição foi de 3,158s e 5,716s respectivamente, não foi possível usar doses mais baixas, pois a taxa de dose do equipamento é alta, logo foi colocado como limite a dose de 4Gy, já que esta é letal para um ser humano quando exposto de corpo inteiro. Após a irradiação as amostras foram recolocadas na garrafa térmica a 36°C, junto com a mostra controle. As amostras ficaram acondicionadas durante duas horas após a irradiação.

Esse processo permite a reorganização nuclear, pois a célula inicia seu processo de reparo e de combate aos radicais livres gerados pelo efeito indireto da radiação ionizante, após o dano causado (AZZAM et al., 2012).

Figura 13 - Irradiador gama fonte Cobalto-60

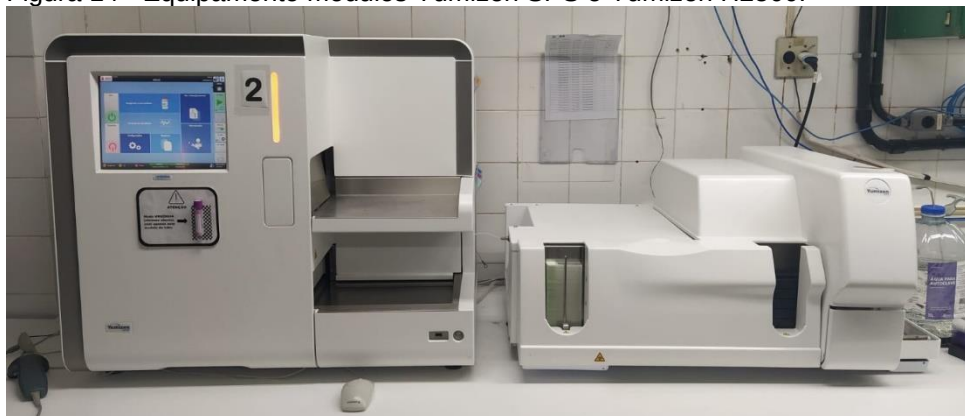


Fonte: O Autor (2021).

2.4.5 Preparo do esfregaço e coloração

Os esfregaços foram confeccionados e corados por meio de automação. Para confecção e coloração do esfregaço foi usado o módulo Yumizen SPS da HORIBA Medical (figura 14). A automação utiliza como método de coloração, May-Grünwald's - Giemsa's. De cada tubo coletado foram confeccionados dez esfregaços, usando o módulo Yumizen H2500 da HORIBA Medical (figura 14). As amostras foram submetidas também a um hemograma completo, a fim de confirmar o status de saúde dos voluntários (figura 15) (SILVA, 1988; MOURA et.al, 1992).

Figura 14 - Equipamento módulos Yumizen SPS e Yumizen H2500.



Fonte: O Autor (2021).

Figura 15 - Realização do hemograma para confirmação do status de saúde.



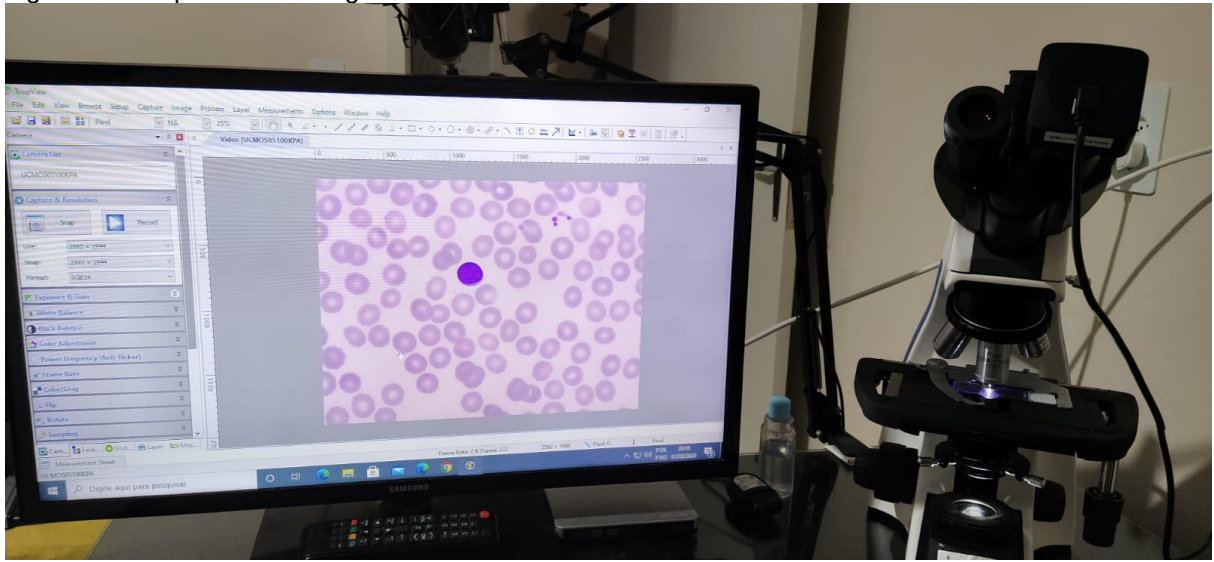
Fonte: O AUTOR (2021).

2.4.6 Análise micrografia

Os esfregaços foram analisados por meio de microscópio óptico na objetiva de 100X com óleo de imersão LABORCLIN (Lote: 200930092). As fotomicrografias foram

capturadas com câmera digital, INDUSTRIAL DIGITAL CAMERA, modelo: UCMOS05100KPA 5.1MP 1/2.5" COLOR USB2.0, usando o *software* de captura ToupView. Apenas linfócitos em condições de normocromia e normocitose foram fotomicrografados (figura 16).

Figura 16 - Captura de micrografias de linfócitos.



Fonte: O Autor (2021).

2.4.7 Desenvolvimento do *software* para estimar a dimensão fractal

O *Software* foi desenvolvido usando a linguagem de programação Python versão 3.10.0, disponível em: <https://www.python.org/downloads/>, e as bibliotecas Tkinter, numpy, matplotlib, PIL e pyinstaller. O código foi compilado e a partir daí foi gerado um executável.

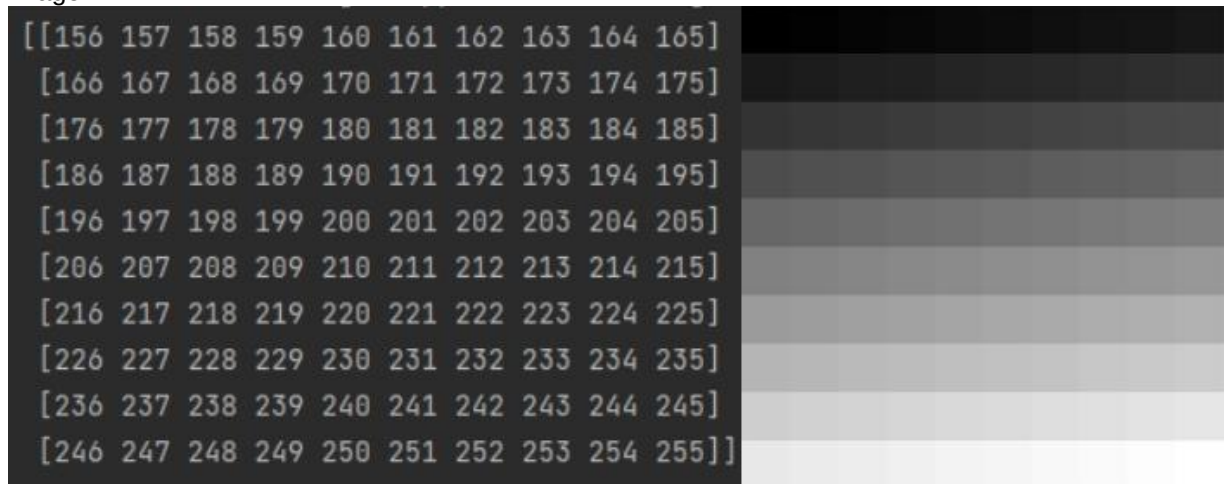
2.4.7.1 Carregando e abrindo imagens

Inicialmente foi desenvolvido um algoritmo que permitisse a importação das imagens. Para isso, elaboramos duas funções: a primeira carrega a imagem informando qual o local em que as imagens estão no computador; e a segunda abre a imagem para ser utilizada pelo *software*. As imagens foram carregadas em um conjunto de 100, para cada voluntário e condição de análise.

2.4.7.2 Processamento, rastreo e corte

Com as imagens disponíveis para manipulação, uma função aumentava o brilho e o contraste da imagem. A ideia era deixar o linfócito em destaque, para que a função de rastreo possa encontrá-lo com maior facilidade. A função de rastreo converte a imagem em uma matriz, onde cada pixel é representado por um número inteiro. Dessa forma, “255” representa os pixels brancos (ausência de imagem) e valores menores que “255” representam os tons de cinza (existência de imagem) (figura 17).

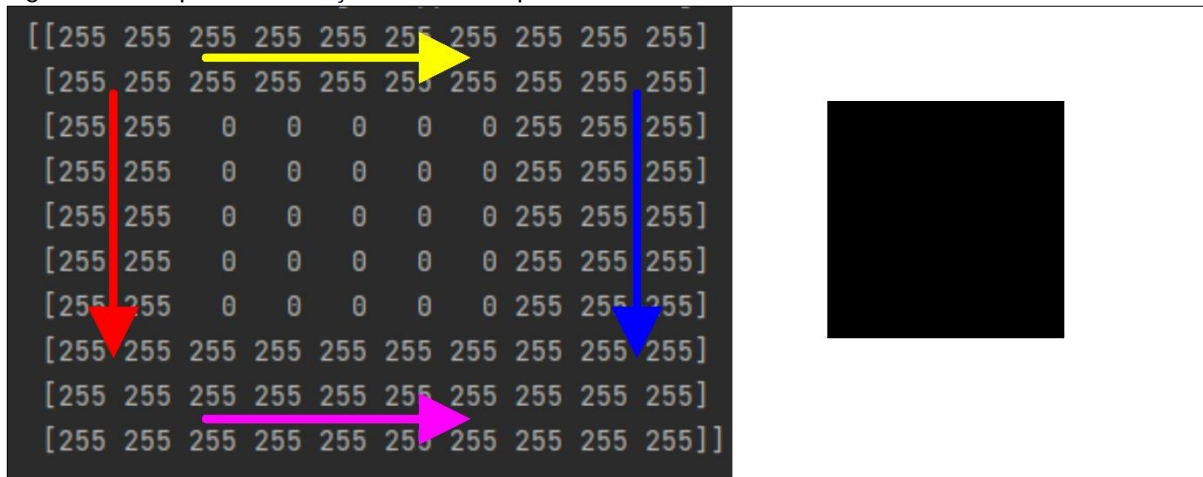
Figura 17 - Representação de uma matriz bidimensional e sua respectiva equivalência em pixels de imagem.



Fonte: O Autor (2021).

A função analisa as linhas e colunas da matriz bidimensional gerada a partir da imagem, verificando se nas linhas e colunas existem algum valor diferente de 255. Se tiver, os números destas linhas e colunas, são armazenados. Como resultado, obtemos as coordenadas de onde o linfócito foi encontrado. A figura 18 exemplifica esse processo:

Figura 18 - Esquema da função de rastreio para linfócitos.



Fonte: O Autor (2021).

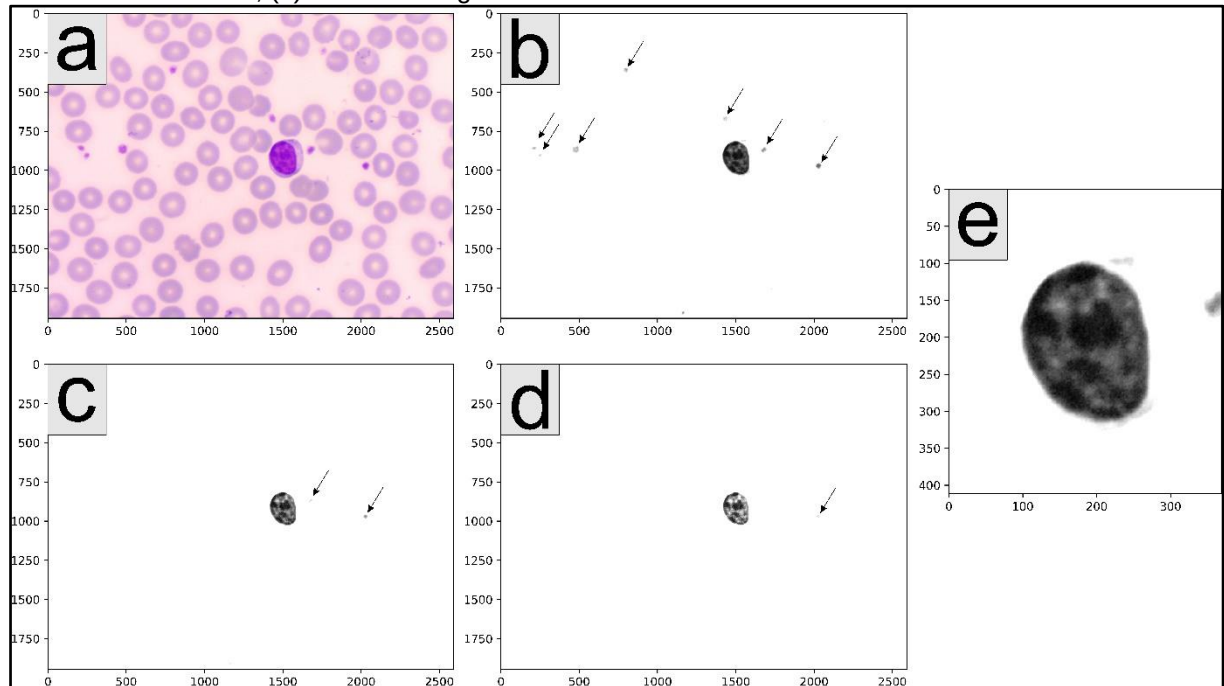
A seta amarela verifica cada valor presente nas linhas da esquerda para a direita começando da parte superior da imagem, em busca de um valor que seja diferente de 255, o que significa que é o pixel de uma imagem. Ao encontrar o número da linha que contém algum valor diferente de 255, esse é armazenado. A seta vermelha verifica cada valor presente nas colunas de cima para baixo começando a esquerda da imagem. Ao encontrar uma coluna que possui entre seus valores, algum que seja diferente de 255, o número da coluna é armazenado.

A seta rosa verifica cada valor presente nas linhas da esquerda para a direita começando da parte inferior da imagem. em busca de um valor que seja diferente de 255, o que significa que é o pixel de uma imagem. Ao encontrar o número da linha que contém algum valor diferente de 255, esse é armazenado. A seta azul verifica cada valor presente nas colunas de cima para baixo começando a direita da imagem. Ao encontrar uma coluna que possui entre seus valores, algum que seja diferente de 255, o número da coluna é armazenado. Como resultado, obtemos as coordenadas (amarelo, vermelho, azul, rosa) que correspondem, no exemplo da figura 6, às coordenadas (3, 3, 7, 7).

Entretanto a função de rastreio nem sempre encontra o linfócito no primeiro aumento de brilho. Para garantir o resultado, todas as coordenadas dos objetos encontrados são armazenadas: chamamos estes de eventos. O brilho da imagem é aumentado repetidamente, até que reste o número mínimo de eventos onde seja possível calcular o tamanho do mesmo. O evento de maior tamanho é o linfócito (figura 19).

Com as coordenadas estabelecidas é possível chamar a função de corte. Esta função recebe as coordenadas como parâmetro e corta a região onde o linfócito foi encontrado pela função de rastreo.

Figura 19 - Demonstração das funções de rastreo e corte do algoritmo: (a) a imagem bruta com várias células; (b) o primeiro aumento de brilho evidenciando (setas) diversos eventos (objetos); (c) novo aumento no brilho, menos eventos encontrados; (d) mais um aumento de brilho, número mínimo de eventos encontrados; (e) corte da imagem baseado nas coordenadas do maior evento encontrado.

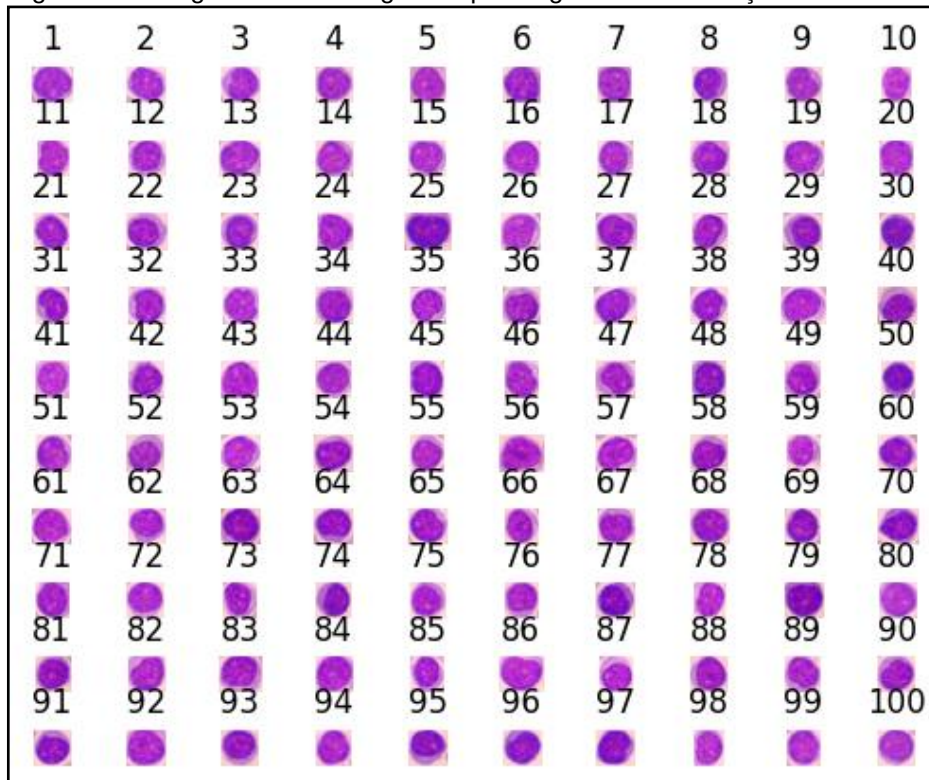


Fonte: O Autor (2021).

2.4.7.3 Correção de erros

Para evitar erros, elaboramos um algoritmo que após o corte automático das imagens, exibe o resultado para inspeção. Caso algum linfócito tenha sido selecionado de forma incorreta, podemos selecioná-lo manualmente (figura 20).

Figura 20 - Imagem de revisão gerada pelo algoritmo de correção de erros.



Fonte: O Autor (2021).

2.4.7.4 Redimensionamento

O algoritmo de análise fractal foi padronizado para utilizar imagens com 300 pixels de largura e 300 pixels altura. Os linfócitos, depois de cortados, foram convertidos a tons de cinza e redimensionados para o tamanho de (300 X 300) pixels. Com esse tamanho, obtemos grades de caixas com valores inteiros.

2.4.7.5 Contagem das caixas

Para cada imagem, a função de contagem das caixas é aplicada. Inicialmente, essa função determina a quantidade de grades e o tamanho das caixas. A partir do tamanho da imagem, é feita uma lista com os mínimos divisores comuns. Como as imagens foram padronizadas em 300 X 300 pixels foi obtida a seguinte lista: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 50, 60, 75, 100, 150, 300. Sendo assim, o algoritmo usa dezoito grades. Os valores na lista representam o tamanho, em pixels, de cada caixa, em cada grade: 1 x 1; 2 x 2; 3 x 3; 4 x 4; 5 x 5; 6 x 6; 10 x 10; 12 x 12; 15 x 15; 20 x 20; 25 x 25; 30 x 30; 50 x 50; 60 x 60; 75 x 75; 100 x 100; 150 x 150; 300 x 300.

A imagem recebe grades com diferentes tamanhos de caixas e é contabilizado em quais caixas existem pixels válidos (< 255). Os resultados são armazenados em duas listas (figura 21): uma com os valores do $\log(1/\text{tamanho do lado das caixas})$ e outra com o valor do $\log(\text{número de caixas preenchidas})$.

Figura 21 - Listas com valores obtidos pela função de contagem de caixas.

```
x = [log(1/1), log(1/2), log(1/3), log(1/4), log(1/5), log(1/6), log(1/10), log(1/12), log(1/15),
log(1/20), log(1/25), log(1/30), log(1/50), log(1/60), log(1/75), log(1/100), log(1/150), log(1/300)]

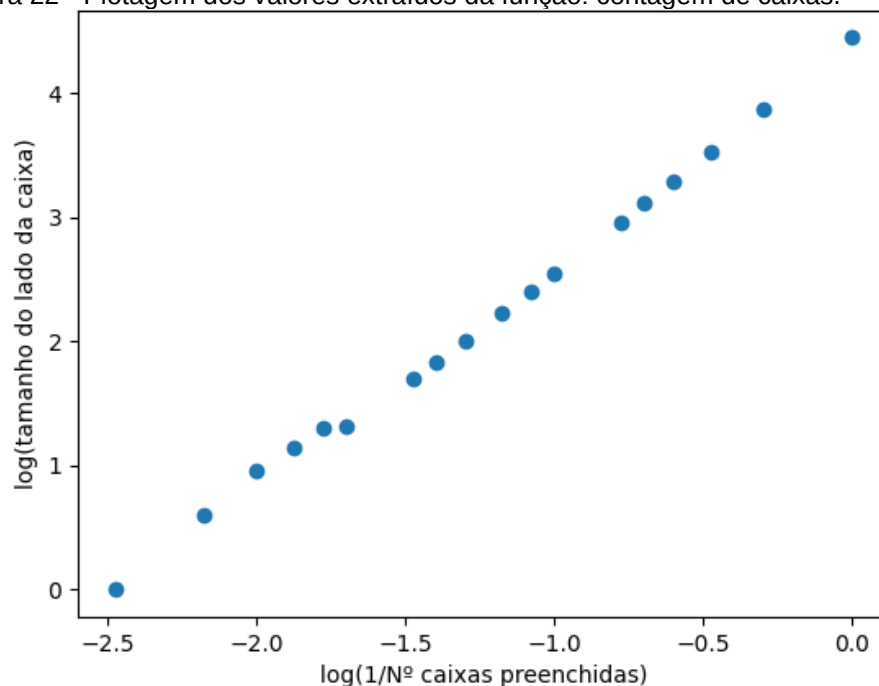
y = [log(nº caixas grade 1), log(nº caixas grade 2), log(nº caixas grade 3) ... log(nº caixas grade 18)]
```

Fonte: O Autor (2021).

2.4.7.6 Dimensão fractal

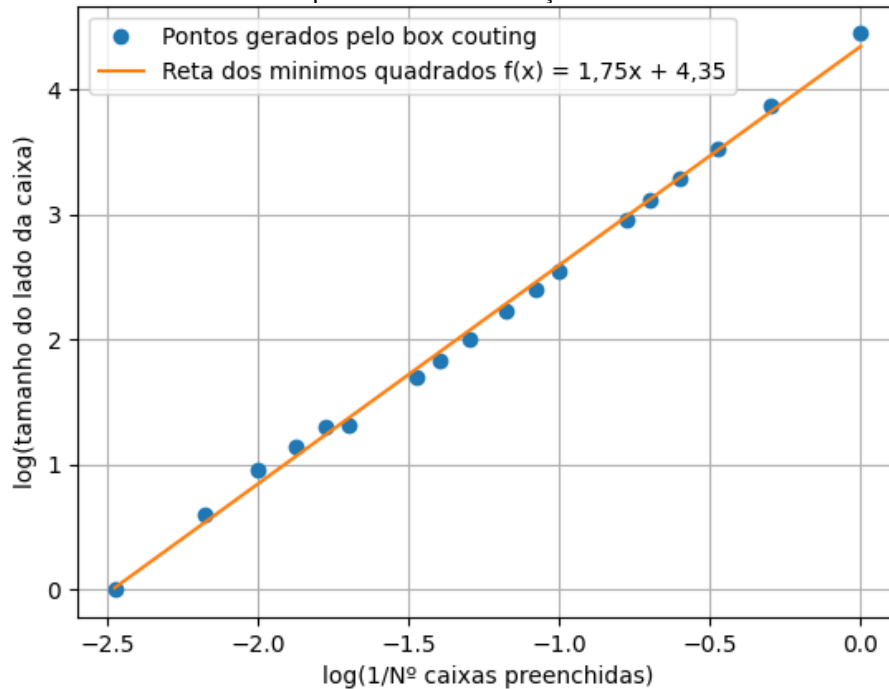
A função de cálculo da dimensão fractal recebe como parâmetro as listas do $\log(1/\text{tamanho do lado das caixas})$ e $\log(\text{número de caixas preenchidas})$, conforme figura 21. Os valores destas listas são plotados em um gráfico (figura 22). Em seguida, é feita uma regressão de mínimos quadrados, resultando numa função de reta, onde a inclinação é a dimensão fractal estimada (figura 23). O valor da dimensão é então exibido na tela e pode ser copiado para análise estatística.

Figura 22 - Plotagem dos valores extraídos da função: contagem de caixas.



Fonte: O Autor (2021).

Figura 23 - Reta dos mínimos quadrados: a inclinação é a dimensão fractal estimada.



Fonte: O Autor (2021).

2.4.7.7 Validação

Para confirmar o funcionamento do *software* quanto a estimativa da dimensão fractal de imagens, utilizamos objetos fractais e não fractais com dimensões conhecidas, dentre as quais estão: Curva de Koch, Triângulo de Sierpinski, Curva de Peano, linha e quadrado.

2.4.7.8 Análise estatística

Os valores obtidos no *software* foram copiados e organizados em: análise por voluntários e análise por condição da amostra. Objetivou-se avaliar se ocorriam alterações da dimensão fractal nas diferentes condições de amostra, em cada voluntário, e se cada condição de amostra era estatisticamente igual entre os voluntários, respectivamente.

Inicialmente foi aplicado um teste de normalidade aos dados, com hipótese nula (H_0), com nível de significância de 0,05. Após o resultado do teste de normalidade, rejeitamos a hipótese nula. Dessa forma, usamos o teste de análise de variância não paramétrico, Kruskal-Wallis, com post-hoc de Rank Sum e post-hoc de Dun. A análise

estatística foi realizada utilizando dois *softwares* distintos: o complemento de R para o Excel®, na forma do suplemento Action (versão 2.4) distribuído em <https://edisciplinas.usp.br/mod/resource/view.php?id=3016421&forceview=1>, e o BioEstat (versão 5.3), distribuído em <https://www.mamiraua.org.br/downloads/programas/>. Foi usado um limite de confiança de 95% para os dois *softwares*.

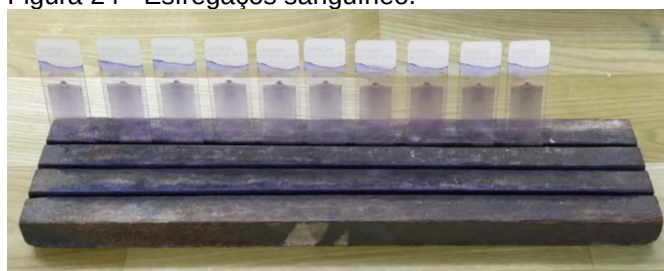
O teste de normalidade e Kruskal-Wallis foi realizado em ambos os *softwares*, com exceção do post-hoc de rank sum e post-hoc de dun, realizados respectivamente, no Action e BioEstat.

3 ANÁLISE DOS RESULTADOS

3.1 ESFREGAÇO E HEMOGRAMA

Os esfregaços apresentaram coloração uniforme e boa distribuição do sangue (figura 24). Dessa forma, os esfregaços mantiveram o padrão esperado. Os hemogramas apresentaram normalidade na morfologia e coloração (normocitose e normocromia). Os índices hematológicos também mostraram normalidade, estando as amostras dos quatro voluntários aptas para serem utilizadas na pesquisa.

Figura 24 - Esfregaços sanguíneos.

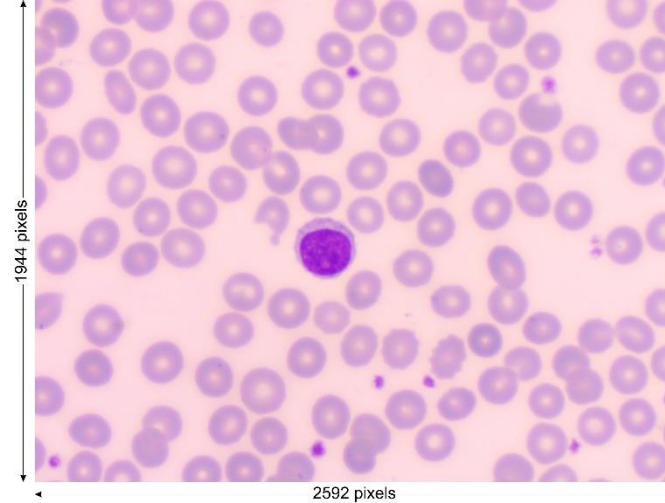


Fonte: O Autor (2021).

3.2 OBTENÇÃO DAS FOTOMICROGRAFIAS

As fotomicrografias obtidas apresentaram boa coloração. Apesar disso, notou-se uma diferença na intensidade da coloração entre os linfócitos. As fotomicrografias possuíam 2592 pixel de largura e 1944 pixels de altura, apresentando apenas um linfócito cada (figura 25), o que facilitou o processo de identificação dos mesmos.

Figura 25 - Fotomicrografia estirado sanguíneo com linfócito



Fonte: O Autor (2021).

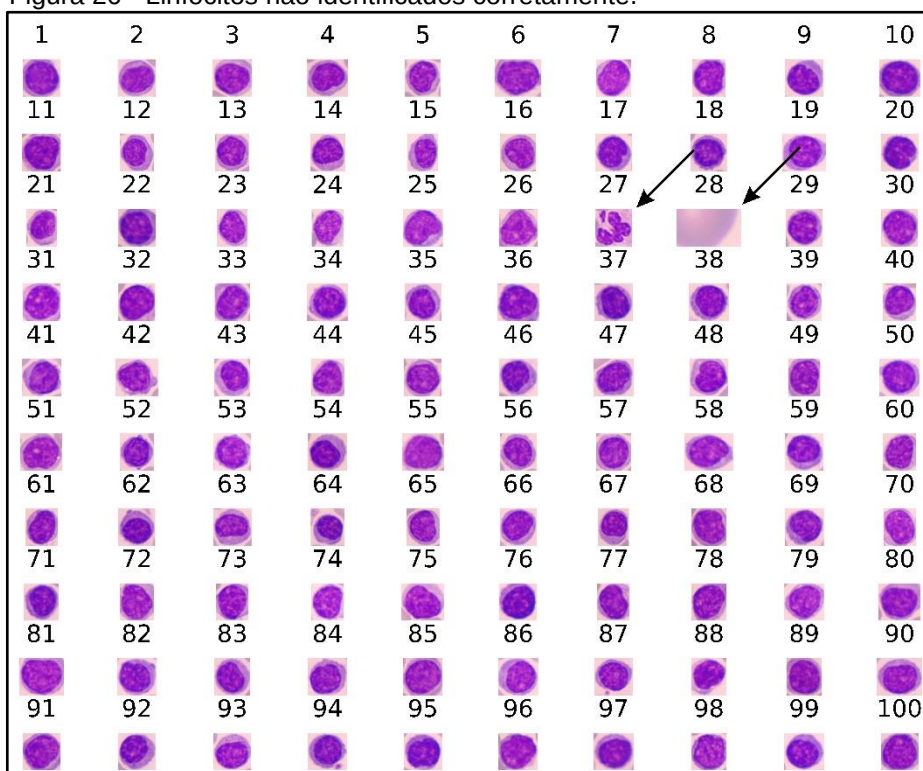
3.3 CARREGAMENTO DE IMAGENS

As imagens foram carregadas corretamente. Esse procedimento foi feito em grupos de 100 imagens, que corresponde a cada grupo amostral. Assim, o tempo de análise foi encurtado, quando comparado a processamentos manuais, uma vez que, foram avaliadas de cem em cem, e dependendo do desenho do estudo, podem ser avaliados em quantidades indefinidas, limitando-se, apenas, à capacidade de processamento do computador.

3.4 IDENTIFICAÇÃO E CORTE

A maior parte dos linfócitos foi devidamente reconhecida nas fotomicrografias. O algoritmo obteve uma precisão de 99,6%. Entretanto, alguns poucos linfócitos não foram identificados corretamente. Isso se deu em alguns casos, pela presença de artefatos com coloração tão forte quanto a dos linfócitos. Em outros casos, o simples aumento do brilho e contraste apagaram toda a imagem, não restando nenhum evento que pudesse ser contabilizado. A figura 26 demonstra o resultado de um grupo de 100 células que não foram totalmente identificadas.

Figura 26 - Linfócitos não identificados corretamente.



Fonte: O Autor (2021).

3.5 CORREÇÃO DE ERRO DE IDENTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS

A principal estratégia para corrigir os erros na identificação dos linfócitos, nas fotomicrografias, foi o desenvolvimento de dois algoritmos: um de análise e outro de corte manual. O algoritmo de análise possibilitou a pré-visualização das células identificadas de forma autônoma, como já demonstrado na figura 26. Em seguida é perguntado ao usuário se todas as imagens foram identificadas corretamente. Caso contrário, é pedido que o mesmo indique o número das imagens que foram erroneamente identificadas (figura 27).

O algoritmo de corte manual consiste em mostrar a fotomicrografia que teve o linfócito não identificado indicado pelo usuário e possibilita que o mesmo faça a identificação e corte manualmente (figura 28). O algoritmo de correção de erros apresentou uma solução eficaz, permitindo a seleção de forma manual e corrigindo o erro do algoritmo de identificação (figura 29).

Figura 27 - Etapa de verificação

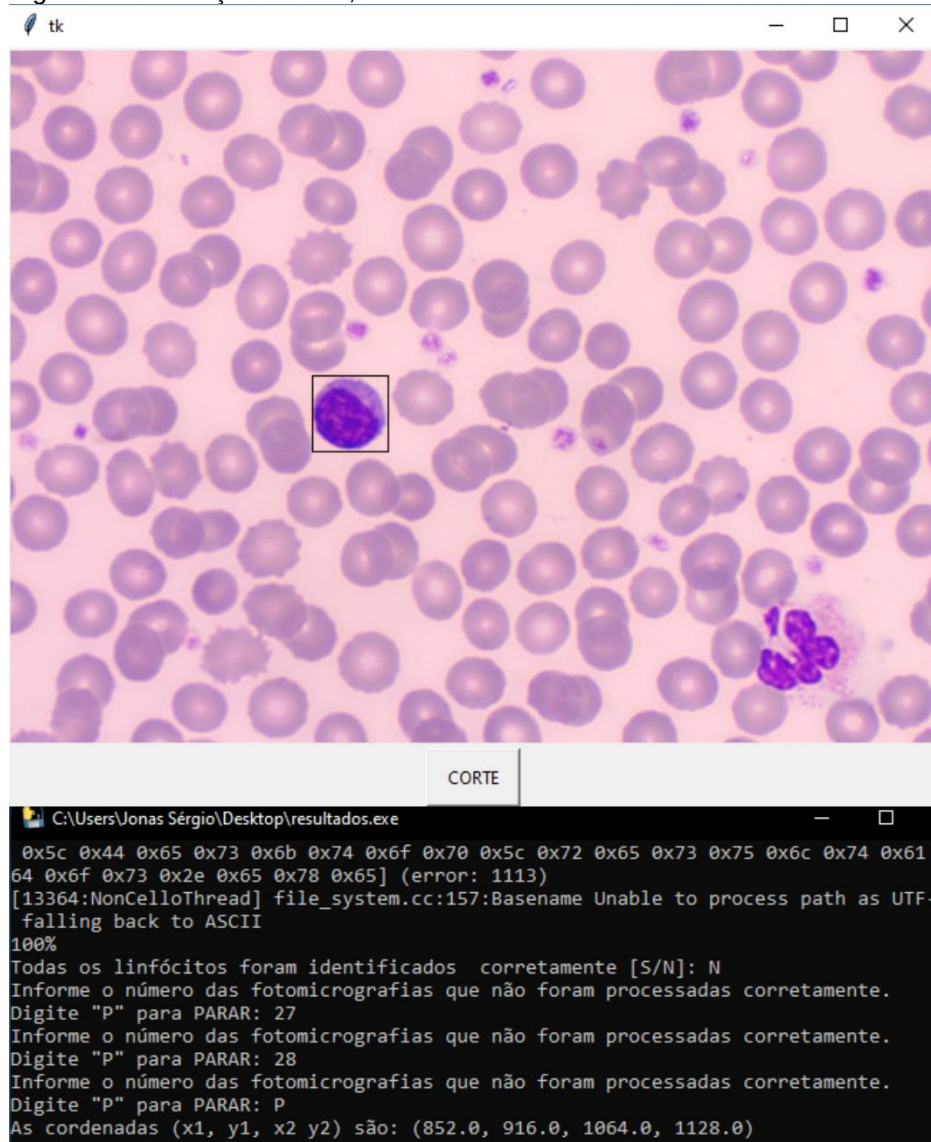
```

C:\Users\Jonas Sérgio\Desktop\resultados.exe
0x5c 0x44 0x65 0x73 0x6b 0x74 0x6f 0x70 0x5c 0x72 0x65 0x73 0x75 0x6c 0x74 0x61 0x
64 0x6f 0x73 0x2e 0x65 0x78 0x65] (error: 1113)
[13364:NonCelloThread] file_system.cc:157:Basename Unable to process path as UTF-8;
falling back to ASCII
100%
Todas os linfócitos foram identificados corretamente [S/N]: N
Informe o número das fotomicrografias que não foram processadas corretamente.
Digite "P" para PARAR: 27
Informe o número das fotomicrografias que não foram processadas corretamente.
Digite "P" para PARAR: 28
Informe o número das fotomicrografias que não foram processadas corretamente.
Digite "P" para PARAR:

```

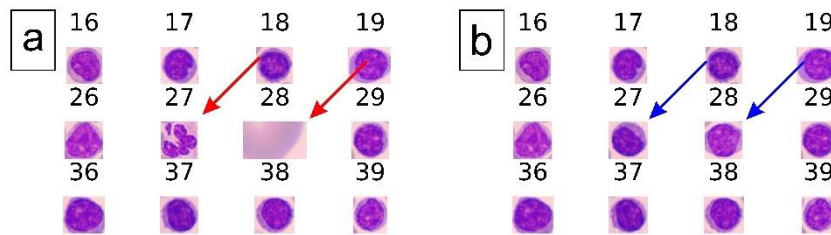
Fonte: O Autor (2021).

Figura 28 - Correção de erro, corte manual



Fonte: O Autor (2021)

Figura 29 - Correção do erro de identificação: (a) imagem dos linfócitos 27 e 28 antes da correção, (b) imagem dos linfócitos 27 e 28 após o corte manual.



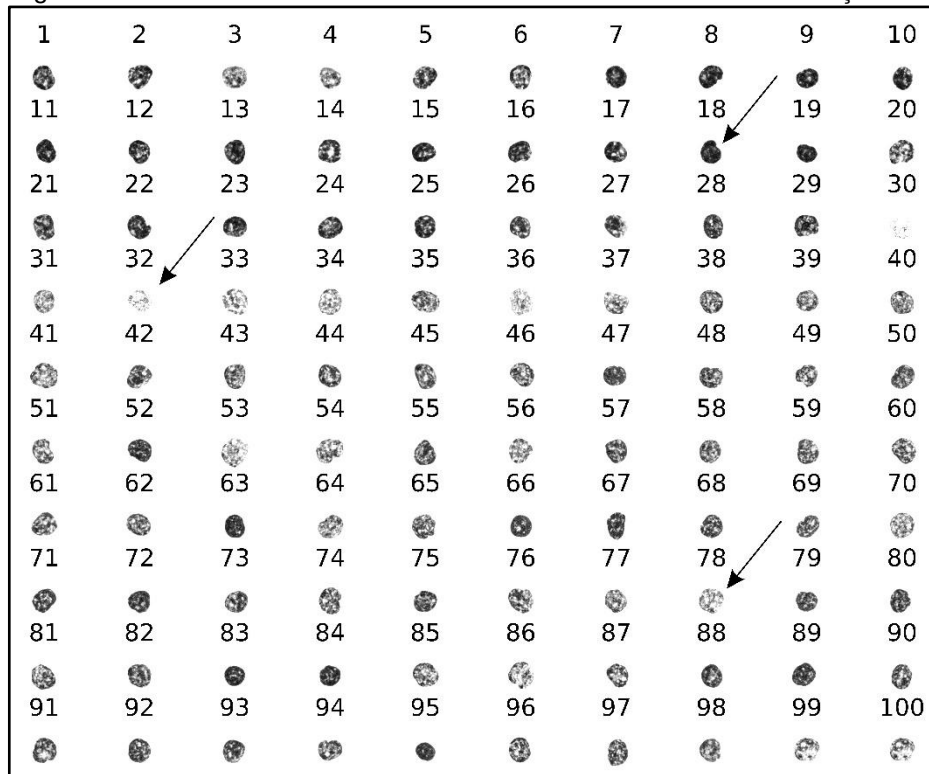
Fonte: O Autor (2021).

3.6 REDIMENSIONAMENTO E TONS DE CINZA

O algoritmo de redimensionamento possibilitou a padronização do tamanho das imagens de linfócitos em 300 X 300 pixels, pois, seguido o corte na fotomicrografia, estes possuíam os mais variados tamanhos. Com isso, o número de grades aplicados aos mesmos seriam variados, uma vez que, o tamanho e número de grades é determinado de acordo com o tamanho da imagem.

Para que as imagens de linfócitos ficassem prontas para a análise da dimensão fractal, estas foram convertidas em tons de cinza. Entretanto, observou-se uma heterogeneidade na intensidade dos linfócitos, podendo alguns deles não estarem muito visíveis. Isso ocorre devido a diferença de intensidade da coloração nos linfócitos e ao aumento do brilho e contraste ser o mesmo para todos, independente da sua intensidade de coloração (figura 30).

Figura 30 - Linfócitos em tons de cinza. As setas evidenciam a diferença na intensidade.



Fonte: O Autor (2021).

3.7 DIMENSÃO FRACTAL

3.7.1 Validação

Para confirmar o funcionamento do algoritmo da dimensão fractal, foi realizada uma etapa de validação, onde foram utilizadas imagens de objetos fractais (Curva de Koch, Triângulo de Sierpinski e Curva de Peano) e não fractais (linha, quadrado), que possuem dimensões conhecidas (ANTONIAZZI, 2007; SO e JIN, 2017). Os resultados constam na tabela 1:

Tabela 1 - Dimensão fractal de objetos conhecidos

Objeto	Dimensão fractal		Razão entre dimensão calculada e conhecida
	Calculada no algoritmo	Valores encontrados na literatura	
Linha	1,0036	1	1,0036
Quadrado	2,0000	2	1
Curva de Koch (<i>snow flake</i>)	1,2579	1,2618	0,996909
Triângulo de Sierpinski	1,6232	1,5849	1,024166
Curva de Peano	1,7410	1,736	1,00288

Fonte: O Autor (2021).

A razão entre a dimensão calculada pelo algoritmo e a encontrada na literatura, fora igual ou próximo a um (1). Sendo assim, o algoritmo, de fato, estima a dimensão fractal corretamente.

3.7.2 Dimensão dos linfócitos, controle, irradiado 3Gy e Irradiado 4Gy por voluntário.

Os resultados das dimensões fractais e seus valores médios, máximos e mínimos, com desvio padrão e valor de p , para 100 células controle (não irradiadas), 100 células Irradiadas 3Gy e 100 células Irradiadas 4Gy, dos voluntário 1, 2 e 3, são apresentados respectivamente, nas tabelas 3, 4, 5 e 6.

Tabela 2 - Dimensão fractal: valores máximos, mínimos e médios, com desvio padrão e valor de p , em dois *software* de estatística distintos, para o voluntário 1.

Software utilizado	Condição da amostra	Estatística Descritiva					Kruskal-Wallis
		Número de Células	Menor Dimensão Fractal	Maior Dimensão Fractal	Média	Desvio Padrão	Valor de p
Excel suplemento Action	Controle	100	1,3728	1,7764	1,7363	0,0412	0,7940
	Irradiadas 3Gy	100	1,6917	1,7744	1,7394	0,0164	
	Irradiadas 4Gy	100	1,6877	1,7805	1,7402	0,0178	
BioEstat	Controle	100	1,3728	1,7764	1,7363	0,0412	0,8277
	Irradiadas 3Gy	100	1,6917	1,7744	1,7394	0,0164	
	Irradiadas 4Gy	100	1,6877	1,7805	1,7402	0,0178	

Fonte: O Autor (2021).

A diferença das dimensões fractais, entre as condições das amostras não são estatisticamente significativas para o voluntário 1 ($p > 0,05$). Dessa forma, não é possível identificar qual amostra é a irradiada e nem estimar a dose de radiação. É possível observar que as dimensões fractais para todas as condições de análise do voluntário 1 estão entre 1 e 2, o que indica que o núcleo das células avaliadas está entre uma linha e um plano (CAPRA, 1996).

Tabela 3 - Dimensão fractal: valores máximos, mínimos e médios, com desvio padrão e valor de p , em dois *software* de estatística distintos, para o voluntário 2.

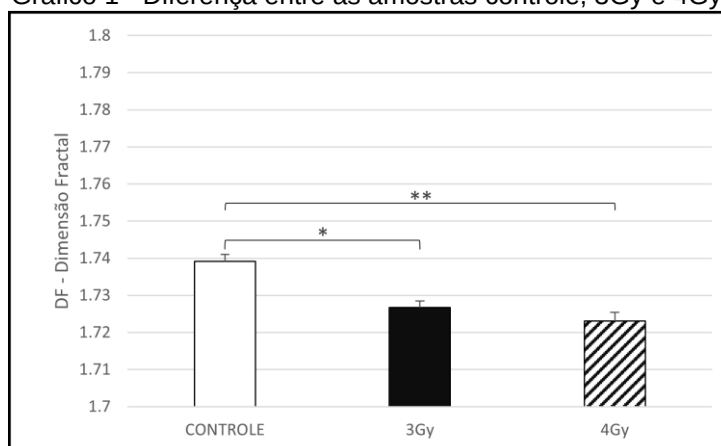
Software utilizado	Condição da amostra	Estatística Descritiva					Kruskal-Wallis
		Número de Células	Menor Dimensão Fractal	Maior Dimensão Fractal	Média	Desvio Padrão	Valor de p
Excel suplemento Action	Controle	100	1,6748	1,7751	1,7392	0,0186	$p \cong 0,00000003$
	Irradiadas 3Gy	100	1,6678	1,7678	1,7267	0,0182	
	Irradiadas 4Gy	100	1,6037	1,7679	1,7231	0,0240	
BioEstat	Controle	100	1,6748	1,7751	1,7392	0,0186	$p < 0,0001$
	Irradiadas 3Gy	100	1,6678	1,7678	1,7267	0,0182	
	Irradiadas 4Gy	100	1,6037	1,7679	1,7231	0,0240	

Fonte: O Autor (2021).

A diferença das dimensões fractais, entre as condições das amostras são estatisticamente significativas para o voluntário 2 ($p < 0,0001$), em ambos os *softwares* de estatística utilizados. É possível observar que as dimensões fractais para todas as condições de análise do voluntário 2, estão entre 1 e 2, o que indica que o núcleo das células avaliadas está entre uma linha e um plano (CAPRA, 1996).

No gráfico 1 podemos identificar quais condições amostrais foram estatisticamente significativas.

Gráfico 1 - Diferença entre as amostras controle, 3Gy e 4Gy do voluntário 2.



Fonte: O autor (2021).

Para o voluntário 2, a relação entre as amostras, controle e irradiada 3Gy, apresentaram diferença estatística significativa ($*p < 0,05$), assim como as amostras controle e irradiada 4Gy ($**p < 0,05$). Nesse caso é possível diferenciar as amostras não irradiadas e irradiadas, entretanto, não é possível estimar a dose, uma vez que, não há diferença entre as amostras irradiadas 3Gy e irradiadas 4Gy.

Tabela 4 - Dimensão fractal: valores máximos, mínimos e médios, com desvio padrão e valor de p, em dois *software* de estatística distintos, para o voluntário 3.

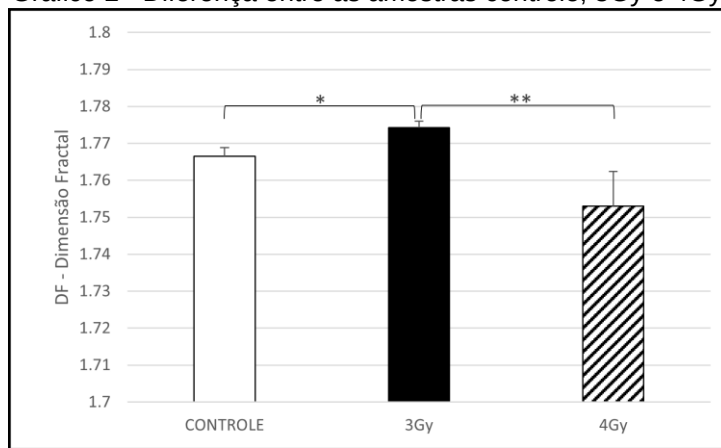
Software utilizado	Condição da amostra	Estatística Descritiva					Kruskal-Wallis
		Número de Células	Menor Dimensão Fractal	Maior Dimensão Fractal	Média	Desvio Padrão	
Excel suplemento Action	Controle	100	1,6587	1,8432	1,7665	0,0228	$p \cong 0,0028$
	Irradiadas 3Gy	100	1,7219	1,8264	1,7742	0,0181	
	Irradiadas 4Gy	100	0,8805	1,8571	1,7530	0,0943	
BioEstat	Controle	100	1,6587	1,8432	1,7665	0,0228	$p \cong 0,0029$
	Irradiadas 3Gy	100	1,7219	1,8264	1,7742	0,0181	
	Irradiadas 4Gy	100	0,8805	1,8571	1,7530	0,0943	

Fonte: O Autor (2021).

A diferença das dimensões fractais, entre as condições das amostras são estatisticamente significativas ($p < 0,005$) para o voluntário 3, em ambos os *softwares* de estatística utilizados.

É possível observar que as dimensões fractais das condições de análise do voluntário 3, estão entre 1 e 2, o que indica que o núcleo das células avaliadas, está entre uma linha e um plano, exceto o valor mínimo para amostra irradiada 4Gy (dimensão fractal = 0,8805), indicando que o núcleo da célula com esta dimensão fractal, está entre um ponto e uma reta (CAPRA, 1996). No gráfico 2 podemos identificar quais condições de amostras foram estatisticamente significativas.

Gráfico 2 - Diferença entre as amostras controle, 3Gy e 4Gy do voluntário 3.



Fonte: O Autor (2021).

Para o voluntário 3, a relação entre as amostras, controle e irradiada 3Gy, apresentou diferença estatística significativa ($*p < 0,05$), assim como as amostras Irradiada 3Gy e irradiada 4Gy ($**p < 0,05$). Entretanto, não houve diferença entre as amostras controle e irradiada 4G, mesmo a amostra controle sendo diferente da amostra irradiada 3Gy.

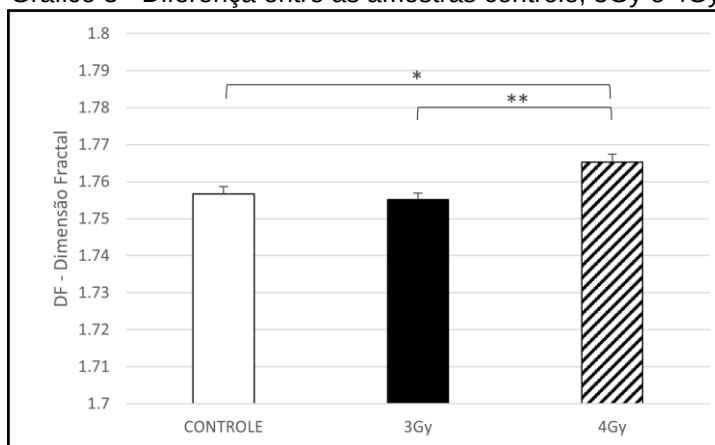
Tabela 5 - Dimensão fractal: valores máximos, mínimos e médios, com desvio padrão e valor de p , em dois *softwares* de estatística distintos, para o voluntário 4.

Software utilizado	Condição da amostra	Estatística Descritiva					Kruskal-Wallis
		Número de Células	Menor Dimensão Fractal	Maior Dimensão Fractal	Média	Desvio Padrão	Valor de p
Excel suplemento Action	Controle	100	1,6629	1,8030	1,7564	0,0206	$p \cong 0,0006$
	Irradiadas 3Gy	100	1,6838	1,7892	1,7552	0,0177	
	Irradiadas 4Gy	100	1,6986	1,8267	1,7652	0,0215	
BioEstat	Controle	100	1,6629	1,8030	1,7564	0,0206	$p \cong 0,0005$
	Irradiadas 3Gy	100	1,6838	1,7892	1,7552	0,0177	
	Irradiadas 4Gy	100	1,6986	1,8267	1,7652	0,0215	

Fonte: O Autor (2021).

A diferença das dimensões fractais, entre as condições das amostras são estatisticamente significativas ($p < 0,005$) para o voluntário 4, em ambos os *softwares* de estatística utilizados. É possível observar que as dimensões fractais para todas as condições de análise do voluntário 4, estão entre 1 e 2, o que indica que os núcleos das células avaliadas estão entre uma linha e um plano (CAPRA, 1996)). No gráfico 3 podemos identificar quais condições de amostras foram estatisticamente significativas.

Gráfico 3 - Diferença entre as amostras controle, 3Gy e 4Gy do voluntário 4.



Fonte: O Autor (2021).

Para o voluntário 4, a relação entre as amostras, controle e irradiada 4Gy, apresentaram diferença estatística significativa ($*p < 0,05$), assim como as amostras Irradiada 3Gy e irradiada 4Gy ($**p < 0,05$). Neste caso é possível diferenciar as amostras não irradiadas e irradiadas, entretanto em doses a partir de 4Gy. Não foi possível estimar a dose, uma vez que, a amostra controle é estatisticamente igual a amostra irradiada 3Gy e irradiada 4Gy.

3.7.3 Dimensão dos linfócitos, controle, irradiado 3Gy e Irradiado 4Gy, por condição de amostra.

Os resultados das dimensões fractais médias e valor de p , para as condições de amostra controle, irradiado 3Gy e irradiado 4Gy, entre os voluntários, são apresentados respectivamente, nas tabelas 7, 9, 11.

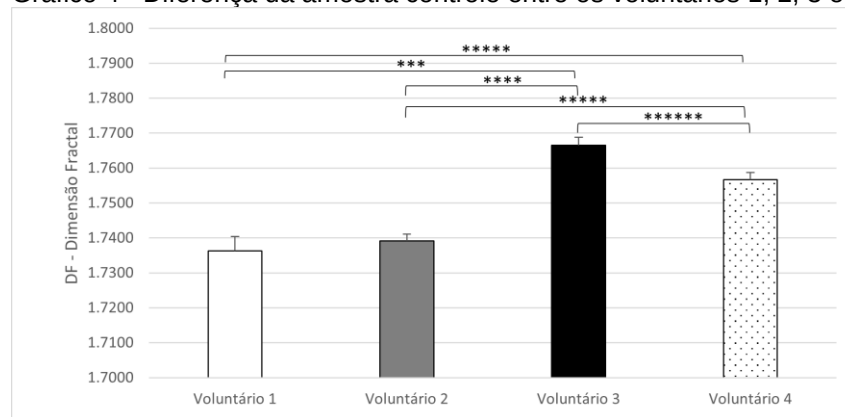
Tabela 6 - Condição de amostra controle entre os voluntários.

Software utilizado	Voluntários	Estatística Descritiva		Kruskal-Wallis
		Média	Desvio padrão	
Excel suplemento Action	1	1,7363	0,0412	$P < 0,0001$
	2	1,7392	0,0186	
	3	1,7665	0,0228	
	4	1,7564	0,0206	
BioEstat	1	1,7363	0,0412	$P < 0,0001$
	2	1,7392	0,0186	
	3	1,7665	0,0228	
	4	1,7564	0,0206	

Fonte: O Autor (2021).

Para condição de amostra controle, houve diferença estatística significativa ($p < 0,0001$). O gráfico 4 apresenta quais voluntários tiveram suas amostras controle diferentes.

Gráfico 4 - Diferença da amostra controle entre os voluntários 1, 2, 3 e 4.



Fonte: O Autor (2021).

Dentre as relações avaliadas, apenas a relação entre as amostras controle dos voluntários 1 e 2 não demonstraram diferença significativa. A relação completa consta na tabela 8.

Tabela 7 - Relação entre os voluntários para amostra controle.

Relação	Marcador	Valor de <i>p</i>
voluntario 1 – voluntario 2	-	$p > 0,05$
voluntario 1 – voluntario 3	*	$p < 0,05$
voluntario 1 – voluntario 4	**	$p < 0,05$
voluntario 2 – voluntario 3	***	$p < 0,05$
voluntario 2 – voluntario 4	****	$p < 0,05$
voluntario 3 – voluntario 4	*****	$p < 0,05$

Fonte: O Autor (2021).

Diante dos resultados apresentados, a maioria das amostras controle não compartilham dimensões fractais que sejam estatisticamente iguais.

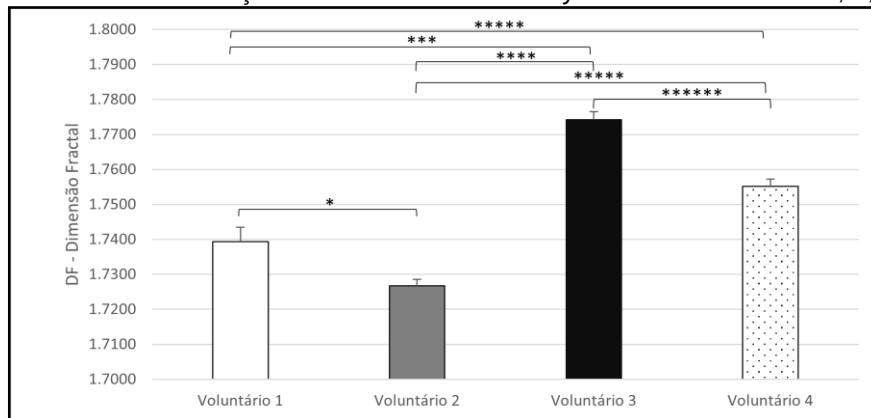
Tabela 8 - Diferença da amostra irradiada 3Gy entre os voluntários 1, 2, 3 e 4.

Software utilizado	Voluntários	Estatística Descritiva		Kruskal-Wallis
		Média	Desvio padrão	
Excel suplemento Action	1	1,7395	0,0165	$P < 0,0001$
	2	1,7267	0,0182	
	3	1,7742	0,0181	
	4	1,7552	0,0177	
BioEstat	1	1,7395	0,0165	$P < 0,0001$
	2	1,7267	0,0182	
	3	1,7742	0,0181	
	4	1,7552	0,0177	

Fonte: O Autor (2021).

Para condição de amostra Irradiada 3Gy, houve diferença estatística significativa ($p < 0,0001$). O gráfico 5, apresenta quais voluntários tiveram suas amostras irradiadas 3Gy.

Gráfico 5 - Diferença da amostra irradiada 3Gy entre os voluntários 1, 2, 3 e 4.



Fonte: O Autor (2021).

Nas amostras Irradiadas 3Gy, todos os voluntários tiveram diferença estatística significativa. A relação completa consta na tabela 10.

Tabela 9 - Relação entre os voluntários para amostra controle.

Relação	Marcador	Valor de p
voluntario 1 – voluntario 2	*	$p < 0,05$
voluntario 1 – voluntario 3	**	$p < 0,05$
voluntario 1 – voluntario 4	***	$p < 0,05$
voluntario 2 – voluntario 3	****	$p < 0,05$
voluntario 2 – voluntario 4	*****	$p < 0,05$
voluntario 3 – voluntario 4	*****	$p < 0,05$

Fonte: O Autor (2021).

Diante dos resultados apresentados, nenhuma das amostras irradiadas 3Gy, compartilham dimensões fractais que sejam estatisticamente iguais.

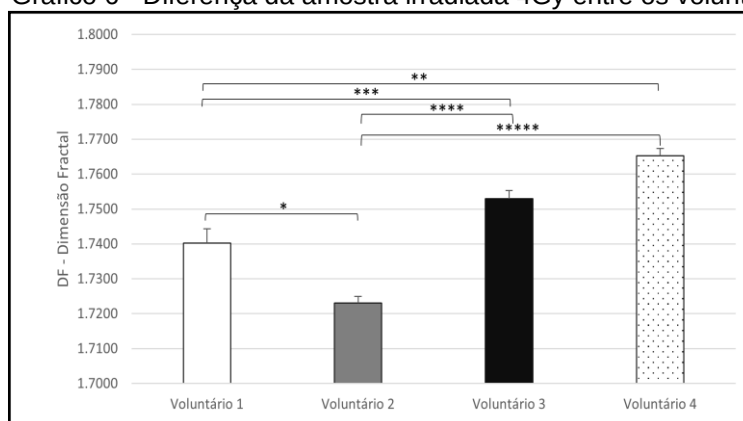
Tabela 10 - Diferença da amostra irradiada 4Gy entre os voluntários 1, 2, 3 e 4.

Software utilizado	Voluntários	Estatística Descritiva		Kruskal-Wallis
		Média	Desvio padrão	
Excel suplemento Action	1	1,7402	0,0178	$p < 0,0001$
	2	1,7231	0,0240	
	3	1,7530	0,0943	
	4	1,7652	0,0215	
BioEstat	1	1,7402	0,0178	$p < 0,0001$
	2	1,7231	0,0240	
	3	1,7530	0,0943	
	4	1,7652	0,0215	

Fonte: O Altor (2021).

Para condição de amostra Irradiada 4Gy, houve diferença estatística significativa ($p < 0,0001$). O gráfico 6, apresenta quais voluntários tiveram suas amostras irradiadas 4Gy diferentes.

Gráfico 6 - Diferença da amostra irradiada 4Gy entre os voluntários 1, 2, 3 e 4.



Fonte: O Autor (2021).

Dentre as relações avaliadas, apenas a relação entre as amostras irradiadas 4Gy, dos voluntários 2 e 3, não demonstraram diferença significativa. A relação completa consta na tabela 12.

Tabela 11 - Relação entre os voluntários para amostra irradiada 4Gy.

Relação	Marcador	Valor de <i>p</i>
voluntario 1 – voluntario 2	*	$p < 0,05$
voluntario 1 – voluntario 3	**	$p < 0,05$
voluntario 1 – voluntario 4	***	$p < 0,05$
voluntario 2 – voluntario 3	**	$p < 0,05$
voluntario 2 – voluntario 4	*****	$p < 0,05$
voluntario 3 – voluntario 4	-	$p > 0,05$

Fonte: O Autor (2021).

Diante dos resultados apresentados, a maioria das amostras irradiadas 4Gy, não compartilham dimensões fractais que sejam estatisticamente iguais.

4 DISCUSSÃO

Apesar da padronização da coloração por meio da automação, microscopicamente as células apresentaram uma coloração heterogênea e esta diferença ocorreu em todas as amostras. Isso acontece, porque no esfregaço, a distensão do sangue na lâmina, cria um gradiente de cor após a coloração. Quanto mais próximo do corpo do esfregaço, mais intensa a coloração fica (RODAK e CARR, 2013).

A identificação e o corte dos linfócitos nas fotomicrografias, foram baseados no aumento do brilho e contraste, o que possibilitou a limpeza de fundo das células menos coradas, como as hemácias. Entretanto, devido a coloração heterogênea dos linfócitos, discutido anteriormente, algumas células não foram identificadas corretamente.

O algoritmo de correção de erro foi eficiente na identificação manual de linfócitos não identificados. Contudo, essa solução pode ser um problema em casos que existam muitos linfócitos não identificados. Soluções alternativas como redes neurais, podem ser usadas futuramente para a identificação dos linfócitos (KUSUMOTO e YUASA, 2019).

Foi observada que todas as amostras, com exceção da amostra irradiada 4Gy do voluntário 3, apresentam uma variação de dimensão fractal entre 1 e 2, indicando que a imagem do núcleo dos linfócitos estão dimensionalmente entre uma reta e um plano (CAPRA, 1996). Entretanto, Xavier e colaboradores (2018) encontraram dimensões fractais variando entre 2 e 3, ou seja, entre um plano e uma esfera (CAPRA, 1996).

Xavier e colaboradores (2018) utilizaram o FracLac, que é um plugin do ImageJ, voltado para análise fractal. Contudo, o algoritmo utilizado foi o box counting diferencial, que renderiza a imagem em três dimensões baseado nos tons de cinza, ou seja, a intensidade do pixel em escala de cinza, é convertida em altura.

Ao avaliar a amostra irradiada 4Gy, do voluntário 3, que chegou a apresentar dimensão fractal igual a 0,8805 entre um ponto e uma reta (CAPRA, 1996), as imagens após o processamento foram analisadas, uma vez que, pela lógica, uma imagem que tem, apenas, comprimento e largura, não poderia ter dimensão menor que 1 (APÊNDICE A).

Ficou evidente, que pela coloração heterogênea, o aumento do brilho, fez algumas imagens desaparecer parcialmente ou ficar apagadas, resultando em dimensões fractais menores que 1. Uma possível solução, seria ajustar o algoritmo, para que o brilho seja aumentado de forma personalizada à coloração das imagens, para um melhor processamento. Entende-se como um bom processamento, aquele que mantém o contorno da imagem.

Embora a técnica de box counting utilizada tenha sido diferente da empregada por Xavier e colaboradores (2018), resultados com diferença significativamente estatística, para amostras irradiadas e não irradiadas, foram encontradas. Entretanto,

nem todos os voluntários apresentaram diferença estatística em suas amostras, a exemplo do voluntário 1.

O voluntário 2 apresentou diferença entre o controle e amostra irradiada 3Gy, e entre controle e amostra irradiada 4Gy. As alterações na dimensão fractal não acompanharam a dose para este voluntário, sendo apenas possível diferenciar a amostra não irradiada e irradiada a partir de 3Gy, uma vez que as amostras de 3Gy e 4Gy foram estatisticamente iguais.

O voluntário 3 mostrou diferença entre as amostras controle e irradiada 3Gy, mas não mostrou diferença entre o controle e uma dose maior, irradiada 4Gy. Entretanto, o processamento da amostra 4Gy para este voluntário não foi satisfatório (APÊNDICE A). Com isso, o resultado válido é de que para o voluntário 3 foi possível diferenciar amostra não irradiada e irradiada 3Gy.

O voluntário 4 mostrou diferença entre controle e amostra irradiada 4Gy, e entre irradiada 3Gy e irradiada 4Gy. Foi possível diferenciar a amostra não irradiada e a amostra irradiada, sendo esta a partir de 4Gy, uma vez que, as amostras controle e irradiada 3Gy, foram estatisticamente iguais.

Os resultados assemelham-se aos encontrados por Xavier e colaboradores (2018), em relação aos voluntários 2 e 3. No entanto, o voluntário 1 não apresentou diferença alguma e o voluntário 4 só apresentou diferença em doses maior que 3Gy. Uma possível explicação seria a radiosensibilidade individual, conceito bem estabelecido na literatura, desde o início do século XX. A radiosensibilidade individual tem relação com a propensão a reações teciduais, induzidas por radiação, atribuída a morte celular, sendo esta resposta particular de cada indivíduo (FERLAZZO et al, 2017).

Segundo Mirjolet e colaboradores (2015), os telômeros podem estar relacionados com a radiosensibilidade individual, sendo estes diferentes em cada indivíduo. Algumas hipóteses relacionam a sensibilidade de telômeros curtos, com mudanças na estrutura da cromatina ligadas a eucromatina, causando compactação da cromatina. Este dado reforça a ideia de que a dimensão fractal do núcleo dos linfócitos muda, mediante a alterações causadas na estrutura da cromatina, provocadas pela radiação ionizante. Entretanto, a magnitude dessa alteração é individual.

A relação entre as amostras controle para os voluntários 1, 2, 3 e 4, apresentou diferença significativamente estatística, exceto pelos voluntários 1 e 2, que foram

estatisticamente iguais. Com isso, a ideia de individualidade é reforçada. Essa diferença estatística se manteve nas amostras irradiadas 3Gy, com diferença entre todos os voluntários, e irradiadas 4Gy, que não apresentou diferença apenas entre os voluntários 3 e 4.

5 CONCLUSÃO

Apesar da pequena margem de erro na identificação dos linfócitos, o algoritmo desenvolvido se mostrou eficiente. No entanto, outras soluções podem ser aplicadas, como por exemplo, o uso de redes neurais artificiais.

O sistema de correção de erro foi capaz de solucionar o problema de identificações erradas, e se revelou como uma alternativa viável. Contudo, considerando um cenário onde muitas fotomicrografias apresentem falhas, essa não seria a melhor solução.

Na etapa de validação, obtivemos sucesso ao confrontar com a literatura, a dimensão fractal de objetos fractais e não fractais conhecidos. O algoritmo, portanto, é capaz de estimar a dimensão fractal de forma rápida e com grau de confiabilidade.

O *software* desenvolvido foi capaz de identificar amostras irradiadas e não irradiadas, entretanto, em alguns casos, possivelmente devido a sensibilidade individual à radiação ionizante, a diferenciação não foi possível ou só ocorreu a partir de 4Gy.

Contudo, o tipo de box counting usado, avalia apenas a distribuição das regiões cromossômicas, sugerindo-se uma avaliação por box counting diferencial. Ademais, é possível avaliar, também, a intensidade da coloração, que está relacionada diretamente a concentração de ácidos nucleicos da cromatina, e assim, aumentar a sensibilidade de identificação.

REFERÊNCIAS

- ALMASSALHA, L.M. *et al.* The Global Relationship between Chromatin Physical Topology, Fractal Structure, and Gene Expression. **Scientific Reports**, jan. 2017.
- ANTONIAZZI, R. **APLICAÇÃO DO MÉTODO BOX COUNTING PARA A ESTIMATIVA DA DIMENSÃO FRACTAL DE FIGURAS PLANAS DIGITALIZADAS MONOGRAFIA DE ESPECIALIZAÇÃO**. Monografia de Especialização - Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Geomática, Área de Concentração em Tecnologia da Geoinformação, da Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, p. 52.2007.
- ASSIS, Thiago. *et al.* Geometria fractal: Propriedades e características de fractais ideais. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, jul. 2008.
- AZZAM, Edouard. *et al.* Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. **Cancer Letters**, dez. 2012.
- BACKES, Andre; BRUNO, Ademir. Técnicas de Estimativa da Dimensão Fractal: Um Estudo Comparativo. **ResearchGate**, jul. 2005.
- BENDIN, Valcinir. *et al.* Fractal dimension of chromatin is an independent prognostic factor for survival in melanoma. **BioMedCentral**, jun. 2010.
- BERGONIÉ, J.; TRIBONDEAU, L. Interpretation of Some Results from Radiotherapy and na Attempt to Determine a Rational Treatment Technique. *Yale Journal of Biology and Medicine*, v. 76, p. 181 – 182, 2003.
- BERGONIÉ, J.; TRIBONDEAU, L. **Interpretation of Some Results from**
- BICUDO, Irineu. **Os elementos**. São Paulo. UNESP. 2009.
- BORRELL, R. *et al.* Parallel mesh partitioning based on Space Filling Curves. **ResearchGate**, jan. 2018.
- BUSHONG, S. C. *Ciência, radiologia para tecnólogos: física, biologia e proteção*. 9 ed. Editora: Elsevier, 2010.
- CAPRA, Fritjof. **A TEIA DA VIDA: Uma nova compreensão científica dos sistemas vivos**. São Paulo. Cultrix. 1996.
- CREMER, Thomas; CREMER, Marion. *et al.* Non-random radial arrangements of interphase chromosome territories: evolutionary considerations and functional implications. **Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, jan. 2002.
- EINSTEINS, Andrew. *et al.* Fractal characterization of chromatin appearance for diagnosis in breast cytology. **Journal of Pathology**, mar. 1998.
- ELEUTÉRIO, Aline. **O espaço de Hausdorff e a dimensão fractal: Estudo e abordagens no ensino fundamental**. 2021. Dissertação. (Mestrado Profissional em

Matemática em Rede Nacional) - Faculdade de Matemática, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2021.

FERLAZZO, M. L., Bourguignon, M., & FORAY, N. Functional Assays for Individual Radiosensitivity: A Critical Review. In **Seminars in Radiation Oncology** (Vol. 27, Issue 4, pp. 310–315).2017. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2017.04.003>

FERNANDES, Thiago; *et al.* Non-linear Dynamics of Chromosome Condensation Induced by Colcemid. **BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY**, fev. 2013.

FERNANDES, Thiago; *et al.* Unstable chromosomal aberrations and micronuclei analyses in the biomonitoring of workers occupationally exposed to ionising radiation. **ResearchGate**, jan. 2006.

GRACIOTTI, Maria Elizabeth. **Assistência de enfermagem a pacientes radio-acidentados em Goiânia**. São Paulo. IPEN. 1989.

GRASSBERGER, P. On the fractal dimension of the henon attractor. **PHYSICS LETTERS**. abril, 1983.

KERR, George; *et al.* Workshop report on atomic bomb dosimetry— Review of dose related factors for the evaluation of exposures to residual radiation at Hiroshima an Nagasaki. **Health Physics Society**, jun. 2015.

KUSUMOTO, D., & Yuasa, S. (2019). The application of convolutional neural network to stem cell biology. In **Inflammation and Regeneration** (Vol. 39, Issue 1).2019. <https://doi.org/10.1186/s41232-019-0103-3>

LIEBERMAN-AIDEN, Erez; *et al.* Comprehensive mapping of long range interactions reveals folding principles of the human genome. **NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH**, out. 2009.

LOGANOVSKY, Konstantin; YURYEV, Konstantin. EEG Patterns in Persons Exposed to Ionizing Radiation as a Result of the Chernobyl Accident: Part 1: Conventional EEG Analysis. **The Journal Neuropsychiatry**, out. 2001.

LOPES, R; BETROUNI, N. Fractal and multifractal analysis: A review. **Medical image Analysis**, maio. 2009.

MANDELBROT, Benoit. **The fractal geometry of nature**.W.H. FREEMAN. 1983.

MANDELBROT, Benoit; **Fractals and the Geometry of Nature**: Guided by the mathematics underlying a recently revived family of “monstrous” geometric shapes, computer drawing machines are producing realistic representations of some familiar but grossly irregular patterns in nature. 1983.

MARINELLI, Danilo; *et al.* **Fractals in biology and medicine**. Washington. SPRINGER BASEL AG. 1977.

MASHIAH, Adi; *et al.* Lymphoma and Leukemia Cells Possess Fractal Dimensions That Correlate with Their Biological Features. **KARGER**, abril. 2008.

METZE, Konradin. Fractal dimension of chromatin: potential molecular diagnostic applications for cancer prognosis. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, set, 2013.

MIRJOLET, C. *et al.* The role of telomeres in predicting individual radiosensitivity of patients with cancer in the era of personalized radiotherapy. In **Cancer Treatment Reviews** (Vol. 41, Issue 4, pp. 354–360).2015.. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2015.02.005>

MOURA, R. A. *et al.* **Técnicas de laboratório**, 3ªEd., Ed Atheneu, 1992.

NASCIMENTO, Maristal; *et al.* Uma proposta didática para o ensino de geometria fractal em sala de aula na educação básica. **VIDYA**, dez. 2012.

NUSSENZVEIG, H. Moysés. **COMPLEXIDADE & CAOS**. Rio de Janeiro. UFRJ/COPEA. 2003.

OKUNO, E.; CALDAS, I. L.; CHOW, C. Física para Ciências Biológicas e Biomédicas. São Paulo: 1 ed. Editora: Harbra, 1982.

OKUNO, Emico. Efeitos biológicos das radiações ionizantes. Acidente radiológico de Goiânia. ESTUDOS AVANÇADOS. USP. 2013.

OLIVEIRA, Marcilio; BELLO, Samuel. Livros didáticos de matemática: O ponto, a reta e o plano da geometria euclidiana e a transposição didática. **BRAZILIAN JOURNAL OF EDUCATION, TECHNOLOGY AND SOCIETY**, 2019.

PANIGRAHY, Chinmaya; *et al.* Differential box counting methods for estimating fractal dimension of gray-scale images: A survey. **Chaos, solitons and fractals**, jun. 2019.

PILGRIM, Ian; TAYLOR, Richard. **Fractal Analysis of Time-Series Data Sets: Methods and Challenges**. IntechOpen. 2018.

Radiotherapy and na Attempt to Determine a Rational Treatment Technique.

ROCCA, Héctor; *et al.* **Determinações de perfis de concentrações de cézio-137 nos focos principais do acidente radiológico ocorrido em Goiânia -GO**. São Paulo. IPEN. 1988.

RODAK, Bernadette F & CARR, Jacqueline H.. *Clinical Hematology Atlas*. 4th Edition. St. Louis: Saunders, 2013. <http://evolve.elsevier.com/Rodak/atlas/>

SILVA, Armando; YONEZAWA, Wilson. A GEOMETRIA EUCLIDIANA E AS GEOMETRIAS NÃO-EUCLIDIANA NUMA VISÃO EPISTEMOLÓGICA SEGUNDO A FILOSOFIA DE BACHELARD. **Revista de Produtos Educacionais e Pesquisas em Ensino**, 2017.

SILVA, M. B. S., **Hematologia, Técnicas Laboratoriais e Interpretação**, 28-32, 1988.

SILVA, Míriem; SOUZA, Wallysonn. Dimensão Fractal. **REVISTA ELETRÔNICA DE MATEMÁTICA**, 2010.

SO, G. B., SO, H. R., & JIN, G. G. Enhancement of the Box-Counting Algorithm for fractal dimension estimation. ***Pattern Recognition Letters***, (Vol 98, p 53–580).2017. <https://doi.org/10.1016/j.patrec.2017.08.022>

TANIZAWA, Hideki. Mapping of long-range associations throughout the fission yeast genome reveals global genome organization linked to transcriptional regulation. **NUCLEIC ACIDS RESEARCH**, out. 2018.

VITORIO, Jeferson; PRIMO, Aislan. GEOMETRIA DOS FRACTAIS E SUA INSERÇÃO NOS MEIOS FÍSICOS NATURAIS. **Caderno de Graduação Ciência Exatas e Tecnologias**, set. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies. International Atomic Energy Agency, 2011.

XAVIER, A. I. S. F. Fractal analysis of chromatin as a potential indicator of human exposures to ionizing radiation. **Scientia Plena**, jan. 2018.

Yale Journal of Biology and Medicine, v. 76, p. 181 – 182, 2003.

ZAGO, Marco Antonio et al. TRATADO DE HEMATOLOGIA. São Paulo: Atheneu, 2013. p 5.

ZIMMER, Christophe; FABRE, Emmanuelle. Principles of chromosomal organization: lessons from yeast. **THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY**, 2011.

**APÊNDICE A – AMOSTRA 4GY DO VOLUNTARIO 3, APÓS A CONVERSÃO
EM ESCALA DE CINZA**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100

Fonte: O Autor (2021).