



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e Comércio Exterior
Instituto Nacional de Propriedade Industrial

(21) BR 10 2012 015288-6 A2



* B R 1 0 2 0 1 2 0 1 5 2 8 8 A 2 *

(22) Data de Depósito: 21/06/2012
(43) Data da Publicação: 05/08/2014
(RPI 2274)

(51) Int.Cl.:
G01N 33/48
G06K 9/00
A61B 5/00

(54) Título: MÉTODO DE ANÁLISE E MENSURAÇÃO MORFOMÉTRICA NUCLEAR E USO DO MÉTODO DE ANÁLISE E MENSURAÇÃO MORFOMÉTRICA NUCLEAR

(73) Titular(es): Universidade Federal do Rio Grande do Sul

(72) Inventor(es): Eduardo Cremonese Filippi Chiela, Guido Lenz, Manuel Menezes de Oliveira Neto, Sidia Maria Callegari Jacques, Vinicius Duval da Silva

(57) Resumo: MÉTODO DE ANÁLISE E MENSURAÇÃO MORFOMÉTRICA NUCLEAR E USO DE MÉTODO DE ANÁLISE E MENSURAÇÃO MORFOMÉTRICA NUCLEAR. A presente invenção descreve método de análise e mensuração morfométrica além do uso do referido método para determinação do desenvolvimento de mecanismos de proliferação morte celular por células eucarióticas, preferencialmente apoptose, senescência, mitose ou catástrofe mitótica.

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

MÉTODO DE ANÁLISE E MENSURAÇÃO MORFOMÉTRICA NUCLEAR E USO DO MÉTODO DE ANÁLISE E MENSURAÇÃO MORFOMÉTRICA NUCLEAR

5 Campo da Invenção

A presente invenção descreve método de análise e mensuração morfológica, além do uso do referido método para determinação do desenvolvimento de mecanismos de proliferação e morte celular por células eucarióticas, preferencialmente apoptose, senescência, mitose ou catástrofe mitótica. A presente invenção pertence à área da farmacologia e medicina.

Antecedentes da Invenção

As células eucariotas são as células que possuem núcleo definido pela presença de um envoltório nuclear protetor, onde núcleo celular significa uma organela celular delimitada por um envoltório e que armazena o material genético celular. Esse núcleo, quando normal, é esférico, não apresentando nenhuma protuberância ou irregularidade de outra natureza.

A mitose representa processo pelo qual as células eucarióticas dividem seus cromossomos entre duas células filhas; para tal, a célula passa por 4 fases principais, nas quais o núcleo se torna condensado e os cromossomos se arranjam de diferentes maneiras até a fase de segregação para formação de dois novos núcleos idênticos. A apoptose, ou morte celular programada tipo I, consiste na condensação celular seguida da condensação nuclear, fragmentação nuclear e, finalmente, fragmentação celular (no chamado blebbing da membrana). Este é um processo induzido pela maioria das abordagens quimioterápicas anticâncer clássicas, sendo avaliado por técnicas que mensuram a ativação de proteínas envolvidas no processo apoptótico ou alterações na membrana celular. Porém, não há relatos de metodologias de avaliação morfológica nuclear para avaliação de apoptose em populações celulares.

A catástrofe mitótica é um evento celular que ocorre em células com defeitos na maquinaria de mitose (genéticos ou induzidos por fármacos) ou que apresentam dano no DNA e são forçadas a seguir no ciclo celular por alterações na sinalização do ponto de checagem ao final da fase G2 do ciclo celular (chamado de ponto de checagem de dano ao DNA). Dessa forma, durante a mitose, a deficiência de um dos componentes envolvidos no processo ou o conflito entre a presença de dano no DNA e a sinalização defeituosa do ponto de checagem de G2 leva à mitose defeituosa, chamada de catástrofe mitótica (CM). Este evento normalmente ocorre como precedente à morte da célula, apesar de alguns poucos estudos mostrarem que poderia favorecer a sobrevivência celular em aneuploidia.

Após sofrerem uma mitose catastrófica, os núcleos celulares apresentam alta heterogeneidade, invariavelmente irregulares e, quase que invariavelmente, aumentados em tamanho. Esta irregularidade pode se manifestar como a fragmentação nuclear, presença de micronúcleos, projeções ou protruções nucleares, arranjos cromossômicos aberrantes, entre outras formas.

A senescência celular é um processo de parada permanente no ciclo celular, induzida por replicações excessivas, dano em DNA, estresse oxidativo, drogas citotóxicas/citostáticas, entre outros. Neste processo, as células permanecem metabolicamente ativas, recebendo sinalizações e, da mesma forma, liberando moléculas sinalizadoras autócrinas e parácrinas para o meio extracelular. Morfologicamente, a senescência é caracterizada pelo alargamento e achatamento celular aumento do tamanho nuclear em células em cultura celular e aumento da acidez citoplasmática. Entretanto, a única metodologia objetiva atual para determinação da senescência celular é o ensaio da atividade da enzima beta-galactosidase. A atividade desta enzima está aumentada em células senescentes, podendo ser avaliada através da produção de substrato cromogênico. Entretanto, este ensaio apresenta limitações e pode gerar resultados falso-negativos ou falso-positivos.

O núcleo de células eucarióticas contém o material genético responsável por muitas características celulares, sendo envolto por um envoltório especializado denominado envoltório nuclear, formado principalmente pela membrana nuclear além de um arcabouço protéico denominado lâmina nuclear, tanto na parte interna do núcleo quanto na parte citosólica. A organização do material genético dentro do núcleo é bastante controlada, assim como a estrutura morfológica nuclear. Dessa forma, em células saudáveis, o núcleo sofre alterações fenotípicas fisiológicas mais visíveis apenas na fase da mitose, quando ocorre a condensação do material genético e arranjo cromossomal que permite a segregação dos mesmos para os pólos celulares, seguido da divisão celular em duas células-filhas. Neste processo, os componentes estruturais do envelope celular são desfeitos para permitir as alterações morfológicas fundamentais à mitose, após a qual há novamente a formação do envoltório nuclear. Entretanto, quando a célula sofre alguma injúria ou ativação de vias de morte celular programada, podem ocorrer alterações celulares que culminam ou com a adaptação celular ao contexto inadequado ou, mais comumente, com parada no crescimento e/ou morte celular. Entre os componentes celulares que sofrem alterações nestes dois últimos eventos está o núcleo, o qual apresenta alterações fenotípicas específicas em cada evento celular. Entre os processos de inibição do crescimento e morte celular que apresentam alterações morfológicas nucleares típicas e biologicamente significativas estão a apoptose, senescência e catástrofe mitótica. Dessa forma, a análise do estado morfológico nuclear constituída do tamanho e da forma do núcleo é uma ferramenta adicional importante para determinação do comportamento celular. Atualmente a determinação da morfologia nuclear é realizada apenas qualitativamente pelo operador, através da análise de imagens e determinação relativa do número de núcleos alterados, onde a classificação como "alterado" é dada subjetivamente pelo avaliador. A análise morfométrica nuclear é a análise do tamanho e da forma do núcleo.

No âmbito patentário, foram localizados alguns documentos relevantes que serão descritos a seguir.

O artigo "*Análise da morfometria nuclear: descrição da metodologia e o papel dos softwares de edição de imagem*" publicado em: *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. vol.44, no.1, Rio de Janeiro. Edição de 5 Fevereiro de 2008 descreve método de análise morfométrico compreendendo uso de software, no caso, *ImageTool 3,0* para mensuração automática de parâmetros em curto intervalo de tempo. O intuito principal é complementar o estudo morfométrico de células corrigindo problemas associados à captura das 10 imagens, como por exemplo, temperatura da amostra, matriz da cor, iluminação desigual, foco, fatores os quais podem dificultar uma correta análise, ou afetar diagnósticos realizados a partir destas análises. A presente invenção difere deste documento, pois descreve método para análise morfométrica de células eucarióticas compreendendo padronização de análise 15 dos parâmetros através de fórmula matemática e separação das subpopulações celulares em grupos específicos, determinados pela análise morfométrica; além de descrever o uso do método de análise morfométrica para a determinação do desenvolvimento de mecanismos nas células, especialmente apoptose, senescência, mitose ou catástrofe mitótica; fatos não 20 citados ou sugeridos no referido documento.

O documento WO 2011130645 descreve método de detecção e análise das margens de um tumor, além de analisar parâmetros morfométricos nucleares para discriminar entre o tecido normal e tumoral. O referido documento descreve a realização de uma comparação entre uma zona de 25 interesse do tecido tumoral e das zonas circundantes deste tecido por meio de análise morfométrica topológica do núcleo celular. As diferenças encontradas nestas amostras são indicativos de uma margem tumoral. Os espectros de refletância assim obtida da área de interesse são comparados com os espectros de refletância da zona circundante.

30 A presente invenção difere de WO 2011130645, pois descreve método para análise morfométrica de células eucarióticas compreendendo

padronização de análise dos parâmetros através de fórmula matemática e separação das sub-populações celulares em grupos específicos, determinados pela análise morfométrica; além de descrever o uso do método de análise morfométrica para a determinação do desenvolvimento de mecanismos nas células, especialmente apoptose, senescência, mitose ou catástrofe mitótica; fatos não citados ou sugeridos no referido documento.

O documento US 2006/0050946 descreve um método automatizado de análise morfométrica de células, não dependente da análise de um operador humano. Para tal, descreve o estado fisiológico das células com base na recolha automática de dados de *software* de processamento de imagem e análise estatística destes dados, as imagens das células são analisadas por um *software* de processamento que determina os vários estados das células analisadas. Os aspectos das imagens analisadas são: número de células na imagem, a área de pixel de cada célula, perímetro de cada célula, o volume de cada célula, elipticidade de cada célula, o número de núcleos por célula, área de pixel de cada núcleo, perímetro de cada núcleo, o volume de cada núcleo, da forma de cada núcleo, a área de pixel de núcleo, o grau de coloração para o ácido nucléico em cada núcleo, o número de centrômeros por célula, a área da secção transversal média das células, morfologia, a excentricidade, o grau de coloração para uma proteína citoplasmática, grau de coloração para uma proteína nuclear e padrão de coloração. Estes aspectos são analisados para determinar em que fase do ciclo celular as células se encontram (se as células estão em divisão, morrendo, em diferenciação ou em apoptose, se a síntese de proteína ou DNA foi inibida, ou se a transcrição foi inibida).

A presente invenção difere de US 2006/0050946, pois descreve um método para análise morfométrica de células eucarióticas compreendendo padronização de análise dos parâmetros através de fórmula matemática sem utilização de *software* para tal, e após, separação das sub-populações celulares em grupos específicos, determinados pela análise morfométrica; além de descrever o uso do método de análise morfométrica para a determinação do desenvolvimento de mecanismos nas células, especialmente apoptose,

senescência, mitose ou catástrofe mitótica; fatos não citados ou sugeridos no referido documento.

Do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

Sumário da Invenção

A presente invenção descreve metodologia para mensuração e análise morfológica de células eucarióticas, além do uso do referido método para determinação do desenvolvimento de mecanismos de proliferação e morte celular por células eucarióticas, preferencialmente apoptose, senescência, mitose ou catástrofe mitótica.

A presente invenção apresenta uma série de vantagens, incluindo: mensuração padronizada do tamanho e formato de núcleos; permite a análise de núcleos apoptóticos condensados. Assim, a análise é realizada previamente à soltura da célula da placa de cultura e à fragmentação celular; permite determinação do estado senescente celular, possibilita a análise de núcleos em mitose, mais especificamente núcleos condensados nas fases de metáfase, anáfase e telófase; permite determinação de evento de catástrofe mitótica.

É um objeto da presente invenção método de análise e mensuração morfológica nuclear, compreendendo as etapas de:

- a) Obtenção dos valores de variáveis de morfometria nuclear
- b) Cálculo de um índice de irregularidade nuclear (NII) para núcleo;
- c) Separação das populações nucleares a partir do tamanho nuclear e do NII;

Em uma realização preferencial a obtenção dos valores de variáveis de morfometria nuclear compreende análise de imagens microscópicas.

Em uma realização preferencial a análise compreende gráfico de área *versus* NII.

Em uma realização preferencial o índice de irregularidade nuclear (NII) ser calculado pela relação: $NII = b * B - c * C + d * D + e * E$; onde,

“A” é o tamanho nuclear;

5 “B” é o aspecto do núcleo da razão dos raios maior e menor da elipse equivalente ao objeto;

“C” é a razão entre a área do núcleo e a área da sua caixa delimitadora inferida;

“D” é a razão entre o maior e menor raio do núcleo;

10 “E” é a esfericidade do núcleo segundo a relação: $Esf = \text{perímetro} / (4 * \pi * \text{área})$; e onde $b=0,90$, $c=0,87$, $d=0,96$, $e=0,92$.

Em uma realização preferencial os núcleos são classificados em: normais (N), núcleos grandes e regulares (GR), núcleos grandes e irregulares (GI), núcleos com tamanho normal e irregulares (I), núcleos pequenos (P), núcleos pequenos e regulares (PR) e núcleos pequenos e irregulares (PI).

15 É, adicionalmente, um objeto da presente invenção o uso do método para determinação de mecanismos de proliferação e morte celular por células eucarióticas.

Em uma realização preferencial os ditos mecanismos de proliferação e morte celular são apoptose, senescência, mitose ou catástrofe mitótica.

20 Em uma realização preferencial ditas células eucarióticas são células submetidas a tratamentos farmacológicos ou modificações genéticas.

Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

25

Breve Descrição das Figuras

30 Figura 1: mostra a descrição teórica das variáveis utilizadas para cálculo do índice de regularidade nuclear (NII). No esquema, são mostradas as variáveis utilizadas para o cálculo do NII (esquerda), a definição e a representação de cada variável. Estes pesos podem ser zero ou qualquer outro valor positivo ou negativo. As variáveis são: (A) área de cada núcleo, (B) razão

entre o eixo maior e o eixo menor da elipse equivalente ao núcleo, (C) razão entre o raio maior e o raio menor de cada núcleo, (D) razão entre a área de cada objeto e a área de sua caixa delimitadora inferida, (E) esfericidade de cada objeto dada pela fórmula $(\text{perímetro})/(4*\pi*\text{área})$.

5 Figura 2: mostra um gráfico de NII (eixo x) versus área (eixo y) e a separação das populações nucleares através da ferramenta NMA. Os limites que definem os conjuntos de núcleos foram definidos com base na distribuição de todo o conjunto de núcleos em análise, podendo ser alterados pelo usuário da ferramenta de acordo com a população em estudo (à semelhança da
10 metodologia de citometria de fluxo). A elipse representa o intervalo de área e NII representativo de núcleos normais (ou regulares). Cruzes representam núcleos de controle usados na determinação dos parâmetros para os núcleos normais deste tipo celular, e triângulos representam núcleos teste. Os quadrados preenchidos representam a média de área e NII de cada sub-
15 população de núcleos. As siglas indicam o nome dado à população nuclear do respectivo quadrante, sendo: GR=grande e regular; GI=grande e irregular; N=normal; I=irregular; PR=pequeno e regular; P=pequeno; PI=pequeno e irregular.

20 Figura 3: mostra um modelo de gráfico obtido após uma análise NMA para análise de apoptose. Células foram tratadas com a droga Vincristina (Vinc), na concentração de 20 nM. À esquerda, são mostradas imagens dos núcleos (fluorescente – azul) e à direita são mostradas as células (visível). Os números indicam a porcentagem de núcleos em cada população nuclear. Pode-se observar um aumento de células com núcleos pequenos e regulares
25 (PR), típicos de apoptose, e redução de núcleos pequenos (P), típicos de mitose. N = normal; I = irregular; P = pequeno; GR = grande e regular; P1-P4 = núcleos pequenos de 1 a 4.

30 Figura 4: mostra um modelo de gráfico obtido após uma análise NMA para análise de senescência. Células foram tratadas com uma combinação de drogas indutoras de senescência. Em volta do gráfico são mostradas células marcadas com um marcador de senescência (em azul), à esquerda ou acima

no par de fotos, e os núcleos das mesmas à direita ou abaixo de cada par (preto – núcleo - e branco). Números indicam a relação do número de células azuis pelo total de núcleos no respectivo quadrante.

Figura 5: mostra um modelo de gráfico obtido após uma análise NMA para análise de catástrofe mitótica. Em (A) é mostrada a população controle, enquanto em (B) é mostrado o gráfico de núcleos de células tratadas com um composto indutor de catástrofe mitótica. Porcentagens indicam a porcentagem de núcleos em cada população. Em volta do gráfico, são mostradas imagens dos núcleos (fluorescente – azul).

Descrição Detalhada da Invenção

Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

A metodologia consiste na análise de imagens de núcleos de células eucarióticas e classificação objetiva dos núcleos baseada no tamanho e em um índice de irregularidade nuclear. Este índice é gerado a partir de quatro variáveis de regularidade morfométrica, selecionadas através de uma análise estatística objetiva realizada para obtenção das variáveis mínimas capazes de representar a forma do núcleo. A partir dos dados de tamanho e índice de irregularidade, é feita a separação gráfica dos núcleos em sub-populações diferentes representativas de um determinado mecanismo celular. A metodologia objeto da presente patente, além de ser pioneira no estudo morfométrico nuclear, apresenta as vantagens da objetividade, sendo assim menos sujeita a vieses de avaliação, além de mensurar a intensidade de alteração da regularidade e tamanho nucleares, a partir das médias da área e do índice de irregularidade de cada sub-população nuclear, conforme pode ser notado na figura 2.

Os principais aspectos da presente invenção serão descritos a seguir.

As utilizações da ferramenta apresentada são apenas exemplos de aplicações, não devendo ser apropriadas como limitantes da invenção.

Análises similares, bem como variáveis com nomenclaturas diferentes, mas com significado biológico similares às utilizadas aqui devem ser consideradas dentro do escopo da invenção.

A metodologia/ferramenta de Análise Morfométrica Nuclear (MNA)

5 O nome da metodologia desenvolvida – MNA - bem como os nomes da variável de tamanho celular (nomeada “área”), das variáveis utilizadas para cálculo do índice de irregularidade nuclear (nomeadas “Aspecto”, “Área/caixa”, “Razão de raios” e “Esfericidade”) e o próprio nome do índice de irregularidade nuclear (NII) são nomes utilizados apenas para facilitar a descrição ao longo do
10 relatório. Dessa forma, nomes alternativos para as mesmas variáveis ou mesmos significados biológicos devem ser considerados dentro do escopo da metodologia. MNA consiste nas seguintes etapas, a partir de imagens de núcleos celulares:

15 Obtenção dos dados de tamanho nuclear, das variáveis que compõem o índice de irregularidade nuclear e geração do NII.

A primeira etapa do MNA consiste em obter os dados de tamanho (área) e das variáveis de morfologia que compõem o NII, em um programa de análise de imagens. As características morfométricas (seguidas do nome e abreviatura) usadas neste método são: (A) Tamanho nuclear (área; área); (B)
20 Aspecto do núcleo, que se refere à razão dos raios maior e menor da elipse equivalente ao objeto (Aspecto; Asp); (C) razão entre a área do núcleo e a área da sua caixa delimitadora inferida (Área/caixa; Arcx); (D) razão entre o maior e menor raio do núcleo (Razão de Raios; Rr); e (E) Esfericidade do núcleo dada pela fórmula “Esf= perímetro/(4*π*área)” (Esfericidade; Esf). As medidas B, C,
25 D e E (Asp, Arcx, Rr e Esf, respectivamente) são agrupadas em um índice de irregularidade nuclear (NII) calculado pela fórmula:

$$NII = b * B - c * C + d * D + e * E$$

Equação 1: Determinação do índice de irregularidade nuclear (NII).

Onde: 'b', 'c', 'd' e 'e' são os pesos atribuídos às variáveis B, C, D e E, respectivamente. Os valores dos pesos utilizados nos exemplos demonstrados aqui foram $b=0,90$, $c=0,87$, $d=0,96$, $e=0,92$ e definem uma concretização preferencial, mas não limitante para a presente invenção. Tais valores foram obtidos após análise estatística, no entanto outros valores, diferentes destes, podem ser utilizados sem que o objeto da presente invenção seja alterado.

A análise e geração de NII com valores que não os citados aqui, de qualquer maneira, estão dentro do escopo da presente invenção. O objeto da presente invenção tem como objetivo o significado teórico das variáveis utilizadas, independente do nome atribuído às mesmas. Dessa forma, diversos programas de análise morfométrica de objetos podem ser utilizados para obtenção das variáveis com significados similares àqueles das variáveis utilizadas aqui, descritos na figura 1. Da mesma forma, a variável representativa do tamanho nuclear foi nomeada "área" apenas para facilitação, estando no escopo da presente patente o significado da mesma, independente da nomenclatura.

Separação das populações nucleares a partir do tamanho e regularidade nucleares.

Após a obtenção dos dados de área e a geração do NII para cada núcleo, os dados são plotados em um gráfico no qual há a separação das populações de núcleos. Estas populações correspondem a: núcleos normais em área e regularidade (núcleos controle), a partir dos quais é determinada a classificação dos núcleos em análise em normais (N), núcleos grandes e regulares (GR), núcleos grandes e irregulares (GI), núcleos com tamanho normal e irregulares (I), núcleos pequenos (P), núcleos pequenos e regulares (PR) e núcleos pequenos e irregulares (PI). Estas populações são ilustradas na figura 2. Os limiares que definem a separação entre as populações podem ser alterados pelo usuário para cada análise executada. A opção de eixos (eixo x =área; eixo y =NII), da mesma forma, não é restrita, podendo ser feita da maneira inversa (eixo x =NII; eixo y =área). E, finalmente, os nomes das populações utilizados na figura e no texto são apenas para facilitar o

entendimento da ferramenta. Nomes alternativos para tais núcleos devem ser considerados dentro do escopo da invenção.

Determinação do significado biológico da distribuição dos núcleos.

5 A distribuição dos núcleos nas diferentes populações citadas acima representa um significado biológico específico. Núcleos que aparecem no gráfico NMA com NII e áreas semelhantes à elipse de núcleos normais/regulares são núcleos normais (sub-população N); núcleos com NII elevado são classificados como grandes e irregulares (GI), irregulares (I) ou pequenos e irregulares (PI), e usualmente ocorrem em eventos de catástrofe mitótica; núcleos pequenos (condensados) e regulares (baixo NII) (sub-população PR) usualmente são representativos de apoptose inicial; núcleos pequenos (condensados), mas com NII intermediário (sub-população P) são tipicamente núcleos em mitose; e, finalmente, núcleos com área grande, mas regulares (baixo NII) (sub-população GR) são representativos de células senescentes. Confirmamos as observações acima utilizando o NMA, como descrito nos exemplos a seguir.

15 A utilização da presente ferramenta para qualquer análise que for executada se baseia na execução das três etapas descritas acima. Os exemplos são apenas demonstrações da funcionalidade da ferramenta, de modo que análises de outros eventos celulares através da MNA estão contidas dentro do escopo da invenção.

Realização Preferencial

Exemplo 1 - Análise da Morfometria Nuclear na Apoptose

25 O relato a seguir descreve a análise morfométrica nuclear de uma população celular para análise da indução de apoptose, confirmado por metodologias específicas para a indução de apoptose (ensaios de anexina e morfologia celular).

Material Biológico

30 A análise da morfometria nuclear para avaliação da apoptose pode ser realizada com células eucarióticas de diferentes espécies expostas a diferentes

condições. Aqui, a análise foi realizada na linhagem de fibroblastos aviários HD11 expostos ao agente quimioterápico vincristina in vitro, havendo um aumento do número de núcleos no quadrante PR (Figura 3). Porém, este modelo foi utilizado apenas como ferramenta de teste, não sendo a análise limitada a nenhum tipo celular específico.

Exemplo 2 – Análise da Morfometria Nuclear na Senescência Celular

O relato a seguir descreve a análise morfométrica nuclear de uma população celular para análise da indução de senescência celular, confirmado por metodologias específicas para a indução de senescência (morfologia celular e ensaio de beta-galactosidase).

Material Biológico

A análise da morfometria nuclear para avaliação da senescência pode ser realizada com células eucarióticas de diferentes espécies expostas a diferentes condições. A presente análise foi realizada em células de gliomas C6 expostas a um tratamento indutor de senescência celular, havendo um aumento do número de núcleos no quadrante GR, conforme ilustrado na figura 4. Porém, este modelo foi utilizado apenas como ferramenta de teste, não sendo a análise limitada a nenhum tipo celular específico.

Exemplo 3 – Análise da Morfometria Nuclear na Catástrofe Mitótica

O relato a seguir descreve a análise morfométrica nuclear de uma população celular para análise da indução de catástrofe mitótica (CM).

Material Biológico

A análise da morfometria nuclear para avaliação da catástrofe mitótica pode ser realizada com células eucarióticas de diferentes espécies expostas a diferentes condições. A presente análise foi realizada em células da linhagem de glioblastoma humano U87 expostas a um tratamento farmacológico indutor de catástrofe mitótica, havendo um aumento do número de núcleos nos quadrantes I e GI, conforme ilustrado na figura 5. Porém, este modelo foi utilizado apenas como ferramenta de teste, não sendo a análise limitada a nenhum tipo celular específico.

Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidos no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

MÉTODO DE ANÁLISE E MENSURAÇÃO MORFOMÉTRICA NUCLEAR E USO DO MÉTODO DE ANÁLISE E MENSURAÇÃO MORFOMÉTRICA NUCLEAR

- 5 1. Método de análise e mensuração morfométrica nuclear **caracterizado por** compreender as etapas:
- a) Obtenção dos valores de variáveis de morfometria nuclear
 - b) Cálculo de um índice de irregularidade nuclear (NII) para núcleo;
 - c) Separação das populações nucleares a partir do tamanho nuclear e
- 10 do NII;
2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** utilizar como variáveis morfometria: área, razão entre o raio maior e menor da esfera equivalente ao núcleo, razão entre a área do núcleo e a área da sua caixa delimitadora, razão entre o maior e menor raio e esfericidade.
- 15 3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** obtenção dos valores de variáveis de morfometria nuclear compreender a análise de imagens microscópicas.
4. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** dito índice de irregularidade nuclear (NII) ser calculado pela relação:
- 20 $NII = b * B - c * C + d * D + e * E$; onde,
- “A” é o tamanho nuclear;
 - “B” é o aspecto do núcleo da razão dos raios maior e menor da elipse equivalente ao objeto;
 - “C” é a razão entre a área do núcleo e a área da sua caixa delimitadora
- 25 inferida;
- “D” é a razão entre o maior e menor raio do núcleo;
 - “E” é a esfericidade do núcleo segundo a relação: $Esf = \text{perímetro} / (4 * \pi * \text{área})$; e onde $b=0,90$, $c=0,87$, $d=0,96$, $e=0,92$.
5. Uso do método de análise e mensuração morfométrica nuclear,
- 30 conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, **caracterizado**

por ser na determinação de mecanismos de proliferação e morte celular em células eucarióticas.

6. Uso, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado por** os ditos mecanismos de proliferação e morte celular são apoptose, senescência, mitose ou catástrofe mitótica.

7. Uso, de acordo com as reivindicações 4 e 5, **caracterizado pelas** ditas células eucarióticas serem células submetidas a tratamentos farmacológicos ou modificações genéticas.

Resumo

MÉTODO DE ANÁLISE E MENSURAÇÃO MORFOMÉTRICA NUCLEAR E USO DO MÉTODO DE ANÁLISE E MENSURAÇÃO MORFOMÉTRICA NUCLEAR

5 A presente invenção descreve método de análise e mensuração morfolométrica, além do uso do referido método para determinação do desenvolvimento de mecanismos de proliferação e morte celular por células eucarióticas, preferencialmente apoptose, senescência, mitose ou catástrofe mitótica.