

# Dimensão fractal na quantificação do grau de rejeição celular miocárdica pós-transplante cardíaco

*Fractal dimension in quantifying the degree of myocardial cellular rejection after cardiac transplantation*

Roberto Douglas MOREIRA<sup>1</sup>, Antonio Roberto MORIEL<sup>2</sup>, Luiz Otávio MURTA JUNIOR<sup>3</sup>, Leandro Alves NEVES<sup>4</sup>, Moacir Fernandes de GODOY<sup>5</sup>

RBCCV 44205-1262

## Resumo

**Introdução:** O termo “fractal” é derivado do latim *fractus*, que significa “irregular” ou “quebrado”, considerando a estrutura observada como tendo uma dimensão não-inteira. Há muitos estudos que empregaram a Dimensão Fractal (DF) como uma ferramenta de diagnóstico. Um dos métodos mais comuns para o seu estudo é a “Box-plot counting” (Método de contagem de caixas).

**Objetivo:** O objetivo do estudo foi tentar estabelecer a contribuição da DF na quantificação da rejeição celular miocárdica após o transplante cardíaco.

**Métodos:** Imagens microscópicas digitalizadas foram capturadas na resolução 800x600 (aumento de 100x). A DF foi calculada com auxílio do “software ImageJ”, com adaptações. A classificação dos graus de rejeição foi de acordo com a “Sociedade Internacional de Transplante Cardíaco e Pulmonar” (ISHLT 2004). O relatório final do grau de rejeição foi confirmado e redefinido após exaustiva revisão das lâminas por um patologista experiente externo. No total, 658 lâminas foram avaliadas, com a seguinte distribuição entre os graus de rejeição (R): 335 (0R), 214 (1R), 70 (2R), 39 (3R). Os dados foram analisados estatisticamente com os testes Kruskal-Wallis e curvas ROC sendo considerados significantes valores de  $P \leq 0,05$ .

**Resultados:** Houve diferença estatística significativa entre os diferentes graus de rejeição com exceção da 3R versus 2R. A mesma tendência foi observada na aplicação da curva ROC.

**Conclusão:** A DF pode contribuir para a avaliação da rejeição celular do miocárdio. Os valores mais elevados estiveram diretamente associados com graus progressivamente maiores de rejeição. Isso pode ajudar na tomada de decisão em casos duvidosos e naqueles que possam necessitar de intensificação da medicação imunossupressora.

**Descritores:** Fractais. Rejeição de Enxerto. Transplante de Coração. Biópsia.

## Abstract

**Introduction:** The term “Fractal” is derived from the Latin *fractus* meaning “irregular” or “broken” considering the observed structure with a non-integer dimension. There are many studies which employed the Fractal Dimension (FD) as a diagnostic tool. One of the most common methods for its study is the “Box Counting Method”.

**Objective:** The aim of the present study was to try to establish the contribution of FD in the quantification of myocardial cellular rejection after cardiac transplantation.

1. Médico Especialista em Cardiologia pelo Conselho Federal de Medicina; Professor Colaborador na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil.
2. Médico Patologista pela Sociedade Brasileira de Patologia; Médico Patologista do Instituto de Anatomia Patológica e Citopatologia de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, SP, Brasil.
3. Doutor em Física; Chefe do Departamento de Computação e Matemática da USP de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brasil.
4. Doutor em Engenharia Elétrica. Universidade Estadual Paulista, DEMAC, Rio Claro, SP, Brasil.
5. Livre-Docente em Cardiologia pela FAMERP; Diretor Adjunto de Ensino da FAMERP, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Trabalho realizado na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Endereço para correspondência:

Moacir Fernandes de Godoy. Rua Garabed Karabashian, 570 – Mansur Daud – São José do Rio Preto, SP, Brasil – CEP 15070-600.

E-mail: mfgodoy@netsite.com.br

Artigo recebido em 14 de fevereiro de 2011

Artigo aprovado em 8 de março de 2011

**Methods:** Microscopic digital images were captured at 800x600 resolution (magnification 100x). FD was calculated with the aid of "ImageJ software" with adaptations. The classification of the degrees of rejection was in agreement with the "International Society for Heart and Lung Transplantation" (ISHLT 2004). The final report of the degree of rejection was confirmed and redefined after an exhaustive review of the slides by an external experienced pathologist. 658 slides were evaluated with the following distribution among the degrees of rejection (R): 335 (0R); 214 (1R); 70 (2R); 39 (3R). The data were statistically analyzed with Kruskal-Wallis tests and ROC curves being considered significant values of  $P \leq 0.05$ .

**Results:** There was significant statistical difference between the various degrees of rejection with the exception of R3 versus R2. The same trend was observed in applying the ROC curve.

**Conclusion:** FD may contribute to the assessment of myocardial cellular rejection. Higher values are directly associated with progressively higher degrees of rejection. This may help in decision making of doubtful cases and those which contemplate the intensification of immunosuppressive medication.

**Descriptors:** Cardiac surgical procedures. Graft rejection. Heart transplantation. Biopsy.

## INTRODUÇÃO

Os métodos cirúrgicos atuais dos implantes cardíacos têm a finalidade precípua de possibilitar o prolongamento da vida, e embora tenham sido praticamente superadas as dificuldades técnico-cirúrgicas, científicas, sociais e éticas, ainda ressalta-se o problema da rejeição, sendo este um importante fator que pode limitar a vida útil do enxerto e, conseqüentemente, o sucesso em longo prazo [1,2].

A rejeição hiperaguda é uma forma incomum de rejeição. Ocorre como fator causal à presença de anticorpos citotóxicos pré-formados no receptor contra antígenos do doador. Caracteriza-se por disfunção súbita e irreversível do enxerto de minutos a horas após revascularização, com oclusão trombotica da microvasculatura, ao que se segue infiltrado neutrofilico e hemorragia no miocárdio [3].

A rejeição celular aguda é a principal causa de morbidade e mortalidade no período entre 30 dias e 12 meses pós-transplante e, juntamente com as rejeições crônicas e neoplasias, representa também uma importante causa de morte no pós-transplante tardio. Durante o primeiro ano pós-transplante, a incidência de rejeição aguda situa-se em torno de 40 episódios de rejeições por 100 pacientes por mês [4].

A rejeição aguda vascular caracteriza-se por dano à microcirculação, geralmente mediado por anticorpos, cuja especificidade não está completamente esclarecida. Linfócitos T também podem contribuir. O principal substrato morfológico é a deposição de imunoglobulinas e complemento na microcirculação, associada à vasculite ou à tumefação endotelial. Apesar de alguns autores referirem incidência elevada, a rejeição vascular não tem sido considerada complicação rotineira na maioria dos centros [3].

A rejeição crônica ou doença vascular do enxerto representa importante complicação, sendo o principal fator limitante da sobrevida em fase tardia do transplante. A doença vascular do enxerto é a responsável pela maioria dos óbitos no seguimento tardio pós-transplante e sua incidência atinge valores estimados de 10% ao ano de pós-operatório, chegando a 40-50% em receptores que completam o quinto ano de seguimento [5].

O estudo da rejeição cardíaca pós-transplante é muito importante para o tratamento adequado dos pacientes. Atualmente, este procedimento é realizado utilizando-se biopsias endomiocárdicas (EMB) seriadas ou motivadas pelo quadro clínico. A preocupação com a rejeição é tão importante que vários métodos para avaliação têm sido propostos, a exemplo de marcadores da bioquímica e ecocardiografia. Entretanto, ainda não se conseguiu prever adequadamente este evento e, por isso, novas investigações com esta abordagem devem ser estimuladas.

O diagnóstico de rejeição pós-transplante cardíaco repousa fundamentalmente na avaliação histopatológica de biopsias endomiocárdicas, uma vez que as alterações funcionais decorrentes da rejeição se expressam em geral mais tardiamente. A avaliação histológica de EMB, entretanto, apresenta problemas de sensibilidade e nem sempre permite a distinção entre episódios de rejeição leves, autolimitados, e aqueles que irão progredir para quadros mais sérios. Desta maneira, tornam-se importantes pesquisas sobre outros métodos que, isoladamente, ou em conjunto com a avaliação histológica de biopsias endomiocárdicas, possam contribuir para uma maior precisão no diagnóstico de rejeição do transplante cardíaco [4].

Ao longo dos anos, diversos métodos têm sido propostos para a gradação histológica da rejeição cardíaca. Os graus propostos na Workformulation WF 90 da

*International Society for Heart & Lung Transplantation* (ISHLT) foram baseados primariamente na quantidade de infiltrado inflamatório e a presença de dano ao miócito. Em 1990, Billingham et al. [6], na Universidade de Stanford, representando o Grupo de Estudos da Rejeição Cardíaca da ISHLT, publicaram uma formulação para padronização da nomenclatura no diagnóstico das rejeições cardíaca e pulmonar.

Essa formulação sofreu uma análise crítica em 2003 [7] e, em 2004, um grupo de trabalho multidisciplinar, composto de especialistas internacionais em transplante cardíaco, encontrou-se para revisar as definições da classificação de 1990 em termos de rejeição celular e mediada por anticorpos, além de identificar áreas de dificuldade na interpretação de biopsias pós-transplante e, finalmente, revisar o sistema de gradação. Havia um forte consenso de que qualquer alteração na formulação deveria refletir a prática patológica vigente e não deveria afetar a gradação de amostras históricas. Assim, a questão não foi propriamente de uma mudança na escala de gradação de 1990, mas uma forma de definir mais claramente como patologistas e cardiologistas deveriam interpretar o sistema de gradação.

O Quadro 1 traz uma comparação entre a classificação de 1990 e as alterações propostas em 2004.

### Geometria Fractal

Se um segmento de reta for medido usando algum elemento medidor que tenha comprimento  $r$  equivalente a  $1/3$  daquele segmento de reta, obviamente serão necessários três elementos para sobrepor completamente o referido segmento e isso será válido para qualquer fração escolhida, infinitamente. Matematicamente, a quantidade

de elementos necessários para sobrepor esse segmento de reta é dada por  $1/r$ . Se agora tentarmos sobrepor totalmente um quadrado de lado  $l$  com pequenos quadrados com comprimento de lado  $r$ , se cada pequeno quadrado tiver como medida de lado  $r$ , o valor 0,5 então serão necessários quatro quadrados e matematicamente essa quantidade pode ser obtida pela formulação  $1/r^2$ . Por fim, se usarmos pequenos cubos para ocupar totalmente o volume de um cubo de  $1 \times 1 \times 1$ , e se cada lado  $r$  dos pequenos cubos, por exemplo, medir 0,5 serão necessárias oito unidades. Alternativamente, se cada lado  $r$  medir  $1/3$  (como se vê geralmente naqueles quebra-cabeças chamados *Cubo Mágico*) então serão necessárias 27 unidades, ou seja, independentemente do valor de  $r$ , no caso de preenchimento de um cubo sempre serão necessárias  $1/r^3$  unidades.

Relembrando que, no caso da superposição de um quadrado com vários pequenos quadrados, a quantidade esperada era de  $1/r^2$  e para sobrepor um segmento de reta com vários pequenos segmentos era de  $1/r$ . Então, fica claro que o expoente, especificamente para essas estruturas consideradas, é sempre o mesmo que a dimensão do objeto que estamos tentando sobrepor ou preencher, ou seja, um no caso da linha reta, dois no caso do quadrado e três no caso do cubo.

Para uma formulação genérica então, teremos:

$$N_r = r^{-D}$$

na qual  $N_r$  é a quantidade de elementos iguais necessários para sobrepor ou preencher o objeto original, sendo  $r$  a régua ou escala aplicada ao objeto e  $D$  a dimensão da referida estrutura ou objeto.

Quadro 1. Comparação entre os sistemas de gradação da rejeição celular aguda nas classificações de 1990 e 2004 da Sociedade Internacional de Transplante Cardíaco e Pulmonar (ISHLT).

1990	2004
Grau 0 (sem rejeição aguda)	Grau 0R (sem rejeição aguda)
Grade 1A (rejeição aguda focal leve)	
Grau 1B (rejeição aguda difusa leve)	Grau 1R (rejeição celular aguda leve, de baixo grau): infiltrado intersticial e/ou perivascular com até 1 foco de dano ao miócito.
Grau 2 (rejeição aguda focal moderada)	
Grau 3A (rejeição aguda multifocal moderada)	Grau 2R (rejeição celular aguda, moderada, de grau intermediário): 2 ou mais focos de infiltrado com associação de dano ao miócito
Grau 3B (rejeição aguda difusa grave limítrofe)	Grau 3R (rejeição celular aguda, grave, de alto grau): infiltrado difuso com dano multifocal de miócitos com ou sem edema, hemorragia ou vasculite.
Grau 4 (rejeição aguda grave)	

Até aqui estivemos tratando de estruturas ditas regulares e que obedecem à Geometria Euclidiana. Nessas estruturas, o tamanho do objeto medido é sempre o mesmo, independentemente do tamanho da régua ou escala utilizada. A grande maioria das estruturas da natureza, porém, são ditas “Fractais”.

O neologismo “Fractal”, deriva do adjetivo latino *fractus*, que significa “irregular” ou “quebrado”, servindo para indicar que o objeto ou estrutura observada não tem um número inteiro como dimensão, podendo assumir valores como 1,75 ou 1,3492621, por exemplo. Abriu-se, com isso, espaço então para estudo e aplicação da Geometria Fractal.

A “Geometria Fractal” foi primeiramente introduzida por Richardson (*apud* Karperien et al., 2008) [8], em 1960, para descrever as linhas costeiras. Richardson constatou que, dependendo da escala usada para medir uma linha costeira, o comprimento total obtido podia variar. Mais especificamente falando, um decréscimo na escala poderia redundar eventualmente em um aumento não linear no comprimento. Essa constatação foi popularizada por Benoit Mandelbrot, resultando no que se denomina atualmente de Análise Fractal, largamente aplicada em vários ramos da Ciência.

A manipulação matemática da Equação 1 fornece a solução para a obtenção do que se denomina como Dimensão Fractal, apresentada na Equação 2, a seguir:

$$DF = \lim_{r \rightarrow 0} (\text{Log } Nr / \log r^{-1})$$

Para o caso de lâminas histológicas, existem diversas técnicas para a determinação da dimensão fractal. Dentre elas, a técnica do *Box-counting* é uma das mais utilizadas. Nesta técnica, utiliza-se a sobreposição da imagem com quadrados de lados *r* progressivamente menores e, neste caso, *N<sub>r</sub>* é a quantidade de quadrados de lado *r* necessários para cobrir a imagem, a cada tamanho escolhido. A *DF* então será a inclinação da linha de regressão daqueles dois log-valores, ou seja, do tamanho do lado *r* e da quantidade de quadrados *N<sub>r</sub>* [8]. A literatura médica contém vários trabalhos que utilizam a dimensão fractal como ferramenta diagnóstica. Assim, a dimensão fractal já foi utilizada para estudo de neurônios e células da glia, células ganglionares da retina, células ósseas, estudos histopatológicos de neoplasias, vasculatura renal e pulmonar, morfometria de hepatócitos, fibrose hepática e estrutura de DNA, entre muitos outros [9,10].

## MÉTODOS

Todas as biopsias endomiocárdicas foram realizadas no mesmo Serviço e os fragmentos de miocárdio foram obtidos com auxílio de biótomo específico. O biótomo foi introduzido preferencialmente pela veia jugular direita e,

excepcionalmente, pela veia femoral direita ou jugular esquerda. Os fragmentos de miocárdio (geralmente três) foram fixados em solução de formol tamponado a 10% e processados por método de inclusão em parafina. Os cortes foram corados em Hematoxilina-Eosina (H&E). Todo esse processamento foi feito no mesmo Serviço de Anatomia Patológica.

As imagens microscópicas foram capturadas digitalmente utilizando-se de Microscópio Trinocular Olympus BX41 com objetiva planacromática de 10x acoplada a uma câmera digital color Samsung SCC-131, com adaptador Olympus U-TV1X-2 na resolução 800x600 (aumento total 100 x) e armazenadas em arquivos do tipo “jpeg”.

Em face da nova classificação dos graus de rejeição utilizada no presente estudo, de acordo com o sistema recomendado pela ISHLT [11], o laudo inicial de cada caso foi revisto e o parecer conclusivo do grau de rejeição foi confirmado ou redefinido após exaustiva reavaliação das lâminas por um patologista experiente (ARM), respaldado por pareceres complementares quando a dúvida justificasse. No total, foram avaliadas 658 lâminas, com a seguinte distribuição entre os graus de rejeição: 335 (0R); 214 (1R); 70 (2R); 39 (3R).

A dimensão fractal foi estimada pelo método *Box-counting*, com auxílio do *software* ImageJ do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH), amplamente utilizado na literatura e disponível gratuitamente na Internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Esse *software* considera o *Box-counting* em duas dimensões, permitindo a quantificação da distribuição de pixels nesse espaço, não considerando, portanto, a textura da imagem. A influência disso é que duas imagens com a mesma distribuição dos pixels, uma binarizada e outra em níveis de cinza, possuirão a mesma dimensão fractal. Por este fato a *DF* calculada com o ImageJ ficará sempre entre 0 e 2, não distinguindo texturas diferentes. O programa recebeu implementação adicional do físico e engenheiro LOMJ, com “*plugins*” que facilitaram a coleta dos resultados de forma global, incluindo a possibilidade de estudo concomitante da Entropia de Shannon e a Contagem de Núcleos Celulares.

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do *software* Stats Direct versão 2,7,2. Foi feita a estatística descritiva e para comparação entre os grupos 0R, 1R, 2R e 3R, utilizou-se o teste estatístico não-paramétrico de Kruskal-Wallis. No caso de detecção de diferença estatística global foi feita a comparação intergrupos pelo método Dwass-Steel-Chritchlow-Fligner. Os resultados também são apresentados graficamente no formato *Box-plot*, tendo sido acrescentados ainda os cálculos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia, complementando-se com a apresentação das Curvas ROC com as respectivas áreas sob a curva. Admitiu-se erro alfa de

5%, sendo considerados significantes valores de *P* menores ou iguais a 0,05.

O projeto foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Instituição, tendo recebido o parecer favorável número 403/2007, em 17/12/2007.

**RESULTADOS**

A estatística descritiva dos valores da Dimensão Fractal nos diferentes graus de rejeição encontra-se na Tabela 1.

A Figura 1 mostra os gráficos *Box-plot* da distribuição dos valores da Dimensão Fractal nos graus de rejeição 0, 1, 2 e 3. Observa-se uma tendência de que os níveis mais elevados de rejeição cardíaca estejam relacionados com maiores valores de Dimensão Fractal.

A análise estatística pelo método não-paramétrico de Kruskal-Wallis mostra a existência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos (*P* < 0,0001). A comparação intergrupos pelo método Dwass-Steel-Christchlow-Fligner mostra diferença significativa (*P* < 0,0001) para todas as combinações, exceto para Grupo 3R *versus* Grupo 2R (*P*=0,9592).

Tabela 1. Estatística descritiva dos valores da Dimensão Fractal nos diferentes graus de rejeição (Graus 0, 1, 2 e 3)

Variável	Rejeição Grau 0	Rejeição Grau 1	Rejeição Grau 2	Rejeição Grau 3
Nº imagens	335	214	70	39
Média	1,1795	1,3178	1,5396	1,5512
Desvio-padrão	0,1529	0,1431	0,1175	0,1194
Máximo	1,6890	1,6969	1,7406	1,7279
Quartil superior	1,2556	1,4041	1,6273	1,6499
Mediana	1,1626	1,3026	1,5609	1,5808
Quartil inferior	1,0830	1,2143	1,4639	1,4545
Mínimo	0,8360	0,8833	1,2325	1,2459
Coef. variação	0,1298	0,1085	0,0763	0,0769

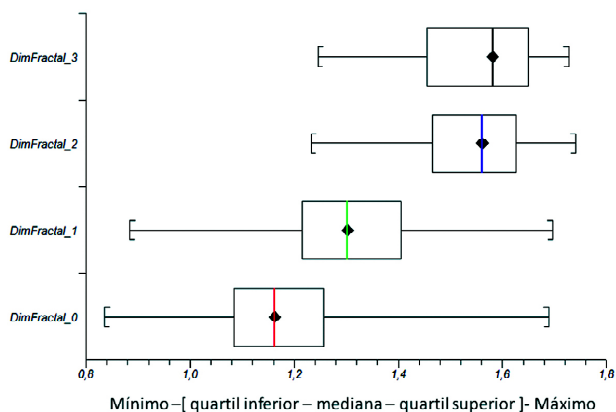


Fig. 1 - Gráfico *Box-plot* (valor mínimo, quartil inferior, mediana, quartil superior, valor máximo) da dimensão fractal das lâminas de biopsia endomiocárdica, nos diferentes graus de rejeição cardíaca

A Figura 2 demonstra que as melhores discriminações foram obtidas na diferenciação entre grau 2 *versus* grau 0 e entre grau 3 *versus* grau 0, com áreas sob a curva, respectivamente, de 0,9560 (IC95% 0,9199 a 0,9922) e 0,9594 (IC95% 0,9127 a 1,0000).

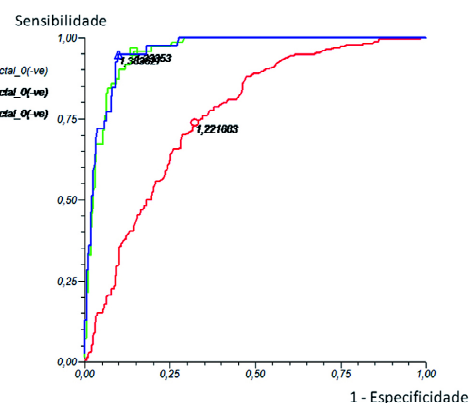


Fig. 2 - Gráfico Curva ROC para diferenciação pela dimensão fractal entre os diferentes graus de rejeição cardíaca (Grau 3 *versus* 0; Grau 2 *versus* 0 ; Grau 1 *versus* 0)

Já para a diferenciação entre grau 1 *versus* 0, a área sob a curva não foi tão expressiva, embora ainda considerada moderadamente elevada, sendo de 0,7608 (IC95% 0,7177 a 0,8040).

Na diferenciação entre graus 3 *versus* 2, a área sob a curva foi de 0,5289 (IC95% 0,4104 a 0,6474) não havendo, portanto, separação entre os grupos 3 e 2 em termos de Dimensão Fractal.

Os níveis de corte para as diferentes comparações foram:

- Grupo 3R *versus* 0R: maior ou igual a 1,3836;
- Grupo 2R *versus* 0R: maior ou igual a 1,3335;
- Grupo 1R *versus* 0R: maior ou igual a 1,2216;
- Grupo 3R *versus* 2R: maior ou igual a 1,6643.

A Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo e Valor Preditivo Negativo dos diferentes níveis de corte na separação entre os grupos encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo e Valor Preditivo Negativo nas diferenciações entre diversos graus de rejeição (Grau 3 *versus* 0; Grau 2 *versus* 0; Grau 1 *versus* 0 e Grau 3 *versus* 2) de acordo com os níveis de corte, para Dimensão Fractal.

	Grau 3 Versus 0	Grau 2 Versus 0	Grau 1 Versus 0	Grau 3 Versus 2
Nível de corte	1,3836	1,3335	1,2216	1,6643
Sensibilidade	0,9487	0,9571	0,7383	0,2307
Especificidade	0,9014	0,8567	0,6776	0,8857
Valor preditivo positivo	0,5286	0,5826	0,5940	0,5294
Valor preditivo negativo	0,9934	0,9896	0,8022	0,6739

Na sequência, são apresentados alguns casos ilustrativos dos diferentes aspectos histológicos e respectivos valores de Dimensão Fractal, dentro de cada grau de rejeição cardíaca (Figura 3).

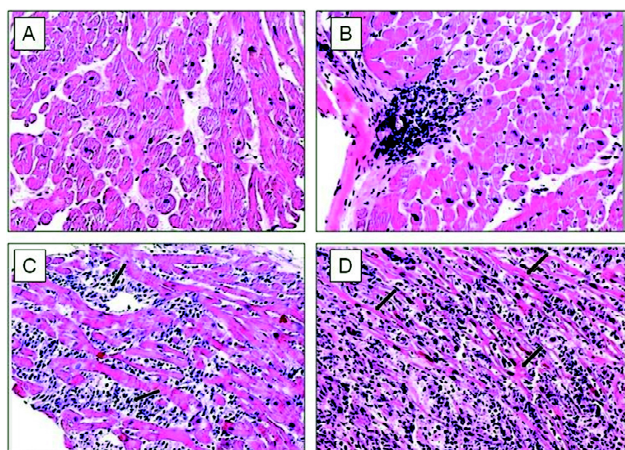


Fig. 3 - Microfotografias de biopsias endomiocárdicas (Hematoxilina-Eosina 100x), demonstrando no Painel A fibras miocárdicas em secção transversal (na região centro-esquerda) e longitudinal (na região direita) com arquitetura preservada e espaço intersticial sem sinais de infiltrado inflamatório. Ausência de rejeição (Grau 0R). Dimensão Fractal = 1,109; Painel B, na região central esquerda, foco único de infiltrado mononuclear agressivo, subendocárdico, com envolvimento de miócitos, destruição e apagamento da arquitetura regional. Rejeição celular aguda leve (Grau 1R). Dimensão Fractal = 1,370; Painel C com moderado infiltrado mononuclear e múltiplos focos de agressão aos miócitos (setas), ocasionando destruição e alargamento dos espaços intersticiais; Rejeição celular aguda moderada (Grau 2R). Dimensão Fractal = 1,460; Painel D com alteração da arquitetura por intenso infiltrado inflamatório mononuclear difuso, agressivo, com destruição maciça dos miócitos. Observar algumas fibras residuais em secção longitudinal (setas) permeadas pelo processo inflamatório; Rejeição celular aguda grave (Grau 3R). Dimensão Fractal = 1,670.

## DISCUSSÃO

A distribuição dos linfócitos infiltrantes no tecido cardíaco é diretamente proporcional ao padrão de classificação histológica (0R, 1R, 2R e 3R), o que sugere que a distribuição destas células apresenta dimensão fractal característica, que pode ser relacionada à migração linfocitária. De fato, os linfócitos T CD4 e CD8 infiltram os tecidos durante o processo inflamatório da rejeição como resultado da estimulação determinada por mecanismos de ativação mediados por diferenças antigênicas entre o receptor e o doador [12]. Além disso, os níveis de citocinas pró-inflamatórias que o receptor expressa influenciam a intensidade da rejeição e a taxa de sobrevivência dos enxertos.

Os fatos acima relatados justificam o aumento progressivo da dimensão fractal documentado no presente estudo, uma vez que a quantidade de células inflamatórias também se apresentou de forma crescente e estatisticamente significativa.

A dimensão fractal do objeto conta o número efetivo de graus de liberdade no sistema dinâmico e, portanto, quantifica a sua complexidade. Assim, infere-se que imagens evidenciando maior dimensão fractal sejam, conseqüentemente, mais complexas. Isso foi realmente percebido no presente estudo, no qual imagens sem rejeição aparentavam na impressão visual menor complexidade que imagens com rejeição. Não se pode, porém, apenas pelo aspecto visual, quantificar essa complexidade. A dimensão fractal viria então sanar essa dificuldade ao adicionar um valor numérico objetivo.

Kido et al. [13] analisaram a dimensão fractal de anormalidades intersticiais pulmonares em radiogramas de tórax. Um dos métodos empregados foi o *Box-counting*. Compararam 100 regiões de interesse de radiografias de 50 pacientes com anormalidade intersticial pulmonar e compararam com 100 regiões de interesse de radiografias de 50 pacientes com pulmões normais. A dimensão fractal obtida nos casos com doença intersticial foi significativamente maior quando comparada aos pulmões normais ( $1,67 \pm 0,10$  versus  $1,44 \pm 0,12$ , respectivamente;  $P < 0,001$ ).

Wielgus et al. [9] avaliaram a dimensão fractal das vilosidades terminais de placentas maduras de mulheres fumantes e não-fumantes durante o terceiro trimestre da gravidez. As placentas foram obtidas de 60 mulheres saudáveis, primíparas, que não haviam recebido tratamento hormonal e que estavam na faixa etária entre 18 e 27 anos. Foram estudados três grupos: não-fumantes, fumantes até 30 cigarros por dia e fumantes de mais de 30 cigarros por dia. Um dos métodos utilizados para quantificação da dimensão fractal foi o *Box-counting*.

Os resultados levaram à conclusão de que a dimensão fractal obtida com essa técnica, independentemente de vários fatores, permite estimar o grau de densidade de vilosidades terminais placentárias. Aqui, a densidade significava a proporção entre a superfície das vilosidades e a superfície total da preparação analisada. Encontraram, ainda, que a dimensão fractal aumentou diretamente com relação ao número de cigarros fumados durante a gestação, embora nos dois grupos de mulheres fumantes a dimensão fractal foi significativamente menor que no caso de não-fumantes ( $1,295 \pm 0,021$ ;  $1,36 \pm 0,009$ ;  $1,63 \pm 0,012$ , respectivamente).

Vasilescu et al. [14] avaliaram a Dimensão Fractal na diferenciação diagnóstica entre tipos de carcinoma gástrico. Utilizaram entre outras, a técnica do *Box-counting* que foi por eles considerada a técnica mais apropriada. Compararam a dimensão fractal da interface entre o tecido epitelial



maligno e o tecido de suporte (estroma), procurando relacionar a dimensão fractal dessa região com o grau de invasividade do tumor. Incluíram em seu estudo 20 casos de carcinoma gástrico e dois casos de tecido gástrico normal. O grupo do carcinoma foi dividido em dois subgrupos: os que apresentavam a chamada forma intestinal e os que apresentavam a forma difusa.

A forma intestinal tem uma estrutura glandular definida com células que se assemelham ao do câncer intestinal, sendo menos invasivo. O tipo difuso é composto por células isoladas ou pequenos agrupamentos celulares que infiltram as camadas da parede gástrica. Encontraram que menores valores de dimensão fractal estiveram significativamente associados com maior invasividade do tumor, ou seja, a dimensão fractal da interface epitélio-estroma foi bem menor para o carcinoma gástrico tipo difuso. Os valores da média e desvio-padrão para a mucosa gástrica normal, carcinoma gástrico tipo intestinal e carcinoma gástrico tipo difuso foram, respectivamente,  $1,622 \pm 0,0667$ ,  $1,5045 \pm 0,0865$  e  $1,1711 \pm 0,0799$ . Os autores concluem que a carcinogênese seria então caracterizada por perda da complexidade e perda da autosimilaridade.

Dioguardi et al. [10] digitalizaram secções de biopsias hepáticas de 209 pacientes portadores de hepatite C e com diferentes graus de fibrose ou cirrose e analisaram, entre outros, a dimensão fractal pelo método *Box-counting*. Obtiveram valores de dimensão fractal variando de 1,22 a 1,79 e o valor desse parâmetro aumentou na dependência da extensão da fibrose, com o elevado coeficiente  $r$  de 0,81. Concluíram que o aumento da dimensão fractal, nesse caso, foi decorrente de ruptura do estado harmônico natural, criando-se desordem na estrutura lobular normal do tecido hepático.

Sullivan et al. [15] realizaram um estudo para determinar se a análise fractal poderia ser um método apropriado para a medida da migração de linhagens celulares de câncer mamário humano. Para tanto, compararam a migração de células MDA-MB-231 que apresentam alta mobilidade e invasibilidade com a migração de células MDA-MB-468 de comportamento mais moderado, em um experimento de cicatrização tecidual. Constataram que a intensidade de flutuação da dimensão fractal poderia ser usada como ferramenta na quantificação da migração celular em termos da gravidade do câncer e resposta ao tratamento. A dimensão fractal permitiu uma descrição quantitativa dessa migração celular.

Tambasco et al. [16], em 2009, avaliaram o material incluído em 82 blocos de parafina constituído por tecido prostático retirado por biopsia com agulha de 82 diferentes pacientes, sendo 63 contendo tecido prostático benigno e 19 com tecido prostático carcinomatoso de alto grau (Gleason 8 a 10). Para cada caso, prepararam duas lâminas, sendo uma delas corada com hematoxilina-eosina e a outra

com Pan-queratina, que cora especificamente estruturas epiteliais. Utilizaram a medida da dimensão fractal pelo método *Box-counting* com larguras de caixa indo de um mínimo de 4 micrometros (tamanho nominal do núcleo) até 340 micrometros (tamanho nominal de uma estrutura glandular prostática).

Isto é relevante, pois essa variação corresponde aos limites físicos da estrutura estudada e, além desses limites, os gráficos começariam a se desviar da linearidade, uma vez que não conteriam mais informação estrutural, já que ou haveria aproximação do limite de resolução ou tamanho mínimo do pixel ou, no outro extremo, chegar-se-ia a um tamanho maior que a maior estrutura presente na imagem (500 micrometros). Observaram que as diferenças entre a dimensão fractal média do tecido prostático normal em comparação ao tecido prostático neoplásico de alto grau foram significantes ( $P < 0,0001$ ), tanto com a coloração HE quanto com a coloração Pan-queratina, mas no grupo corado com pan-queratina, a separação entre os intervalos interquartis, em unidades de dimensão fractal, foi bem maior que no grupo corado com HE (0,09 versus 0,01, respectivamente).

A dimensão fractal do tecido benigno foi de  $1,85 \pm 0,04$  com a coloração HE e de  $1,51 \pm 0,08$  com a coloração Pan-queratina. Da mesma forma, a dimensão fractal do tecido altamente neoplásico foi de  $1,90 \pm 0,04$  com a coloração HE e de  $1,73 \pm 0,09$  com a coloração Pan-queratina. Essas diferenças se devem ao fato de que sendo a Pan-queratina uma coloração mais específica para os tecidos glandulares, houve menos estruturas coradas do que com HE, que tem espectro de ação mais amplo, corando mais estruturas histológicas.

Isto ressalta a importância da coloração utilizada. No nosso estudo utilizamos apenas a coloração HE, abrindo-se espaço então para uma reavaliação de todo o material com o possível uso de outras colorações.

O grau de luminosidade com que as imagens são obtidas poderia eventualmente constituir-se em um viés, uma vez que é praticamente impossível obter todas as lâminas com um mesmo grau, mas neste mesmo estudo de Tambasco et al. [16] foi constatado que não houve influência sobre a dimensão máxima fractal obtida.

Abu Eid & Landini [17], em 2003, quantificaram a complexidade local e global da interface tecidual epitélio-conjuntival (CITEC) de 377 mucosas orais humanas normais, displásicas e neoplásicas, usando imagens digitais e aplicando como ferramentas o método *Box-counting* para estimar a dimensão fractal global e a relação massa-raio para estimar a dimensão fractal local. Constataram que a CITEC aumentou significativamente da situação normal para a de pré-malignidade e desta para a de malignidade, tanto em escala global quanto local. Concluíram que a geometria fractal é útil na avaliação das alterações da complexidade

tecidual que ocorrem devido transformações malignas propondo o método como marcador quantitativo da complexidade epitelial.

Outra vantagem do método, no nosso entender, seria a de fornecer uma ferramenta com possibilidade de levar ao consenso entre os patologistas em uma relativamente grande quantidade de casos de dúvida diagnóstica, minimizando com isso as variabilidades intra e interobservador. Além disso, poderia também atuar como um método de *screening*, identificando tumores de graus baixos e intermediários em centros de alto volume de movimento, racionalizando o tempo dos patologistas gasto na pesquisa de áreas teciduais comprometidas [16].

Conseguimos neste estudo diferenciar os diversos graus de rejeição (1 *versus* zero; 2 *versus* zero; 3 *versus* 0; 2 *versus* 1; e 3 *versus* 1). Não houve possibilidade de diferenciar entre os graus 3 e 2. O consenso entre os patologistas também dificilmente poderia ser alcançado na diferenciação dos atuais graus 2 e 3 de rejeição, uma vez que a diferença entre eles se resume apenas na disposição dos focos inflamatórios grau 2, com dois ou mais focos delimitados de agressão aos miócitos e grau 3 com infiltrado inflamatório difusamente distribuído com extensa destruição de fibras.

Então essa característica talvez não seja suficiente para produzir diferença na quantificação da dimensão fractal, levantando à necessidade de futuros estudos com novas abordagens da complexidade.

Quanto às limitações ao estudo que possam ser aventadas, seguem-se algumas contra-argumentações:

a. O tamanho das caixas para cálculo da dimensão fractal no método *Box-counting* foi padronizado em 4, 8, 16, 32 e 64 pixels. Sabe-se que o tamanho do pixel depende do grau de resolução utilizado. Como comenta Tambasco et al. [16], o tamanho da caixa utilizado deve guardar uma certa relação com a estrutura estudada, pois pode ser tão pequeno que, na verdade, esteja avaliando subcomponentes da estrutura ou tão grande que, na verdade, estariam sendo incluídos na medição componentes dos arredores da estrutura de interesse e não a estrutura em si. Esse valores, no entanto, são os valores padrão utilizados na literatura e, portanto, provavelmente não causaram interferência nos resultados.

b. Quantidade de fragmentos coletados na biopsia (três) poderia ser considerada pequena, já que alguns autores recomendam até cinco ou seis, mas a finalidade do presente estudo não era diagnosticar a presença ou não de rejeição e sim, frente a um determinado achado de rejeição, avaliar se havia ou não associação com maior grau de dimensão fractal.

## CONCLUSÕES

1. Constatou-se que o cálculo da dimensão fractal pode

contribuir na avaliação da rejeição celular miocárdica de pacientes submetidos à biopsia endomiocárdica pós-transplante cardíaco.

2. Maiores graus de dimensão fractal estiveram diretamente associados com rejeição celular miocárdica progressivamente maior.

3. Esses achados poderão contribuir na tomada de decisão em casos clínicos duvidosos e naqueles nos quais se cogite a intensificação de medicação imunossupressora.

## AGRADECIMENTO

Agradecemos ao Sr. Antonio Assad Mussi Koury, pela enorme colaboração prestada na edição gráfica das imagens histológicas.

## REFERÊNCIAS

1. Silva PR. Transplante cardíaco e cardiopulmonar: 100 anos de história e 40 de existência. Rev Bras Cir Cardiovasc. 2008;23(1):145-52.
2. Fiorelli AI, Abreu Filho CAC, Santos RHB, Bucu FHA, Fiorelli LR, Bacal F, et al. Transplante cardíaco com anastomose bicaval e anuloplastia tricúspide profilática no enxerto. Rev Bras Cir Cardiovasc. 2008;23(1):7-13.
3. Barroso E, Garcia MI, Pinho JC, Guedes MV. Pós-operatório de transplante cardíaco e tratamento imunossupressor. Rev SOCERJ. 2002;15(3):164-71.
4. Morgun A, Shulzhenko N, Gerbase-DeLima M. Monitoração imunológica pós-transplante cardíaco. <http://www.brazilpednews.org.br/junh2002/bnp06023.htm>. Acesso em 01/11/2007.
5. Bacal F, Veiga VC, Fiorelli AI, Bellotti G, Bocchi EA, Stolf NAG, et al. Análise dos fatores de risco da doença vascular do enxerto em pacientes assintomáticos após transplante cardíaco. Arq Bras Cardiol. 2000;75(5):413-20.
6. Billingham ME, Cary NR, Hammond ME, Kemnitz J, Marboe C, McCallister HA, et al. A working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart and lung rejection: Heart Rejection Study Group. The International Society for Heart Transplantation. J Heart Transplant. 1990;9(6):587-93.
7. Rodriguez ER; International Society for Heart and Lung Transplantation. The pathology of heart transplant biopsy specimens: revisiting the 1990 ISHLT working formulation. J Heart Lung Transplant. 2003;22(1):3-15.



- 
8. Karperien A, Jelinek HF, Leandro JJ, Soares JV, Cesar RM, Luckie A. Automated detection of proliferative retinopathy in clinical practice. *Clin Ophthalmol*. 2008;2(1):109-22.
  9. Wielgus E, Pawlicki K, Kawa A, Wloch S, Kaminski M. Fractal analysis of placenta mature villi in healthy, smoking and non-smoking women. *Med Sci Monit*. 2000;6(2):271-7.
  10. Dioguardi N, Grizzi F, Franceschini B, Bossi P, Russo C. Liver fibrosis and tissue architectural change measurement using fractal-rectified metrics and Hurst's exponent. *World J Gastroenterol*. 2006;12(14):2187-94.
  11. Stewart S, Winters GL, Fishbein MC, Tazelaar HD, Kobashigawa J, Abrams J, et al. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24(11):1710-20.
  12. Benjamin JE, Gill S, Negrin RS. Biology and clinical effects of natural killer cells in allogeneic transplantation. *Curr Opin Oncol*. 2010;22(2):130-7.
  13. Kido S, Ikezoe J, Naito H, Tamura S, Machi S. Fractal analysis of interstitial lung abnormalities in chest radiography. *Radiographics*. 1995;15(6):1457-64.
  14. Vasilescu C, Herlea V, Talo° F, Ivanov B, Dobrescu R. Differences between intestinal and diffuse type of gastric carcinoma: a fractal analysis. <http://isis.pub.ro/iafa2003/files/7-3.pdf> Acesso em 28/6/2010.
  15. Sullivan R, Holden T, Tremberger Jr E, Cheung E, Branch C, Burrero J, et al. Fractal dimension of breast cancer cell migration in a wound healing assay. *Intern J Biological Life Sciences*. 2010;6(3):170-5.
  16. Tambasco M, Costello BM, Kouznetsov A, Yau A, Magliocco AM. Quantifying the architectural complexity of microscopic images of histology specimens. *Micron*. 2009;40(4):486-94.
  17. Abu Eid R, Landini G. Quantification of the global and local complexity of the epithelial-connective tissue interface of normal, dysplastic, and neoplastic oral mucosae using digital imaging. *Pathol Res Pract*. 2003;199(7):475-82.