



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO
INTEGRADO EM MEDICINA**

TIAGO JORGE MARTINS BRANCO

***RESSONÂNCIA MECÂNICA EM
CROMOSSOMAS HUMANOS***

ARTIGO CIENTÍFICO

ÁREA CIENTÍFICA DE BIOMEDICINA

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:
PROFESSORA DOUTORA MARIA FILOMENA BOTELHO
PROFESSOR DOUTOR FRANCISCO JOSÉ CAMELO**

FEVEREIRO/2015

Ressonância Mecânica em Cromossomas Humanos

Tiago Jorge Martins Branco



tbranco91@gmail.com

Esta tese é dedicada à minha família, em especial, aos meus pais, Paulo e Graça, e à minha irmã, Inês, pelo seu constante e inabalável apoio.

Índice de Conteúdos

Resumo	1
Abstract	1
Palavras-chave	1
Introdução.....	2
Métodos.....	3
Resultados	10
Discussão.....	17
Conclusão	22
Agradecimentos	23
Referências Bibliográficas	24

Índice de Imagens

Imagem 1 Modelo de Cone Excêntrico.....	4
Imagem 2 Esquemas dos dois modos vibracionais.....	12

Índice de Tabelas

Tabela 1 Massa de cada variante das Histonas H1 e H3.....	6
Tabela 2 Massa de cada variante das Histonas H2A e H2B	6
Tabela 3 Comprimento e Número de Pares de Bases num Braço de Cromossoma	9
Tabela 4 Variações do 1p.....	9
Tabela 5 Dados para a Simulação.....	10
Tabela 6 Dados das Variações de 1p para a Simulação	11
Tabela 7 Frequências Naturais	13
Tabela 8 Valores de Frequência Natural Ordenados por Ordem Crescente	14
Tabela 9 Diferença entre Valores Consecutivos de Frequência Natural.....	15
Tabela 10 Frequências Naturais das Variações do 1p	15

Índice de Gráficos

Gráfico 1 Relação entre o comprimento de um braço de cromossoma e a sua frequência natural para o MV1.....	17
Gráfico 2 Relação entre o comprimento de um braço de cromossoma e a sua frequência natural para o MV2.....	17
Gráfico 3 Relação entre a massa de um braço de cromossoma e a sua frequência natural para o MV1.	18
Gráfico 4 Relação entre a massa de um braço de cromossoma e a sua frequência natural para o MV2.	18

Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AT	Massa de um par de base de adenina-timina
D	Diâmetro de um cromossoma em metáfase / diâmetro da base maior
d	Diâmetro do estreitamento a nível do centrómero de um cromossoma em metáfase / diâmetro da base menor
GC	Massa de um par de base de guanina-citosina
L	Comprimento de um braço de cromossoma
M	Massa de um braço de cromossoma
M1pm	Massa do braço curto do cromossoma 1 com uma mutação pontual
mH	Massa das histonas num nucleossoma
mH1	Média aritmética das massas das diferentes variantes de H1
mH2A	Média aritmética das massas das diferentes variantes de H2A
mH2B	Média aritmética das massas das diferentes variantes de H2B
mH3	Média aritmética das massas das diferentes variantes de H3
mH4	Massa da histona H4
MV1	Modo de Vibração 1
MV2	Modo de Vibração 2
N	Número total de nucleossomas de um braço de cromossoma
PB	Número total de pares de base de um braço de cromossoma
V	Volume de um braço de cromossoma

Resumo

Desencadear um fenômeno de ressonância mecânica em cromossomas poderá resultar na sua destruição e comprometer a sobrevivência celular. Criou-se um modelo virtual de braços de cromossomas: um cone excêntrico com características próprias de cada braço. Utilizando simulações computacionais (COMSOL Multiphysics 4.4®), chegou-se à frequência natural em dois modos de vibração de vários cromossomas. A diferença média entre as várias frequências obtidas foi de cerca de 2 kHz em ambos modos de vibração, sendo necessário adicionar 100 000 pares de bases ou aumentar 1 nm para que haja variação de 1 Hz na frequência natural. Conclui-se que modificando a massa e o comprimento dos braços dos cromossomas de forma significativa, produz-se uma alteração na frequência de ressonância. Isto poderá conduzir ao desenvolvimento de uma terapia que destrua seletivamente cromossomas.

Abstract

Producing a mechanical resonance phenomenon in chromosomes could lead to its destruction. A virtual model of chromosome arms was created: eccentric cone with characteristics specific for each arm. Using virtual simulations (COMSOL Multiphysics 4.4®), natural frequency was found for various chromosomes, in two modes of vibrations. The mean difference between those frequencies was about 2 kHz in both vibration modes. It was necessary to add 100,000 base pairs or increase 1 nm in chromosomes arm to get a change of 1 Hz in natural frequency. Therefore, changing mass and length of chromosome's arm, in a significant manner, will produce a change in its resonant frequency. This could lead to a new therapy which destroys chromosomes selectively.

Palavras-chave: Ressonância Mecânica; Frequência Natural de Cromossomas; Destruição Seletiva de Cromossomas.

Introdução

A ressonância mecânica é um fenómeno físico bem conhecido que consiste na tendência de um sistema a aumentar a sua amplitude de vibração quando é perturbado por uma frequência específica, denominada frequência natural ou frequência de ressonância, que está na dependência de certos aspetos físicos (conformação tridimensional, tamanho, densidade, razão de Poisson e módulo de Young). Nestas condições mesmo pequenas perturbações levam a um crescente aumento da amplitude de vibração mecânica que pode conduzir ao dano da estrutura em causa. Este conceito físico dota-se de particular importância na área da engenharia, pois um fenómeno de ressonância numa estrutura de um edifício pode resultar na destruição deste.

A quase totalidade dos seres conhecidos pelo Homem codifica o seu genoma em moléculas de ácido desoxirribonucleico (*ADN*), que apresenta-se na forma de nucleóide nas células procariontes e na forma de cromossomas nas células eucariontes. Alterações a este nível podem conduzir a profundas modificações do comportamento celular ou mesmo à sua morte.

Ao unir estes dois conceitos, percebe-se que é possível levar à “destruição” de uma determinada célula ao introduzir-se uma perturbação com a frequência de ressonância de um cromossoma/nucleóide específico, deixando as células vizinhas imaculadas se tiverem um diferente genoma da primeira.

As aplicabilidades deste princípio seriam inúmeros, pois está-se perante um novo método para destruir componentes celulares específicos.

O objetivo deste trabalho consiste em encontrar a frequência de ressonância de cromossomas humanos, averiguando como esta varia se a massa e/ou o tamanho forem alterados.

Métodos

As simulações neste trabalho foram feitas utilizando modelos de cromossomas humanos em metáfase recorrendo ao programa de simulação digital COMSOL Multiphysics 4.4®.

Tendo em conta que o fuso acromático é uma estrutura semirígida e que no estadió do ciclo celular acima enunciado os cromossomas estão ligados a este através do centrómero, considerou-se que os braços dos cromossomas seriam identidades separadas, sendo o centrómero um plano fixo. Ainda, a fim de simplificar os cálculos, assumiu-se que todos os cromossomas tinham uma composição idêntica em termos de pares bases, isto é, cada braço de cromossoma era composto por 50% de nucleótidos de adenina e timina, sendo os restantes 50% de guanina e citosina.

O estudo incidiu sobre: um genoma humano normal e genérico (22 cromossomas autossómicos, um cromossoma X e um cromossoma Y); 1p com mais pares de base que o 1p original^{*}; 1p com maior comprimento que o 1p original[†]; 1p com uma mutação pontual, onde um par de base de adenina-timina havia sido substituído por guanina-citosina[‡]; 22q resultante da translocação t(9;22)(q34;q11) – translocação Filadélfia.

Simulou-se 1p com alterações em relação ao 1p original, a fim de averiguar o quão diferentes têm de ser dois cromossomas, em termos de pares de bases ou de comprimento, para que a sua frequência de ressonância varie. A translocação Filadélfia também foi tida em conta por ser uma alteração genética bem conhecida na Leucemia Mieloide Crónica e noutras neoplasias, sendo, por isso, relevante para este trabalho quantificar a disparidade entre a frequência natural deste cromossoma mutante em relação ao restante genoma humano.

^{*} Mais 1, 10, 100, 1 000, 10 000 e 100 000 pares de base, mantendo, no entanto, o mesmo volume e comprimento que 1p original.

[†] Mais 1 nm, 5 nm e 10 nm, porém conservando a mesma massa que 1p original.

[‡] Neste modelo, por razões óbvias, não se considerou que a distribuição de pares de base fosse igual, ou seja, aqui a composição em termos de pares de base não correspondia a 50% de adenina-timina e 50% de guanina-citosina. Contudo manteve-se o comprimento e volume de 1p original.

Assim, no *software* referido desenhou-se um cone excêntrico em três dimensões e utilizou-se o estudo de *Eigenfrequency* na área de mecânica sólida.

O cone excêntrico (fig.1) necessita de três valores: diâmetro, a razão entre as bases e a altura. O diâmetro do modelo corresponde ao diâmetro dos cromossomas em metáfase (D), que foi considerado como sendo sempre $0,4375 \mu\text{m}$. [1]

A razão entre as bases expressa uma relação entre o diâmetro da base menor (d) e o diâmetro base maior, onde a base menor equivale ao estreitamento a nível do centrómero e a base maior ao diâmetro do restante cromossoma em metáfase (D). Portanto, e tendo em conta que este estreitamento é igual para todos os cromossomas, d será igual a $0,1875 \mu\text{m}$ e a razão entre d e D será de aproximadamente 0.43. [1]

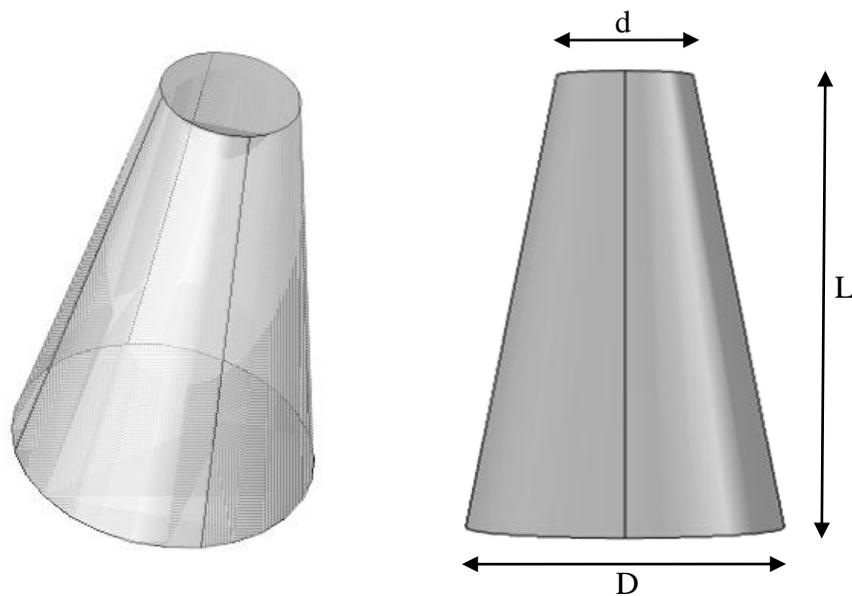


Imagem 1 Modelo de Cone Excêntrico usado para simulação como representação de um braço de cromossoma. D - diâmetro da base maior; d - diâmetro da base menor; L - comprimento do braço do cromossoma

De seguida, definiu-se o material que seria atribuído ao cone excêntrico, recorrendo à razão de Poisson, ao módulo de Young e à densidade. Foi assumido que os dois primeiros parâmetros seriam constantes e corresponderiam, respetivamente, a 0,1 e a 300 Pa. [2,3]

A densidade resulta do quociente entre a massa de um braço de um determinado cromossoma (M) e o seu volume (V), aqui representado pelo volume de um cone excêntrico. A massa varia consoante os diferentes constituintes do cromossoma: histonas e ADN [§].

O ADN liga-se às histonas e forma uma estrutura denominada nucleossoma (octâmeros de histonas^{**} envolvidos pela dupla cadeia de ADN) que se repete aproximadamente a cada 200 pares de bases. Não fazendo diretamente parte do nucleossoma, mas contribuindo para a massa dos cromossomas, existe a histona H1, que desempenha um papel importante na condensação da cromatina. Por conseguinte, o número total de nucleossomas^{††} de cada braço de um cromossoma (N) corresponde ao quociente entre o total de pares de base desse braço (PB) e 200. [1,4]

Cada histona tem várias variantes e dentro dessas variantes podem existir diferentes isoformas. Com o objetivo de simplificar-se o cálculo da massa das histonas, para cada tipo de histona fez-se a média aritmética das massas das diferentes variantes^{‡‡} (tabelas 1 e 2). Portanto as histonas H1, H2A, H2B e H3 têm uma massa média de 23105,05 Da, 15792,93 Da, 15035,55 Da e 15225 Da, respetivamente. A exceção é a histona H4 humana que só se conhece uma variante com 11367 Da. [1,4-6]

Assim a massa das histonas num nucleossoma será:

$$mH = mH1 + 2 \times (mH2A + mH2B + mH3 + mH4)$$

Onde mH é a massa das histonas num nucleossoma, $mH1$ é a média aritmética das massas das diferentes variantes de H1, $mH2A$ é a média aritmética das massas das diferentes variantes de H2A, $mH2B$ é a média aritmética das massas das diferentes variantes de H2B, $mH3$ é a média aritmética das massas das diferentes variantes de H3, $mH4$ é a massa da histona H4.

[§] Não foram consideradas outras proteínas ou ácido ribonucleico, pois a sua ligação ao cromossoma é apenas temporária.

^{**} O octâmero é constituído por duas cópias das seguintes histonas: H2A, H2B, H3 e H4.

^{††} Pois questões práticas, neste estudo considera-se que a histona H1 faz parte do nucleossoma.

^{‡‡} Dado algumas variantes possuírem mais do que uma isoforma, nesses casos fez-se a média aritmética das isoformas e com esse valor é que se calculou-se a média aritmética das variantes.

Tabela 1 Massa de cada variante das Histonas H1 e H3

Histona H1		Histona H3	
Variantes	Peso (Da)	Variantes	Peso (Da)
H1.0	20015 ^a	<i>H3-like centromeric protein A</i>	14496 ^a
H1.1	21842	H3.1	15404
H1.2	21365	H3.1t	15508
H1.3	22350	H3.2	15388
H1.4	21865	H3.3	15328
H1.5	22580	H3.3c	15214
H1oo	28411,5 ^a	-	-
H1t	22019	-	-
H1x	22487	-	-
<i>Testis-specific H1</i>	28116	-	-

^a média aritmética das massas das diferentes isoformas.

Tabela 2 Massa de cada variante das Histonas H2A e H2B

Histona H2A		Histona H2B	
Variantes	Peso (Da)	Variantes	Peso (Da)
<i>Core histone macro-H2A.1</i>	19430 ^b	H2B <i>type</i> 1-A	14167
<i>Core histone macro-H2A.2</i>	40058	H2B <i>type</i> 1-B	13950
H2A <i>type</i> 1	14091	H2B <i>type</i> 1-C/E/F/G/I	13906
H2A <i>type</i> 1-A	14234	H2B <i>type</i> 1-D	13936
H2A <i>type</i> 1-B/E	14135	H2B <i>type</i> 1-H	13892
H2A <i>type</i> 1-C	14105	H2B <i>type</i> 1-J	13904
H2A <i>type</i> 1-D	14107	H2B <i>type</i> 1-K	13890
H2A <i>type</i> 1-H	13906	H2B <i>type</i> 1-L	13952
H2A <i>type</i> 1-J	13936	H2B <i>type</i> 1-M	13989
H2A <i>type</i> 2-A	14095	H2B <i>type</i> 1-N	13922
H2A <i>type</i> 2-B	13995	H2B <i>type</i> 1-O	13906
H2A <i>type</i> 2-C	13988	H2B <i>type</i> 2-F	13920
H2A <i>type</i> 3	14121	H2B <i>type</i> 2-E	14380,5 ^b
H2A-Bbd <i>type</i> 1	12697	H2B <i>type</i> 3-B	13908
H2A-Bbd <i>type</i> 2/3	12713	H2B <i>type</i> F-M	17001
H2A.J	15064,5 ^b	H2B <i>type</i> F-S	13944
H2A.V	10584,2 ^b	H2B <i>type</i> W-T	19618
H2A.X	15145	<i>Putative histone H2B type</i> 2-C	21472
H2A.Z	13553	<i>Putative histone H2B type</i> 2-D	18018

^b média aritmética das massas das diferentes isoformas.

O número total de pares de base (PB) dos vários cromossomas, divididos por braço longo e braço curto, bem como o comprimento (L) de cada estão explícitos na tabela 3 e 4. [1,7,8]

A massa de cada par de base de adenina-timina (AT) é aproximadamente 651,43 Da e a massa de cada guanina-citosina (GC) é cerca de 652,41 Da. [9]

Em suma, a massa de um braço de um determinado cromossoma traduz-se pela seguinte expressão:

$$M = \left(PB \times \frac{1}{2} \times AT \right) + \left(PB \times \frac{1}{2} \times GC \right) + (mH \times N) = \frac{PB}{2} \times (AT + GC) + (mH \times N)$$

Onde M é massa de um braço de um determinado cromossoma, PB é número total de pares de base de um cromossoma, AT é a massa de cada par de base de adenina-timina, GC é a massa de cada par de base de guanina-citosina, mH é a massa das histonas num nucleossoma e N é o número total de nucleossomas de cada braço de um cromossoma.

Esta fórmula sofreu alterações quando foi aplicada ao braço curto do cromossoma 1 que possuía uma mutação pontual. Como neste caso existe uma substituição de um par adenina-timina por guanina-citosina a massa deste modelo foi calculada através:

$$M_{1pm} = \left[\left(\frac{PB}{2} - 1 \right) \times AT \right] + \left[\left(\frac{PB}{2} + 1 \right) \times GC \right] + (mH \times N)$$

Onde M_{1pm} é massa do braço curto do cromossoma 1 com uma mutação pontual, PB é número total de pares de base de um cromossoma, AT é a massa de cada par de base de adenina-timina, GC é a massa de cada par de base de guanina-citosina, mH é a massa das histonas num nucleossoma e N é o número total de nucleossomas de cada braço de um cromossoma.

O volume do modelo em questão traduz-se pela seguinte expressão:

$$V = \frac{\pi \times L}{3} \times (D^2 + D \times d + d^2)$$

Onde V é o volume do cone excêntrico / de um braço de cromossoma, π é a constante pi, L é o comprimento de um braço de cromossoma, D é o diâmetro da base maior e d é o diâmetro base menor.

Após a introdução dos dados no programa, fez-se a simulação e obteve-se a frequência de ressonância para cada braço de cromossoma. Posteriormente, ordenou-se de forma crescente os valores obtidos dentro de cada modo de vibração e calculou-se as diferenças entre valores consecutivos, a fim de averiguar a menor variabilidade, chegando a uma média dessas diferenças. Verificou-se, com as variações de $1p$, o que teria de mudar em termos de pares de base ou de comprimento para que se verifica-se alterações na frequência natural e relacionou-se o comprimento com a frequência de ressonância e a massa com a frequência de ressonância através de gráficos de dispersão.

Tal como já foi referido, o cálculo das frequências naturais foi feito utilizando o *software* COMSOL Multiphysics®, enquanto para os restantes recorreu-se ao programa Microsoft Excel®.

Tabela 3 Comprimento e Número de Pares de Bases num Braço de Cromossoma

Cromossoma	Pares de Bases (x10⁷)	Comprimento - L (µm)	Cromossoma	Pares de Bases (x10⁷)	Comprimento - L (µm)
1q	12,60	5,25	13q	9,60	3,38
2p	9,40	3,62	14p	1,70	0,94
2q	14,80	5,75	14q	9,00	3,06
3p	9,10	3,44	15p	1,90	0,88
3q	10,70	4,12	15q	8,30	2,94
4p	5,00	1,62	16p	3,70	1,38
4q	14,00	4,44	16q	5,30	2,12
5p	4,90	1,50	17p	2,50	1,12
5q	13,30	4,75	17q	5,80	2,25
6p	6,00	2,38	18p	1,90	0,75
6q	11,10	4,50	18q	6,10	1,94
7p	6,00	2,25	19p	2,60	1,25
7q	9,90	3,94	19q	2,30	1,31
8p	4,50	1,56	20p	2,80	1,06
8q	10,00	3,69	20q	3,60	1,44
9p	4,30	1,69	21p	1,20	0,69
9q	9,50	3,50	21q	3,50	1,12
10p	4,00	1,56	22p	1,50	0,69
10q	9,40	1,38	22q	3,60	1,62
11p	5,30	2,00	Xp	6,10	2,44
11q	8,20	3,31	Xq	9,50	3,88
12p	3,60	1,25	Yp	1,75	0,44
12q	9,70	3,50	Yq	3,95	8,75
13p	1,80	0,75	22q t(9;22)(q34;q11)	2,14	0,63

Tabela 4 Variações do 1p

Cromossoma	Pares de Bases	Comprimento - L (µm)	Cromossoma	Pares de Bases	Comprimento - L (µm)
1p	1230000	5,000	1p+100000 <i>pb</i>	1330000	5,000
1p+1 <i>pb</i>	1230001	5,000	1p mutação pontual	1230000	5,000
1p+10 <i>pb</i>	1230010	5,000	1p+0,001 µm	1230000	5,001
1p+100 <i>pb</i>	1230100	5,000	1p+0,005 µm	1230000	5,005
1p+1000 <i>pb</i>	1231000	5,000	1p+0,01 µm	1230000	5,010
1p+10000 <i>pb</i>	1240000	5,000	-	-	-

pb – Pares de base.

Resultados

As tabelas 5 e 6 revelam os resultados das expressões enunciadas na secção Métodos, que foram necessários para a simulação da frequência de ressonância.

Tabela 5 Dados para a Simulação

Cromossoma	Número de Nucleossomas (x10³)	Massa (x10⁻¹⁶ kg)	Volume (x10⁻¹⁹ m³)	Densidade (kg/m³)
1q	630	2,82	12,50	227
2p	470	2,11	8,60	245
2q	740	3,32	13,60	243
3p	455	2,04	8,16	250
3q	535	2,40	9,79	245
4p	250	1,12	3,86	290
4q	700	3,14	10,50	298
5p	245	1,10	3,56	308
5q	665	2,98	11,30	264
6p	300	1,34	5,63	239
6q	555	2,49	10,70	233
7p	300	1,34	5,34	252
7q	495	2,22	9,34	237
8p	225	1,01	3,71	272
8q	500	2,24	8,75	256
9p	215	0,96	4,00	241
9q	475	2,13	8,30	256
10p	200	0,90	3,71	242
10q	470	2,11	8,01	263
11p	265	1,19	4,75	250
11q	410	1,84	7,86	239
12p	180	0,81	2,97	272
12q	485	2,17	8,30	262
13p	90	0,40	1,78	227
13q	480	2,15	8,01	269
14p	85	0,38	2,22	171
14q	450	2,02	7,27	277
15p	95	0,43	2,08	205
15q	415	1,86	6,97	267
16p	685	0,83	3,26	254

16q	265	1,19	5,04	235
17p	125	0,56	2,67	210
17q	290	1,30	5,34	243
18p	95	0,43	1,78	239
18q	305	1,37	4,60	297
19p	130	0,58	2,97	196
19q	165	0,74	3,11	237
20p	140	0,63	2,52	249
20q	180	0,81	3,41	236
21p	60	0,27	1,63	165
21q	175	0,78	2,67	294
22p	75	0,34	1,63	206
22q	180	0,80	3,86	209
Xp	305	1,37	5,78	236
Xq	475	2,13	9,19	231
Yp	87,5	0,39	1,04	378
Yq	197,5	0,89	2,08	426
22q t(9;22)(q34;q11)	107	0,48	1,48	323

Tabela 6 Dados das Variações de 1p para a Simulação

Cromossoma	Número de Nucleossomas	Massa (x10⁻¹⁶ kg)	Volume (x10⁻¹⁹ m³)	Densidade (kg/m³)
1p	615000	2,7551632819	11,90	232,252657177
1p+1 <i>pb</i>	615000	2,7551633043	11,90	232,252659065
1p+10 <i>pb</i>	615000	2,7551635059	11,90	232,252676060
1p+100 <i>pb</i>	615001	2,7551655219	11,90	232,252846000
1p+1000 <i>pb</i>	615005	2,7551856817	11,90	232,254545410
1p+10000 <i>pb</i>	615050	2,7553872790	11,90	232,271539507
1p+100000 <i>pb</i>	615500	2,7574032521	11,90	232,441480476
1p mutação pontual	615000	2,7551632820	11,90	232,252657179
1p+0,001 μ m	615000	2,7551632819	11,90	232,206215934
1p+0,005 μ m	615000	2,7551632819	11,90	232,20636541
1p+0,01 μ m	615000	2,7551632819	11,90	231,789079019

pb – Pares de base.

Após a simulação computacional, obteve-se as seguintes frequências naturais em dois modos de vibração diferentes^{§§} (tabela 7). Um esquema de cada modo vibracional pode ser visto na imagem 2.

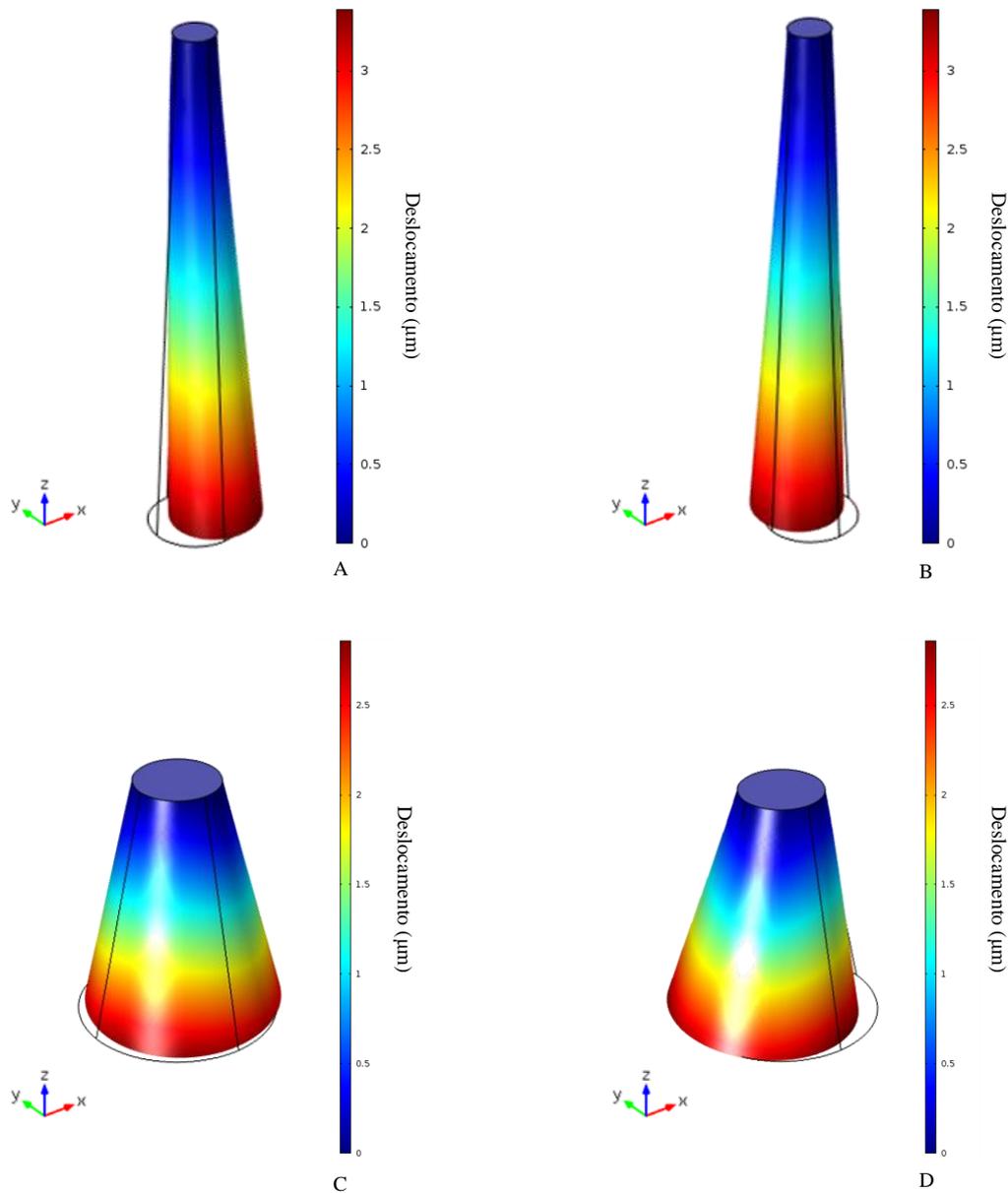


Imagem 2 Esquemas dos dois modos vibracionais. A – MV1 de 1p; B – MV2 de 1p; C – MV1 de 17p; D – MV2 de 17p.

^{§§} Modo de Vibração 1 e Modo de Vibração 2

Tabela 7 Frequências Naturais

Cromossoma	Frequência Natural ^c (Hz)	Frequência Natural ^c (Hz)	Cromossoma	Frequência Natural ^c (Hz)	Frequência Natural ^c (Hz)
	MV1	MV2		MV1	MV2
1p	1638	1640	11p	9572	9573
1p mutação pontual	1638	1640	11q	3698	3699
1p+1 <i>pb</i>	1638	1640	12p	22280	22281
1p+10 <i>pb</i>	1638	1640	12q	3131	3131
1p+100 <i>pb</i>	1638	1640	13p	59603	59717
1p+1000 <i>pb</i>	1638	1640	13q	3310	3311
1p+10000 <i>pb</i>	1638	1640	14p	47035	47059
1p+100000 <i>pb</i>	1637	1639	14q	3968	3968
1p+0,001 μm	1640	1640	15p	48380	48400
1p+0,005 μm	1637	1637	15q	4375	4376
1p+0,01 μm	1635	1635	16p	19195	19205
1q	1506	1506	16q	8741	8743
2p	3012	3012	17p	30466	30484
2q	1214	1214	17q	7723	7731
3p	3316	3316	18p	58087	58198
3q	2330	2333	18q	9311	9313
4p	13141	13142	19p	26246	26247
4q	1833	1833	19q	21890	21897
5p	14917	14920	20p	31376	31388
5q	1704	1704	20q	18395	18399
6p	6989	6989	21p	80522	80651
6q	2018	2018	21q	25748	25764
7p	7584	7591	22p	72065	72180
7q	2605	2605	22q	15480	15481
8p	14746	14747	Xp	6700	6700
8q	2853	2853	Xq	2718	2719
9p	13459	13461	Yp	104946	105008
9q	3167	3167	Yq	33561	33575
10p	15633	15635	22q t(9;22)(q34;q11)	67107	67254
10q	3348	3348	-	-	-

^cAs frequências foram arredondadas às unidades. MV1 – Modos de Vibração 1; MV2 – Modo de Vibração 2; *pb* – Pares de base.

Para melhor entender a diferença que existe entre duas frequências de ressonância consecutivas (dentro de cada modo de vibração), ordenou-se os valores de frequência natural

por ordem crescente (tabela 8). Essa diferença pode ser consultada na tabela 9. Tanto a tabela 8 como a tabela 9 não consideram os resultados da variação do 1p simuladas.

Tabela 8 Valores de Frequência Natural Ordenados por Ordem Crescente

Cromossoma	Frequência Natural (Hz)	Frequência Natural (Hz)	Cromossoma	Frequência Natural (Hz)	Frequência Natural (Hz)
	MV1	MV2		MV1	MV2
2q	1214	1214	11p	9572	9573
1q	1506	1506	4p	13141	13142
1p	1638	1640	9p	13459	13461
5q	1704	1704	8p	14746	14747
4q	1833	1833	5p	14917	14920
6q	2018	2018	22q	15480	15481
3q	2330	2333	10p	15633	15635
7q	2605	2605	20q	18395	18399
Xq	2718	2719	16p	19195	19205
8q	2853	2853	19q	21890	21897
2p	3012	3012	12p	22280	22281
12q	3131	3131	21q	25748	25764
9q	3167	3167	19p	26246	26247
13q	3310	3311	17p	30466	30484
3p	3316	3316	20p	31376	31388
10q	3348	3348	Yq	33561	33575
11q	3698	3699	14p	47035	47059
14q	3968	3968	15p	48380	48400
15q	4375	4376	18p	58087	58198
Xp	6700	6700	13p	59603	59717
6p	6989	6989	22q t(9;22)(q34;q11)	67107	67254
7p	7584	7591	22p	72065	72180
17q	7723	7731	21p	80522	80651
16q	8741	8743	Yp	104946	105008
18q	9311	9313	-	-	-

MV1 – Modos de Vibração 1; MV2 – Modo de Vibração 2.

A média das diferenças para o modo de vibração 1 foi de 2161,083 Hz (mínimo de 6 Hz e máximo de 24424 Hz) e para o modo de vibração 2 a média das diferenças foi de 2162,333 Hz (mínimo de 6 Hz e máximo de 24357 Hz).

Tabela 9 Diferença entre Valores Consecutivos de Frequência Natural

Diferença	Frequência Natural (Hz)	Frequência Natural (Hz)	Diferença	Frequência Natural (Hz)	Frequência Natural (Hz)
	MV1	MV2		MV1	MV2
1q-2q	292	292	11p-18q	260	260
1p-1q	132	134	4p-11p	3570	3569
5q-1p	66	64	9p-4p	317	319
4q-5q	129	129	8p-9p	1287	1286
6q-4q	186	185	5p-8p	172	173
3q-6q	311	315	22q-5p	563	560
7q-3q	275	272	10p-22q	153	154
Xq-7q	113	114	20q-10p	2762	2764
8q-Xq	135	134	16p-20q	801	806
2p-8q	159	159	19q-16p	2695	2692
12q-2p	118	118	12p-19q	389	384
9q-12q	36	37	21q-12p	3469	3483
13q-9q	143	143	19p-21q	498	484
3p-13q	6	6	17p-19p	4220	4237
10q-3p	32	32	20p-17p	911	903
11q-10q	351	350	Yq-20p	2185	2188
14q-11q	269	270	14p-Yq	13474	13484
15q-14q	407	408	15p-14p	1344	1340
Xp-15q	2324	2324	18p-15p	9708	9798
6p-Xp	289	290	13p-18p	1516	1518
7p-6p	596	602	22q t(9;22)(q34;q11)-13p	7504	7537
17q-7p	139	139	22p-22q t(9;22)(q34;q11)	4957	4926
16q-17q	1018	1012	21p-22p	8457	8471
18q-16q	570	570	Yp-21p	24424	24357

MV1 – Modos de Vibração 1; MV2 – Modo de Vibração 2.

A tabela 10 revela as frequências naturais encontradas para as variações do 1p atrás mencionadas.

Tabela 10 Frequências Naturais das Variações do 1p

Cromossoma	Frequência Natural (Hz)	Frequência Natural (Hz)	Cromossoma	Frequência Natural (Hz)	Frequência Natural (Hz)
	MV1	MV2		MV1	MV2
1p	1638	1640	1p+100000 pb	1637	1639
1p+1 pb	1638	1640	1p mutação pontual	1638	1640
1p+10 pb	1638	1640	1p+0,001 µm	1640	1640
1p+100 pb	1638	1640	1p+0,005 µm	1637	1637
1p+1000 pb	1638	1640	1p+0,01 µm	1635	1635
1p+10000 pb	1638	1640	-	-	-

pb – Pares de base; MV1 – Modos de Vibração 1; MV2 – Modo de Vibração 2.

De forma a melhor compreender como o comprimento e a massa de um braço de cromossoma afeta a sua frequência natural, optou-se por gráficos de dispersão que evidenciam uma possível relação. Assim os gráficos 1 e 2 representam a relação entre o comprimento de um braço de cromossoma e a sua frequência natural, para o MV1 e MV2, respetivamente, enquanto os gráficos 3 e 4 representam a relação entre a massa de um braço de cromossoma e a sua frequência de ressonância, para o MV1 e MV2, respetivamente. É importante referir que nestes gráficos apenas foram utilizados os dados relativos aos cromossomas de um genoma humano genéricos (46, XY).

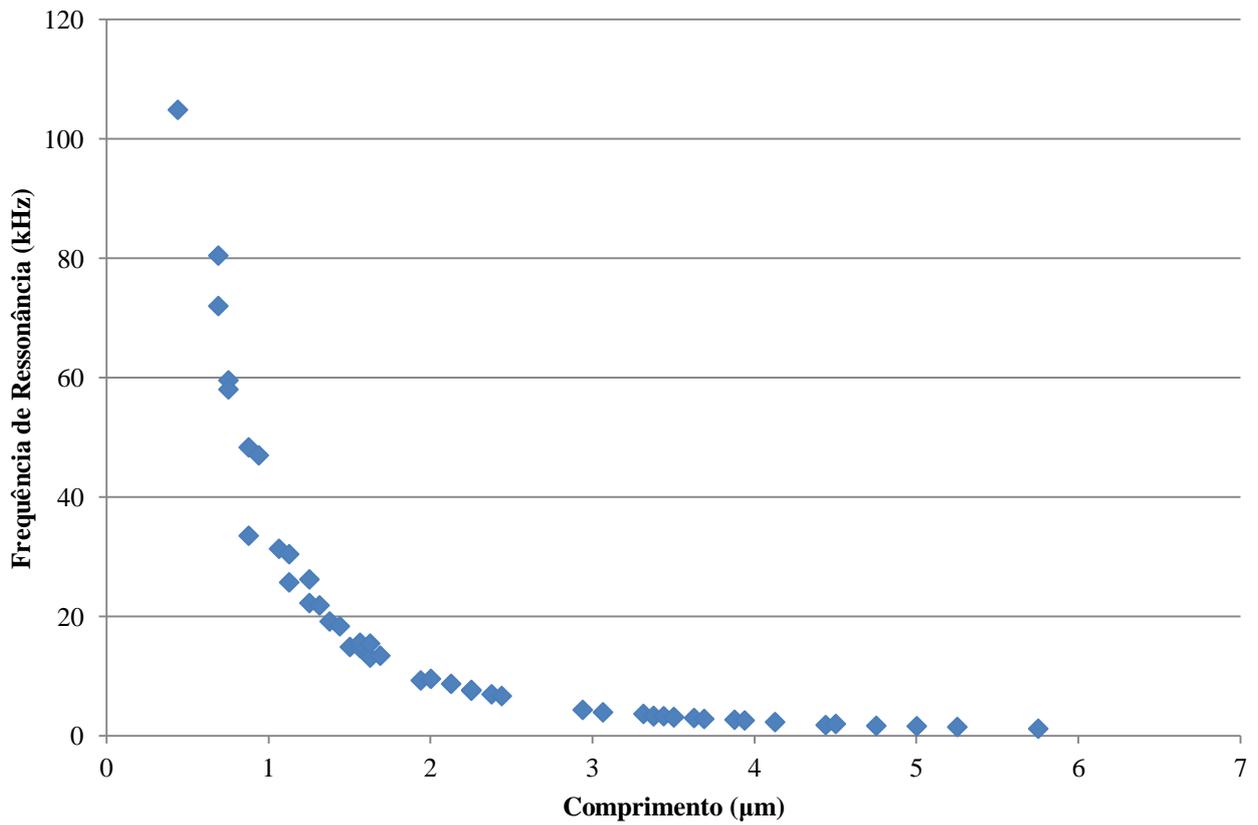


Gráfico 1 Relação entre o comprimento de um braço de cromossoma e a sua frequência natural para o MV1.

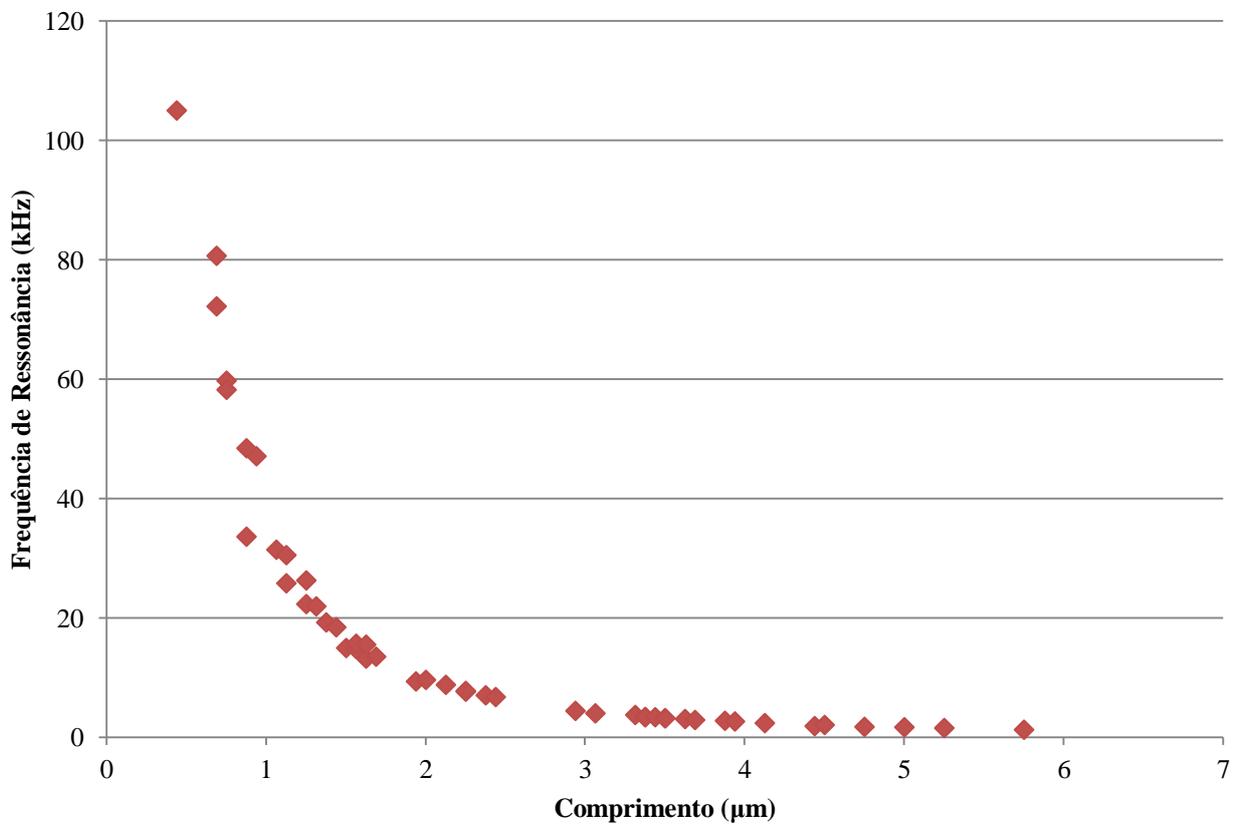


Gráfico 2 Relação entre o comprimento de um braço de cromossoma e a sua frequência natural para o MV2.

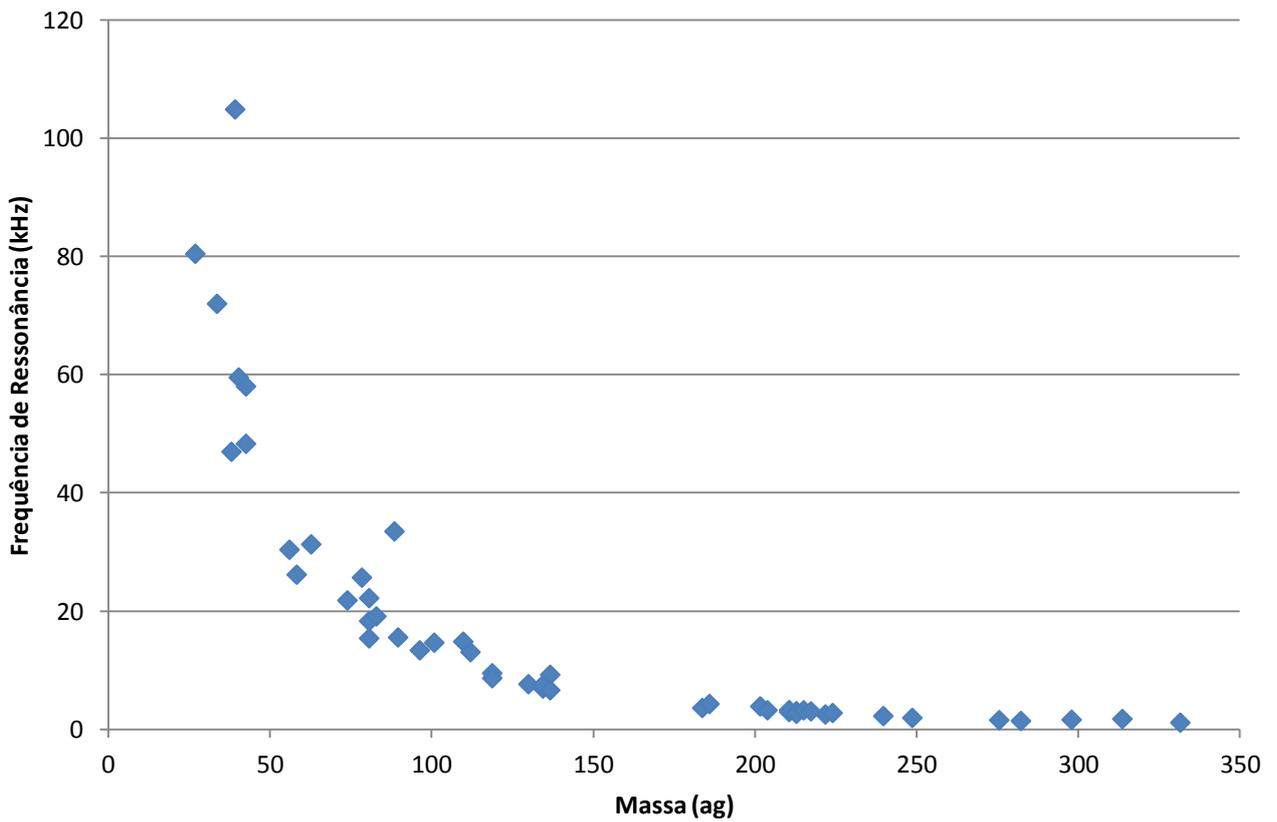


Gráfico 2 Relação entre a densidade de um braço de cromossoma e a sua frequência natural para o MV1. ag - Atograma

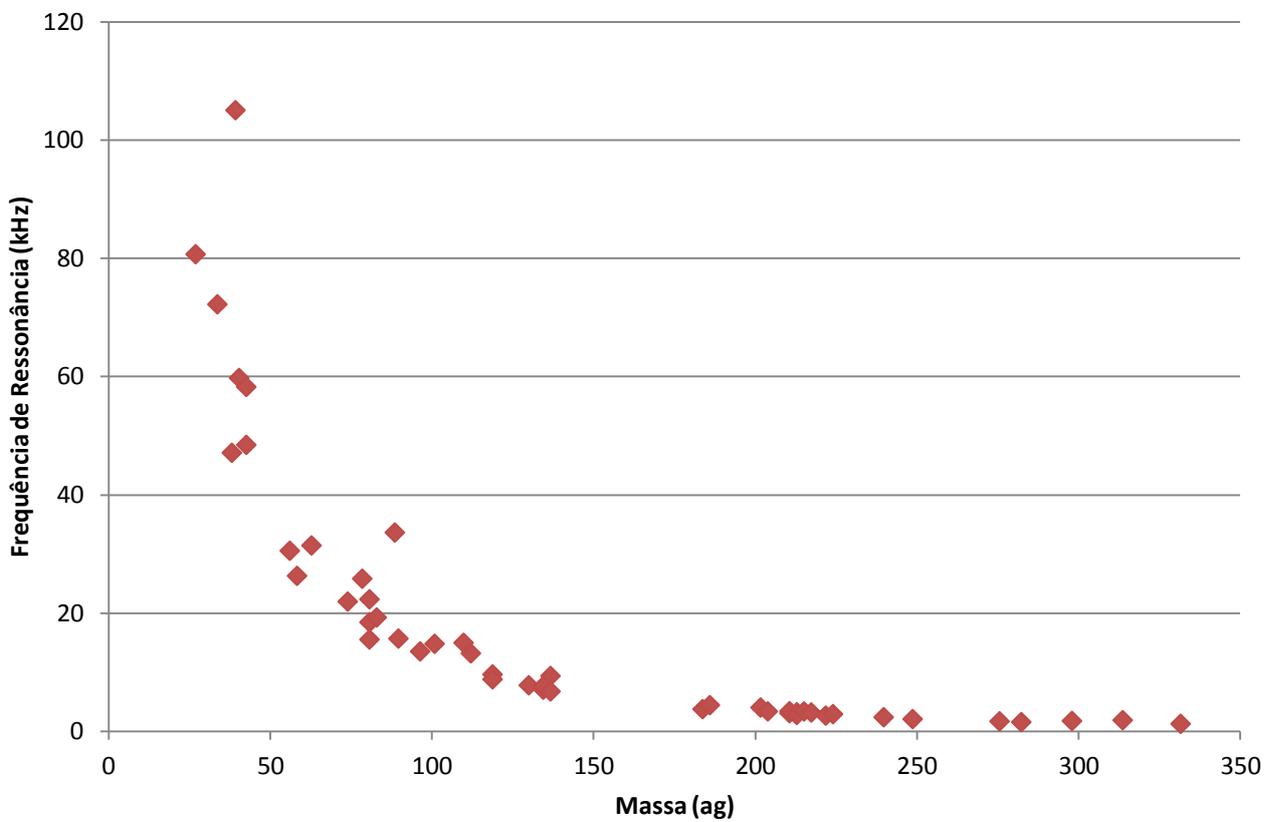


Gráfico 4 Relação entre a densidade de um braço de cromossoma e a sua frequência natural para o MV2. ag - Atograma

Discussão

Uma análise da tabela 5 permite afirmar que existe uma desigualdade de valores importante entre os vários braços de cromossomas em termos de massa, volume e densidade, algo expectável, uma vez que o número de pares de base, nucleossomas e comprimento do braço são diferentes. Já na tabela 6, não se verifica essa grande discrepância, facto igualmente previsível, pois a diferença entre os objetos de estudo é mínima.

A imagem 2 revela dois modos de vibração muito semelhantes, todavia diferentes quando se considera as três dimensões espaciais. Vê-se que a extremidade do cromossoma que não está fixa é a que sofre maior deslocamento e que a região do centrómero, que está fixa, não se move.

Após a simulação obteve-se a frequência natural de cada braço de cromossoma para os modos de vibração acima mencionados. Entre estes modos a frequência é bastante semelhante ou mesmo igual em alguns casos, mas substancialmente diferente noutros: 13p, 18p, 21p, 22p, Yp e 22q t(9;22)(q34;q11). Poder-se-ia ter calculado mais modos de vibração, porém tal foge ao objetivo deste trabalho. O que é notável é a variação que ocorre dentro de cada modo vibracional (tabela 7), isto é, cada braço de cromossoma tem uma frequência natural própria e diferente dos demais. Acontece que algumas frequências estão próximas entre si (e.g. a diferença entre 9p e 13p é de apenas 6 Hz), nunca sendo, no entanto, iguais.

Os resultados para as variações de 1p mostram que a substituição de um par de base ou a adição de algumas bases não provoca uma alteração suficientemente significativa para que a frequência natural mude, aliás foi necessário adicionar 100 000 pares de bases para que houvesse uma diminuição de 1 Hz na frequência natural. Já o aumento do comprimento na ordem dos nanómetros resulta em alterações da frequência natural, sendo necessário apenas incrementar 1 nanómetro, para que esse efeito se dê. Todavia, apenas se considerou estas

variações em cenários separados, ou seja, quando mudava-se o peso não se alterava o comprimento e vice-versa. Este facto pode condicionar o resultado final.

Assim, quando a massa e comprimento dos braços dos cromossomas variam de forma significativa, a frequência de ressonância também se diversifica. Pode observar-se que existe uma tendência exponencial negativa quando se relaciona a frequência natural e o comprimento do braço do cromossoma (gráficos 1 e 2) e quando se confronta a frequência de ressonância e a massa do braço do cromossoma (gráficos 3 e 4).

A verificação de que uma alteração significativa na sequência genómica reflete-se na frequência natural de um braço de cromossoma implica que ao sujeitar-se uma célula, por tempo e intensidade suficiente, a uma onda sonora com essa frequência, o braço do cromossoma oscile até à sua rotura, enquanto os restantes cromossomas permanecem intatos (desde que a frequência de ressonância destes últimos seja significativamente diferente do primeiro). O resultado seria uma monossomia daquele cromossoma ou pelo menos uma deleção daquele braço, que poderá ter consequências nefastas na sobrevivência daquela célula em particular.

Por exemplo, imagine-se um doente com leucemia mieloide crónica, onde as células neoplásicas são portadoras da translocação $t(9;22)(q34;q11)$. Sabe-se que fármacos que bloqueiam o gene de fusão bcr-abl localizado em $22q t(9;22)(q34;q11)$, aumentam a sobrevida, porém as células neoplásicas acabam por ganhar resistências aos fármacos e a doença evoluiu inexoravelmente. [1,8,10]

Todavia se esse doente fosse exposto a ondas sonoras com a frequência de ressonância do $22q t(9;22)(q34;q11)$, que é substancialmente diferente dos restantes braços (tabela 7), esse cromossoma seria destruído, pondo em causa a sobrevivência da célula neoplásica, mas deixando as restantes células inócuas.

Pensa-se que a monossomia 2 ou a monossomia 4 são letais para células neoplásicas. [11] Se uma neoplasia tiver mutações nestes cromossomas que conduzam a uma alteração significativa da frequência natural em relação às restantes células do hospedeiro, a aplicação de ondas sonoras com esta frequência destruiria as células neoplásicas e pouparia as células nativas. Apesar das restantes monossomias em neoplasias não serem letais isoladamente, uma combinação de várias monossomias (tantas quanto as aberrações cromossômicas dessas células o permitam) terão provavelmente um impacto importante no funcionamento e na sobrevivência dessa linhagem celular.

Por conseguinte, está-se perante um método que poderá permitir a destruição seletiva de células com um genoma diferente, neoplásicas ou outras (e.g. bacterianas), das células do hospedeiro.

Este estudo, tal como outros, apresenta algumas fontes de erro e limitações. Uma será a que advém de utilizar-se morfologias aproximadas e valores arredondados, estimados ou generalizados para efetuar os cálculos, o que poderá afetar o resultado final (frequências de ressonância). Outra limitação é a de a simulação não distinguir o quão diferentes terão de ser as frequências naturais de dois objetos para que apenas um seja afetado.

Eventuais soluções para os problemas levantados no parágrafo precedente serão a medição e experimentação laboratorial, ou seja, mensurar e aplicar ondas sonoras em cromossomas reais.

Conclusão

Neste trabalho, utilizando simulação computacional, chegou-se à frequência de ressonância de vários braços de cromossomas. Verificou-se que modificando a massa e o tamanho dos braços dos cromossomas, altera-se a frequência de ressonância. Isto poderá permitir o desenvolvimento de uma nova arma terapêutica que destrua seletivamente células com um genoma diferente das células do hospedeiro.

Recomenda-se a experimentação laboratorial deste princípio, a fim de averiguar a sua viabilidade.

Agradecimentos

Um estudo desta envergadura precisa de muita ajuda para ser efetuado. Várias foram as pessoas que contribuíram de forma significativa para a conceção, planificação, elaboração e redação deste trabalho. Assim de entre as numerosas pessoas que tornaram esta tese possível, destaco e agradeço a:

Professora Doutora Maria Filomena Botelho por ter-me recebido e acolhido as minhas ideias de forma tão honesta e simpática e ao enorme impulso na conceção e planificação do trabalho que proporcionou.

Professor Doutor Francisco Caramelo pelo apoio constante na conceção e planificação do trabalho e produção e avaliação do modelo computacional.

Professor Doutor Miguel Patrício Dias pelo trabalho árduo na conceção e avaliação do modelo computacional.

Professora Doutora Ana Margarida Abrantes pelo acolhimento e validação que me proporcionou nas fases iniciais desta tese e igualmente pela ajuda na conceção e planificação deste estudo.

Inês Margarida Branco e **Maria da Graça Martins Branco**, irmã e mãe, pela enorme paciência e motivação para a anotação e redação de todos os números envolvidos nesta tese.

Todos os Profissionais da área de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra que permitiram que este trabalho tivesse sido elaborado.

Referências Bibliográficas

- [1] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of The Cell*. 5ª Edição. EUA: Garland Science, 2008. pp 203-218, 1208
- [2] Poirier MG. Micromechanical Biochemical Studies of Mitotic Chromosome Elasticity and Structure. PhD [tese]. Chicago: Universidade de Illinois; 2001
- [3] Poirier MG, Marko JF. Micromechanical studies of mitotic chromosomes. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. 2002; 23: 409–431
- [4] Mariño-Ramírez L, Kann MG, Shoemaker BA, Landsman D. Histone structure and nucleosome stability. *Expert review of proteomics* 2005;2(5):719-729. doi:10.1586/14789450.2.5.719.
- [5] Khare SP, Habib F, Sharma R, Gadewal N, Gupta S, Galande S. Histome: a relational knowledgebase of human histone proteins and histone modifying enzymes (*Nucleic Acids Research* (2011) Database issue doi:10.1093/nar/gkr1125). PubMed ID: 22140112
- [6] Magrane M. and the UniProt consortium UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data Database, 2011: bar009 (2011).
- [7] The NCBI handbook [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2002 Oct. Chapter 18, The Reference Sequence (RefSeq) Project. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/>
- [8] Kurzrock R, Kantarjian HM, Druker BJ, Talpaz M. Philadelphia Chromosome–Positive Leukemias: From Basic Mechanisms to Molecular Therapeutics. *Ann Intern Med*. 2003;138:819-830.
- [9] Stothard P (2000) The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* 28:1102-1104.
- [10] Aparicio S, Caldas C. The Implications of Clonal Genome Evolution for Cancer Medicine. *N Engl J Med* 2013; 368:842-851
- [11] Clarke DJ, Giménez-Abia N JF, Nnies HT, Neitzel H, Sperling K, Downes CS, Johnson RT. Creation of monosomic derivatives of human cultured cell lines. *Cell Biology*. 1998; 95: 167–171.