

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
Instituto de Biociências  
Campus de Botucatu

**“DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UMA  
TÉCNICA QUANTITATIVA DE ANÁLISE DE IMAGEM  
PARA AVALIAÇÃO DO TESTE DO COMETA CORADO  
PELA PRATA”**

**GABRIELLI BRIANEZI**

Orientador: Prof. Dr. Hélio Amante Miot

Co-orientador: Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo

Monografia realizada no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina (FMB) e apresentada ao Instituto de Biociências – IB – UNESP – Campus de Botucatu - SP, como exigência parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas – Modalidade Médica.

Botucatu – SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Brianezi, Gabrielli.

Desenvolvimento e validação de uma técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata / Gabrielli Brianezi. - Botucatu [s.n], 2008.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas – Modalidade médica) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2008

Orientador: Hélio Amante Miot

Co-Orientador: João Lauro Viana de Camargo

1. Bioinformática 2. Imagen digital 3. Toxicología genética

Palavras-chave: Análise de imagem; Genotoxicidade; Métodos quantitativos; Teste do cometa

“Precisamos dar um sentido humano às nossas construções. E, quando o amor ao dinheiro, ao sucesso nos estiver deixando cegos, saibamos fazer pausas para olhar os lírios do campo e as aves do céu”.

Érico Veríssimo

## DEDICATÓRIA

---

Dedico este trabalho com muito carinho:

Primeiramente a Deus, que me acompanha e abençoa todos os dias da minha vida, que me dá ânimo e saúde para realizar meu trabalho.

"Riqueza e força engrandecem o coração, mas acima delas está o temor do Senhor. Com o temor do Senhor nada falta, e além dele não é preciso buscar outra ajuda. O temor do Senhor é como paraíso de bênçãos, e sua proteção está acima de qualquer glória". Eclesiastes 40 (Bíblia Sagrada)

A meus pais, Sandoval e Marina, que sempre me apoiaram em minhas decisões, e sempre estiveram comigo, apesar de distantes, me dando forças para nunca desistir. Amo muito vocês!!!

A meus irmãos, Danielli e Aislan, pelos dias de diversão e pelo companheirismo que sempre tivemos, mesmo estando mais tempo longe um do outro que próximos, e também ao meu cunhado Claudinho, a quem tenho um imenso carinho.

A meus avós, que sempre torceram e rezaram para meu sucesso e pelo carinho que sempre demonstraram por mim.

"A família está convocada a ser templo, ou seja, casa de oração: uma oração singela, cheia de esforço e ternura. Uma oração que se faz vida, para que toda a vida se converta em oração". (Papa João Paulo II)

As minhas amigas, minha segunda família, Ana Paula (Buzuza), Ana Paula (E.coli), Marina (Perdiz), Simone (Dori), Simony (Lyrirrixa) e Andressa (Ingá), agradeço pelos dias de convivência, pelas conversas, pelas brigas, pelos momentos de descontração e diversão vividos e que nunca serão esquecidos.

"O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis". (Fernando Pessoa)

As minhas amigas, irmãs de coração, Danielle e Débora, que apesar da pouca convivência e da distância, nossa amizade somente se intensificou e se fortaleceu. Obrigada pelos nossos encontros, muitas vezes depois de meses sem nos ver.

"Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra, mas não vai sozinha e nem nos deixará só, porque leva um pouco de nós e deixa um pouco de si. Há os que levam muito e deixam pouco, há os que levam pouco e deixam muito. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que não nos encontramos por acaso". (Charles Chaplin)

Aos meus companheiros de laboratório, Toxicam, que tanto me ajudaram e que participaram de minha formação profissional e também pessoal, as amigadas que encontrei lá e que ficarão para sempre.

## AGRADECIMENTO ESPECIAL

---

Agradeço ao Prof. Hélio, que me orientou neste trabalho e proporcionou meu desenvolvimento e minha formação como pesquisadora, e que me ajudou na realização de minha pesquisa e no meu crescimento profissional e pessoal..

"A aprendizagem é um simples apêndice de nós mesmos; onde quer que estejamos, está também nossa aprendizagem." (William Shakespeare)

Ao Prof. João Lauro, que realizou minha ligação ao meu orientador e me acolheu em seu laboratório para a realização de meu trabalho, e também por proporcionar meu amadurecimento na carreira científica.

"A vida sem ciência é uma espécie de morte." (Sócrates)

Aos pós-graduandos, e amigos, Renato, Mariana e Marise, que disponibilizaram um pouco de seu tempo para colaborarem com meu trabalho, agradeço a seriedade com que trabalharam e certamente foram fundamentais para o bom desenvolvimento deste trabalho.

"O conhecimento é orgulhoso por ter aprendido tanto; a sabedoria é humilde por não saber mais."  
(William Cowper)

## Sumário

1. Resumo .....	9
2. Abstract .....	11
3. Introdução .....	14
4. Material e Métodos .....	19
4.1 Aquisição do material .....	19
4.2 Tratamento dos animais .....	19
4.3 Processamento e coloração .....	20
4.4 Padronização da aquisição das imagens .....	21
4.5 Validação do método visual.....	22
4.6 Processamento das imagens .....	22
4.7 Validação do método de análise de imagens .....	23
4.8 Cálculo do Tamanho da amostra .....	24
4.9 Análise Estatística .....	24
5. Resultados .....	27
6. Discussão.....	33
7. Conclusão .....	38
8. Anexo I – Quadros .....	40
9. Anexo II – Gráficos.....	50
10. Anexo III – Tabelas .....	54
11. Bibliografia.....	64

## RESUMO / ABSTRACT

---



## 1. Resumo

O teste do cometa é um método de análise de dano no DNA amplamente utilizado para quantificar danos oxidativos e *crosslinks* de DNA, apoptose e a genotoxicidade de substâncias químicas como produtos químicos, farmacêuticos, agroquímicos, entre outros.

A técnica é sensível para detectar lesões em fita simples de DNA, lesões de sítios alcalinos lábeis e locais de reparos incompletos e se baseia na migração de fragmentos de DNA em microeletroforese, o DNA migra para o ânodo formando uma “cauda”, e a imagem formada tem a aparência de um cometa.

As lâminas podem ser coradas com fluorescência ou ainda pela prata, tendo diferenças no tipo de microscópio utilizado para a análise e pela possibilidade de armazenamento das lâminas, e sendo a primeira um método de coloração com maiores dificuldades de realização.

A análise das imagens pode ser realizada de maneira visual, porém há a desvantagem da subjetividade dos resultados, o que pode ser minimizado por um método automatizado de análise digital.

Esse processo foi estudado neste trabalho com o objetivo de realizar a validação da análise digital tornando-o um método quantitativo com maior reprodutibilidade, minimizando a variabilidade e imprecisão decorrente da análise subjetiva.

Para essa validação utilizamos 50 cometas fotografados de maneira padronizada e impressos, as imagens foram submetidas a três avaliadores experientes, os quais as quantificaram manualmente. Posteriormente, as imagens foram processadas pelo software gratuito ImageJ 1.38x, impressas e quantificadas manualmente pelos mesmos avaliadores.

Houve melhor desempenho na concordância intraclasse das medidas avaliadas manualmente após o processamento digital das imagens.

Em seguida, foi desenvolvido um algoritmo de análise digital das medidas do cometa, os valores obtidos foram comparados com os estimados manualmente após o processamento e observamos alta correlação entre os resultados.

Assim, temos que o uso de sistemas de análise de imagem aumenta a objetividade da análise do cometa, podendo ser utilizado na estimativa de seus parâmetros.

Palavras chave: Teste do cometa, genotoxicidade, análise de imagem, método quantitativo.

## 2. Abstract

### **Development and validation of a quantitative image analysis method to evaluate comet assay (silver staining).**

The comet assay is a method of DNA damage analysis widely used to quantify oxidative damage, crosslinks of DNA, apoptosis and genotoxicity of chemicals substances as chemical, pharmaceuticals, agrochemicals products, among others.

This technique is suitable to detect DNA strand breaks, alkali-labile sites and incomplete excision repair sites and is based on the migration of DNA fragments by microelectrophoresis, DNA migrates for the anode forming a “tail”, and the formed image has the appearance of a comet.

The slides can be stained with fluorescence or silver, having differences in the microscopy type used for the analysis and the possibility of storage of the slides, moreover, the first one is a stained-method with more difficulties of accomplishment.

The image analysis can be performed by a visual way, however, there is a disadvantage as the subjectivity on the results, that can be minimized by an automated method of digital analysis.

This process was studied in this report with the aim to perceive the validation of the digital analysis turning it a quantitative method with larger reproductibility, minimizing the variability and imprecision due to the subjective analysis.

For this validation we selected 50 comets photographed in a standardized way and printed, afterwards, pictures were submitted to three experienced appraisers, who quantified them manually. Later, the images were processed by free software ImageJ 1.38x, printed and quantified manually by the same appraisers.

The intraclass correlation was higher to comet measures after image processing.

Following, an algorithm of automated digital analysis from the measures of the comet was developed; the values obtained were compared with those

estimated manually after the processing resulting high correlation among the measures.

The use of image analysis systems increases the objectivity of the comet analysis, and could be used in the estimate of its parameters.

Key words: Comet assay, genotoxicity, image analysis, quantitative method.

## INTRODUÇÃO

---

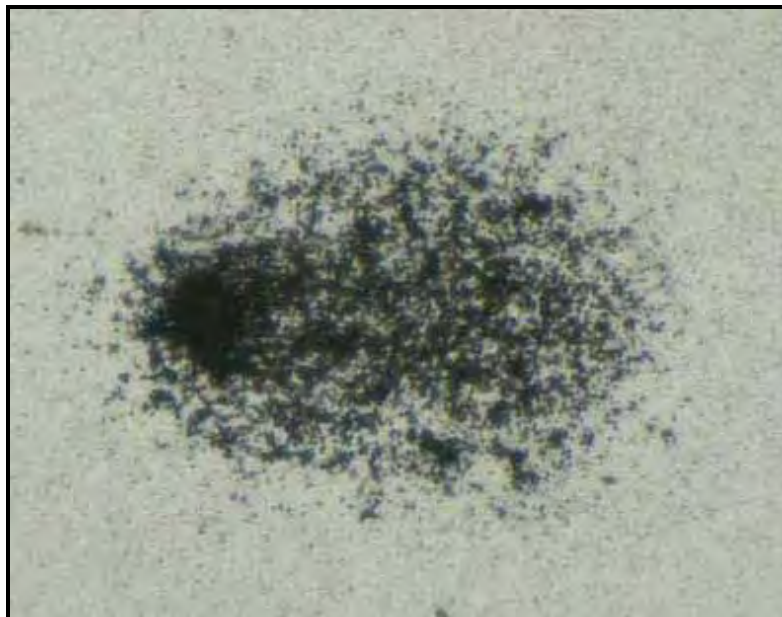
### 3. Introdução

O ensaio do cometa ou técnica da eletroforese em microgel é uma técnica muito útil e largamente empregada para avaliação de dano de DNA e seu reparo em células individuais.

Inicialmente, a técnica foi desenvolvida para visualizar o dano de DNA induzido por radiação em células de mamíferos (Ostling e Johanson 1984). Atualmente, esse método é amplamente usado na pesquisa científica para estimar danos oxidativos e *crosslinks* de DNA, apoptose, e em genotoxicidade induzido por combinações de substâncias químicas, como produtos químicos, farmacêuticos e agroquímicos. É um método rápido, de baixo custo, de relativa facilidade de realização, seguro e que pode ser aplicado na maioria dos tecidos.

Duas versões diferentes do ensaio de cometa foram descritas por Singh et al. (1988) e Olive (1989). É importante notar que a versão alcalina do teste do cometa (Singh et al. 1988) que tem sido adotada pela maioria dos laboratórios, é sensível para uma variedade de lesões de DNA como lesão em fita simples de DNA, lesões de sítios alcalinos lábeis e locais de reparos incompletos, o que a difere da versão neutra (Olive et al 1989), a qual é menos sensível e detecta apenas lesão de fita dupla de DNA.

A versão utilizada neste estudo é a descrita por Singh et al (1988) com modificações (Nadin et al., 2001; Hartmann et al., 2003; Fukumasu et al., 2006) e seu princípio básico é após a lise celular e da carioteca, há a migração de DNA em uma matriz de agarose sob condições de eletroforese. Quando vista ao microscópio, uma célula adquire a forma de um cometa, com cabeça (a região nuclear) e cauda que contém fragmentos de DNA ou fitas que migram na direção do ânodo (Figura 1).



**Figura 1:** Imagem do teste do cometa corado pela prata

Depois de submetidas à eletroforese, as lâminas precisam passar pelo processo de coloração, que pode ser feito com fluorescência pelo brometo de etídio, iodeto de propídio e *cyber green* ou ainda pela coloração de prata.

Na coloração de fluorescência há necessidade de um microscópio de fluorescência para a análise das lâminas e se forem guardadas para uma posterior observação necessitam passar novamente pelo processo de coloração, porque esta é perdida em um dia. Já com a coloração de prata, não há a necessidade de corar as lâminas novamente podendo, portanto, armazená-las para uma análise posterior, a análise ainda pode ser feita com um microscópio de luz convencional, o que facilita o emprego do teste do cometa.

Outra desvantagem do brometo de etídio, um dos tipos de coloração de fluorescência e a mais utilizada, é sua alta toxicidade e mutagenicidade, podendo causar sérios danos quando em contato com o indivíduo, causando tosse e espirros quando inalados, se ingeridos causa desarranjos gastro-intestinais com problemas no fígado e rins, irritação na pele e olhos e na exposição crônica é um provável cancerígeno.

Quando comparadas, as duas colorações (prata e fluorescência) não apresentam diferenças em relação aos resultados das imagens obtidas, sendo, portanto equivalentes (Nadin 2001, Garcia 2007).

Pode-se utilizar uma grande variedade de tecidos para a realização do teste, porém, o uso de linfócitos é muito facilitado, por já se encontrar em suspensão (sangue) não necessitando de processamento do tecido por enzimas ou por processo mecânico para a produção das lâminas, porque esses processos, principalmente o enzimático, podem causar danos adicionais ao DNA das células utilizadas.

Outras vantagens do uso de linfócitos são: a facilidade de sua obtenção em grande número não necessitando de cultura celular, as células estarem quase todas na mesma fase do ciclo celular e por poderem refletir o estado do organismo como um todo (Collins 2008).

A análise do teste dos cometas basicamente depende do grau de fragmentação do DNA e sua migração a microeletroforese, dessa forma, medidas como o comprimento total da “cauda” e sua densidade de DNA fornecem dados indiretos sobre o estado do DNA da amostra.

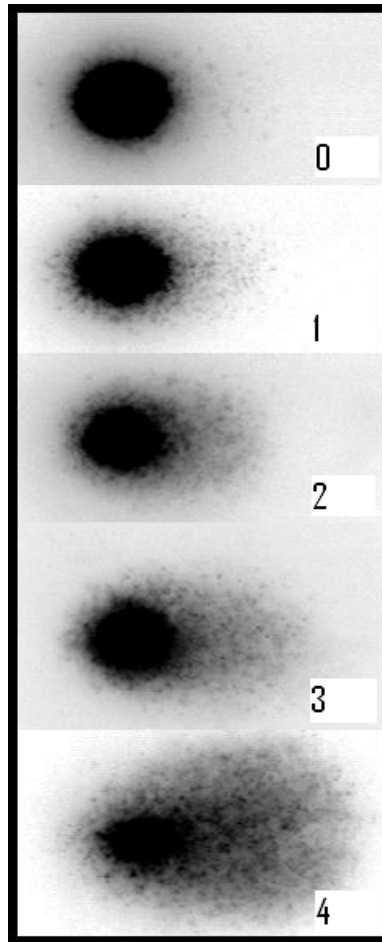
Essas medidas são feitas visualmente (Figura 2), o que pode ocasionar uma falta de precisão na avaliação desses parâmetros devido à subjetividade do observador, também se pode notar uma menor uniformidade nas leituras dessas medidas e uma baixa reprodutibilidade do teste em laboratórios diferentes.

Uma maior variabilidade das medidas do teste apresenta também a limitação na detecção de pequenos efeitos genotóxicos, ou, a necessidade, para isso, de amostragens mais numerosas.

A avaliação dos cometas pode ser realizada por um método de análise de imagem automatizado, medindo diferentes parâmetros de danos: comprimento total do cometa, comprimento da cauda, densidade da cauda (% de DNA na cauda) e momento da cauda.

O uso de um sistema quantitativo por análise de imagem pode contribuir para a minimização desses problemas e tornar o teste do cometa mais objetivo e com alta reprodutibilidade.





**Figura 2:** Esquema de classificação visual do cometa utilizada pelos avaliadores (Speit, 1995, García 2004).

## MATERIAL E MÉTODOS

---

## 4. Material e Métodos

### 4.1 Aquisição do material

Para a aquisição de material destinado aos testes de cometa, foram empregados linfócitos de ratos Wistar machos com oito semanas pesando em média 200g, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

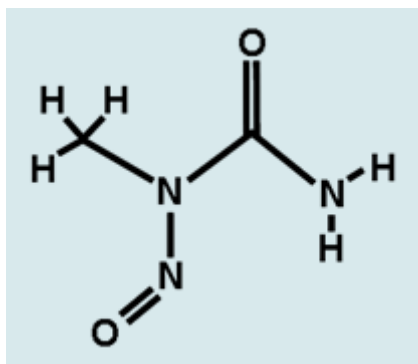
Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, com dimensões de 41x34x16 centímetros (cinco animais/gaiola), forradas com maravalha de pinho autoclavada, trocadas três vezes por semana. Durante os experimentos os animais permaneceram no biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UNESP em Botucatu recebendo ração basal *peletizada* (Biobase, Bio-tec, Bases Química Ltda., Colombo-PR) e água filtrada *ad libitum*, em uma sala com temperatura de 22°C, umidade relativa de 55%, ciclo de luz de 12 horas claro/escuro e exaustão contínua do ar ambiente. Após período de aclimação de duas semanas, os ratos foram casualizados e separados em lotes de cinco animais por caixa.

Foi coletado sangue do plexo periorbital para o processamento das amostras após um período de oito semanas.

### 4.2 Tratamento dos animais

Foram utilizados 15 animais por grupo. Sendo, portanto dois grupos, um tratado com MNU (N-nitroso-N-methylurea) e o outro não recebeu tratamento, mas somente ração basal e água filtrada *ad libitum*.

O MNU não tem uso comercial conhecido, sua fórmula química é  $C_2H_5N_3O_2$  e estrutural mostrada na figura 3, existe na forma de cristais pálidos de cor amarela e tem peso molecular de 103,10 g/mol. Possui alto poder carcinogênico, mutagênico e teratogênico, sua toxicidade é devido a sua capacidade de transferir um grupo metil para as bases dos ácidos nucléicos e está classificado no grupo 2B (provável carcinógeno humano) segundo a IARC.



**Figura 3:** Fórmula estrutural do *N*-Nitroso-*N*-Methylurea, MNU.

Os animais tratados com MNU receberam 1ml para cada 100g de peso do animal de uma solução de MNU diluído em NaCl na concentração de 50mg/Kg, administrada via intraperitoneal uma vez, e a coleta do sangue periorbital foi realizada três horas após administrada a dose de MNU.

### 3.3 Processamento e coloração

Foram preparadas lâminas com sangue coletado segundo o protocolo abaixo.

O teste do cometa será desenvolvido segundo protocolo de Singh et al (1988) com modificações (Nadin, 2001; Hartmann e Speit, 1995; Fukumasu et al., 2006).

Todo o procedimento do ensaio do cometa foi realizado sob baixa luminosidade devido à foto sensibilidade dos reagentes. Em resumo, lâminas histológicas foram mergulhadas em gel de agarose mantido em banho-maria à 60°C e, após remoção do excesso com papel-toalha, secas em temperatura ambiente e em posição horizontal.

Amostras de sangue periférico dos animais testados foram coletadas do plexo venoso periorbital com tubo microcapilar. Após coleta, o material foi transferido para um microtubo identificado. Este material foi misturado com agarose Low Melting Point 0,5% e PBS livre de Ca<sup>++</sup> e Mg<sup>++</sup>. Uma alíquota de cada tubo foi aspirada para preparo de esfregaços individuais sobre as lâminas previamente revestidas de agarose normal. Para adesão adequada das células à agarose, as lâminas foram mantidas em geladeira por cinco minutos.

A seguir, realizou-se a lise das células por 24h e dentro da geladeira, com detergentes (n-lauroil sarcosinato, SIGMA) e altas concentrações de sais

(EDTA, NaCl, Tris, Dimetilsulfóxido e Triton X-100) para ruptura das membranas e liberação do DNA. A eletroforese foi realizada em condições alcalinas ( $\text{pH} > 13$ ) com soluções de EDTA (1mM) e NaOH (300mM). A neutralização desses álcalis foi feita com solução de tampão Tris (Invitrogen).

A coloração foi realizada com prata pelo método descrito por Nadin, (2001) e (Fukumasu et al., 2006). Para tanto, misturou-se em uma cubeta 32mL da solução A (50gNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> q.sp. 1000mL de H<sub>2</sub>O bidestilada), e 68mL da solução B (0,2g de NH<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>, 0,2g de AgNO<sub>3</sub>, 1g de ácido silicotungstênico, 500uL de formaldeído, q.s.p. 1000mL de água bidestilada) por um minuto.

Ao término da coloração, as lâminas foram lavadas por cinco minutos em solução finalizadora (1 mL de ácido acético q.s.p. 100 mL de água bidestilada) e depois em água bidestilada por um minuto.

#### **4.4 Padronização da aquisição das imagens**

Uma etapa importante para a análise de imagem é a padronização do método de captura, armazenamento, correção dos defeitos (como iluminação não-uniforme, ruídos eletrônicos), aumento da imagem, segmentação de objetos da imagem.

A captura da imagem é feita através de uma câmera que converte o sinal analógico (imagem) em uma informação digital (numérica). Essa informação digital é representada por valores de cinza que indicam o brilho de cada ponto dentro da imagem, que é denominado pixel (Oberholzer 1996).

Neste trabalho utilizamos uma câmera fotográfica digital Olympus Camedia C-7070 acoplada a um microscópio Olympus BX41 com aumento de 40x, iluminação cinco.

As fotografias seqüenciais foram adquiridas em modo manual, ISO 100, resolução de 1024x768 pixels, 24 bits de cor, densidade de 72 dpi, velocidade do obturador de 1/2000, F 4.8 em Zoom máximo, e armazenadas em arquivos tipo TIFF.

O protocolo fotográfico empregado resultou em uma escala de 6,29 pixels por micrômetro.

Os cometas corados pela prata foram fotografados a partir das lâminas provenientes dos grupos controle positivo e negativo, foram selecionadas 50 células para proceder à análise do teste do cometa.

O processo de seleção das células foi realizado pela pesquisadora principal e compreendeu o rastreamento das lâminas (movimento contínuo do topo para a base da lâmina) (McCarthy et al. 1997), até o encontro de estruturas bem formadas e isoladas no campo, onde foram documentadas fotograficamente, até a conclusão de 10 unidades para cada classe visual.

As imagens dos cometas foram classificadas conforme o comprimento da cauda em cinco categorias que correspondem às seguintes gravidades de danos no DNA: 0 = sem danos (<5%); 1 = baixo nível de danos (5-20%); 2 = médio nível de danos (20-40%); 3 = alto nível de danos (40-95%); 4 = totalmente danificados (>95%) (Speit, 1995), essa classificação é em relação ao comprimento da cauda correspondendo à respectiva gravidade de dano ao DNA (Figura 2).

#### **4.5 Validação do método visual**

As imagens dos cometas selecionadas para a análise foram impressas em papel A4 e submetidas a três observadores experientes na análise do cometa, os quais mediram as imagens com a mesma régua transparente. A partir dessas medidas foi feita a quantificação visual do nível de dano no DNA das células observadas e então classificadas nas cinco categorias mencionadas acima (Figura 2).

Foi estimada a correlação interpessoal das medidas a partir do teste de correlação linear e o coeficiente de correlação intraclassa, a precisão relativa das estimativas a partir do coeficiente de variação.

#### **4.6 Processamento das imagens**

As imagens dos cometas fotografadas foram recortadas e pré-processadas a partir do algoritmo desenvolvido para o software ImageJ 1.38x (Anexo I - Quadro 1) para análise automatizada e também para análise manual feita pelos mesmos três avaliadores. Estes mediram as imagens com a mesma régua transparente, anteriormente utilizada, e os parâmetros analisados foram os mesmos das imagens não processadas.

Após a definição da região de interesse (cometa individualizado), foram desenvolvidos métodos que envolvem a filtragem por cor, ajuste de contraste, definição de bordas, filtragem, e remoção do fundo a fim de preparar a imagem

para a segmentação e análise dos parâmetros. Todos os passos do processamento estão expostos no Anexo I - Quadro 1, os comandos de macro utilizados estão expostos no Anexo I - Quadro 2 e os efeitos visuais do processamento expostos no Anexo I - Quadro 3.

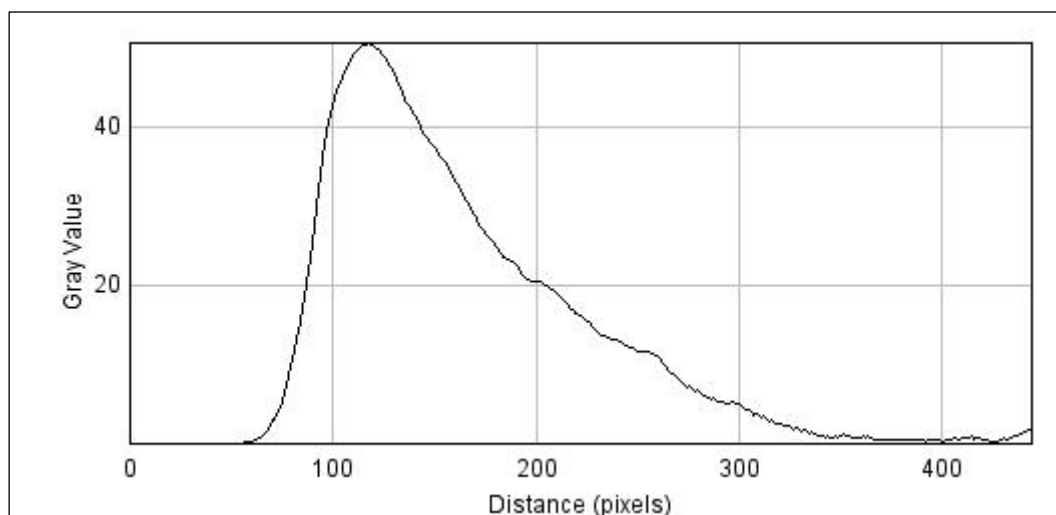
A filtragem de cor foi selecionada de acordo com o canal (R, G ou B) de cor que reteve maior informação digital, expressa pelo coeficiente de variação do histograma de cada imagem.

#### 4.7 Validação do método de análise de imagens

O sistema de análise digital utilizado estimou a quantificação do comprimento total do cometa, o comprimento da cauda e o momento da cauda para a validação do método digital (Olive, 1989).

Para essa análise digital as imagens foram processadas por um algoritmo desenvolvido para o software ImageJ 1.38x (Anexo I - Quadros 4 e 5) que envolve, após o pré-processamento, a filtragem estatística espacial (filtros de mediana e mínimo).

Os histogramas dos *pixels* das imagens processadas foram analisadas quanto às diferentes variáveis do teste do cometa em planilha do MSExcel (Figura 4).



**Figura 4:** Histograma da imagem do cometa 42 processada com algoritmo

Os parâmetros medidos pela análise digital foram: a intensidade de cor em escala de cinza, o comprimento total, da cabeça e da cauda do cometa, e o momento da cauda.

Os valores lineares estimados pelo sistema de análise digital foram comparados com as medidas realizadas com régua pelos pesquisadores e a correlação dos valores foi estimada pelo teste de correlação linear.

Posteriormente, todas as medidas estimadas pelo sistema de análise digital foram comparadas com a classificação visual (Figura 2) empregando o teste de correlação linear.

#### **4.8 Cálculo do Tamanho da amostra**

Os autores determinaram uma amostra inicial de 50 unidades baseados na padronização da literatura que emprega habitualmente essa quantidade para análise dos testes comparativos (Ribeiro, 2004).

Após a seleção das unidades, aquisição, processamento e análise das imagens, a amostra foi submetida ao teste de correlação linear de acordo com as classes visuais, e o tamanho amostral foi testado para seu coeficiente de correlação, estimando-se um poder de 0,8 e nível alfa de 0,05.

#### **4.9 Análise Estatística**

As medidas obtidas foram testadas quanto à normalidade pelo teste de Lilliefors.

A tendência central das amostras foi expressa como média ou mediana, e sua dispersão como desvio-padrão ou desvio interquartilico.

A precisão das medidas foi estimada a partir do coeficiente de variação. Os coeficientes de variação das imagens dos cometas nos canais R, G e B foram comparados entre si pelo teste de ANOVA (*two way*).

As medidas com distribuição paramétrica foram testadas quanto à correlação de seus valores pelo teste de correlação linear de Pearson, já as medidas não-paramétricas foram analisadas pelo teste de Spearman. A correlação interpessoal foi estimada pelo coeficiente de correlação intraclasse.

A diferença entre as estimativas dos avaliadores foi estimada pelo teste de Friedman.



Foi adotado como significativos valores bicaudais de  $p < 0,05$ . Para a análise estatística foi empregado o software Bioestat 5.0 (Ayres, 2003).

## RESULTADOS

---

## 5. Resultados

As lâminas foram coradas pela prata segundo o método descrito por Nadin et al. (2001), após passarem pelo procedimento do teste do cometa desenvolvido segundo protocolo de Singh et al (1988) com modificações (Nadin, 2001; Hartmann e Speit, 1995; Fukumasu et al., 2006).

Foram selecionadas 50 imagens de cometas, escolhidas pelo processo de rastreamento das lâminas (movimento contínuo do topo para a base da lâmina) (McCarthy et al. 1997), para evitar a análise repetida de um mesmo cometa, sendo somente selecionados os cometas com morfologia bem formada e que se encontravam isolados.

Após seleção das imagens, essas foram impressas e submetidas à análise de três avaliadores experientes, os seguintes parâmetros foram observados: classe dos cometas (0-4), comprimento total do cometa (mm), comprimento da cabeça (mm) e comprimento da cauda (mm) (Anexo I - Quadro 6).

Os três analisadores utilizaram a mesma régua transparente para obter as medidas e para a classificação visual das imagens utilizaram a seguinte escala: cometa 0 = sem danos (<5%); 1 = baixo nível de danos (5-20%); 2 = médio nível de danos (20-40%); 3 = alto nível de danos (40-95%); 4 = totalmente danificados (>95%) Speit, (1995) (Figura 2), essa classificação é em relação ao comprimento da cauda correspondendo à respectiva gravidade de dano ao DNA.

Os três avaliadores destacaram que as imagens dos cometas com “sujeira no fundo” não são utilizadas para a avaliação computadorizada utilizadas por eles e que também só submetem para a análise os cometas bem formados. Ainda analisam o padrão “geral” da lâmina, com as formas de cometa predominantes para obter os resultados.

Foi realizada a quantificação visual (classificação dos cometas - classe 0 a 4) como parâmetro de correlação posterior com as medidas computadorizadas.

Foi realizado o teste de normalidade (Lilliefors) para as estimativas. Todas as medidas, exceto o comprimento da cauda do avaliador 3 (Cau 3) mostraram distribuição não-paramétrica ( $p < 0,01$ ) (Anexo II - Gráfico 1).

As medidas manuais das imagens não-processadas foram expressas em mediana e estão representadas no Anexo III – Tabela 1.

Houve alta correlação nas estimativas das classificações visuais dos cometas entre os três avaliadores, com predominância das classificações das extremidades (0 e 4) (Anexo III - Tabela 3).

Em todos os parâmetros avaliados (classificação visual, comprimento total do cometa, comprimento da cabeça e comprimento da cauda), apesar de haver boa correlação, as estimativas dos três avaliadores divergem entre si, não apresentando boa concordância (reprodutibilidade) (Anexo III - Tabelas 2 e 3).

Foi identificada boa reprodutibilidade somente entre os avaliadores 2 e 3 em relação à classificação visual (0-4). Já em relação ao comprimento da cauda do cometa, não houve boa concordância, exceto entre os estimadores Av1 e Av2. Quando observamos as estimativas do comprimento da cabeça, a não concordância ocorre entre os estimadores Av1 e Av2; e Av2 e Av3 (Anexo III - Tabela 3).

Foi realizada também a medida manual das imagens impressas pelos mesmos avaliadores, após serem pré-processadas com o software gratuito ImageJ 1.38x (Collins, 2007) para destacar as características do cometas.

As etapas de processamento da imagem para a obtenção das medidas manuais estão representadas no Anexo I - Quadro 1 e as figuras desse processamento no Anexo I - Quadro 3, para a execução desse processamento foi criada uma Macro que automatiza o processo após a seleção da área de interesse (Anexo I - Quadro 2).

Um dos passos do processamento da imagem foi a escolha da filtragem da imagem pelo canal de cor “RED” (canal R – Anexo I - Quadro 3-C). Este canal é o que apresenta o maior coeficiente de variação dos histogramas de cor dos cometas processados, sendo, portanto o canal que reteve mais informação digital ( $p < 0,01$  ANOVA “two way”) (Anexo II - Gráfico 2).

Os parâmetros avaliados foram os mesmos analisados nas imagens não processadas e para essas medidas também foi utilizada a mesma régua transparente, e a mesma escala para a classificação visual (classe de 0-4) (Anexo III - Tabela 4).

O teste de normalidade (Lilliefors) também foi aplicado para os dados obtidos das imagens processadas. Todas as medidas, exceto o comprimento

da cabeça do avaliador 2 (cb2) mostraram distribuição não paramétrica ( $p < 0,01$ ). (Anexo II - Gráfico 3).

Para as medidas das imagens processadas, também foi realizado o teste de correlação de Spearman entre as estimativas dos três avaliadores (Anexo III - Tabela 5).

Foram também comparadas as correlações entre as medidas dos avaliadores realizadas com as imagens processadas e não-processadas (Anexo III – Tabelas 2 e 5).

Em todos os parâmetros avaliados (classificação visual, comprimento total do cometa, comprimento da cabeça e comprimento da cauda), houve um aumento na correlação entre os avaliadores, apresentando, portanto, uma melhor concordância (reprodutibilidade).

Em relação à classificação visual, houve uma grande concordância entre os avaliadores 1 e 2. Já em relação ao comprimento total do cometa, a melhor reprodutibilidade está entre os estimadores 2 e 3, mas todas as correlações demonstraram valores altamente significativos, assim como as correlações do comprimento da cauda, sendo a maior, a entre os avaliadores 1 e 3. As correlações do comprimento da cabeça dos avaliadores 1 e 2, e 1 e 3 não apresentaram boa concordância (Anexo III - Tabela 5).

Também podemos observar que houve uma diminuição nas diferenças entre os *ranks* nos testes que avaliaram as amostras quando comparadas as avaliações sem o processamento (Anexo III - Tabelas 3 e 6).

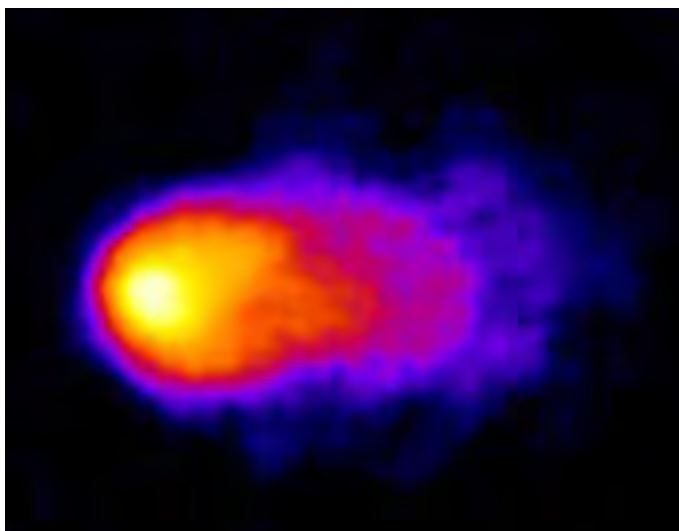
Quando comparamos as medidas manuais das imagens não-processadas com as imagens processadas pelo método proposto, observamos um aumento da precisão na maioria das medidas, melhorando a reprodutibilidade das análises (Anexo III - Tabela 7).

Posteriormente, foram desenvolvidos dois algoritmos de processamento (I e II) para o software gratuito Image J 1.38x (Collins, 2007). Após aplicação dos algoritmos foram realizadas medidas automatizadas das imagens, essas estimativas foram comparadas com a média das medidas manuais dos três avaliadores após o pré-processamento (Anexo I - Quadro 3) das mesmas imagens com o teste de correlação Spearman (Anexo III - Tabela 8 e 9).

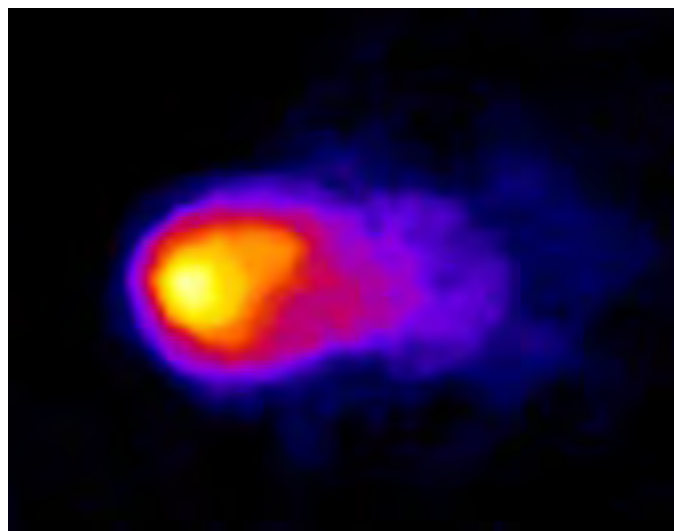
O algoritmo 1 utiliza filtragem de mediana no processamento das imagens e destaque da estrutura central em relação ao fundo.

O algoritmo 2 emprega filtragem estatística de mínimo e de mediana na individualização do corpo do cometa em relação ao fundo.

Para a aplicação dos algoritmos foram criadas macros que automatizam esse processo (Anexo I - Quadro 7 e 8). Esses algoritmos são de código aberto, e somente devem ser aplicados para o teste do cometa corado com a prata e para as imagens fotografadas com o mesmo protocolo descrito para assim obter um bom desempenho na avaliação do teste do cometa. As figuras 5 e 6 representam as imagens finais do cometa após a aplicação dos algoritmos.



**Figura 5:** Imagem do cometa 42 após a aplicação do algoritmo I



**Figura 6:** Imagem do cometa 42 após a aplicação do algoritmo II

Nos parâmetros correlacionados observamos alta correlação ( $R$  Spearman  $> 0,8$ ) entre as medidas automatizadas do algoritmo I e a média das medidas das imagens processadas dos três avaliadores, principalmente na comparação do momento da cauda com classificação visual ( $p < 0,01$ ), e entre os comprimentos totais ( $p < 0,01$ ) ou os comprimentos das caudas ( $p < 0,01$ ) (Anexo III - Tabela 8).

Também foi observada alta correlação ( $R_{\text{Spearman}} > 0,8$ ) entre as medidas do algoritmo II e as médias das medidas manuais das imagens processadas dos três avaliadores, principalmente quando comparamos os comprimentos da cauda, os comprimentos total, o e momento da cauda com a classificação, ( $p < 0,01$ ) (Anexo III - Tabela 9).

Em ambos os algoritmos (I e II), podemos observar uma baixa correlação do comprimento da cabeça com as medidas manuais processadas, por outro lado, esse mau desempenho também foi observado nas medidas manuais, quando correlacionadas as estimativas dos três avaliadores. Houve, porém, uma melhor correlação com o algoritmo II (Anexo III – Tabelas 2, 5, 8 e 9).

## DISCUSSÃO

---



## 6. Discussão

As lâminas do teste do cometa podem ser coradas tanto pela prata como por uma coloração de fluorescência. A coloração de prata oferece algumas vantagens sobre a fluorescência, como a possibilidade de armazenamento das lâminas sem a perda da coloração, podendo, portanto ser novamente analisadas após algum tempo e também tem a vantagem da análise das lâminas ser realizada em um microscópio de luz convencional, o que facilita o emprego dessa coloração por muitos laboratórios convencionais. A coloração de fluorescência também é altamente tóxica e mutagênica podendo causar sérios problemas quando em contato com o pesquisador biomédico.

O método de análise do teste do cometa corado com a prata ainda não foi padronizado, mas estudos anteriores mostram que os resultados da análise das duas colorações quando comparadas são equivalentes (Nadin 2001), sendo, portanto a coloração de prata uma alternativa válida para o teste do cometa, havendo a necessidade de uma validação do método de análise automatizado.

Neste estudo comparamos as medidas dos parâmetros do cometa realizadas nas imagens não-processadas e processadas dos três avaliadores, e observamos que há uma variabilidade nas estimativas manuais dos avaliadores e que com o pré-processamento da imagem essa variabilidade diminui, pois ocorre uma melhora na correlação entre eles, aumentando a reprodutibilidade dos resultados.

Esses resultados sugerem que o processamento digital prévio é uma rotina válida na redução da subjetividade da análise do cometa, aumentando sua precisão e capacidade de detecção de danos mais discretos ao DNA.

Realizamos também a análise digital das mesmas imagens, após o processamento delas com dois algoritmos. O algoritmo II, que empregou os filtros de “mínimo” e “mediana” apresentou melhor desempenho que o algoritmo I, com apenas filtro de “mediana”. Esse processamento das imagens melhora a análise do histograma gerado, como observado no Anexo I – Gráfico 9.

As medidas automatizadas pelos algoritmos desenvolvidos demonstraram alta correlação com os parâmetros medidos manualmente após o processamento das imagens, como também demonstrado em estudos descritos anteriormente (Collins 1997). A partir das medidas automatizadas obtivemos a vantagem de reduzir a subjetividade da análise feita pelos avaliadores, o que sugere seu emprego em pesquisas que utilizem o teste do cometa corado pela prata.

O baixo custo operacional, a possibilidade de armazenamento das lâminas, a relativa segurança dos reagentes, a facilidade de análise em microscópios de luz convencionais e a equivalência dos resultados do teste do cometa comparados à técnica clássica de fluorescência, são argumentos que fortalecem o emprego da coloração pela prata na análise do teste do cometa.

A pigmentação escura da coloração pela prata e a grande quantidade de resíduos (sujeira) depositados na lâmina dificulta o processo de segmentação digital do cometa e a avaliação convencional pelos softwares de análise de imagem.

O desenvolvimento de algoritmos que filtrem as partículas, não agrupadas ao cometa, consiste na maior dificuldade do emprego de sistemas de análise automatizados.

Os sistemas automatizados geram um grande número de parâmetros, os mais empregados na pesquisa científica são: comprimento da cauda, % de DNA na cauda e o momento da cauda.

O comprimento da cauda tem a desvantagem de não apresentar linearidade com a dose das substâncias-teste, atingindo um limite máximo de aumento mesmo que o dano no DNA continue crescendo. O momento da cauda também não apresenta linearidade de dose-resposta, e não possui uma fórmula padronizada, universalmente aceita, possuindo várias maneiras de ser calculado. Neste estudo, inclusive, foi utilizado mais de um modo de cálculo (Collins, 2008; Dehon, 2007).

Já a % DNA na cauda é um parâmetro que varia de forma linear com a frequência de quebra no DNA e também se mostra útil para a comparação de resultados internos ou entre laboratórios diferentes (Collins, 2008; Dehon, 2007).

Um dos parâmetros utilizados neste estudo foi a relação % de DNA na cauda pela % de DNA total no cometa para a comparação com o método manual, onde foi obtido alta correlação entre as técnicas, apresentando, portanto algumas vantagens e mais confiabilidade em sua escolha, ainda que, quando comparados, outros parâmetros possam apresentar valores de correlação ainda mais altos (Collins, 2008; Dehon, 2007).

Métodos objetivos de análise quantitativa também colaboram no “cegamento” dos resultados, já que as imagens avaliadas subjetivamente pelo pesquisador podem sofrer interferência, ainda que inconsciente, do desejo de resultados positivos.

Por outro lado, métodos objetivos de estimativa de parâmetros no teste do cometa não são suficientes para garantir resultados confiáveis de genotoxicidade.

O tratamento do material biológico, a preparação dos espécimes, a técnica de coloração, o rigor do protocolo da microeletroforese, a padronização da captura fotográfica e, principalmente a metodologia de seleção dos cometas são elementos que interferem no resultado numérico das análises.

O presente estudo identificou grande dificuldade na filtragem das imagens com “sujeira” no fundo da lâmina, assim como um grande número de células agrupadas ou com alterações na formação da estrutura do cometa.

É certo ainda que o maior grau de “seleção” dos cometas implica em interferências na aleatoriedade da amostragem, principalmente quando o pesquisador conhece as substâncias testadas em cada lâmina.

Outro elemento interferente é a presença de células na metáfase entre a amostra da lâmina, que, com material genético duplicado, formam caudas longas e densas, alterando alguns parâmetros de leitura do teste. A supressão das medidas *outliers* do sistema, previne a influência dessas estruturas na análise.

A coloração concomitante de todo o experimento com a mesma solução de corante, o uso simultâneo de controles positivo, negativo e doses diferentes da substância-teste, o “cegamento” dos pesquisadores que capturam as imagens, assim como um pré-teste com análise visual, são formas de confrontar a qualidade do experimento que será analisado pelo método objetivo automatizado.

Enfim, resultados de dano ao DNA identificados pelo teste do cometa podem não representar dano a sistemas biológicos quando testados “in vivo”, já que existem sistemas de proteção, reparo do DNA e apoptose celular envolvidos no processo. Pequenas diferenças observadas, ainda que detectadas estatisticamente, indicam essa tendência.

Dessa forma, a alta sensibilidade diagnóstica do teste do cometa deve ser avaliada cuidadosamente, ponderada segundo o comportamento de várias variáveis, que devem ter comportamento gradual de acordo com a concentração da substância testada e correlação direta com as medidas visuais.

Novos estudos contemplando a metodologia de coloração pela prata e fluorescência dos mesmos espécimes, analisadas pelos diferentes softwares devem corroborar para o uso desse algoritmo em larga escala na pesquisa de genotoxicidade usando o teste do cometa.

**CONCLUSÃO**

---

## 7. Conclusão

Foi desenvolvido e validado um sistema de análise de imagem digital para avaliação quantitativa do teste do cometa corado pela prata.

As estimativas manuais dos parâmetros do teste do cometa tiveram certa variabilidade, que foi reduzida após o pré-processamento da imagem, revelando-se um método útil para aumentar a reprodutibilidade dos resultados.

Foi observada alta correlação entre as medidas estimadas pelo sistema e as medidas manuais pré-processadas com a vantagem de reduzir a subjetividade da análise feita pelos avaliadores e aumentar a precisão das amostras. Esses resultados sugerem o emprego da análise digital em pesquisas que utilizem o teste do cometa corado pela prata, o que é facilitado ainda mais pela gratuidade do software utilizado e pelo uso de microscópio de luz convencional.

Para a completa validação do sistema de análise de imagem digital desenvolvido ainda seria de grande valia um estudo comparativo utilizando diferentes concentrações do carcinógeno. Assim como a comparação desse sistema automatizado com outros sistemas disponíveis para a avaliação da fluorescência.

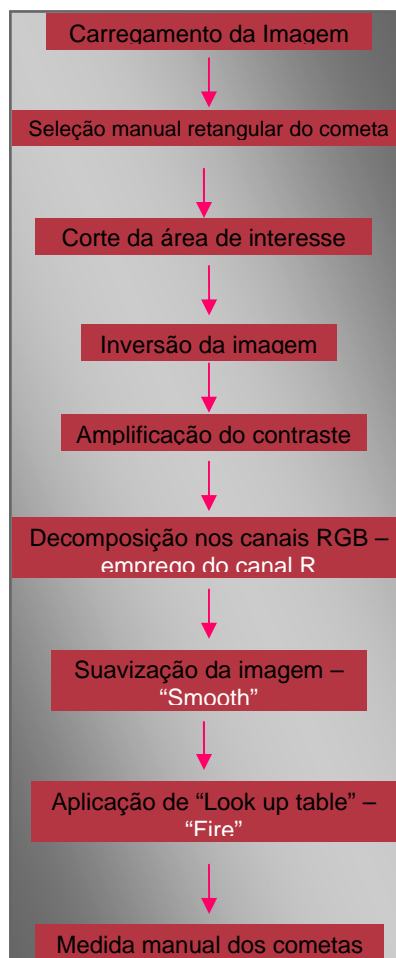
Os algoritmos empregados são de código aberto, e somente devem ser aplicados para o teste do cometa corado com a prata e para as imagens fotografadas com o mesmo protocolo descrito.

## ANEXO I - QUADROS

---

## 8. Anexo I – Quadros

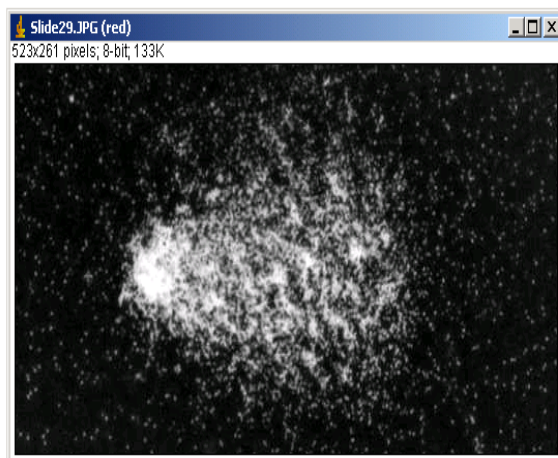
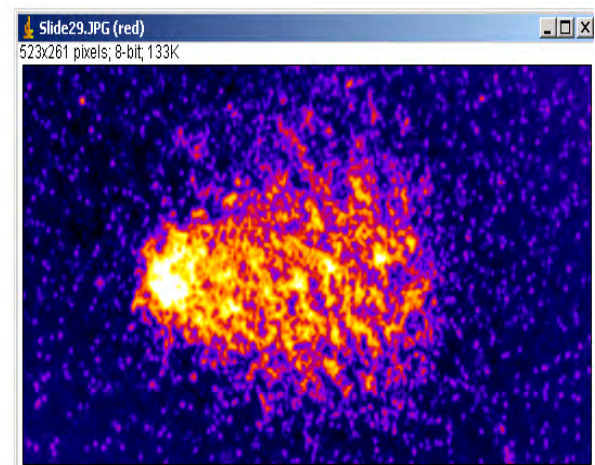
**Quadro 1:** Rotina de processamento das imagens.

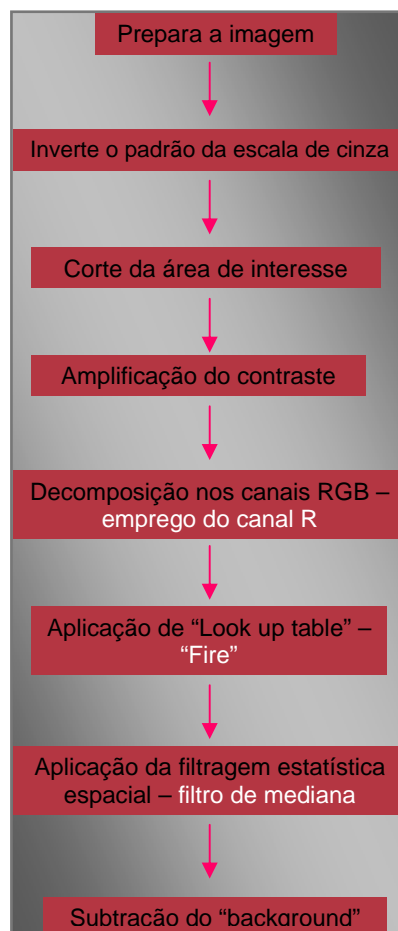




**Quadro 2:** Macro que automatiza o pré-processamento da imagem.

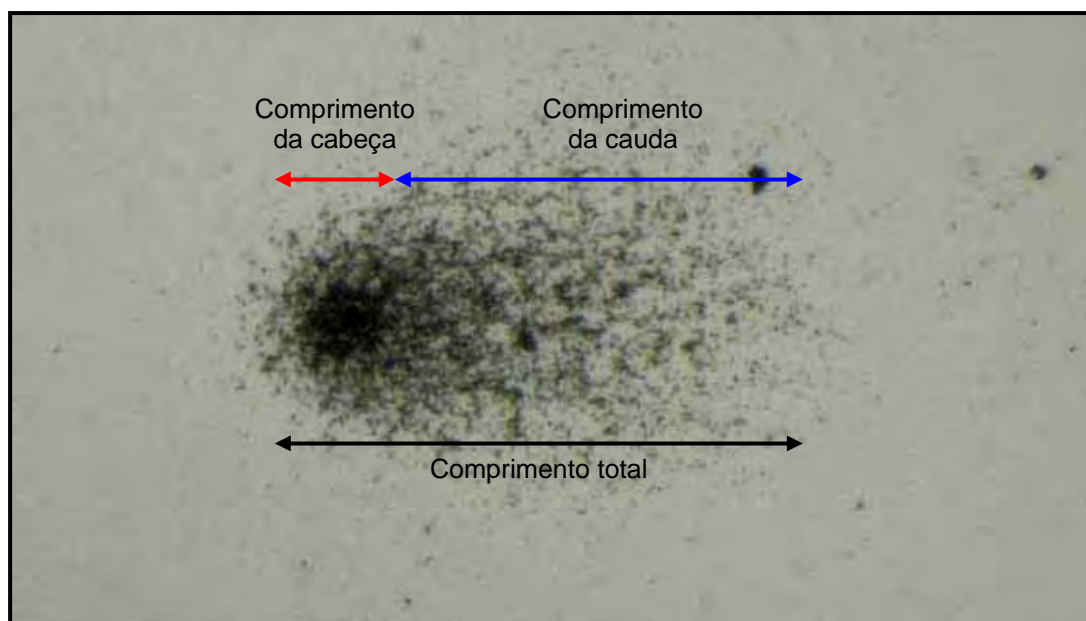
```
Macro "Prepara a imagem [a]" {  
run("Invert");  
run("Crop");  
run("Enhance Contrast", "saturated=0.5");  
run("RGB Split");  
close();  
close();  
run("Fire");  
}
```

**Quadro 3.** Efeito visual do pré-processamento das imagens do cometa.**A:** Seleção da área de interesse**B:** Recorte e inversão da imagem**C:** Aumento do contraste e filtragem para o canal R**D:** Aplicação da ferramenta "smooth" e visualização da "Look up table" do tipo "fire"

**Quadro 4:** Passos do algoritmo I para obtenção das medidas da análise digital

**Quadro 5:** Passos do algoritmo II para obtenção das medidas da análise digital

**Quadro 6:** Esquema das medidas realizadas pelos avaliadores



**Quadro 7:** Macro que automatiza a aplicação do algoritmo I

```
macro "Prepara a imagem [1]" {
run("Invert");
run("Crop");
run("Enhance Contrast", "saturated=0.5");
run("RGB Split");
close();
close();
run("Fire");
run("Median...", "radius=15");
run("Subtract Background...", "rolling=100");
print("Ajuste a linha no eixo do cometa e aperte 2")
makeLine(0, 100, 700, 100);
}

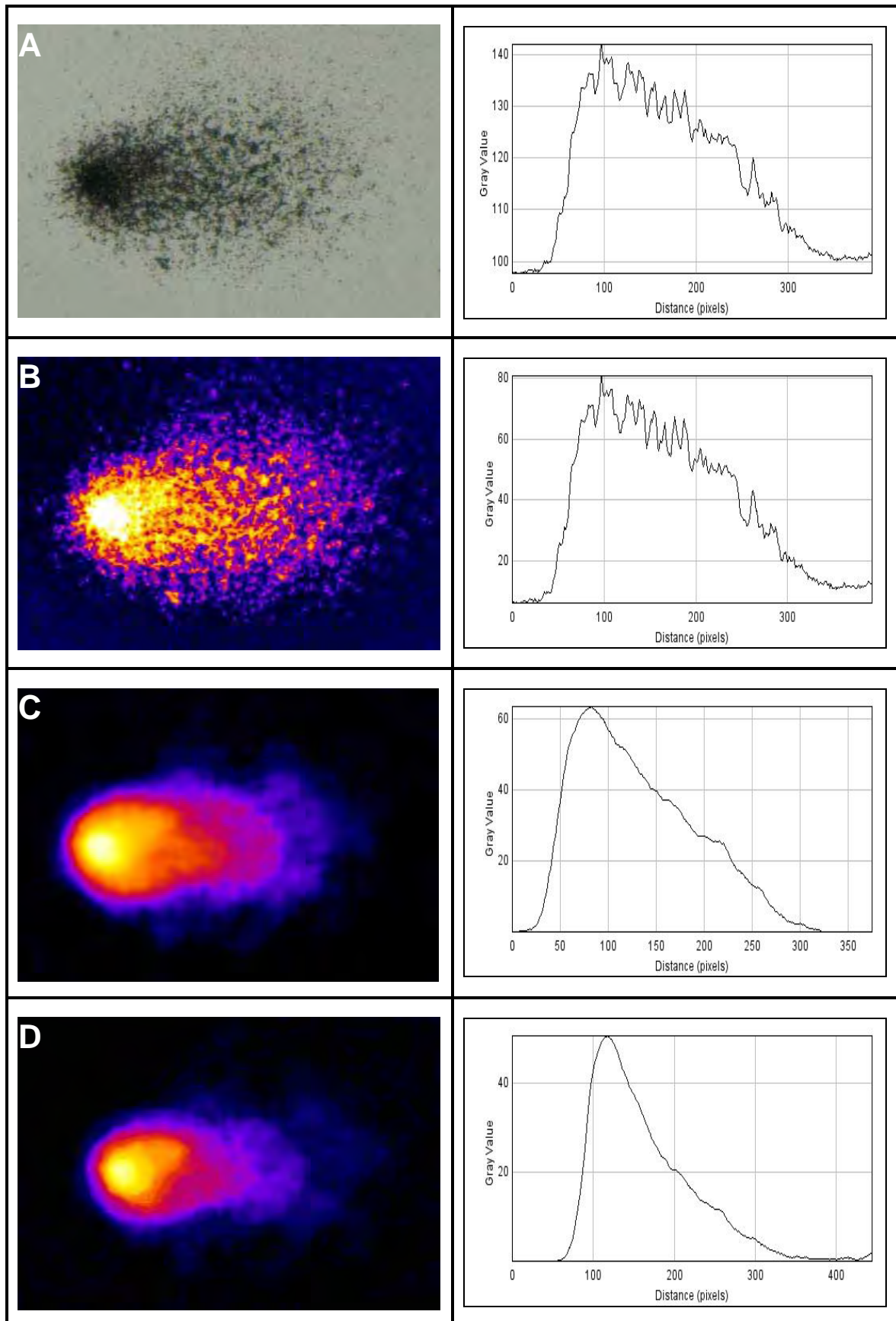
macro "Encontra o centro da cabeça [2]" {
run("Plot Profile");
}

macro "Análise da distribuição do DNA [3]" {
run("Select All");
run("Plot Profile");
}
```

**Quadro 8:** Macro que automatiza a aplicação do algoritmo II

```
macro "Prepara a imagem [1]" {  
  run("Invert");  
  run("Crop");  
  run("Enhance Contrast", "saturated=0.5");  
  run("RGB Split");  
  close();  
  close();  
  run("Fire");  
  run("Minimum...", "radius=2");  
  run("Median...", "radius=15");  
  run("Subtract Background...", "rolling=100");  
  print("Ajuste a linha no eixo do cometa e aperte 2")  
  makeLine(0, 100, 600, 100);  
}  
  
macro "Encontra o centro da cabeça [2]" {  
  run("Plot Profile");  
}  
  
macro "Análise da distribuição do DNA [3]" {  
  run("Select All");  
  run("Plot Profile");  
}
```

**Quadro 9:** Fotos do cometa 42 e respectivos histogramas: (A) Sem processamento; (B) Pré-processamento; (C) Algoritmo I; (D) Algoritmo II.



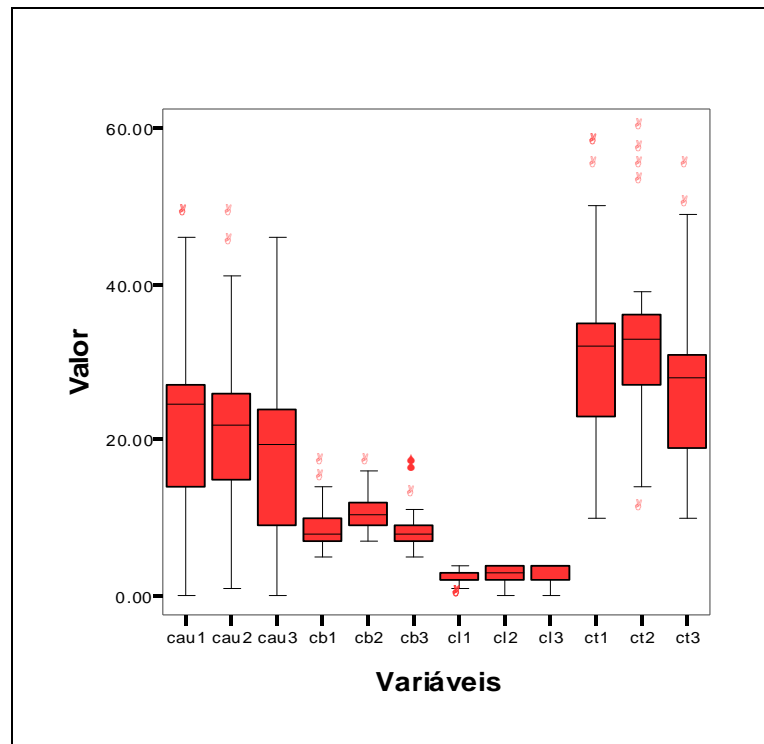


## ANEXO II - GRÁFICOS

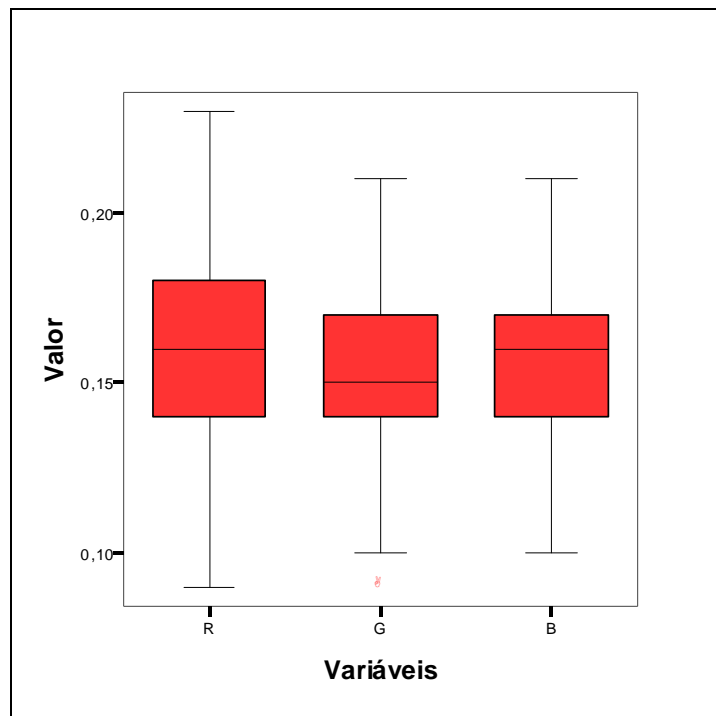
---

## 9. Anexo II – Gráficos

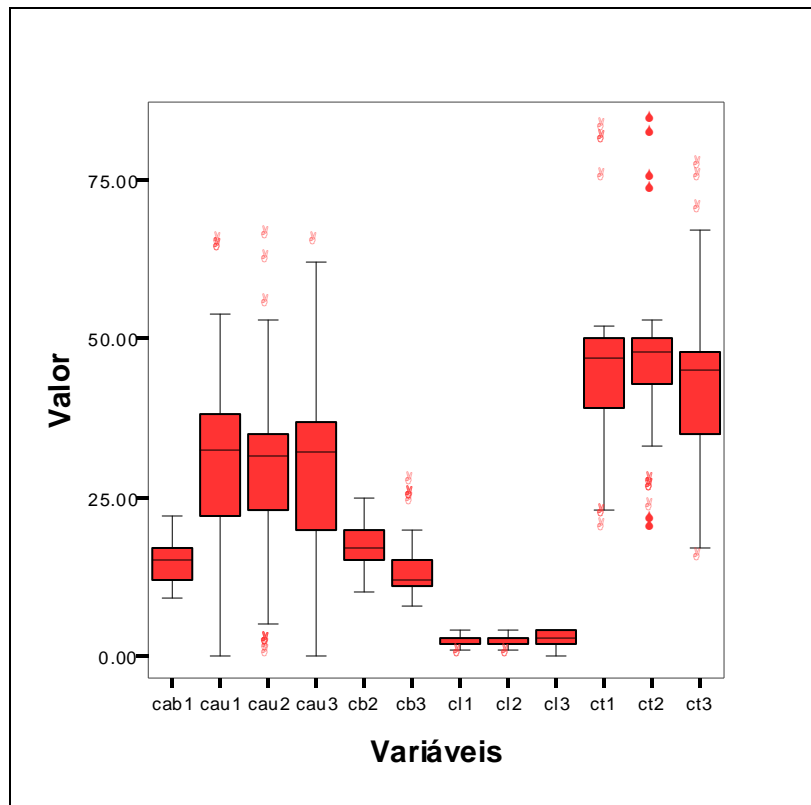
**Gráfico 1:** Distribuição das medidas manuais dos avaliadores.



**Gráfico 2:** Distribuição do coeficiente de variação dos histogramas de cor.



**Gráfico 3:** Distribuição das medidas manuais das imagens processadas pelos avaliadores



## ANEXO III - TALELAS

---

## 10. Anexo III – Tabelas

**Tabela 1:** Medianas e desvios das medidas manuais dos cometas não-processados realizadas pelos avaliadores

	Avaliador 1		Avaliador 2		Avaliador 3	
	Mediana	DIQ*	Mediana	DIQ	Mediana	DIQ
<b>Classificação</b>	2,0	1,0	3,0	2,0	4,0	2,0
<b>Total</b>	32,0	11,8	33,0	8,5	28,0	11,8
<b>Cabeça</b>	8,0	2,8	10,5	2,8	8,0	2,0
<b>Cauda</b>	24,5	13,0	22,0	10,5	19,5	14,8

\* DIQ = Desvio interquartilico

**Tabela 2:** Estimativas da correlação das medidas dos cometas entre os avaliadores

<b>Correlação</b>				
	<b>Av1 x Av2</b>	<b>Av1 x Av3</b>	<b>Av2 x Av3</b>	<b>Coefficiente de Correlação</b>
	<b>R<sub>Spearman</sub></b>	<b>R<sub>Spearman</sub></b>	<b>R<sub>Spearman</sub></b>	<b>Intraclasse</b>
<b>Classificação</b>	0,80	0,83	0,88	0,14*
<b>Total</b>	0,94	0,89	0,91	0,85
<b>Cabeça</b>	0,33	0,55	0,54	0,34
<b>Cauda</b>	0,92	0,91	0,90	0,62

Todos os valores  $p < 0,01$ , exceto \*  $p < 0,05$

**Tabela 3:** Estimativas da concordância interpessoal entre os três avaliadores

	<b>Diferença entre os ranks (Friedman)</b>			
	<b>Friedman</b>	<b>Av1 x Av2</b>	<b>Av1 x Av3</b>	<b>Av2 x Av3</b>
<b>Classificação</b>	37,8*	52,5*	54,0*	1,5
<b>Total</b>	70,4*	31,0*	52,0*	83,0*
<b>Cabeça</b>	38,3*	41,5*	19,0	60,5*
<b>Cauda</b>	26,8*	8,5	48,5*	40,0*

\*  $p < 0,05$



**Tabela 4:** Medianas e desvios das medidas manuais dos cometas processados realizadas pelos avaliadores

	Av1		Av2		Av3	
	Mediana	DIQ*	Mediana	DIQ*	Mediana	DIQ*
<b>Classificação</b>	2,0	1,0	2,0	1,0	3,0	1,8
<b>Total</b>	47,0	10,8	48,0	7,0	45,0	12,8
<b>Cabeça</b>	15,0	4,5	17,0	5,0	12,0	4,0
<b>Cauda</b>	32,5	15,8	31,5	12,0	32,0	16,0

DIQ = Desvio Interquartilico

**Tabela 5:** Estimativas da correlação das medidas dos cometas entre os avaliadores (Processado).

	Correlação			Coeficiente de Correlação Intraclasse
	Av1 x Av2	Av1 x Av3	Av2 x Av3	
	$R_{\text{Spearman}}$	$R_{\text{Spearman}}$	$R_{\text{Spearman}}$	
<b>Classificação</b>	0,96	0,69	0,71	0,65
<b>Total</b>	0,87	0,89	0,90	0,93
<b>Cabeça</b>	0,53	0,58	0,82	0,47
<b>Cauda</b>	0,88	0,93	0,92	0,54

Todos os valores  $p < 0,01$

**Tabela 6:** Estimativas da concordância interpessoal entre os três avaliadores (Processado).

<b>Diferença entre os ranks (Friedman)</b>				
	<b>Friedman</b>	<b>Av1 x Av2</b>	<b>Av1 x Av3</b>	<b>Av2 x Av3</b>
<b>Classificação</b>	25,27*	2	44,5*	42,5*
<b>Total</b>	42,07*	10	50,5*	60,5*
<b>Cabeça</b>	48,67*	47,5*	20,5	68,0*
<b>Cauda</b>	13,71*	36,0*	25,5*	10,5

\*  $p < 0,05$

**Tabela 7:** Coeficiente de variação das médias das medidas dos cometas não-processados e processados

	AV1		AV2		AV3	
	Não processados	Processados	Não processados	Processados	Não processados	Processados
<b>Classificação</b>	0,54	0,47	0,36	0,46	0,45	0,38
<b>Total</b>	0,34	0,31	0,33	0,30	0,38	0,32
<b>Cabeça</b>	0,32	0,22	0,20	0,23	0,31	0,34
<b>Cauda</b>	0,54	0,49	0,50	0,53	0,62	0,56

**Tabela 8:** Estimativa da correlação entre as medidas automatizadas (Algoritmo I) e a média das medidas dos três avaliadores (R Spearman)

	<b>Cabeça</b>	<b>Cauda</b>	<b>Total</b>	<b>Classificação</b>	<b>Cauda/Total</b>
<b>Cabeça</b>	0,26*				
<b>Cauda</b>		0,82			
<b>Total</b>			0,86		
<b>Cauda/Total</b>				0,73	0,69
<b>MT 1<sup>a</sup></b>				0,81	0,77
<b>MT 2<sup>b</sup></b>				0,43	0,44
<b>MT 3<sup>c</sup></b>				0,87	0,82
<b>MT 4<sup>d</sup></b>				0,87	0,83
<b>Int Cauda/Int Total</b>				0,81	0,77

Todos os valores  $p < 0,01$ , exceto \*  $p = 0,07$

<sup>a</sup> MT 1 = % DNA cauda X Comprimento da cauda

<sup>b</sup> MT 2 = % DNA cauda X Ponto médio do comprimento da cauda

<sup>c</sup> MT 3 = % DNA cauda X Distância dos centros de massa da cauda e da cabeça (Cauda medida a partir do meio da cabeça)

<sup>d</sup> MT 4 = % DNA cauda X Distância dos centros de massa da cauda e da cabeça (Cauda medida a partir do fim da cabeça)

**Tabela 9:** Estimativa da correlação entre as medidas automatizadas (Algoritmo II) e a média das medidas dos três avaliadores (R Spearman).

	<b>Cabeça</b>	<b>Cauda</b>	<b>Total</b>	<b>Classificação</b>	<b>Cauda/Total</b>
<b>Cabeça</b>	0,55				
<b>Cauda</b>		0,89			
<b>Total</b>			0,94		
<b>Cauda/Total</b>				0,85	0,81
<b>MT 1<sup>a</sup></b>				0,91	0,87
<b>MT 2<sup>b</sup></b>				0,69	0,63
<b>MT 3<sup>c</sup></b>				0,72	0,60
<b>MT 4<sup>d</sup></b>				0,67	0,67
<b>Int Cauda/Int Total</b>				0,86	0,80

Todos os valores resultaram em  $p < 0,01$

<sup>a</sup> MT 1 = % DNA cauda X Comprimento da cauda

<sup>b</sup> MT 2 = % DNA cauda X Ponto médio do comprimento da cauda

<sup>c</sup> MT 3 = % DNA cauda X Distância dos centros de massa da cauda e da cabeça (Cauda medida a partir do meio da cabeça)

<sup>d</sup> MT 4 = % DNA cauda X Distância dos centros de massa da cauda e da cabeça (Cauda medida a partir do fim da cabeça)

## BIBLIOGRAFIA

---

## 11. Bibliografia

1. Abramoff MD, Magalhaes PJ, Ram SJ. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*. 2004; 11 (7):36-42.
2. Andrea CE, Bleggi-Torres LF, Alves MTS. Análise da morfometria nuclear: descrição da metodologia e o papel dos *softwares* de edição de imagem. *J. Brás. Patol.Merd. Lab*. 2008; 44 (1): 51-57.
3. Ayres M, Ayres Jr M, Ayres DI, dos Santos AS. *Bioestat: 3.0 aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Belém: Sociedade Civil Mamirauá MCT – CNPq Conservation International; 2003.
4. Baert P, Oostveldt PV. Miniaturizing the Comet Assay With 3D Vertical Comets. *Cytometry*. 2003; 51A:26–34.
5. Boeck M, Touil N, Visscher G, Vande PA, Kirsch-Volders M. Validation and implementation of an internal standard in comet assay analysis. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2000; 469:181-197.
6. Böecker W, Bauch T, Müller WU, Streffer C. Image analysis of comet assay measurements. *Int. J. Radiat. Biol*. 1997; 72 (4):449-460.
7. Bowden RD, Buckwalter MR, McBride JF, Johnson DA, Murray BK, O'Neill KL. Tail profile: a more accurate system for analyzing DNA damage using the Comet assay. *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2003; 537:1-9.
8. Collins A, Dusinská M, Franklin M, Somorovská M, Petrovská H, Duthie S, et al. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 1997; 30:139-146.
9. Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, et al. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*. 2008; 23 (3):143-151.
10. Collins TJ. ImageJ for microscopy. *Biotechniques*. 2007; 43 (1 Suppl):25-30.



11. Dehon G, Catoire L, Duez P, Bogaerts P, Dubois J. Validation of an automatic comet assay analysis system integrating the curve fitting of combined comet intensity profiles. *Mutation Research/Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2008; 650 (2):87-95.
12. Duez P, Dehon G, Kumps A, Dubois J. Statistics of the Comet assay: a key to discriminate between genotoxic effects. *Mutagenesis.* 2003; 18 (2):159-166.
13. Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology.* 1995; 339:37-59.
14. Friauff W, Hartmann A, Suter W. Automatic analysis of slides processed in the Comet assay. *Mutagenesis.* 2001; 16 (2):133-137.
15. Fukumasu H, Avanzo JL, Heidor R, Silva TC, Atroch A, Moreno FS, et al. Protective effects of guaraná (*Paullinia cupana* Mart.var. *Sorbilis*) against DEN-induced DNA damage on mouse liver. *Food and Chemical Toxicology.* 2006; 44:862-867.
16. Garcia O, Romero I, González JE, Mandina T. Measurements of DNA damage on silver stained comets using free Internet software. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environment Mutagenesis.* 2007; 627:186-90.
17. García O et al. Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay. Results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. *Mutat Res.* 2004; 556:25-34.
18. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis.* 2003; 18 (1):45-51.
19. Hartmann A, Speit G. Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister chromatid exchanges (SCE). *Mutat. Res.* 1995; 346:49-56.
20. Kent CRH, Eady JJ, Ross GM, Steel GG. The comet moment as a measure of DNA damage in the comet assay. *Int. J. Radiat. Biol.* 1995; 67 (6):665-660.
21. Kumaravel TS, Awadhesh N J. Reliable comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals.

- Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2006; 605:7-16.
22. Lovell DP, Omori T. Statistical issues in the use of the comet assay. *Mutagenesis*. 2008; 23 (3):171-182.
  23. McCarthy PJ, Sweetman SF, McKenna PG, McKelvey-Martin VJ. Evaluation of manual and analysis quantification of DNA damage in the alkaline comet assay. *Mutagenesis*. 1997; 12 (4):209-214.
  24. Miot HA, Paixão MP, Paschoal FM. Fundamentos da fotografia digital em Dermatologia. *An Bras Dermatol*. 2006; 81 (2):174-80.
  25. Moller P. The Alkaline Comet Assay: Towards Validation in Biomonitoring of DNA Damaging Exposures. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2006; 98:336-345.
  26. Nadin SB, Vargas-Roig LM, Ciocca DR. A silver staining method for single-cell gel assay. *Journal Histochemistry and Cytochemistry*. 2001; 9:1183-86.
  27. Oberholzer M, Östreicher M, Christen H, Brühlmann M. Methods in quantitative image analysis. *Histochem. Cell Biol*. 1996; 105:333-355.
  28. Olive PL. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. *Radiat Res*. 1989; 117:79-92.
  29. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984; 123:291-298.
  30. Ribeiro DA, Scolastici C, Marques MEA, Salvadori DMF. Fluoride does not induce DNA breakage in Chinese hamster ovary cells in vitro. *Oral Biology*, 2004; 3:192-6.
  31. Silva J, Simeoni N, Groff AA, Ianistcki M, Benvegnú V, Schröder NT. O ensaio do cometa na avaliação da genotoxicidade induzida por poluentes atmosféricos utilizando como biomonitor o molusco *Cantareus aspersus* (Müller, 1774). *J. Braz. Soc. Ecotoxicol*. 2007; 2 (1):45-51.
  32. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider, EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res*. 1988; 175:184-191.

33. Speit G. Protocol for the application of the alkaline single cell gel test (SCG-Test or Comet assay) to detection of DNA damage in eukaryote cells. Publicação avulsa, 1995.
34. Wiklund SJ, Agurell E. Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay. *Mutagenesis*. 2003; 18 (2): 167-175.
35. Wolf DE, Samarasekera C, Swedlow JR. Quantitative analysis of digital microscope images. *Methods Cell Biol*. 2007; 81:365-96.