



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

(21) BR 10 2012 001773-3 A2

(22) Data de Depósito: 26/01/2012

(43) Data da Publicação: 29/10/2013
(RPI 2234)



(51) Int.Cl.:

C12Q 1/68

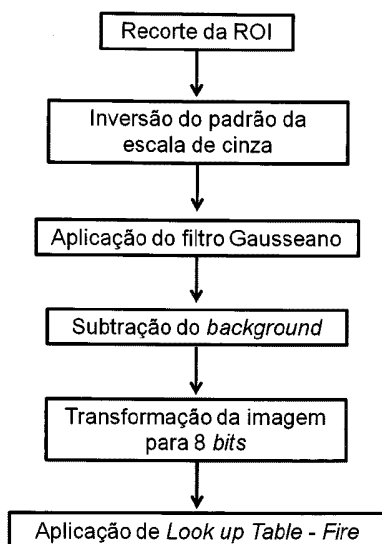
G01N 27/447

(54) Título: METODOS DE PROCESSAMENTO DE IMAGENS PARA DETERMINAÇÃO DE DANO EM DNA

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

(72) Inventor(es): GABRIELLI BRIANEZI, HÉLIO AMANTE MIOT

(57) Resumo: MÉTODOS DE PROCESSAMENTO DE IMAGENS PARA DETERMINAÇÃO DE DANO EM DNA. Patente de invenção de métodos para processamento de imagens obtidas a partir de amostras preparadas 'cbrnforme protocolo para reajização de teste do cometa, particularmente corado pela prata. Este teste é amplamente utilizado para avaliação de genotoxicidade de substâncias. Há sistemas automatizados que analisam cometas corados por substâncias fluorescentes. A coloração de prata é uma técnica pOUco difundida pela falta de tecnologia de análise digital automatizada e tem desempenho semelhante às técnicas com fluorescência, porém, é de baixo custo, rápida execução, não depende de microscópios de fluorescência e não utiliza produtos mutagênicos em seu protocolo. Os métodos de processamento da imagens apresentados neste pedido foram desenvolvidos para sanar tais problemas e a falta de automatização.



MÉTODOS DE PROCESSAMENTO DE IMAGENS PARA DETERMINAÇÃO DE DANO EM DNA

A presente invenção refere-se a métodos para processamento de imagens obtidas a partir de amostras preparadas conforme protocolo para realização de teste do cometa, particularmente corado pela prata, que se mostram fortemente correlacionados à classificação visual. Este teste é amplamente utilizado para avaliação de genotoxicidade de substâncias. Há sistemas automatizados que analisam os cometas corados por substâncias fluorescentes. A coloração de prata é uma técnica pouco difundida pela falta de tecnologia de análise digital automatizada e tem desempenho semelhante às técnicas com fluorescência, porém, é de baixo custo, rápida execução, não depende de microscópios de fluorescência e não utiliza produtos mutagênicos em seu protocolo. Os métodos de processamento de imagens apresentados neste pedido foram desenvolvidos para sanar tais problemas e a falta de automatização.

O teste do cometa, ou teste de eletroforese em gel de uma única célula, é utilizado para a determinação do dano existente no DNA de uma célula eucariótica, tendo sido descrito pela primeira vez por Singh *et al.* em 1988 [Experimental Cell Research, 175 (1) 184-191]. Esta técnica pode ser utilizada como técnica padrão para avaliação do dano em DNA, biomonitoramento e genotoxicidade. Basicamente, as etapas do teste são o encapsulamento das células em uma suspensão de agarose de baixo ponto de fusão, lise celular em condições de pH neutro ou alcalino ($\text{pH} > 13$) e eletroforese das células lisadas suspensas. A última etapa consiste na aplicação de corante ao DNA e análise visual da extensão da coloração, a qual é parelha com a extensão do dano ao DNA, podendo ser realizada manualmente ou por um sistema automatizado.

De acordo com o documento publicado por Richard D. Bowden *et al.* em Mut. Res. 2003 537(1): 1-9, o teste do cometa (teste de eletroforese em gel de uma única célula) mede a quebra das fitas de DNA em células individuais. No teste, as células são embebidas em agarose, lisadas, e submetidas a eletroforese em baixa voltagem, permitindo a migração do DNA danificado. Este DNA é marcado e visualizado em um microscópio epifluorescente. Se houve dano ao DNA, a eletroforese de seus fragmentos aparece como uma cauda difusa atrás do núcleo, conhecida como “cometa”. Vários sistemas de análises computacionais são atualmente utilizados para quantificar o dano ao DNA que é representado em uma imagem do cometa. Neste documento é apresentada uma nova metodologia de análise denominada “perfil da cauda”, que difere do tradicional “momento da cauda”. Não obstante a descrição dos autores, esta metodologia não utiliza filtragem do fundo e não há uma automatização da identificação do início da cabeça e fim do cometa, que devem ser definidos manualmente. Ainda, esta metodologia não foi adequadamente validado pelo escore visual. A presente invenção vem suprir as lacunas deixadas por esta tecnologia e por outras.

No documento JP2007024612 é apresentado um método para realização do teste do cometa, por meio de análise de imagens de uma amostra. A imagem compreende a cabeça e a cauda do cometa, circunscrita em um retângulo. Caso a razão entre a área do cometa e a área do retângulo esteja dentro de uma faixa prescrita, determina-se que a imagem do cometa como sendo de uma célula. É possível a distinção de imagens quando uma pluralidade de células se superpõe na imagem de cometa, por meio da exclusão do ruído de fluorescência.

No documento JP2003210155 é apresentado um sistema capaz de analisar a forma da expressão do dano no DNA de uma amostra. Este equipamento é projetado para operar com várias

amostras, submetidas a um tratamento definido em um dispositivo de captura de imagem, transmissão da imagem capturada de cada amostra para um analisador, detecção seletiva de apenas a parte do cometa do DNA de uma célula existente na lista de amostras, recebida de um dispositivo de armazenamento e itens de análise, e sucessivamente analisando o grau de dano ao DNA da célula de cada amostra. Em um display, os resultados analíticos são inseridos em um gráfico e exportados de acordo com o item recebido do dispositivo de armazenamento.

10 O teste do cometa é empregado para avaliação de dano ao DNA em diversas áreas do conhecimento, principalmente em testes de novos fármacos, defensivos agrícolas, aditivos alimentares, biomonitoramento humano, ecogenotoxicidade e quimioprevenção.

15 Medidas automatizadas são amplamente utilizadas na análise do teste do cometa, muitos sistemas estão disponíveis para a coloração de fluorescência, aumentam sua produtividade e reduzem a subjetividade dos resultados.

Entretanto, a escolha manual dos cometas, que ocorre antes do processamento de quaisquer dos métodos, pode originar viés de seleção que não se dilui com o aumento da amostra. Já que este processo é realizado pelo avaliador, e sua subjetividade pode interferir na aleatoriedade da amostragem, é importante que seja realizado segundo protocolo “cego”.

25 A coloração de prata é empregada pela sua simplicidade, segurança, baixo custo e possibilidade de análise em microscópios convencionais, que são amplamente disponíveis, apesar disso, seu uso ainda é limitado, provavelmente, pela indisponibilidade de sistemas automatizados que permitam a análise em escala.

O principal componente da coloração de prata é o nitrato de

prata: esta substância é corrosiva, havendo necessidade de cuidados em seu manuseio. Entretanto, não é classificada como carcinógeno em humanos, sendo negativo seu teste de mutagenicidade bacteriana.

Já o brometo de etídio é o corante fluorescente mais
5 utilizado; contudo, é um mutágeno forte, podendo ser carcinogênico e teratogênico. Pode provocar efeitos irreversíveis, é tóxico se inalado, irritante para a pele e sistema respiratório. O seu uso requer cuidados, configurando real problema de segurança para pesquisadores.

Ainda, o *SYBR Gold* é um corante fluorescente alternativo ao
10 brometo de etídio, preferido por ser considerado mais seguro. Apesar de não se conhecerem todas suas características mutagênicas, pelo fato de se ligar ao material nuclear, deve ser tratado como substância com potencial mutagênico e manuseado com as devidas precauções.

A análise do teste do cometa corado pela prata geralmente é
15 feita pela classificação visual, mas estudos demonstraram a grande influência da subjetividade do avaliador, com alta variabilidade sobre a classificação. O método de análise automatizada direta do teste do cometa corado pela prata ainda não foi padronizado, havendo a necessidade de validação desta técnica.

20 Um dos elementos limitantes do desenvolvimento de técnicas de processamento de imagem na coloração pela prata é a grande quantidade de resíduos de fundo que interferem com a leitura do nucleóide de forma individualizada, exigindo o desenvolvimento de filtros específicos capazes de tal segmentação.

25 A utilização desses filtros para a realização do processamento da imagem anteriormente à análise automatizada dos cometas corados pela prata reduz a variabilidade das medidas e aumenta a correlação do método automatizado com as medidas manuais e classificação visual.

A versão neutra do teste foi desenvolvida inicialmente para detectar somente quebras de fita dupla do DNA. Contudo, modificações no protocolo inicial, empregando uma solução alcalina, permitiram aumentar a gama de danos detectáveis, evidenciando também quebras em fita simples, sítios álcali-lábeis e locais de reparos incompletos. A versão alcalina atualmente é a mais adotada pelos laboratórios de pesquisa de genotoxicidade. Outras variações da técnica são utilizadas, como o uso de enzimas de restrição para a demonstração de danos oxidativos, ou inclusão de períodos de incubação para detecção de reparo de bases no DNA.

A técnica fundamenta-se no comportamento do DNA, submetido à eletroforese, que se movimenta para a região do anodo, cuja migração é proporcional à fração de quebras moleculares. Após sua coloração, adquire a forma aparente de um cometa, com a cabeça, representada pela região nuclear, e a cauda, pelos fragmentos de DNA que migraram.

Constitui método rápido, de baixo custo, de relativa facilidade de realização, com alta sensibilidade e que pode ser aplicado na maioria dos tecidos. Células provenientes do sangue total, especialmente linfócitos, são as mais empregadas, pois são de fácil obtenção e já se encontram em suspensão, evitando danos adicionais que os processos para digestão do tecido podem causar. Porém, o uso de células sanguíneas pode não representar o real dano a um diferente tecido.

As lâminas podem ser coradas por técnicas de fluorescência, em que são usados brometo de etídio, iodeto de propídio, SYBR Green e SYBR Gold, ou por histotécnica convencional com sais de prata. Os corantes de fluorescência possuem potencial mutagênico, necessitam de equipamentos específicos para visualização da coloração e a análise deve ser feita imediatamente após o processo de coloração. A coloração

do DNA com sais de prata é usada desde o século XIX, é permanente, três vezes mais sensível que o brometo de etídio, e as lâminas podem ser analisadas em microscópio convencional.

5 Há diferentes maneiras de se avaliar os resultados do teste do cometa, o método padrão é a classificação visual qualitativa em cinco categorias de acordo com a extensão de dano ao DNA. Pode-se ainda, determinar um índice resultante da multiplicação do número de cometas de cada categoria e sua classificação visual, podendo atingir um escore que varia de 0 a 400.

10 Alguns parâmetros quantitativos podem ser medidos por sistemas de análise automatizados. Os mais empregados são o comprimento da cauda, momento da cauda e percentual de DNA na cauda. A análise métrica manual dos cometas é possível, porém, a utilização dos sistemas automatizados apresenta vantagens
15 operacionais.

Sistemas computacionais de análise de imagem permitem maior agilidade no cálculo e redução da subjetividade dos pesquisadores na estimativa dos parâmetros dos cometas. Esses elementos favorecem a análise objetiva de grande número de células em um estudo e
20 possibilitam a avaliação de diferentes compostos e concentrações.

Há vários sistemas automatizados para o teste do cometa corado pela fluorescência, os mais empregados são importados, onerosos e requerem microscópio de fluorescência. Já foram desenvolvidas alternativas para se obterem sistemas que utilizem
25 software de código aberto. Até o momento, não há nenhum sistema automatizado de análise direta para o teste do cometa corado pela prata adequadamente validado.

O teste do cometa corado pela prata é utilizado nos laboratórios de investigação toxicológica, e sua disseminação é limitada

pela necessidade de equipamento para análise automatizada.

A alternativa é a análise pela técnica de fluorescência, que necessita de microscópios especiais dedicados, sistemas de análise onerosos, os corantes são potencialmente carcinogênicos e as lâminas
5 sofrem degradação progressiva com o tempo.

Assim, desenvolveram-se algoritmos para a realização do processamento das imagens geradas pelo teste do cometa corado pela prata e a partir de sua aplicação extrair as informações (parâmetros) de interesse para a análise do teste do cometa, visando:

10 - o desenvolvimento de um sistema de análise de imagem para avaliação automatizada do teste do cometa corado pelo nitrato de prata;

- a implementação de processo de alta produtividade na análise do teste do cometa corado pela prata; e

15 - o aumento da precisão e objetividade dos resultados do teste do cometa corado pela prata.

Os algoritmos desenvolvidos podem vir a ser utilizados em:

- sistemas automatizados de análise de imagem;
- sistemas de captura de imagem;
20 - sistemas de avaliação de genotoxicidade;
- sistemas de avaliação do risco toxicológico;
- protocolos de controle de qualidade de produtos químicos em geral: (medicamentos, saneantes, cosméticos, alimentos, aditivos alimentares, agroquímicos).

25 Não há técnicas de análise automatizadas para determinar parâmetros de genotoxicidade do teste do cometa corado pelo nitrato de prata que não dependam da indicação manual dos elementos do cometa. Quando comparado à estimativa visual (escore), as medidas automatizadas representam ganho em precisão e maior objetividade dos

resultados.

Os algoritmos foram criados a partir das ferramentas do software ImageJ 1.44h (freeware). Eles envolvem duas técnicas de segmentação do nucleóide em relação ao fundo (lâmina). O algoritmo 1
 5 emprega o filtro gaussiano e o algoritmo 2, após a seleção do canal “red”, emprega sequências dos operadores estatísticos “mínimo” e “mediana” para individualizar o cometa.

Ambos os algoritmos empregam após o uso dos filtros, a ferramenta de subtração de background, que diminui a irregularidade do
 10 fundo da imagem.

A partir dos algoritmos, foi construído no software ImageJ 1.44h um comando de automatização denominado macro, que possibilitou a automatização do processamento das imagens.

A Figura 1 apresenta um fluxograma com a descrição do
 15 Algoritmo 1 utilizado para a realização do teste do cometa, o qual utiliza-se do o filtro gaussiano.

A Figura 2 apresenta um fluxograma com a descrição do Algoritmo 2 utilizado para a realização do teste do cometa o qual, após a seleção do canal “red”, emprega sequências dos operadores estatísticos
 20 “mínimo” e “mediana” para individualizar o cometa.

A Figura 3 mostra imagens de cometas originais corados pela prata e processados pelos algoritmos 1 (A) e 2 (B) e os diagramas de *pixels* resultantes.

A Figura 4 contém diagramas de linhas das medianas dos
 25 parâmetros obtidos pelos algoritmos 1 (A1. MNU e A2. DEN) e 2 (B1. MNU e B2. DEN) e pela fluorescência (C1. MNU e C2. DEN). Os dados foram transformados em seus percentuais em relação ao grupo controle para representação conjunta em uma mesma escala.

ALGORITMO 1

Passos para a realização do processamento a partir do algoritmo 1 desenvolvido e seu comando de automatização (macro)

Como mostrado na Figura 1, para a utilização do algoritmo 1, é necessária a seleção da região de interesse (ROI) na imagem, neste caso trata-se do cometa (conteúdo de DNA das células utilizadas no teste). Após a seleção manual da ROI, recorta-se a imagem, há uma inversão no padrão da escala de cinza, seguida pela aplicação do filtro Gaussiano, subtração do *background*. Por fim transforma-se a imagem em 8 *bits* de cor e aplica-se um *Look up Table* (apresentado como LUT no ImageJ) denominado “*Fire*”. A partir do diagrama de *pixels* da imagem processada foram obtidos os parâmetros de análise do teste do cometa para a coloração de prata.

ALGORITMO 2

Passos para a realização do processamento a partir do algoritmo 2 desenvolvido e seu comando de automatização (macro)

Como mostrado na Figura 2, para a utilização do algoritmo 2, também é necessária a seleção da região de interesse (ROI) na imagem, neste caso trata-se do cometa. Após a seleção manual da ROI, há uma inversão no padrão da escala de cinza, recorte da imagem, seguida por amplificação do contraste com saturação 0,5.

O passo seguinte é a decomposição nos canais de cor *Red*, *Green* e *Blue* (RGB) e emprego do canal de cor *Red* para a continuidade do processamento. A imagem obtida pelos outros canais é descartada. Na imagem do canal de cor *Red* aplica-se um *Look up Table* (LUT) denominado “*Fire*”. Nesta imagem, aplica-se o filtro de mínimo com alcance de 3 *pixels*, seguido do filtro de mediana com alcance de 20 *pixels* e subtração do *background*.

A partir do diagrama de *pixels* da imagem processada foram obtidos os parâmetros de análise do teste do cometa para a coloração de

prata.

EXEMPLO

A presente invenção é adicionalmente explicada pelo exemplo a seguir, que de maneira alguma a limita.

5 Para a preparação das amostras, foi utilizado sangue total de camundongos BALB/c machos com dois meses de idade, mantidos em gaiolas de polipropileno e recebendo ração basal peletizada e água filtrada *ad libitum*, em condições de temperatura (22 °C) e umidade relativa controlados (55 %), ciclo de luz de 12 horas claro/escuro e
10 exaustão contínua do ar ambiente, durante período de aclimação de cinco dias e o período de tratamento (sexto dia).

 Foram utilizados 14 animais, divididos em sete grupos tratados intraperitonealmente com salina fisiológica (controle negativo), MNU (N-nitroso-N-methylurea) ou DEN (N-nitrosodietilamina). Ambas as
15 substâncias teste foram diluídas em solução salina fisiológica (0,9 %), administradas uma única vez, via intraperitoneal. As doses foram selecionadas como frações de controles positivos encontrados na literatura. Foi determinada uma amostra inicial baseada na padronização da literatura, com a análise de apenas 50 cometas por lâmina, sendo,
20 portanto 100 cometas analisados para cada animal.

 A coleta do sangue foi realizada por punção cardíaca três horas após a administração das substâncias e após eutanásia em câmara de CO₂, foi obtido aproximadamente 1 ml de cada animal. O teste foi realizado em duplicata para cada coloração (prata e
25 fluorescência), e todas as lâminas codificadas e analisadas em teste cego.

 A coloração dos nucleoides foi realizada com sais de prata pelo método descrito por Nadin e Fukumasu. Inicialmente, as lâminas foram imersas em uma solução fixadora (150 g TCA, 50 g ZnSO₄, 40 ml

glicerina, q.s.p 1000 ml de água destilada) por 15 minutos. Após fixação, foram lavadas por um minuto em água destilada e secas em temperatura ambiente.

Misturou-se em uma cubeta 32 ml da solução A (50 g
5 Na_2CO_3 q.s.p. 1000 ml de água bidestilada), e 68 ml da solução B (0,2 g de NH_2NO_3 , 0,2 g de AgNO_3 , 1 g de ácido silicotungstênico, 500 μl de formaldeído, q.s.p. 1000 ml de água bidestilada) por 10 minutos. Ao término da coloração, as lâminas foram lavadas em água bidestilada por um minuto e em seguida imersas por 5 minutos em solução finalizadora
10 (1 ml de ácido acético q.s.p. 100 ml de água bidestilada) e banho em água bidestilada por 1 minuto em temperatura ambiente.

O processo de seleção das células coradas com nitrato de prata foi realizado às cegas, e compreendeu o rastreamento das lâminas (movimento contínuo do topo para a base da lâmina), até o encontro de
15 estruturas bem formadas e isoladas no campo, onde foram documentadas fotograficamente (50 por lâmina). As fotografias sequenciais foram adquiridas em microscópio de luz digital, armazenadas em arquivos tipo BMP (1280x960 pixels, 24 bits de cor), magnificação de 40x e iluminação de 100 %. O registro fotográfico dos
20 cometas resultou em uma proporção linear de 5.94 pixels por μm .

A coloração pela fluorescência foi realizada pelo SYBR Gold. Utilizou-se 50 μl da solução (1/10000) e as lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência com magnificação de 40x.

O processo de seleção das células (50 por lâmina) foi
25 realizado às cegas, e compreendeu o rastreamento das lâminas (movimento contínuo do topo para a base da lâmina), até o encontro de estruturas bem formadas e isoladas no campo. Os cometas selecionados foram submetidos a um sistema de análise de imagem.

As imagens dos cometas selecionados foram recortadas e

processadas a partir dos algoritmos desenvolvidos para o software ImageJ 1.44h para análise automatizada (Algoritmos 1 e 2).

5 A partir das representações espaciais dos pixels das imagens processadas estimaram-se diferentes parâmetros das células (Figura 3). O comprimento da cauda, comprimento total, relação entre o comprimento da cauda e comprimento total, momento da cauda (*Olive tail moment*) e percentagem de DNA da cauda foram as variáveis utilizadas para a validação do método digital automatizado.

10 As amostras foram representadas pelas medidas de tendência central: a média para as variáveis paramétricas, ou mediana para as variáveis não paramétricas de cada grupo; e sua dispersão, expressa como desvio-padrão ou desvio interquartilico.

15 As medidas automatizadas geradas pelos algoritmos desenvolvidos e análise pela fluorescência são apresentadas na Figura 4. Houve clara discriminação entre os grupos, porém, incongruências entre as técnicas quanto à tendência dos índices para maiores concentrações das substâncias genotóxicas.

20 Os desempenhos dos dois algoritmos computacionais testados revelaram forte correlação com os parâmetros visuais e as medidas dos avaliadores, alta reprodutibilidade individual e também forte correlação entre si, com evidente equivalência em seus resultados sem indicação de superioridade entre ambos para a análise do teste. Identificaram-se, além disso, diferentes estimativas para as concentrações das substâncias-teste, reforçando a validade do método e
25 a possibilidade do uso em pesquisas de genotoxicidade.

Entretanto, não houve correlação linear entre os parâmetros obtidos pelos algoritmos e a análise da fluorescência, além de apresentarem diferentes tendências à redução da identificação de DNA fragmentado em maiores concentrações de DEN, para a fluorescência e

MNU, para a prata.

Os parâmetros estimados pelos sistemas automatizados para os cometas corados pela prata e fluorescência não apresentaram correlação significativa entre si, sugerindo que as técnicas marquem
5 diferentes estruturas nucleares, ou com diferentes afinidades.

Os dois algoritmos desenvolvidos mostraram-se válidos para o uso de rotina na pesquisa de genotoxicidade e podem ser aplicados em outros estudos utilizando o teste do cometa corado pela prata.

A presente invenção apresenta dois métodos, ou algoritmos, a
10 serem aplicados na análise de imagens obtidas de amostras preparadas conforme protocolo para realização de teste do cometa, particularmente corado pela prata. Embora a invenção tenha sido ilustrada com exemplo no qual os resultados são específicos, este exemplo se destina a ser típico dos resultados obtidos com a aplicação das metodologias, não limitando de
15 maneira alguma o escopo da invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. "MÉTODOS DE PROCESSAMENTO DE IMAGENS PARA DETERMINAÇÃO DE DANO EM DNA" caracterizados por serem empregados em imagens obtidas a partir de amostras preparadas conforme protocolo para realização de teste do cometa, particularmente corado pela prata.

2. "MÉTODO DE PROCESSAMENTO DE IMAGENS PARA DETERMINAÇÃO DE DANO EM DNA" caracterizado por ser constituído por pelo menos as seguintes etapas:

- seleção da região de interesse (ROI) da imagem;
- recorte e inversão do padrão da escala de cinza da imagem;
- aplicação do filtro Gausseano;
- subtração do *background*;
- transformação da imagem em 8 *bits* de cor;
- aplicação de *Look up Table* – “*Fire*”.

3. "MÉTODO DE PROCESSAMENTO DE IMAGENS PARA DETERMINAÇÃO DE DANO EM DNA", alternativo ao método descrito na reivindicação 2, caracterizado por ser constituído por pelo menos as seguintes etapas:

- seleção da região de interesse (ROI) da imagem;
- inversão no padrão da escala de cinza;
- recorte da imagem (ROI);
- amplificação do contraste com saturação 0,5;
- decomposição nos canais de cor *Red*, *Green* e *Blue* (RGB), com emprego do canal de cor *Red* e descarte dos demais canais;
- aplicação de *Look up Table* – “*Fire*”;
- aplicação do filtro de mínimo;
- aplicação do filtro de mediana;

- subtração do *background*.

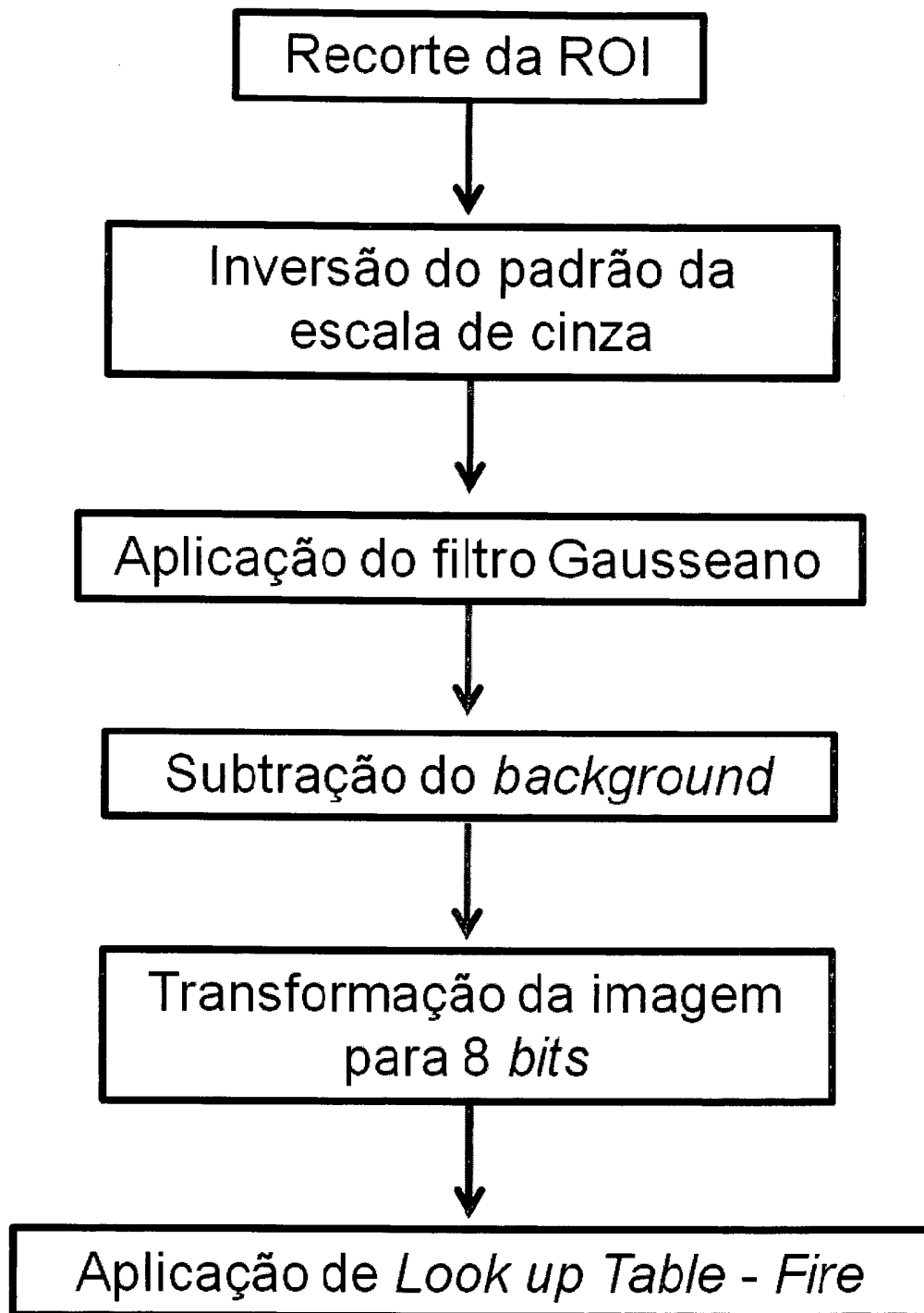


FIGURA 1

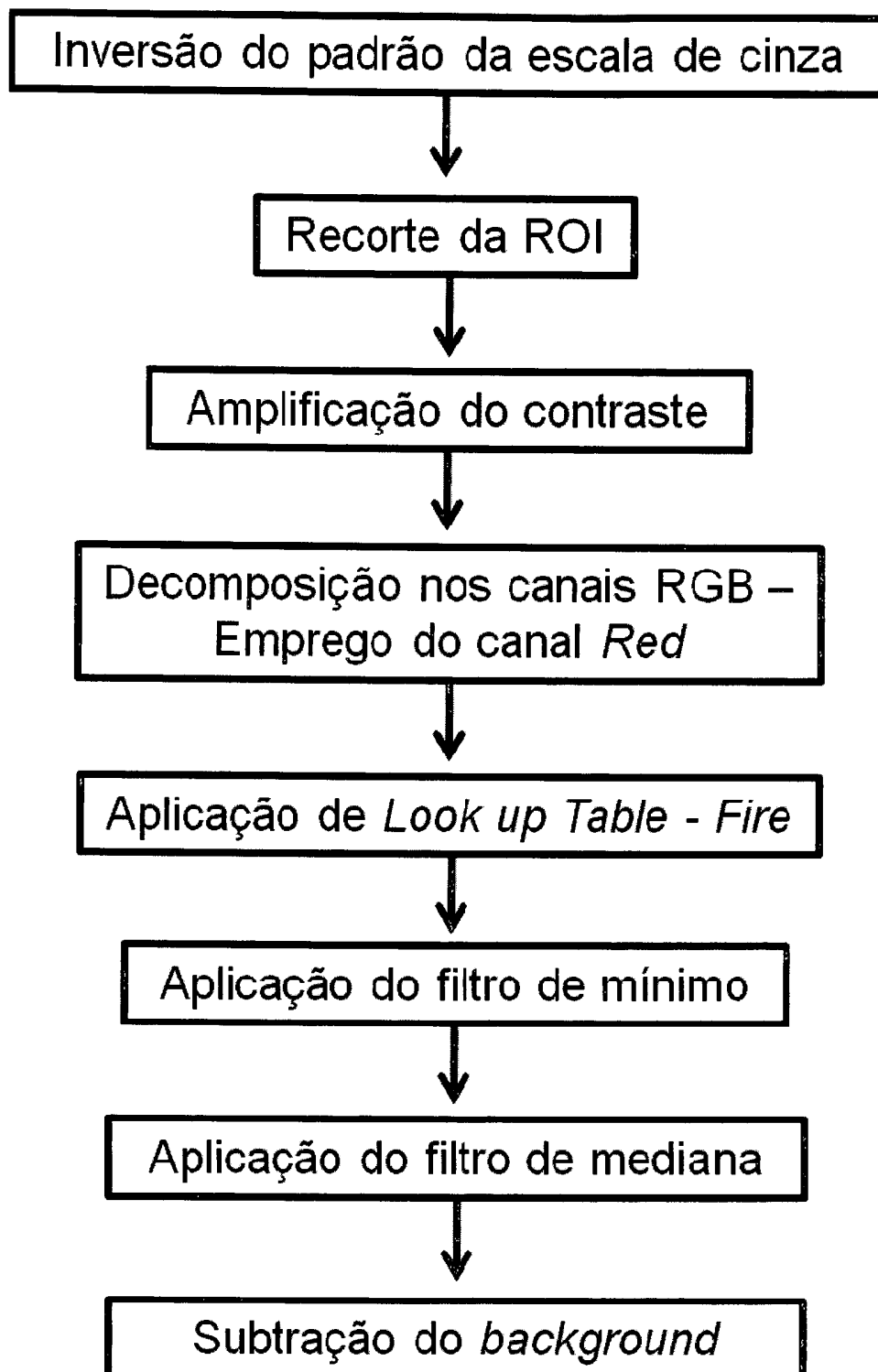


FIGURA 2

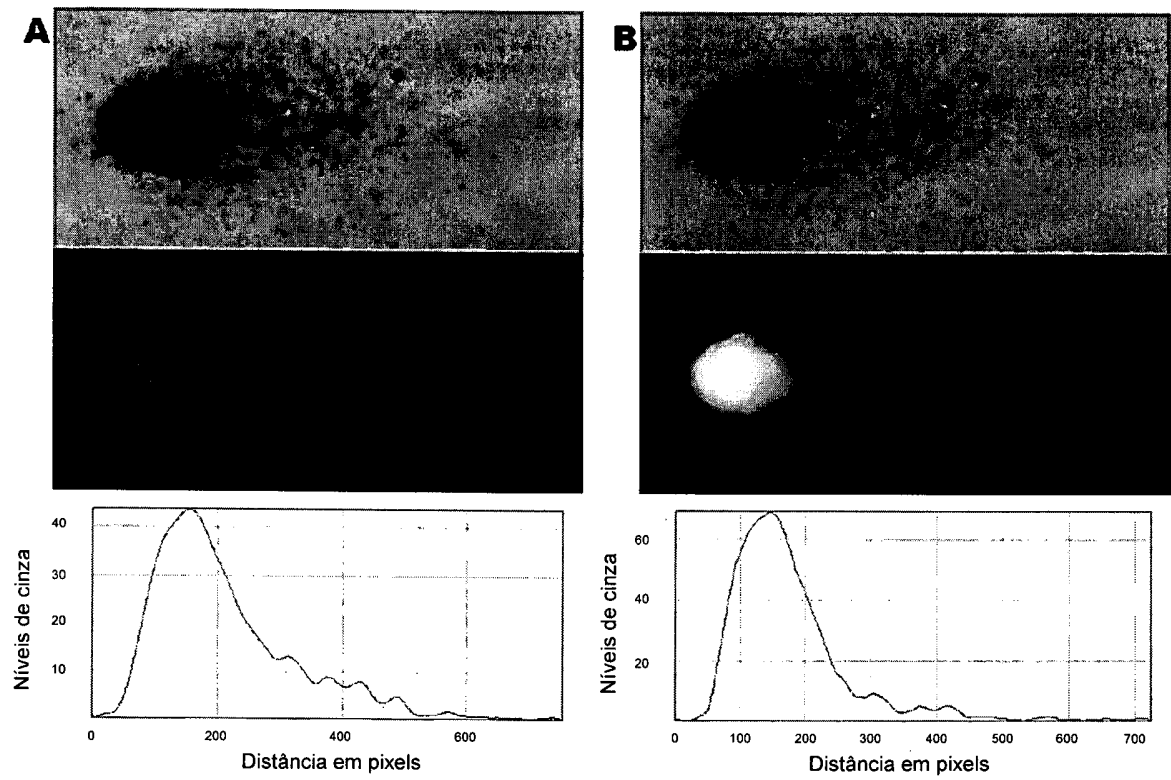


FIGURA 3

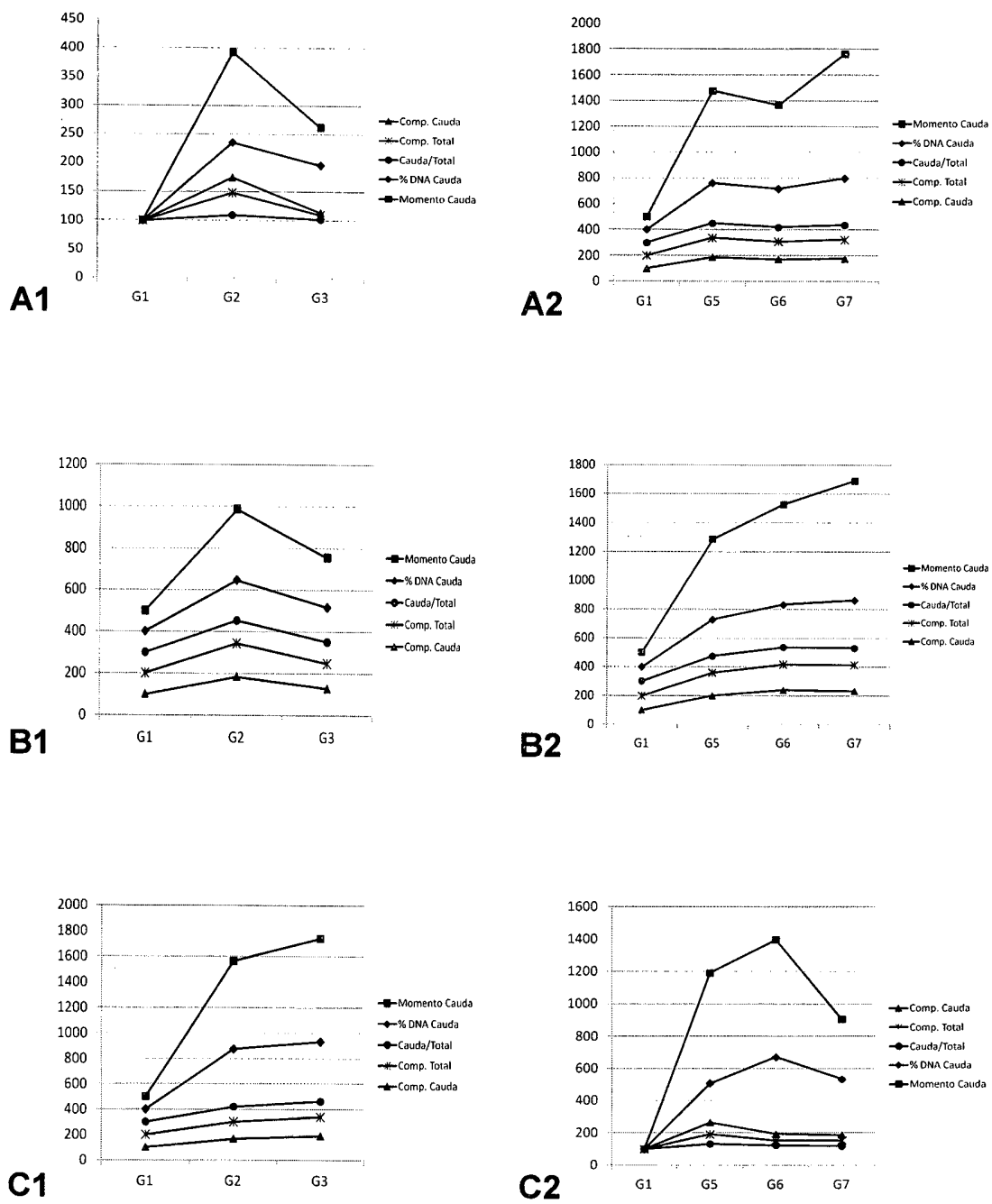


FIGURA 4

RESUMO**MÉTODOS DE PROCESSAMENTO DE IMAGENS PARA DETERMINAÇÃO DE DANO EM DNA.** Patente de invenção de métodos

para processamento de imagens obtidas a partir de amostras preparadas

- 5 conforme protocolo para realização de teste do cometa, particularmente corado pela prata. Este teste é amplamente utilizado para avaliação de genotoxicidade de substâncias. Há sistemas automatizados que analisam os cometas corados por substâncias fluorescentes. A coloração de prata é uma técnica pouco difundida pela falta de tecnologia de
- 10 análise digital automatizada e tem desempenho semelhante às técnicas com fluorescência, porém, é de baixo custo, rápida execução, não depende de microscópios de fluorescência e não utiliza produtos mutagênicos em seu protocolo. Os métodos de processamento de imagens apresentados neste pedido foram desenvolvidos para sanar tais
- 15 problemas e a falta de automatização.