

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA - CAMPUS DE BOTUCATU**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE ANÁLISE DIGITAL PARA O
TESTE DO COMETA CORADO PELA PRATA**

GABRIELLI BRIANEZI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

BOTUCATU – SP

2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA - CAMPUS DE BOTUCATU**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE ANÁLISE DIGITAL PARA O
TESTE DO COMETA CORADO PELA PRATA**

**MESTRANDA: GABRIELLI BRIANEZI
ORIENTADOR: HÉLIO AMANTE MIOT**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

**BOTUCATU – SP
2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Brianezi, Gabrielli.

Desenvolvimento de um método de análise digital para o teste do cometa corado pela prata / Gabrielli Brianezi. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011...

Orientador: Hélio Amante Miot

Capes: 40105008

1. Anatomia patológica. 2. Testes de mutagenicidade.

Palavras-chave: Ensaio do cometa; Processamento de imagem assistida por Computador; Testes de mutagenicidade; Genotoxicidade.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Sandoval e Marina**

Pelo amor incondicional e apoio, por serem exemplos para minha vida e pela certeza de que sempre estarão me esperando de braços abertos. Por os as vezes que me deram o colo que precisava.

Aos meus irmãos, **Danielli e Aislan**

Pela companhia, carinho e amor. Por sempre me apoiarem e por todos os momentos felizes passados juntos.

Amo vocês!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

*A verdadeira felicidade está na própria casa,
entre as alegrias da família.*

Liev Tolstói

Ao meu namorado, **Mário Felipe**

Por estar sempre ao meu lado, pelo seu carinho e amor, apoio e amizade. Por cada momento que passamos juntos e por tantos outros que ainda virão. Momentos que só reforçam nossa cumplicidade. Por querer fazer parte de minha vida. Te amo!!!!

O tempo é muito lento para os que esperam

Muito rápido para os que tem medo

Muito longo para os que lamentam

Muito curto para os que festejam

Mas, para os que amam, o tempo é eterno.

William Shakespeare

AGRADECIMIENTO

ESPECIAL

Ao meu orientador, **Hélio Amante Miot**

Pela orientação, pelo incentivo e paciência. Por acreditar em minha capacidade e ajudar em meu crescimento profissional e científico. Por sempre estar disposto a me ouvir e ajudar.

Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Deus

Pela minha vida, pelas bênçãos derramadas sobre mim e minha família.
Por me guiar pelos caminhos que escolhi, e pela certeza de estar sempre comigo.

*Em Deus está a minha salvação e a minha glória;
Deus é o meu forte rochedo e o meu refúgio.
Confiai nele, ó povo, em todo o tempo;
derramai perante ele o vosso coração;
Deus é o nosso refúgio.
Salmo 62, 7-8*

Ao Prof. João Lauro

Pela oportunidade de fazer parte do TOXICAM, por sempre estar disposto a ajudar e ser exemplo de profissional.

Às Prof^{as}. Márcia e Denise

Pela ajuda para a organização dos eventos, pela paciência e pelo aprendizado muitas vezes não científico que me passaram.

*"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende."
(Leonardo da Vinci)*

Aos meus avós, **Benedito, Zoraide**

Pelas orações, companhia e carinho por todos esses anos.

Aos meus avós, **Adelelmo** (in memoriam) e **Maria** (in memoriam)

Por todas as boas lembranças deixadas, e o carinho recebido.

*“... a Saudade eterniza a presença de quem se foi e com o tempo
esta dor se aquieta, se transforma em silêncio que espera pelos
braços da vida um dia reencontrar...”*

(Fábio de Melo)

Ao meu cunhado, **Rodrigo**

Pelos momentos de diversão e por fazer quem tanto amo feliz.

Aos meus e sogro e sogra, **Francisco (Paco) e Maria**

Por me tratarem como uma filha, obrigada pelo carinho.

Às irmãs de coração, **Danielle, Fernanda, Débora, Andressa**

Pela amizade e carinho, reforçadas a cada encontro, que apesar de poucos, fundamentais. Amizade que distância alguma é capaz de desfazer.

*. Depois de algum tempo você Aprende que verdadeiras amizades
continuam a crescer mesmo a longas distâncias.*

E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher.

William Shakespeare

À **Marina** (Perdiz) e **Uilian** (Prumo)

Pela amizade, por me acolherem em sua casa e pelos dias de convivência.

Aos amigos, **Carlos, Bruna, Karen, Renata, Adriana, Maila, Mariana e Sidney**

Pelas divertidas reuniões do evento e por tantas outras ‘reuniões’ de comemorações que vão continuar sempre. Obrigada pela companhia.

Aos amigos to **TOXICAM**

Merielen, Viviane, Shadia, João Francisco, Marize, Tony, Meire, Paulo, Mara, Mitscheli, Alexandre, Ana, Iza e Carla

Pelo prazer na convivência diária, por ajudar o desenvolvimento desse trabalho mesmo que de maneira indireta, pelos momentos de descontração vividos. À Meri e João pelos agradáveis almoços na faculdade.

À **Cristina Dorico**

Pela disponibilidade de sempre, por sua alegria contagiante e carinho.

O amigo é um outro eu. Sem amizade o homem não pode ser feliz.

Aristóteles

Aos amigos, **Natália, Marilu, Renato, André, Carol, José Alexandre, Rodrigo**

E por outros tantos amigos não citados, mas não menos importantes,
Por existirem e por poder ter a certeza que sempre estarão junto a mim mesmo que distantes.

Cada pessoa que passa por 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

À secretária **Vânia,**

Pelo auxílio no desenvolvimento de minha pós-graduação.

Trabalho desenvolvido no laboratório do Núcleo de Avaliação do Impacto
Ambiental Sobre a Saúde Humana – TOXICAM.

Este trabalho foi realizado com o auxílio financeiro de:

Fundação de Amparo do Estado de São Paulo – FAPESP (2009/08100-9).

Sumário

Índice de abreviaturas e siglas	14
CAPÍTULO I - Revisão da Literatura -	15
1. Fundamentos	16
1.1. Teste do cometa	16
1.2. Análise de imagem digital	21
1.2.1. Elementos prévios ao processamento da imagem	22
1.2.2. Processamento da imagem	23
1.2.3. Sistemas de análise de imagem digital	25
1.3. Elementos da análise de imagem	25
1.4. Referências	35
CAPÍTULO II - Objetivos -	40
1. Objetivos	41
1.1. Objetivo geral	41
1.2. Objetivos específicos:	41
CAPÍTULO III - Manuscrito -	42
1. Manuscrito	43
2. Perspectivas	73
3. Apêndices	76
3.1. Apêndice 1 – Arquivo impresso para análise visual e métrica manual	76
3.2. Apêndice 2 – Algoritmo 1	77
3.3. Apêndice 3 – Algoritmo 2	79
3.4. Apêndice 4 – Mediana algoritmo 1	81
3.5. Apêndice 5 – Mediana algoritmo 2	82
3.6. Apêndice 6 – Mediana fluorescência	83
3.7. Apêndice 7 – Correlação entre avaliadores para algoritmo 1 e 2	84
3.8. Apêndice 8 – Correlação algoritmo 1 e 2	85
3.9. Apêndice 9 – Correlação algoritmo 1 e fluorescência	86
3.10. Apêndice 10 – Correlação algoritmo 2 e fluorescência	87
3.11. Apêndice 11 – CV% avaliação visual e métrica manual	88
3.12. Apêndice 12 – CV% algoritmo 1	89
3.13. Apêndice 13 – CV% algoritmo 2	90
3.14. Apêndice 14 – CV% fluorescência	91
3.15. Apêndice 15 - Matriz de dispersão algoritmo 1 (cometa a cometa)	92
3.16. Apêndice 16 - Matriz de dispersão algoritmo 1 (mediana animal)	93
3.17. Apêndice 17 – Matriz de dispersão algoritmo 2 (cometa a cometa)	94
3.18. Apêndice 18 – Matriz de dispersão algoritmo 2 (mediana animal)	95
3.19. Apêndice 19 – Intensidades da cabeça e cauda de cometas de classes diferentes....	96
4. Anexo	99
4.1. Anexo 1 – Comitê de Ética	99

Índice de abreviaturas e siglas

AgNO₃ – Nitrato de prata

AV 1, AV 2 e AV 3 – Avaliadores 1, 2 e 3

BMP – Arquivo de imagem tipo *Bitmap*

Ca⁺⁺ – Íons cálcio

CCI – Coeficiente de correlação intraclasse

CEMIB – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

CO₂ – Dióxido de carbono

CV% – Coeficiente de variação (percentual)

DEN – N-nitrosodietilamina

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ENDO III – Endonuclease III

EUA – Estados Unidos da América

FGP – Formamidopirimidina DNA glicosilase

FISH – Hibridização fluorescente *in situ*

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

ISO – *International Standards Organization*

Mg⁺⁺ – Íons magnésio

MNU – N-nitroso-N-methylurea

NaCl – Cloreto de sódio

Na₂CO₃ – Carbonato de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

NH₂NO₃ – Nitrato de amônio

PBS – Tampão Fosfato-Salino

POP – Protocolo operacional padrão

ROI – Região de interesse

q.s.p. – Quantidade suficiente para

SYBR Gold – *SYBR Gold nucleic acid gel*

SYBR Green – *SYBR Green nucleic acid gel*

TCA – Ácido tricloroacético

TIFF – Arquivo de imagem tipo *Tagged image files*

TRIS – *tris*(hidroximetil)aminometano

UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

ZnSO₄ – Sulfato de zinco

CAPÍTULO I

- REVISÃO DA LITERATURA -

1. Fundamentos

1.1. Teste do cometa

O teste do cometa, ensaio do cometa, eletroforese em microgel ou eletroforese em gel de célula única, é um teste de genotoxicidade empregado há mais de 20 anos, cujo uso encontra-se em franco crescimento (1).

É o método preferível para avaliar dano ao DNA, devido a sua relativa insensibilidade à citotoxicidade, pois células apoptóticas ou necróticas formam imagens características. O uso de testes de viabilidade celular anteriormente ao ensaio do cometa diminuem a frequência de resultados falso-positivos relacionados à citotoxicidade (2).

Detecta lesões genômicas que, se processadas pela célula, poderão resultar em mutações, não constituindo um marcador direto de mutações ou aneuploidias (2, 3). É empregado em estudos regulatórios, de biomonitoramento, avaliação de mecanismos, novos fármacos e produtos químicos, de diagnóstico e tratamentos médicos, ecogenotoxicidade e quimioprevenção (4-8).

O teste do cometa também tem sido proposto como um método para detecção de apoptose, porém existem discussões entre os pesquisadores quanto a essa capacidade. Alguns acreditam que cometas com quase sua totalidade de conteúdo de DNA na cauda representam células em processo de apoptose (7), são os cometas denominados “ouriços” (*hedgehog*). Entretanto, alguns estudos mostraram capacidade de reparo dessas células o que contraria o processo apoptótico (1).

Estudos mostraram ainda que células marcadas com corante fluorescente Anexina-V, que são externalizados para a membrana celular nos estágios iniciais da apoptose foram mal detectadas, apresentando uma migração quase total do DNA (9).

Pode ser aplicado em ampla variedade de espécies, desde bactérias, plantas e até mamíferos, tanto *in vitro* como em sistemas *in vivo*, e na maioria dos tecidos (10).

Para a análise do teste do cometa, as células necessitam estar em suspensão, portanto, as mais empregadas são as provenientes do sangue total, principalmente os linfócitos (10), pois são de fácil obtenção e danos relacionados com os processos de digestão do tecido não interferem nos resultados relacionados ao tratamento (1).

Porém, podem não representar o real dano em outro tecido (5), e são afetados por fatores externos, como atividade física, estresse, idade e tabagismo (7).

É método rápido, seguro, de baixo custo e relativa facilidade de realização, podendo ser realizado com pequeno número de células, sem a necessidade de estarem em fase de divisão celular. Apesar de apresentar sensibilidade pouco menor que outros testes de genotoxicidade, como o teste de micronúcleo, o ensaio do cometa é capaz de investigar ampla variedade de compostos com potencial genotóxico, assim como detectar seu efeito em baixas concentrações (11).

A inclusão de substâncias inibidoras do reparo ou a utilização da versão acelular do teste aumentam essa sensibilidade, pois durante o processamento do teste do cometa convencional há atividade fisiológica de reparo ao DNA (11).

Inicialmente, a técnica foi desenvolvida para visualizar danos de DNA induzidos por radiação em células de mamíferos por Östling and Johanson 1984 (12). Atualmente, possui duas versões: a neutra (13), considerada menos sensível porque detecta apenas lesão de fita dupla de DNA e a alcalina (14), adotada pela maioria dos laboratórios por detectar maior variedade de lesões de DNA, como quebra de fita simples, lesões de sítios álcali-lábeis e locais de reparos incompletos (15).

Algumas modificações no protocolo podem aumentar a variedade de utilização do teste. A introdução de tratamento com enzimas de restrição permitem a detecção de danos em bases púricas (FGP- Formamidopirimidina DNA glicosilase) e pirimídicas oxidadas (ENDO III- Endonuclease III) (16, 17), ou a inclusão de períodos de incubação para detecção de reparo de bases no DNA (5).

Além disso, sob certas condições, o teste do cometa é capaz de detectar *crosslinks* DNA-DNA e DNA-proteína que causam diminuição na migração de DNA fragmentado na ausência de outros tipos de lesões, e a combinação do teste do cometa com a técnica de FISH (hibridização fluorescente *in situ*) possibilita a identificação de dano em sequências específicas (18-21), tal como genes relevantes a carcinogênese, como: TP53, Kras, APC, HER-2 (22, 23), ou telômeros.

Há ainda uma versão do teste conhecida como acelular. Nesta técnica, identificam-se substâncias que causam dano diretamente ao DNA independente de sua

citotoxicidade. As lâminas preparadas com células não tratadas são expostas à substância teste após a lise, expondo o próprio DNA ao contato com o tratamento (15).

Em todas as versões, o teste se fundamenta no comportamento do DNA de células individualizadas quando submetido à eletroforese. As células em suspensão são embebidas em agarose e imersas em solução de detergente e alta concentração de sais que lisam as células e extraem as proteínas, deixando na lâmina somente as proteínas da matriz nuclear e o DNA condensado e helicoidizado, denominado nucleóide. Durante a eletroforese, o DNA fragmentado se movimenta para a região do ânodo, proporcionalmente à extensão de dano ao DNA, adquirindo a forma aparente de um cometa, com cabeça, representada pela região nuclear, e cauda, composta pelos fragmentos de DNA que migraram (Figura 1) (1).

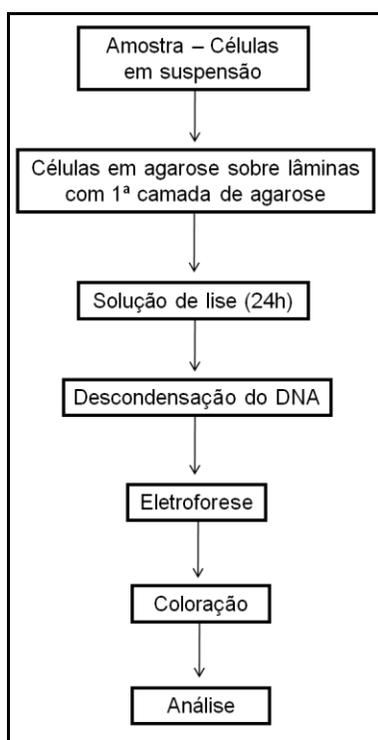


Figura 1: Fluxograma do teste do cometa.

A eletroforese é um passo fundamental do procedimento, e precisa ser cuidadosamente descrita, pois a não padronização dos protocolos pode implicar em variações dos resultados (1).

Há um esforço para se realizar uma padronização internacional do teste, com publicações de *guidelines* para sua execução e possível comparação interlaboratorial (15, 24).

Os parâmetros utilizados para análise dos resultados também variam entre os laboratórios, sendo os mais recomendados o momento da cauda (*Olive tail moment*) e sua porcentagem de DNA (1, 24), porém, a utilização da classificação visual qualitativa e o escore resultante continuam aceitos para análise dos resultados e validação das técnicas.

A avaliação visual é realizada a partir da análise individualizada das células e sua classificação em categorias que variam de 0 a 4, referentes à extensão de dano 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 %) (Figura 2) (25).

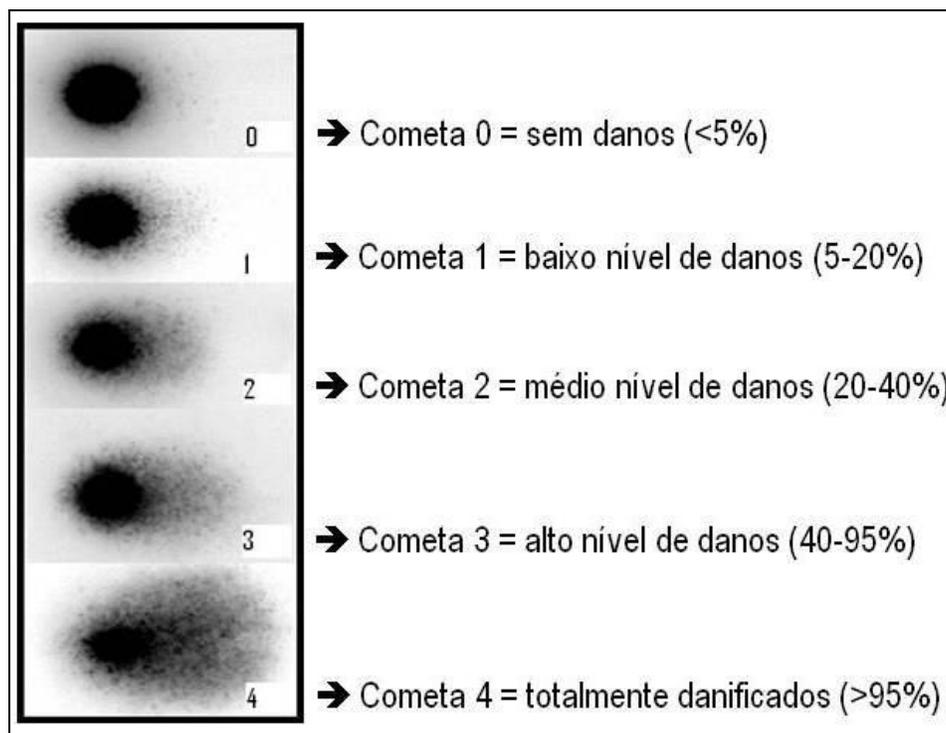


Figura 2: Classificação visual do teste do cometa de acordo com a fragmentação do DNA (25).

Pode-se ainda, determinar um escore resultante da multiplicação do número de cometas de cada categoria e sua classificação visual, podendo atingir um índice que varia de 0 a 400 (5).

A partir do uso de lâminas ou lentes micrometradas, pode-se também estimar diretamente o comprimento da cauda e da cabeça, mas essa forma de mensuração é pouco utilizada.

Entre os parâmetros calculados a partir de sistemas automatizados, o momento da cauda não possui uma fórmula padronizada, a mais utilizada é a descrita por Olive, que é denominada *Olive tail moment*, portanto a comparação desse parâmetro entre estudos pode não ser adequada. É calculado a partir da distância de migração e a percentagem de DNA na cauda, e não apresenta linearidade de dose-resposta (1, 26).

A percentagem de DNA na cauda se mostra mais útil na comparação entre estudos e apresenta uma variação linear com a frequência de quebras no DNA (1, 26).

A classificação visual, entretanto, é o método padrão e mais reproduzível, sendo empregada sob a forma de escore geral da amostra. É influenciada pela experiência do avaliador e possui certa variabilidade entre os analisadores, sendo recomendado que o mesmo avaliador seja responsável pela análise de todos os cometas de um mesmo experimento.

Todos os parâmetros de análise do teste do cometa dependem da relação entre a quantidade de DNA e a quantidade de corante que se ligou ao material nuclear, sendo pressuposta que ocorra uma relação linear (27). A coloração mais utilizada é a fluorescente, com *SYBR Green*, *SYBR Gold*, iodeto de propídio, laranja de acridina, brometo de etídio, mas também pode ser feita com sais de prata (27, 28).

Os corantes de fluorescência possuem potencial mutagênico, necessitam de equipamentos específicos para visualização (microscópio de fluorescência) e a análise deve ser feita imediatamente após o processo de coloração (28). Há sistemas automatizados validados para a avaliação da coloração de fluorescência, o que torna a análise dos dados mais rápida e objetiva, porém são onerosos para sua aquisição (29-31).

A coloração do DNA com sais de prata é usada desde o século XIX, é permanente, é três vezes mais sensível que a avaliação da fluorescência pelo brometo

de etídio (32) e as lâminas podem ser analisadas em microscópio convencional (28, 33, 34). A análise do cometa tem sido realizada pelos escores da classificação visual, porque não há sistemas automatizados de análise direta adequadamente validados e padronizados para o teste do cometa corado pela prata (5, 35).

A análise métrica manual de alguns parâmetros do teste do cometa é possível, porém, a utilização dos sistemas automatizados é mais operacional, principalmente devido à ampla utilização do método e avaliação simultânea de diferentes compostos. Diante disso, tornam-se imprescindíveis processos de automatização não somente da análise do teste, mas do preparo das amostras e do processo de análise dos resultados, o que agregaria ao ensaio modernas tecnologias de alta produtividade de dados (*high throughput*) (36, 37).

Estudos recentes indicam a validação dessa tecnologia e apresentam técnicas de inclusão de várias amostras na mesma lâmina, com codificação dos seus locais de inclusão para a automatização total do processamento do teste do cometa, reduzindo custo operacional e acelerando o processo de eletroforese e coloração do experimento (36, 38, 39).

A alta sensibilidade do teste permite a detecção de pequenos efeitos de dano ao DNA, que, apesar de detectados biologicamente, devem ser cuidadosamente avaliados por não representarem lesão definitiva ao sistema biológico quando testados *in vivo*, já que existem sistemas de proteção, reparo do DNA e apoptose celular envolvidos no processo.

1.2. Análise de imagem digital

Imagem digital é uma representação bidimensional de *pixels*, com cores e distribuição determinadas e que apresenta características como a estabilidade de sua estrutura de cores, organização e dimensões, que favorecem seu emprego na análise quantitativa de fenômenos (41).

Denomina-se análise de imagem a extração de informações (quantitativas ou não), a partir da análise dos *pixels* em uma representação iconográfica de um fenômeno, e pode ser empregada em diversas áreas do conhecimento.

Morfometria microscópica é a mensuração de estruturas que permite descrever quantitativamente características que são percebidas qualitativamente pela visão, como tamanho, área e contagem de elementos (40).

Os primeiros relatos morfométricos datam do século XVII, quando foram desenvolvidos sistemas para medir objetos microscópicos. Em 1624, Antoni van Leeuwenhoek usou como referência grãos de areia para estimar o tamanho de um eritrócito humano (40).

Modernamente, as técnicas fotográficas associaram-se a novas tecnologias como as imagens digitais, vídeos, e além de algoritmos computacionais, agregando novos conceitos, metodologias e procedimentos que aumentaram seu escopo de utilização científica (41, 42). Essas características geraram diferentes nomenclaturas para a técnica como: morfometria digital, análise quantitativa de imagens, análise computacional de imagens, visão computacional, de acordo com particularidades de seu emprego.

1.2.1. Elementos prévios ao processamento da imagem

Os cuidados pré-processamento constituem a série de procedimentos que visam à preparação da imagem para a análise propriamente dita.

É essencial ao sucesso do experimento, pois a validade, precisão e reprodutibilidade da análise morfométrica dependem da qualidade dos espécimes biológicos, técnicas de preparo e padronização da captura da imagem. Esses elementos precisam ser considerados previamente já na fase de projeto, objetivando a menor variabilidade das medidas, e executados cuidadosamente com a ciência que possam interferir nos resultados finais da análise.

A padronização desses parâmetros garante resultados válidos, confiáveis e reprodutíveis ao final do estudo, por isso é necessária sua descrição detalhada no delineamento do projeto ou que seja realizado segundo um protocolo operacional padrão (POP) já estabelecido (43).

O conhecimento da morfologia da espécime biológica utilizada e dos processos envolvidos no estudo é importante para definir e escolher os melhores parâmetros

técnicos a serem utilizados como: espessura dos cortes, técnicas de fixação, marcação e coloração, assim como o próprio preparo e processamento das amostras que devem ser homogêneas, em número adequado para a quantificação, padronizadas para todo o experimento (44).

É importante ressaltar a importância do processamento histotécnico ser realizado em um mesmo momento, com mesma solução, pelo mesmo técnico para todo grupo amostral. Quaisquer alterações na intensidade de coloração, geradas pelo uso de soluções preparadas em dias diferentes, podem gerar leituras fotográficas digitais diferentes para o mesmo fenômeno, e o aumento da variabilidade das leituras geram perda da precisão e necessidade de maiores amostras para detecção dos fenômenos.

O tipo de microscópio, iluminação utilizada, parâmetros de difusão e condensação da luz devem ser estabelecidas e fixadas para toda a amostra, assim como a câmera utilizada na captura, aumento, resolução, zoom, ISO. Com isso, evita-se a necessidade de correções de imagem após o processo de digitalização (41, 45-47).

O número de imagens necessárias para o estudo deve ser representativo, e varia de acordo com a abordagem do problema, baseado sempre na literatura e, principalmente, em teste estatísticos que apresentem o número ideal da amostra tal como determinação da média acumulada baseada na estabilização da amostra, métodos de amostra progressiva (Ex.: Animal 1 → 5 fragmentos → 5 campos → 5 subcampos), ou a partir de estudos piloto.

É, ainda, importante que as imagens sejam capturadas seguindo protocolo cego, para minimizar viés de seleção dos campos pelo pesquisador.

1.2.2. Processamento da imagem

A essência da análise morfométrica digital é o adequado processamento da imagem, que promove transformações na matriz de *pixels* para extrair a informação desejada, segregando o ruído.

Para iniciar uma pesquisa ou estudo utilizando a análise de imagem alguns passos são muito importantes, como a captura, armazenamento, correção dos defeitos,

segmentação dos objetos na imagem e as medidas propriamente ditas (42). Todo esse procedimento denomina-se processamento da imagem e tais passos requerem cuidados e padronização, pois são etapas que podem interferir nos resultados finais.

O primeiro passo da captura da imagem depende da conversão do sinal analógico (imagem) em uma informação digital (numérica), isso ocorre pela conversão das diferentes intensidades de luz e comprimentos de onda da imagem em sinais digitalizados (valores numéricos discretizados). Esses valores podem variar de 0 a 255, para cada canal de cor, sendo 0 o ponto de intensidade de menor brilho (preto) e 255 de maior brilho (branco). Esses sinais são registrados por um sensor fotoeletrônico, e, posteriormente, são armazenados em um arquivo de computador (42).

Todos os níveis de cor semelhantes nessa transformação possuem o mesmo valor, e podem ser representados como níveis de cinza. O número de níveis de cinza é determinado por 2^n , onde n representa o número de *bits* no número binário usado para representar a densidade de cada *pixel*, ou seja, uma imagem com oito bits de cor resulta em 2^8 diferentes tons (48).

Alguns autores subdividem o processamento da imagem em fases independentes (Quadro 1).

Fase	Elementos envolvidos
Captura da imagem	Padronização do sistema óptico, resolução, ISO, iluminação, sistema de cores, distância focal, homogeneidade das amostras
Pré-processamento	Escolha do canal de cor, recorte das áreas de interesse, ajuste de contraste, brilho, gama, normalização e equalização dos histogramas de cor
Processamento	Aplicação de filtros de imagem, operação entre parâmetros numéricos das imagens, transformação de imagens
Segmentação	Aplicação de algoritmos que dividam os <i>pixels</i> da imagem processada em grupos com homologia semântica ou categórica
Análise	Extração de parâmetros numéricos das imagens processadas e segmentadas

Quadro 1: Discriminação das fases da análise digital.

1.2.3. Sistemas de análise de imagem digital

O uso de sistemas computadorizados e automatizados apresentam a vantagem de operacionalizar o processo de medidas, tornando-o mais rápido e ágil, além de diminuir a subjetividade das análises, já que medidas manuais (visuais) realizadas por um observador ou mais, sofrem interferência humana, por mais que se utilizem sistemas de quantificação visual padronizados, por exemplo, escalas.

Outros fatores como a experiência do observador, estresse, cansaço, sonolência, alterações de humor e dificuldades de concentração podem interferir na análise (29).

Apesar do ganho em objetividade da análise morfométrica digital, há possibilidade de viés de seleção do espécime a ser analisado pelo avaliador, reiterando a necessidade de que haja cegamento ou metodologia aleatória na seleção dos espécimes ou dos setores a serem analisados.

1.3. Elementos da análise de imagem

Pixel

O processo de digitalização começa dividindo a imagem em um número de regiões finitas chamadas *pixels* (*picture element*) (48), que representa cada ponto luminoso da imagem. É a estrutura elementar que forma a imagem digital, é adimensional, porém, agrega um tamanho de referência de acordo com a dimensão da imagem real, permitindo a composição de uma escala em relação à imagem real.

Cada *pixel* possui uma coordenada espacial (x,y) e um valor f que é proporcional ao brilho ou nível de cinza da imagem naquele ponto, e a ordem desses *pixels* em uma imagem é chamada de matriz da imagem (48), sendo então esse arranjo ordenado de *pixels* de diferentes intensidades de cor que forma a imagem digital (41).

Se a matriz da imagem for composta de poucos *pixels* grandes, poucos detalhes na imagem original serão perceptíveis. Quanto menores os *pixels* que a formam, maior será a visualização dos detalhes da imagem original. Embora o uso de poucos *pixels*

degrade a resolução da imagem, usar excessivos *pixels* pode exigir custo computacional e não incrementar informação à análise (48).

Quanto maior o número de *pixels* na matriz da imagem, maior será o espaço necessário para armazenar a imagem no computador e será mais demorada sua passagem completa pelo processador de imagem ou para o *display* (41, 48).

A qualidade da imagem é afetada pelo tamanho da matriz, nitidez da região de interesse (ROI), quantidade/profundidade de bits, e ruído da ROI (48).

Resolução

Denomina-se resolução de uma fotografia digital a quantidade de *pixels* que a compõem, e maiores resoluções representam maior nível de detalhe. É determinada pelo tamanho individual de cada *pixel*. O número total de *pixels* multiplicado pelo seu tamanho determina o campo de visão (*field of view*). Se a matriz é fixa, a resolução diminuirá com o aumento do campo de visão (41, 48).

Arquivos x Compressão

Existem vários tipos de sistemas arquivos para armazenar imagens, esses arquivos fazem a compactação dos códigos binários e alguns deles suprimem alguns pontos (*pixels*) da imagem.

Para a análise de imagem essa supressão não é interessante, e por isso o formato de arquivo preferido são os que não geram perda (*lossless*), como o TIFF e BMP, tanto pelo fato dessa forma de compressão de imagem não resultar em perda de pontos na imagem como também pela preferência das publicações científicas (41).

Algoritmo

Compreende a série de operações que caracterizam o processamento da imagem. A maneira mais simples de se pensar um algoritmo é por uma lista de procedimentos bem definida, na qual as instruções são executadas passo a passo a

partir do início, uma ideia que pode ser facilmente visualizada através de um fluxograma.

Informação x ruído

A aquisição de qualquer sinal está sujeita a algum tipo de ruído, ou fração do sinal que não agrega informação específica.

A imagem digital pode ainda conter variações nas intensidades de *pixels* dentro de regiões que na imagem analógica eram uniformes. Denominamos esse efeito de ruído na imagem, que pode afetar o processo de análise digital.

Esse ruído pode acontecer no momento de captura da imagem, é mais comum nas áreas uniformes e *background*, mas pode ser observado na imagem inteira. Há técnicas de processamento da imagem capazes de identificar e reduzir tal interferência (42).

Segmentação

Segmentação é o processo de separação dos *pixels* de uma imagem na ROI, a qual compreende o objeto de interesse com a informação desejada, e o plano de fundo (*background*) (27).

A segmentação é o elemento final de redução do ruído, onde se separa apenas os *pixels* pertencentes às estruturas desejadas.

Existem diversas técnicas de segmentação de imagens, mas não existe nenhum método único que seja capaz de segmentar todos os tipos de imagem, em todas as circunstâncias.

Sistemas de cor

Imagens digitais coloridas possuem geralmente três ou mais níveis de cinza em mesmo *pixel*, que podem resultar em espectros de cor diferentes (49).

Geralmente, cada *pixel* capturado se refere simultaneamente a uma intensidade de cor vermelha, verde e azul (sistema RGB – *Red, Green, Blue*), cuja combinação resulta em uma cor do espectro luminoso, variando do preto (ausência de cor) ao branco (máxima intensidade de cor R, G e B).

Devido à discretização das unidades RGB, o espectro digital não compreende todos os comprimentos de onda da natureza, porém, imagens com 24 bits, ultrapassam 16 milhões de cores, o que suplanta a capacidade de resolução do olho humano (50).

O sistema RGB é o mais utilizado para imagens digitais pela padronização nos monitores de televisão, câmeras, *displays* e pela aproximação com os cones da retina humana (50, 51).

Essas imagens podem ser decompostas em canais elementares de cor, canal R – *Red*, canal G – *Green*, canal B – *Blue*, e desta forma salientam-se detalhes inerentes a cada canal, o que facilita a análise de elementos em uma imagem digital (52).

Há diversos sistemas ou modos de cor que podem ser empregados na representação de *pixels* em uma imagem digital, como, por exemplo: XYZ, HSB (*Hue, Saturation, Bright*), L^*a^*b , o que aumenta a flexibilidade de extração de informações representadas por diferentes sistemas de codificação de sinal (52).

Histograma de *pixels*

O histograma de *pixels* é a representação gráfica de uma imagem no domínio do espaço. Fornece a frequência de ocorrência dos *pixels* nos níveis de cinza (Figura 3). Permite uma descrição global da imagem em termos de distribuição de tonalidades, além da determinação de algumas características da imagem, como luminosidade e desordem dos *pixels* em imagens monotônicas.

Os histogramas são a base para numerosas técnicas de processamento da imagem e segmentação baseada nos grupos de *pixels* em cada tonalidade.

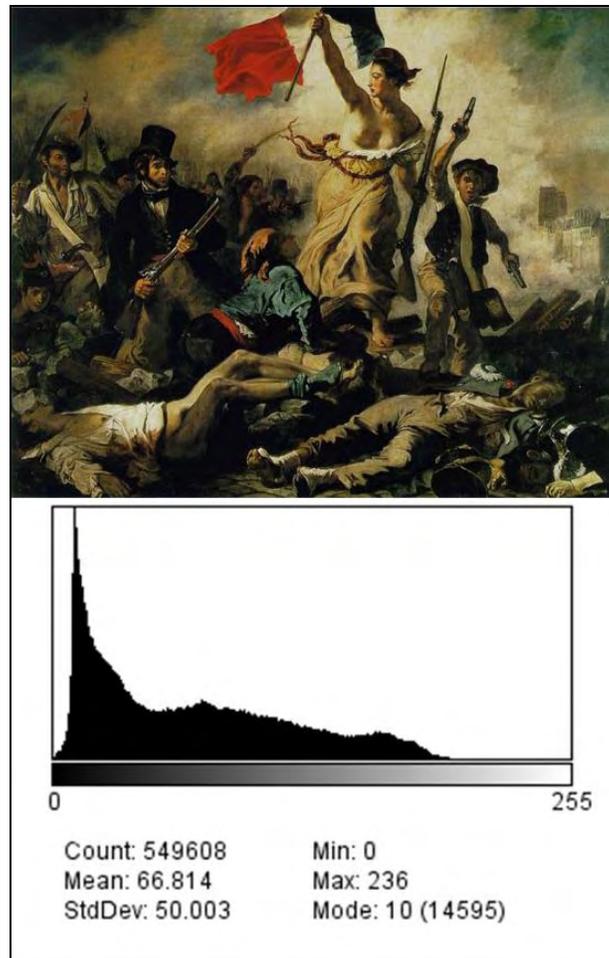


Figura 1: Exemplo de imagem digital e histograma representando a ocorrência de *pixels* ao longo dos níveis de cinza da imagem.¹

Operadores do histograma

Modificações nos histogramas de cor podem auxiliar na segmentação da ROI. Há vários operadores que alteram simultaneamente o comportamento de todos os *pixels* da imagem, como alterações brilho, contraste, tonalidade da imagem (Figura 4). Essas ferramentas podem ainda ser utilizadas no preparo das imagens digitais para o processamento e análise posterior.

A ordem das operações consecutivas no histograma pode interferir no resultado final da imagem, o que torna o processamento de imagens digitais um ofício

¹ *La Liberté guidant le peuple* (A Liberdade guiando o povo – 1830 – Louvre) Eugène Delacroix. Fonte: http://www.artinvest2000.com/delacroix_eugene.htm.

dependente de múltiplas variáveis, e da ordem das operações (42).

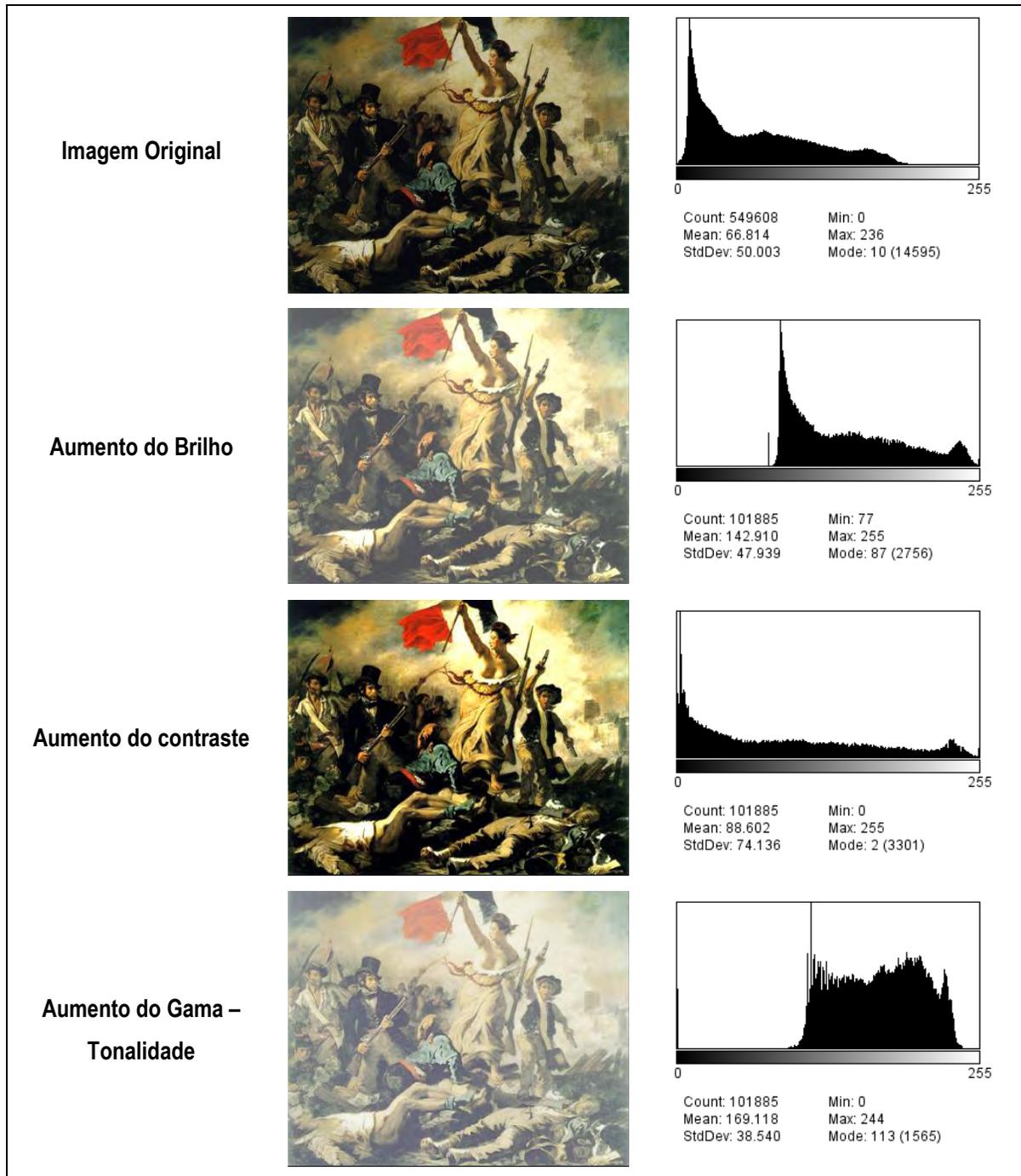


Figura 4: Exemplos de operadores do histograma de cor.

Filtros morfológicos / de frequência

A filtragem por frequência opera alterando a relação de transição de grupos de *pixels* entre si e são muito usados no pré-processamento de imagens para a extração de padrões. Entre muitos exemplos de filtros de frequência, destacam-se os filtros de Fourier, Haar, e os filtros passa-banda, que permitem a expressão (passagem) de grupos de *pixels* com padrões de transição entre si, dentro de regiões e direções pré-definidas.

Filtros de passa-baixa permitem a expressão de *pixels* cuja transição entre si é de baixa frequência, e menor contraste, suavizam a imagem e reduzem o número de níveis de cinza da cena. Tendem a minimizar ruídos e apresenta o efeito de borramento da imagem (Figura 5 A). Pode ser definido pelas representações matemáticas a seguir:

$$H(u,v) = 1 \text{ se } u^2 + v^2 < r^2$$

$$H(u,v) = 0 \text{ se } u^2 + v^2 \geq r^2$$

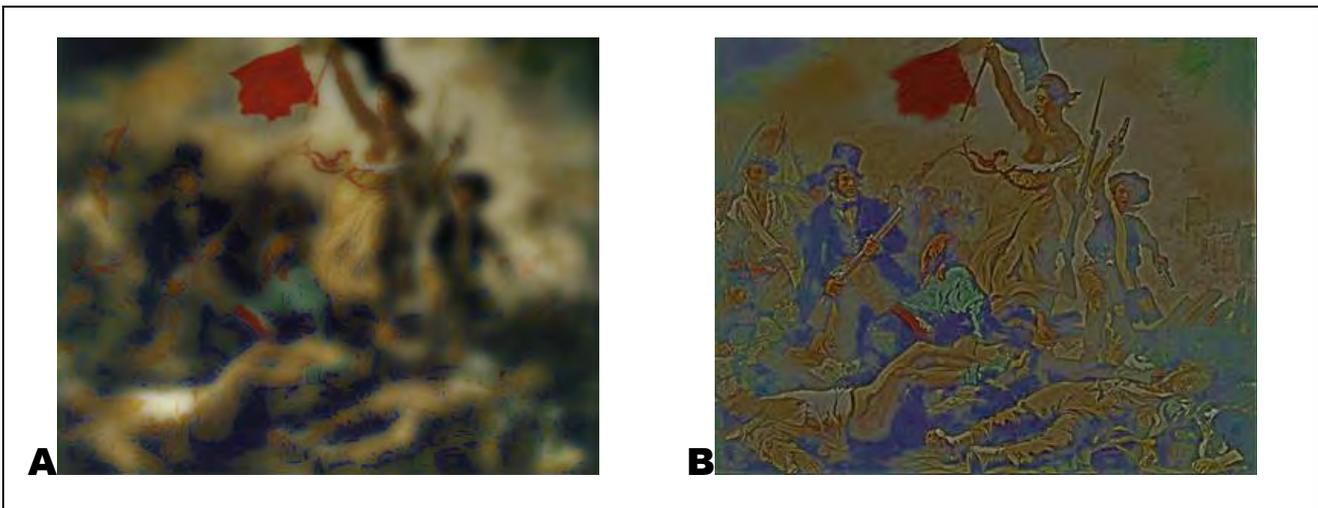


Figura 5: Exemplo de imagem após aplicação dos filtros de passa-baixa (A) e passa-alta (B).

Já filtros de passa-alta permitem a exibição de grupos de *pixels* que apresentem alta frequência de transição entre si, destacando os grandes contrastes da imagem. Há redução de características que variam lentamente em uma imagem como o contraste e

a intensidade média e gera um efeito de intensificação das bordas e de detalhes finos na imagem (Figura 5 B), também empregado na redução de ruído. São representados por:

$$H(u,v) = 0 \text{ se } u^2 + v^2 < r^2$$

$$H(u,v) = 1 \text{ se } u^2 + v^2 \geq r^2$$

Filtros estatísticos

Filtros estatísticos, como o de mediana, máximo, mínimo, ou de variância (Figura 6), transformam os *pixels*, de uma região determinada, de acordo com as características das distribuições das intensidades prévias na mesma região.

No filtro de mediana, o nível de cinza de cada *pixel* é substituído pela mediana dos níveis de cinza na vizinhança do *pixel*, eliminando valores discrepantes e suavizando a imagem, porém, preservando a individualidade de estruturas (Figura 6).

Assim também ocorre com os filtros de mínimo, máximo (Figura 6) ou de média, no qual o *pixel* é substituído pelo valor mínimo, máximo ou médio dos níveis de cinza respectivamente

O filtro gausseano leva em consideração a distribuição normal das intensidades de pixels dentro da imagem. Possui o efeito de suavizar a imagem (Figura 6). A fórmula matemática desse filtro está representada a seguir (53).

$$g(x, y) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} e^{-\frac{x^2+y^2}{2\sigma^2}}$$



Figura 6: Aplicação dos filtros de mediana – 3 *pixels* (A), variância – 2 *pixels* (B), gaussiano – 3 *pixels* (C) e máximo – 2 *pixels* (D).

Cluster

Uma ferramenta útil para segmentação da ROI é o reconhecimento de grupamentos de *pixels* de tonalidades semelhantes. Essa ferramenta substitui um aglomerado de *pixels* pelo valor centroide dessas tonalidades (mediana) (Figura 7) (45).



Figura 7: Aplicação do algoritmo de cluster com nove cores.

Deconvolução

É um algoritmo que utiliza a informação de todas as cores constituintes da imagem. Permite decompor as matrizes de *pixels* em vetores elementares de cores permitindo, por exemplo, separar as colorações histoquímicas de um tecido (54).

Subtração do fundo

Essa ferramenta reduz as irregularidades do fundo da imagem, suavizando-o e aumentando o contraste em relação a área de interesse. Elimina o ruído existente na imagem, corrige o nuance de iluminação e permite uma melhor análise dos objetos que estão no primeiro plano da imagem (55).

A fundamentação desse processamento baseia no algoritmo “rolling ball”, de Stanley Stamberg (56), onde cada *pixel* da imagem bidimensional pode ser projetado em uma terceira dimensão que representa sua intensidade como altura. A projeção do novo diagrama tridimensional dos *pixels* permite o deslizamento de uma estrutura parabolóide, cujo volume estimado dessa trajetória define o fundo da imagem.

1.4. Referências²

1. Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivao I, Giovannelli L, Kruszewski M, et al. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*. 2008 May;23(3):143-51.
2. Witte I, Plappert U, de Wall H, Hartmann A. Genetic toxicity assessment: employing the best science for human safety evaluation part III: the comet assay as an alternative to in vitro clastogenicity tests for early drug candidate selection. *Toxicol Sci*. 2007 May;97(1):21-6.
3. Gontijo AMC, Tice RR. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: Ribeiro LR, Salvadori DM, Marques EK, editors. *Mutagênese ambiental*. Canoas, RS: ED. ULBRA; 2003. p. 247-80.
4. Lovell DP, Omori T. Statistical issues in the use of the comet assay. *Mutagenesis*. 2008 May;23(3):171-82.
5. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*. 2004 Mar;26(3):249-61.
6. Brendler-Schwaab S, Hartmann A, Pfuhler S, Speit G. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis*. 2005 Jul;20(4):245-54.
7. Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res*. 1995 Feb;339(1):37-59.
8. McKenna DJ, McKeown SR, McKelvey-Martin VJ. Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. *Mutagenesis*. 2008 May;23(3):183-90.
9. Morley N, Rapp A, Dittmar H, Salter L, Gould D, Greulich KO, et al. UVA-induced apoptosis studied by the new apo/necro-Comet-assay which distinguishes viable, apoptotic and necrotic cells. *Mutagenesis*. 2006 Mar;21(2):105-14.
10. Dhawan A, Bajpayee M, Parmar D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol Toxicol*. 2009 Feb;25(1):5-32.
11. Kawaguchi S, Nakamura T, Yamamoto A, Honda G, Sasaki YF. Is the comet assay a sensitive procedure for detecting genotoxicity? *J Nucleic Acids*. 2010;2010:541050.

² Referências no formato Vancouver.

12. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984 Aug 30;123(1):291-8.
13. Olive PL. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. *Radiat Res*. 1989 Jan;117(1):79-92.
14. 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 Mar;175(1):184-91.
15. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 2000;35(3):206-21.
16. Azqueta A, Shaposhnikov S, Collins AR. DNA oxidation: investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. *Mutat Res*. 2009 Mar 31;674(1-2):101-8.
17. Dusinska M, Collins AR. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis*. 2008 May;23(3):191-205.
18. Gleis M, Hovhannisyan G, Pool-Zobel BL. Use of Comet-FISH in the study of DNA damage and repair: review. *Mutat Res*. 2009 Jan-Feb;681(1):33-43.
19. Shaposhnikov S, Frengen E, Collins AR. Increasing the resolution of the comet assay using fluorescent in situ hybridization--a review. *Mutagenesis*. 2009 Sep;24(5):383-9.
20. Spivak G. The Comet-FISH assay for the analysis of DNA damage and repair. *Methods Mol Biol*. 2010;659:129-45.
21. Spivak G, Cox RA, Hanawalt PC. New applications of the Comet assay: Comet-FISH and transcription-coupled DNA repair. *Mutat Res*. 2009 Jan-Feb;681(1):44-50.
22. Rapp A, Hausmann M, Greulich KO. The comet-FISH technique: a tool for detection of specific DNA damage and repair. *Methods Mol Biol*. 2005;291:107-19.
23. Kumaravel TS, Bristow RG. Detection of genetic instability at HER-2/neu and p53 loci in breast cancer cells using Comet-FISH. *Breast Cancer Res Treat*. 2005 May;91(1):89-93.

24. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis*. 2003 Jan;18(1):45-51.
25. Speit G, Hartmann A. The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis*. 1995 Nov;10(6):555-9.
26. 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. *Mutat Res*. 2008 Feb 29;650(2):87-95.
27. Vilhar B. Help! There is a comet in my computer! 2004 [cited 2010 10/10]; Available from: http://botanika.biologija.org/exp/comet/comet_guide01.pdf.
28. Nadin SB, Vargas-Roig LM, Ciocca DR. A silver staining method for single-cell gel assay. *J Histochem Cytochem*. 2001 Sep;49(9):1183-6.
29. Bocker W, Rolf W, Bauch T, Muller WU, Streffer C. Automated comet assay analysis. *Cytometry*. 1999 Feb 1;35(2):134-44.
30. Frieauff W, Hartmann A, Suter W. Automatic analysis of slides processed in the Comet assay. *Mutagenesis*. 2001 Mar;16(2):133-7.
31. Helma C, Uhl M. A public domain image-analysis program for the single-cell gel-electrophoresis (comet) assay. *Mutat Res*. 2000 Mar 3;466(1):9-15.
32. Merrill CR. Silver staining of proteins and DNA. *Nature*. 1990 Feb 22;343(6260):779-80.
33. Garcia O, Mandina T, Lamadrid AI, Diaz A, Remigio A, Gonzalez Y, 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 Nov 22;556(1-2):25-34.
34. Zhao R, Heng Z. [Improvement of the silver-stain and its test and verification in comet assay]. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2003 Mar;32(2):107-9.
35. Garcia O, Romero I, Gonzalez JE, Mandina T. Measurements of DNA damage on silver stained comets using free Internet software. *Mutat Res*. 2007 Mar 5;627(2):186-90.

36. Ritter D, Knebel J. Genotoxicity testing in vitro - development of a higher throughput analysis method based on the comet assay. *Toxicol In Vitro*. 2009 Dec;23(8):1570-5.
37. Kiskinis E, Suter W, Hartmann A. High throughput Comet assay using 96-well plates. *Mutagenesis*. 2002 Jan;17(1):37-43.
38. Stang A, Brendamour M, Schunck C, Witte I. Automated analysis of DNA damage in the high-throughput version of the comet assay. *Mutat Res*. 2010 Apr 30;698(1-2):1-5.
39. Wood DK, Weingeist DM, Bhatia SN, Engelward BP. Single cell trapping and DNA damage analysis using microwell arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jun 1;107(22):10008-13.
40. Meijer GA, Belien JA, van Diest PJ, Baak JP. Origins of ... image analysis in clinical pathology. *J Clin Pathol*. 1997 May;50(5):365-70.
41. Miot HA, Paixao MP, Paschoal FM. Fundamentos da fotografia digital para a dermatologia. *An Bras Dermatol*. 2006;81(2):174-80.
42. Oberholzer M, Ostreicher M, Christen H, Bruhlmann M. Methods in quantitative image analysis. *Histochem Cell Biol*. 1996 May;105(5):333-55.
43. Tuomari DL, Kemp RK, Sellers R, Yarrington JT, Geoly FJ, Fouillet XL, et al. Society of Toxicologic Pathology position paper on pathology image data: compliance with 21 CFR Parts 58 and 11. *Toxicol Pathol*. 2007;35(3):450-5.
44. Rojo MG, Bueno G, Slodkowska J. Review of imaging solutions for integrated quantitative immunohistochemistry in the Pathology daily practice. *Folia Histochem Cytobiol*. 2009 Jan;47(3):349-54.
45. Miot HA, Brianezi G. Morphometric analysis of dermal collagen by color clusters segmentation. *An Bras Dermatol*. 2010 Jun;85(3):361-4.
46. Miot HA, Pivotto DR, Jorge EN, Mazeto GM. [Evaluation of oculometric parameters by facial digital photography: use of iris diameter as a reference]. *Arq Bras Oftalmol*. 2008 Sep-Oct;71(5):679-83.
47. Kayser K, Gortler J, Bogovac M, Bogovac A, Goldmann T, Vollmer E, et al. AI (artificial intelligence) in histopathology--from image analysis to automated diagnosis. *Folia Histochem Cytobiol*. 2009 Jan;47(3):355-61.

48. Balter S. Fundamental properties of digital images. *Radiographics*. 1993 Jan;13(1):129-41.
49. Castleman KR. Concepts in imaging and microscopy: color image processing for microscopy. *Biol Bull*. 1998 Apr;194(2):100-7.
50. Rachel JD, Jamora JJ. Skin rejuvenation regimens: a profilometry and histopathologic study. *Arch Facial Plast Surg*. 2003 Mar-Apr;5(2):145-9.
51. Traikovich SS. Use of topical ascorbic acid and its effects on photodamaged skin topography. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1999 Oct;125(10):1091-8.
52. Dessy LA, Mazzocchi M, Rubino C, Mazzarello V, Spissu N, Scuderi N. An objective assessment of botulinum toxin A effect on superficial skin texture. *Ann Plast Surg*. 2007 May;58(5):469-73.
53. Haddad RA, Akansu AN. A Class of Fast Gaussian Binomial Filters for Speech and Image Processing. *IEEE Trans Acoust Speech Signal Process*. 1991 March;39:723-727.
54. Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol*. 2001 Aug;23(4):291-9.
55. Subtract background. 2008 [updated 10/10/2010]; Available from: http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=gui:process:subtract_background.
56. Sternberg SR. Biomedical Image Processing. *Computer*. 1983 Jan, 16(1):22-34.

CAPÍTULO II

- OBJETIVOS -

1. Objetivos

1.1. Objetivo geral

Desenvolvimento e validação de um sistema de análise de imagem digital para avaliação quantitativa do teste do cometa corado pela prata.

1.2. Objetivos específicos:

1. Avaliar a reprodutibilidade da análise visual (qualitativa) e medidas manuais do teste do cometa corado pela prata.
2. Correlacionar dos resultados de sistemas automatizados na análise do teste do cometa corado pela prata e a análise visual.
3. Correlacionar dos resultados de sistemas automatizados na análise do teste do cometa corado pela prata e corado pelo *SYBR Gold*.
4. Estabelecer de rotina de análise digital do teste do cometa corado pela prata.

CAPÍTULO III

- MANUSCRITO -

1. Manuscrito

Texto em português adaptado às normas da revista *Mutagenesis*.

Título: Desenvolvimento de sistema automatizado para avaliação do teste do cometa corado pela prata.

Title: Development of an automated system for the evaluation of silver stained comet assay.

Autores:

Gabrielli Brianezi

Biomédica, Mestranda em Patologia da FMB-Unesp, Botucatu, SP.

Hélio Amante Miot

Professor Assistente Doutor do Departamento de Dermatologia e Radioterapia da FMB-Unesp, Botucatu, SP.

Auxílio: FAPESP (Processo 2009/08100-9).

Resumo

O teste do cometa é utilizado para estimativa de dano ao DNA nos protocolos de avaliação do risco toxicológico. É rápido, de baixo custo, de fácil realização, seguro e pode ser aplicado em diversos tecidos. Corantes fluorescentes são os mais empregados para o ensaio. É também descrita a utilização de sais de prata com vantagens operacionais, carecendo de sistemas automatizados validados para esta análise. Neste trabalho, desenvolveram-se dois algoritmos automatizados para a análise do cometa corado pela prata. Foram realizados ensaios do cometa para sete grupos com dois camundongos Balb/c machos cada, submetidos ao tratamento intraperitoneal com soro fisiológico (G1), e três doses crescentes de genotóxicos conhecidos: MNU (N-nitroso-N-metilurea) (G2 – 5 µg/g, G3 – 25 µg/g, G4 – 50 µg/g) e DEN (N-nitrosodietilamina) (G5 – 20 µg/g, G6 – 80 µg/g, G7 – 180 µg/g). As lâminas dos testes do cometa foram confeccionadas a partir do sangue total e coradas pela prata e *SYBR Gold*. As coradas pela prata foram analisadas por três avaliadores e pelos algoritmos automatizados. Aqueles corados pela fluorescência foram analisados pelo software Comet IV[®]. Os avaliadores apresentaram alta correlação de suas estimativas. Os algoritmos se correlacionaram fortemente com a análise dos avaliadores, principalmente com os escores obtidos pela classificação visual. Houve alta concordância na avaliação da sua repetitividade. Os algoritmos apresentaram resultados semelhantes, não indicando superioridade entre si para a análise do teste. Todos os métodos avaliados se mostraram capazes de diferenciar as concentrações dos genotóxicos utilizados. Porém, os algoritmos desenvolvidos não apresentaram correlação com os resultados obtidos pelo sistema do teste do cometa corado pela fluorescência, sugerindo que os métodos de coloração discriminem diferentes estruturas genômicas ou as identifiquem com diferentes afinidades. Os algoritmos automatizados desenvolvidos se mostraram válidos para a análise direta do teste do cometa corado pela prata, permitindo seu uso em pesquisa de genotoxicidade.

Palavras-chave: Ensaio em Cometa, Processamento de Imagem Assistida por Computador, Testes de Mutagenicidade, Genotoxicidade.

Abstract

The comet assay is used to estimate DNA damage in the protocols for toxicological risk assessment. It's fast, inexpensive, easily performed, safe and can be applied in most tissues. Fluorescent dyes are frequently used for testing. Silver salts have been reported with some operational advantages; however automated systems for its analysis were not sufficiently validated for this staining. In this study, we have developed two algorithms for automated analysis of the comet assay silver stained. The assay was performed for seven groups of two (Balb/c) mice each, treated with intraperitoneal saline (G1) and three different genotoxic doses: MNU (N-nitroso-N-methylurea) (G2 - 5 µg/g, G3 - 25 µg/g, G4 - 50 µg/g) and DEN (N-nitrosodiethylamina) (G5 - 20 µg/g, G6 - 80 µg/g, G7 - 180 µg/g). The slides of the comet assay were made with total blood and were stained with silver and *SYBR Gold*. The silver stained slides were analyzed by three evaluators and the automated algorithms. Those stained by fluorescence were analyzed through software Comet IV®. Evaluators showed high correlation of their estimates. Both algorithms were correlated strongly with the evaluators' analysis mainly on the scores obtained by visual classification. Moreover, their agreement was high when assessed by repetitivity. The algorithms showed similar results, demonstrating no superiority to each other for the analysis of the test. All methods evaluated proved able of differentiating genotoxic concentrations used. However, the algorithms were not correlated with the results obtained by the automated system of comet assay fluorescence stained, suggesting that the staining methods linkage different genomic structures or with different affinities. The automated algorithms developed proved valid for the direct analysis of comet assay silver stained, allowing their use in genotoxicity research.

Key-words: Comet assay; Image Processing, Computer-Assisted; Mutagenicity Tests; Genotoxicity.

Introdução

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 (1).

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 (2), 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 (1).

A técnica fundamenta-se no comportamento do DNA, submetido a eletroforese, que se movimenta para a região do ânodo, 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 (3).

Constitui método rápido, de baixo custo, de relativa facilidade de realização, com alta sensibilidade (4) 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 (3). Porém, o uso de células sanguíneas pode não representar o real dano a um diferente tecido (1).

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 (5).

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 (5).

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 (5-8).

Há diferentes maneiras de se avaliar os resultados do teste do cometa, o método padrão é a classificação visual qualitativa em cinco categorias (0-4) 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 (1).

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 operacionais (1).

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 possibilitam a avaliação de diferentes compostos e concentrações (9).

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 obter sistemas que utilizem *software* de código aberto (10). Até o momento, não há nenhum sistema automatizado de análise direta para o teste do cometa corado pela prata adequadamente validado (11).

O objetivo deste trabalho é desenvolver e validar um sistema de quantificação para o teste do cometa corado pela prata.

Materiais e métodos:

Delineamento experimental

Para os testes do cometa corados pela prata e pela técnica de fluorescência foi utilizado sangue total de camundongos BALB/c machos com dois meses de idade,

provenientes do CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica) da UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno e permaneceram no biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UNESP em Botucatu, recebendo ração basal peletizada NUVILABCR1 (NUVITAL, Curitiba-PR) 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 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) segundo protocolo mostrado na Figura 1. Ambas as 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 (12,13)

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 fluorescência), e todas as lâminas codificadas e analisadas em teste cego.

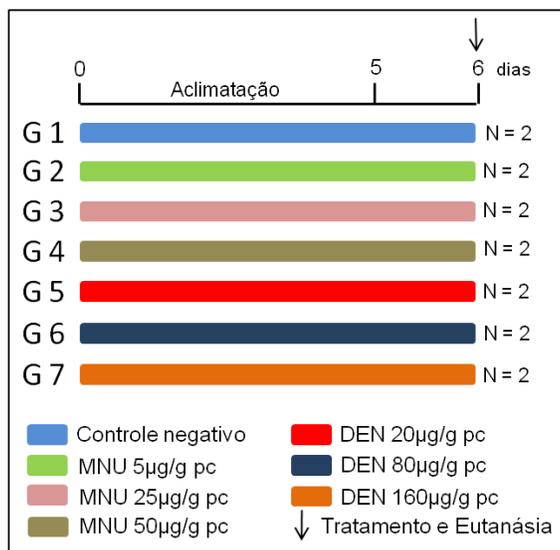


Figura 1: Protocolo experimental de distribuição dos animais.

Processamento das amostras biológicas

O teste do cometa foi desenvolvido segundo protocolo de Singh e colaboradores (2) com modificações (5, 12,14,15), sob baixa luminosidade devido à fotossensibilidade dos reagentes.

As lâminas foram mergulhadas em gel de agarose, mantido em banho-maria a 60 °C e, após remoção do excesso com papel-toalha, secas em temperatura ambiente e em posição horizontal. Amostras de sangue total (10 µl) dos animais testados foram misturados com agarose *Low Melting Point* 0.5 % (120 µl) e PBS livre de Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺. A alíquota de cada tubo foi aspirada e gotejada sobre a lâmina previamente revestida de agarose normal e recobertas por lamínula. Para adesão adequada das células à agarose, as lâminas foram mantidas à 4 °C por dez minutos. A seguir, sob temperatura de 4 °C por 24 h, a lise celular e a liberação do DNA se realizaram com detergentes e altas concentrações de sais (EDTA, NaCl, Tris, Dimetilsulfóxido e Triton X-100). Após as lâminas descansarem por 20 minutos em solução de EDTA (1 mM) e NaOH (300 mM), a eletroforese foi realizada em condições alcalinas (pH>13), com 25 V e 300 mA por 20 minutos na mesma solução. A neutralização desses álcalis foi feita com solução de tampão Tris (Invitrogen, EUA).

Controle de qualidade da eletroforese

A calibração da eletroforese foi realizada previamente com sangue periférico humano, segundo protocolo de Tice et al. (16). O controle positivo foi tratado com H₂O₂ (400 mM) por 30 minutos a 4 °C, incubadas por 30 minutos à 37 °C e logo após foram lavadas com PBS. O controle negativo não recebeu tratamento. Alíquotas de cada controle foram armazenadas em freezer -80 °C.

Foram predeterminados os intervalos de confiança de 30 cometas dos controles positivo e negativo. Em cada eletroforese do estudo experimental incluiu-se uma alíquota dos controles para garantir a qualidade da eletroforese. As amostras só foram analisadas se os resultados dessas lâminas estivessem dentro do intervalo de confiança pré-estabelecido, caso contrário, a eletroforese seria refeita.

Coloração pela prata

A coloração dos nucleoides foi realizada com sais de prata pelo método descrito por Nadin (5) e Fukumasu (12). 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 Na₂CO₃ q.sp. 1000 ml de água bidestilada), e 68 ml da solução B (0,2 g de NH₂NO₃, 0,2 g de AgNO₃, 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 (1 ml de ácido acético q.s.p. 100 ml de água bidestilada) e banho em água bidestilada por 1 minuto em temperatura ambiente.

Registro fotográfico das lâminas coradas pela prata

O processo de seleção das células coradas com nitrato de prata foi realizado pela pesquisadora principal (G.B.), às cegas, e compreendeu o rastreamento das lâminas (movimento contínuo do topo para a base da lâmina) (17), até o encontro de estruturas bem formadas e isoladas no campo, onde foram documentadas fotograficamente (50 por lâmina). As fotografias sequenciais foram adquiridas em microscópio de luz digital (COOLSCOPE II, Nikon Inc., Japão), armazenadas em arquivos tipo BMP (1280x960 pixels, 24 bits de cor), magnificação de 40x e iluminação de 100 %. O registro fotográfico dos cometas resultou em uma proporção linear de 5.94 pixels por µm.

Coloração pela fluorescência

A coloração pela fluorescência foi realizada pelo *SYBR Gold* (Invitrogen, EUA). Utilizou-se 50 µl da solução (1/10000) e as lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX61, Japão) com magnificação de 40x.

O processo de seleção das células (50 por lâmina) foi realizado pela pesquisadora principal (G.B.), às cegas, e compreendeu o rastreamento das lâminas (movimento contínuo do topo para a base da lâmina) (17), até o encontro de estruturas bem formadas e isoladas no campo. Os cometas selecionados foram submetidos ao sistema de análise de imagem *Comet Assay IV* (Perceptive Instruments, Reino Unido).

Avaliação pelo método visual

As imagens dos cometas corados pelo nitrato de prata selecionadas para a análise foram recortadas e impressas em papel A4 (Apêndice 1) e submetidas, cegamente, a três avaliadores experientes na análise do cometa, os quais mediram as imagens com a mesma régua transparente e realizaram a quantificação visual do nível de dano ao DNA das células classificando-as em cinco categorias, conforme o comprimento da cauda 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 %) (15).

A partir da classificação visual foi estabelecido o escore para cada animal, resultante da multiplicação do número de cometas de cada categoria pela sua classificação visual, variando de 0 a 400.

Processamento das imagens

As mesmas imagens dos cometas selecionados para a análise visual foram recortadas e processadas a partir dos algoritmos desenvolvidos para o software ImageJ 1.44h para análise automatizada (Apêndice 2 e 3) (18).

Os algoritmos envolvem duas técnicas de segmentação do nucleóide em relação ao fundo. O algoritmo 1 (Apêndice 2) emprega o filtro gaussiano (19) e o algoritmo 2 (Apêndice 3), após a seleção do canal “red”, emprega sequências dos operadores estatísticos “mínimo” e “mediana” para individualizar o cometa (Figura 2) (20).

Ambos os algoritmos empregam após o uso dos filtros, a ferramenta de subtração de *background*, que diminui a irregularidade do fundo da imagem (21).

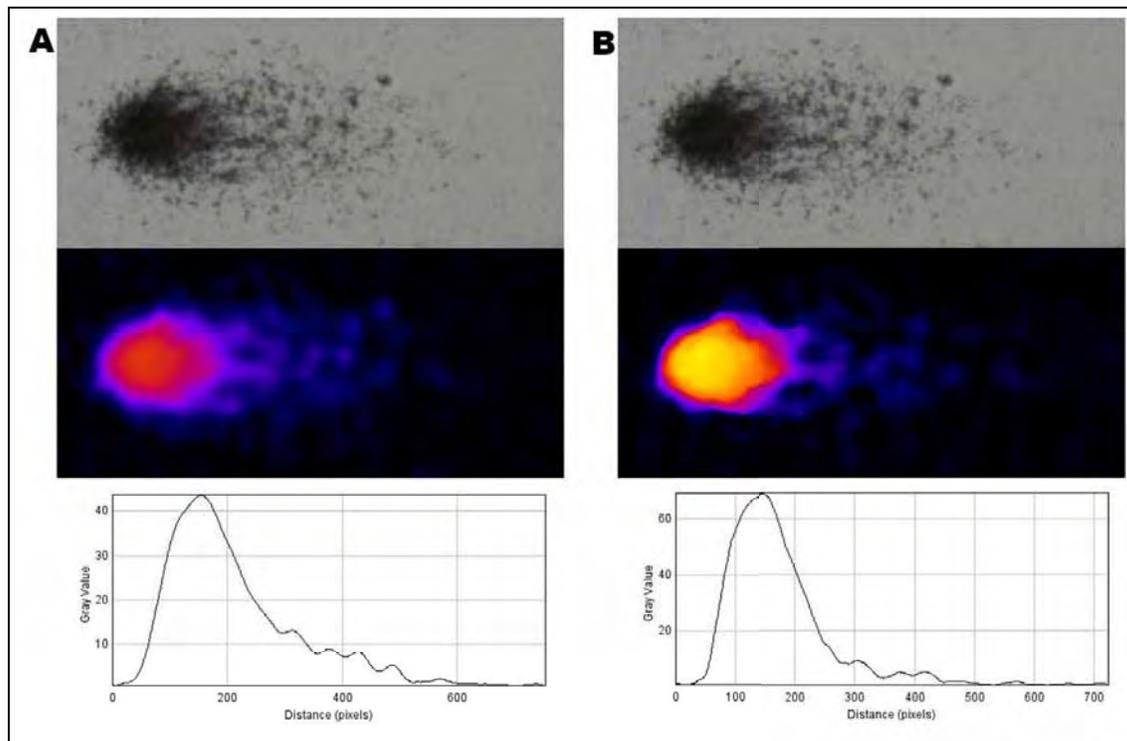


Figura 2: Cometas originais pela prata e processados pelos algoritmos 1 (A) e 2 (B) e os diagramas de *pixels* resultantes.

Validação do método de análise de imagens

Para análise digital automatizada as imagens foram processadas pelos dois algoritmos desenvolvidos (Apêndice 2 e 3).

A partir das representações espaciais dos *pixels* das imagens processadas estimaram-se diferentes parâmetros das células. 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 que foram tabulados em planilha do MSExcel 2007 (Microsoft Inc.).

Para a estimativa da reprodutibilidade das medidas, uma subamostra de 50 cometas foi analisada por dois pesquisadores diferentes (G.B. e H.A.M.) e comparados seus resultados.

Análise Estatística

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.

As medidas obtidas foram testadas quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk (22).

A precisão das medidas das variáveis de cada lâmina foi avaliada pelo coeficiente de variação percentual (CV%).

As variáveis com distribuição paramétrica de suas medidas 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 das avaliações visuais foi estimada pelo coeficiente de correlação intraclasse quanto a consistência e a concordância. A reprodutibilidade dos parâmetros estimados pelos algoritmos foi avaliada pelo coeficiente de correlação intraclasse quanto à concordância (23, 24).

Foi determinada uma amostra inicial baseada na padronização da literatura, com a análise de apenas 50 cometas por lâmina, sendo, portanto 100 cometas analisados para cada animal (25, 26).

A utilização de 14 animais é justificada pela unidade experimental deste estudo ser o número de cometas analisados e não o número de animais (Figura 1 e Tabela 1).

Foram adotados como significativos valores bicaudais de $p < 0,05$. Para a análise estatística foi empregado os softwares SPSS 19 (SPSS Inc., EUA) e os dados tabulados em MSExcel 2007 (Microsoft Inc., EUA).

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, protocolo nº 705 (Anexo 1).

Tabela 1: Amostra para cada tipo de coloração (prata e fluorescência)

Tratamento	N^a	Nº. Lâminas/Animal^b	Cometas/Lâminas	Cometas analisados
G1	2	2	50	100
G2	2	2	50	100
G3	2	2	50	100
G4	2	2	50	100
G5	2	2	50	100
G6	2	2	50	100
G7	2	2	50	100
Total^c	14	28	50	1400

^a Número de animais por grupo

^b Número de lâminas por animal para cada tipo de coloração

^c Total por coloração (prata e fluorescência)

Resultados

Foram avaliadas visualmente, manualmente e pelos sistemas de análise digital 28 lâminas de 14 animais.

Os animais do grupo 4 sofreram dano excessivo ao DNA, formando imagem em “ouriço” (Figura 3), o que impossibilitou a análise dos cometas deste grupo por quaisquer métodos. A identificação de “ouriços” deve ser um parâmetro da qualidade do experimento, pois sua alta frequência pode inviabilizar os resultados (27).

As medianas da classificação visual, escores e medidas manuais dos três avaliadores, assim como cada coeficiente de correlação intraclasse estão representadas na Figura 4 e Tabela 2. Evidenciando forte correlação entre os avaliadores, alta concordância entre as classificações visuais e adequada discriminação entre os animais submetidos às substâncias-teste e o grupo controle.

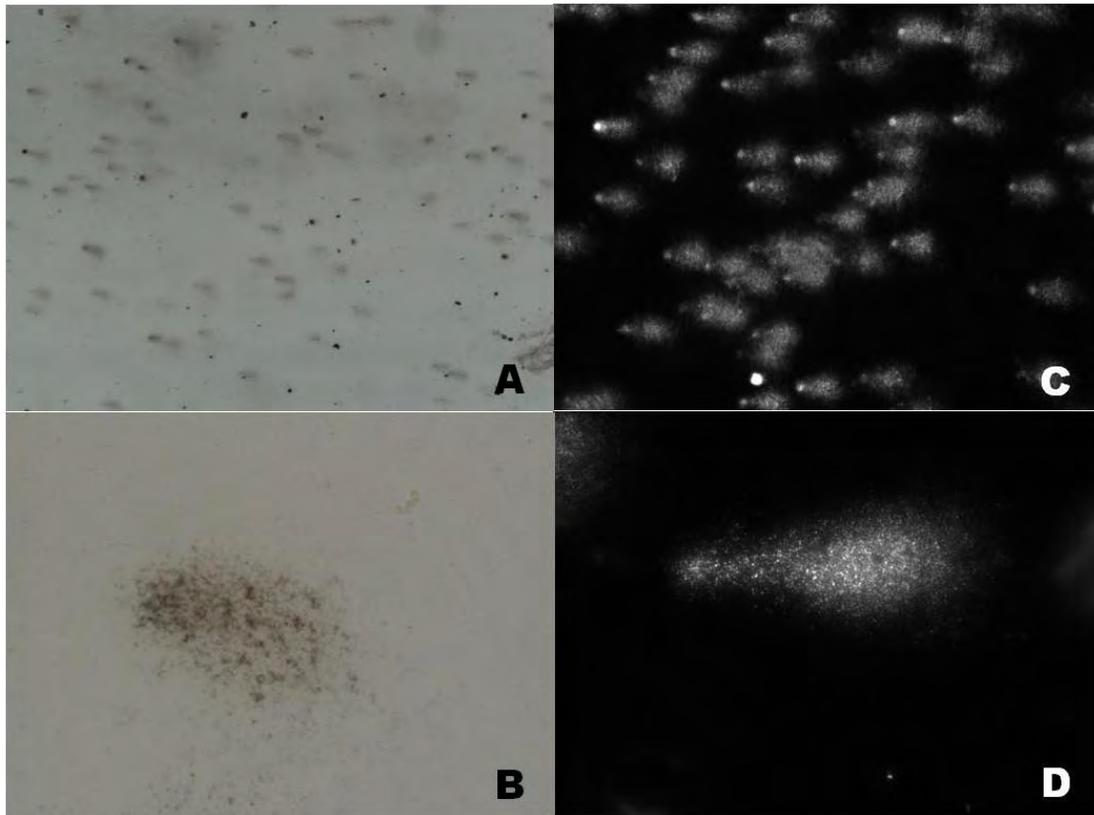


Figura 3: Animal 7, Grupo 4 - A: Cometas corados pela prata (10x); B: Nucleoide em “ouriço” corados pela prata (40x); C: Cometas corados pelo *SYBR Gold* (10x); D: Nucleoide em “ouriço” corados pelo *SYBR Gold* (40x).

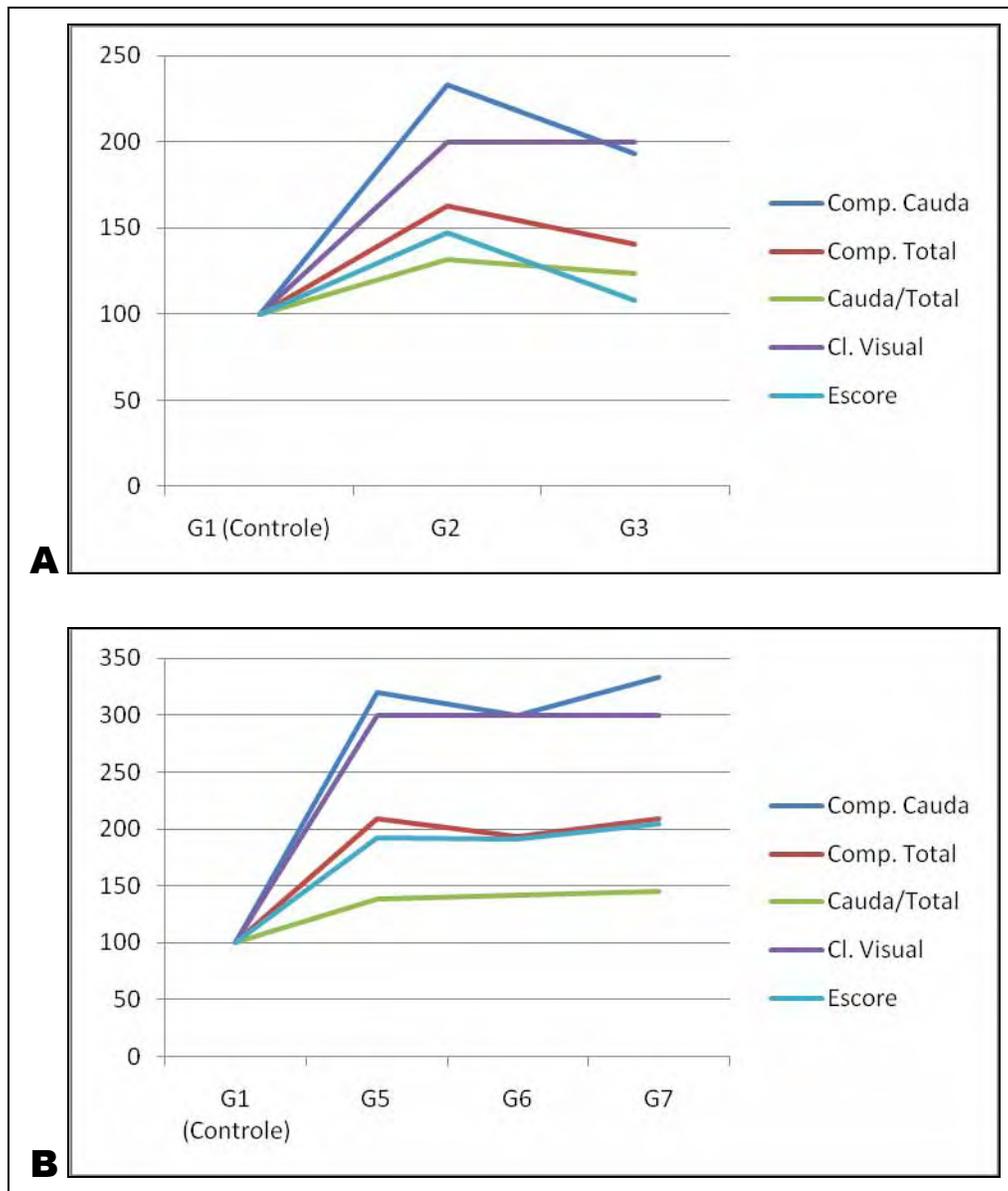


Figura 4: Diagramas de linhas das medianas dos parâmetros obtidos pelos avaliadores 1, 2 e 3 para os diferentes grupos (A. MNU e B. DEN). Os dados foram transformados em seus percentuais em relação ao grupo controle para representação conjunta em uma mesma escala.

Tabela 2: Medianas, desvios interquartilicos e coeficiente de correlação intraclassa da análise manual e classificação visual dos cometas pelos avaliadores.

	G1			G2			G3			G5			G6			G7		
	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Animal 9	Animal 10	Animal 11	Animal 12	Animal 13	Animal 14						
Avaliador 1	Comp. Cauda	43.50±18.00	8.00±5.25	38.00±12.00	31.50±14.25	31.00±9.00	26.00±12.00	50.00±19.25	39.00±9.00	34.00±11.00	57.50±19.25	46.50±16.00	55.00±29.50					
	Comp. Total	57.00±17.25	25.00±7.00	51.50±11.50	54.00±15.25	52.50±10.00	38.00±13.00	73.00±22.50	63.00±12.25	53.00±15.00	71.00±20.00	60.50±17.25	75.00±34.25					
	Cauda/Total	74.77±9.77	31.91±15.50	74.17±7.07	60.61±10.98	61.54±6.63	68.57±9.43	67.86±6.43	61.82±4.64	62.97±6.47	80.44±4.73	76.12±6.53	75.37±4.76					
	Class. visual	2.00±1.00	1.00±1.00	2.00±0.00	2.00±1.00	2.00±1.00	1.00±1.00	3.00±1.00	2.00±1.00	2.00±0.25	3.00±1.00	3.00±1.00	3.00±1.00					
Score	222	58	193	195	181	143	286	236	192	322	255	335						
Avaliador 2	Comp. Cauda	36.00±18.50	6.00±6.00	32.00±13.25	32.00±16.00	34.50±12.00	14.00±11.00	55.00±17.25	38.00±12.25	33.00±13.25	46.50±16.00	38.00±16.00	46.00±33.00					
	Comp. Total	55.00±20.00	21.00±5.25	50.00±12.50	50.00±17.25	53.00±13.25	30.00±12.25	75.50±19.25	57.50±11.00	50.00±16.00	67.00±20.00	57.00±20.00	70.00±33.25					
	Cauda/Total	65.23±16.98	26.79±16.67	64.97±10.12	65.03±10.09	64.03±7.05	46.67±18.78	72.78±4.78	66.67±6.94	66.67±7.26	69.45±6.30	66.67±9.72	68.18±10.83					
	Class. visual	3.00±1.00	1.00±1.00	3.00±1.00	3.00±1.00	3.00±1.00	1.00±1.00	4.00±1.00	3.00±0.00	3.00±1.00	3.00±1.00	3.00±1.00	3.00±1.00					
Score	236	59	247	246	265	141	345	286	254	318	257	344						
Avaliador 3	Comp. Cauda	43.00±16.00	9.00±7.25	33.00±16.25	45.00±18.00	42.00±13.25	18.00±9.25	68.00±20.25	48.50±11.25	44.00±14.00	63.00±18.25	50.00±16.50	57.00±32.25					
	Comp. Total	56.00±15.25	23.50±8.00	49.00±15.00	60.50±19.00	56.50±11.00	30.00±10.00	83.00±19.50	64.00±12.00	58.00±13.25	76.50±20.00	64.00±15.25	75.00±35.00					
	Cauda/Total	75.00±7.29	40.00±19.52	69.16±12.98	74.23±10.44	73.80±6.36	61.20±14.31	81.32±4.86	75.16±5.54	76.18±6.20	80.45±5.71	77.38±6.23	77.65±8.16					
	Class. visual	3.00±1.00	1.00±0.00	2.00±2.00	3.00±1.00	3.00±1.00	1.00±0.00	4.00±1.00	3.00±0.00	3.00±1.00±	4.00±1.00	3.00±1.00	3.00±1.00					
Score	242	78	195	253	251	108	366	292	256	345	279	341						
CCI*	Comp. Cauda ^a	0.96	0.93	0.95	0.94	0.93	0.90	0.91	0.92	0.93	0.96	0.95	0.98					
	Comp. Cauda ^b	0.91	0.89	0.92	0.87	0.80	0.73	0.76	0.78	0.80	0.86	0.87	0.96					
	Comp. Total ^a	0.96	0.95	0.96	0.94	0.94	0.92	0.92	0.95	0.95	0.97	0.95	0.99					
	Cauda/Total ^a	0.89	0.89	0.88	0.91	0.84	0.78	0.81	0.71	0.79	0.84	0.84	0.78					
Class. visual ^a	0.92	0.75	0.87	0.89	0.80	0.78	0.82	0.77	0.82	0.91	0.89	0.97						
Class. visual ^b	0.92	0.73	0.82	0.84	0.67	0.74	0.71	0.67	0.73	0.89	0.88	0.96						

* CCI: Coeficiente de correlação intraclassa; ^a CCI para consistência dos dados; ^b CCI para concordância dos dados.

Índices do CCI (concordância/correlação): <0,2 – muito fraca, 0,2 a 0,4 – fraca, 0,4 a 0,7 – moderada, 0,7 a 0,9 – forte, >0,9 – muito forte

As medidas automatizadas geradas pelos algoritmos desenvolvidos e análise pela fluorescência são apresentadas nas Tabelas 7, 8 e 9 (Apêndice 4, 5 e 6) e Figura 5. Houve clara discriminação entre os grupos, porém, incongruências entre as técnicas quanto à tendência dos índices para maiores concentrações das substâncias genotóxicas.

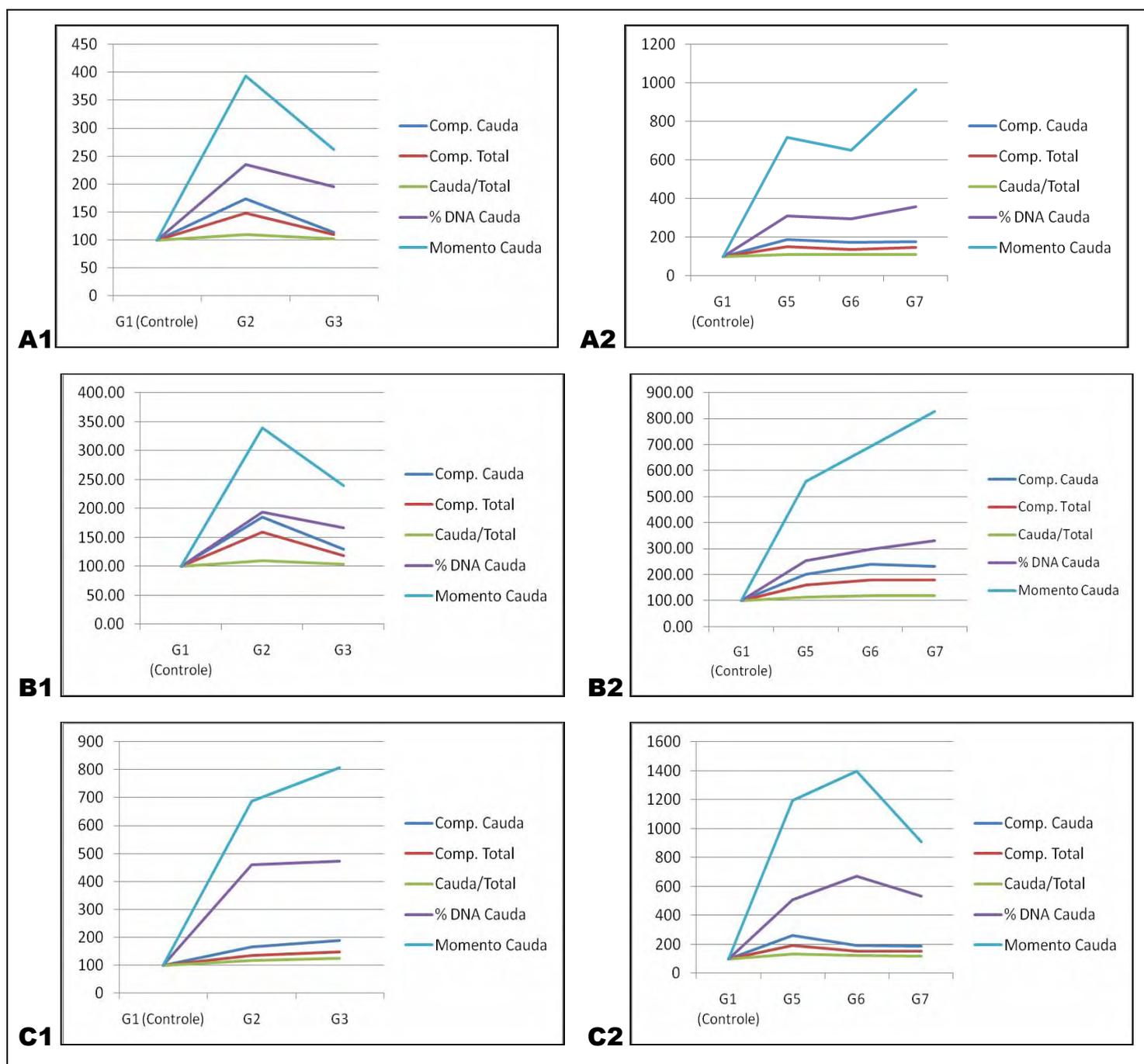


Figura 5: Diagramas de linhas das medianas dos parâmetros obtidos pelos algoritmos 1 (A1. MNU e A2. DEN) e 2 (B1. MNU e B2. DEN) e pela fluorescência (C1. MNU e C2. DEN). Os dados foram transformados em seus percentuais em relação ao grupo controle para representação conjunta em uma mesma escala.

Houve alta concordância entre os investigadores quanto aos parâmetros estimados pelos algoritmos (Tabela 10 – Apêndice 7), sugerindo melhor reprodutibilidade do algoritmo 2.

O tempo médio para a avaliação dos resultados de cada lâmina para a coloração de prata foi de 29 minutos (12 minutos para fotografia e 17 minutos para a análise) para o algoritmo 1, e de 28 minutos para o algoritmo 2 (12 minutos para fotografia e 16 minutos para a análise). Para a coloração fluorescência, o tempo médio para análise de uma lâmina foi de 18 minutos.

Os coeficientes de correlação linear entre as medidas automatizadas dos algoritmos 1 e 2 e fluorescência estão dispostos nas Tabelas 11, 12 e 13 (Apêndices 8, 9 e 10). Evidenciou-se forte correlação entre os algoritmos 1 e 2 ($r > 0,8$; $p < 0,01$), em todos os parâmetros avaliados. Não houve correlação significativa entre os algoritmos de análise da coloração pela prata e a fluorescência.

A correlação entre as medianas das medidas manuais e classificação visual dos três avaliadores e as medidas automatizadas realizadas pelos algoritmos desenvolvidos estão apresentados nas Tabelas 3, 4, 5, e 6. A análise cometa a cometa das lâminas coradas pela prata, evidenciou forte correlação entre os parâmetros. (Tabela 3 e 5 e Figura 8 e 10 – Apêndice 15 e 17). A análise individualizada de cada animal corroborou a intensa correlação entre os parâmetros para o teste do cometa corado pela prata (Tabela 4 e 6 e Figura 9 e 11 – Apêndice 16 e 18).

Tabela 3: Coeficiente de correlação linear entre análise manual e visual e algoritmo 1 (cometa a cometa)

	Comp. Cauda	Comp. Total	Cauda/Total	% DNA Cauda	Momento da Cauda
Comp. Cauda	0.80				
Comp. Total		0.82			
Cauda/Total			0.67		
Class. visual	0.78	0.77	0.72	0.73	0.79

Coeficiente de correlação de Spearman; $p < 0.00$ para todos os parâmetros

Tabela 4: Coeficiente de correlação linear entre análise manual e visual e algoritmo 1 (mediana animal)

	Comp. Cauda	Comp. Total	Cauda/Total	% DNA Cauda	Momento da Cauda
Comp. Cauda	0.71				
Comp. Total		0.80			
Cauda/Total			0.79		
Class. visual	0.61	0.65	0.73	0.73	0.69
Escore	0.76	0.80	0.87	0.89	0.86

Coeficiente de correlação de Spearman; $p < 0.01$ para todos os parâmetros

Tabela 5: Coeficiente de correlação linear entre análise manual e visual e algoritmo 2 (cometa a cometa)

	Comp. Cauda	Comp. Total	Cauda/Total	% DNA Cauda	Momento da Cauda
Comp. Cauda	0.71				
Comp. Total		0.71			
Cauda/Total			0.66		
Class. Visual	0.68	0.66	0.68	0.62	0.70

Coeficiente de correlação de Spearman; $p < 0.00$ para todos os parâmetros

Tabela 6: Coeficiente de correlação linear entre análise manual e visual e algoritmo 2 (mediana animal)

	Comp. Cauda	Comp. Total	Cauda/Total	% DNA Cauda	Momento da Cauda
Comp. Cauda	0.74				
Comp. Total		0.78			
Cauda/Total			0.78		
Class. visual	0.65	0.65	0.76	0.76	0.73
Escore	0.82	0.79	0.84	0.90	0.87

Coeficiente de correlação de Spearman; $p < 0.01$ para todos os parâmetros

A variabilidade de cada parâmetro, em cada método de avaliação, estimada para cada animal está descrito nas Tabelas 14, 15, 16, e 17 (Apêndice 11-14), sendo a relação cauda/total, o parâmetro de menor discrepância, e o momento da cauda, o de maior.

Discussão

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”.

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 (5).

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 (28, 29).

O brometo de etídio é o corante fluorescente mais 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 (30).

SYBR Gold é um corante fluorescente alternativo ao 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 (31).

A análise do teste do cometa corado pela prata geralmente é feita pela classificação visual, mas estudos demonstraram a grande influência da subjetividade do avaliador, com alta variabilidade sobre a classificação (7). O método de análise automatizada direta do teste do cometa corado pela prata ainda não foi padronizado, havendo a necessidade de validação desta técnica (11).

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 (6, 11), exigindo o desenvolvimento de filtros específicos capazes de tal segmentação.

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 (20).

No presente estudo, a análise visual dos três avaliadores obteve forte correlação, indicando reprodutibilidade da técnica de coloração, já sua concordância revelou um índice discretamente menor, principalmente, nas situações em que o dano ao DNA foi intermediário, mostrando a interferência da subjetividade e de também possíveis fatores limitantes como estresse e cansaço. Esses resultados substanciam a necessidade de que o mesmo avaliador seja o responsável pela análise cega de todo o experimento.

Em 2007, Garcia e colaboradores promoveram modificações em um protocolo de análise de imagem gratuito para possibilitar a análise de cometas corados pela prata, e evidenciaram desempenho adequado comparado a resultados de outros estudos que empregaram coloração pela fluorescência (11).

Em 2009, Brianezi e colaboradores demonstraram a possibilidade de avaliação direta do teste do cometa corado pela prata a partir de técnicas de análise de imagem, que resultou forte correlação com a classificação visual (20). Porém, não foi avaliada a correspondência dessa técnica com células tratadas por diferentes genotóxicos, em diferentes concentrações, tampouco, correlacionaram-se os parâmetros extraídos desses algoritmos e a análise automatizada pela fluorescência.

Ambas as colorações mostraram-se válidas para a análise de genotoxicidade, com equivalência nos resultados obtidos quando comparados os escores de suas classificações visuais, porém, não foram testadas suas correlações quando submetidos a diferentes concentrações e de substâncias com diferentes mecanismos de ação (5).

No presente estudo, 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, além disso, diferentes estimativas para as concentrações das substâncias-teste, reforçando a validade do método e 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 algoritmos desenvolvidos ainda consumiram tempo superior à análise pela fluorescência, o que deve ser reduzido com a implementação dos algoritmos em produtos dedicados, já que o procedimento de fotografia e de análise não ocorrem de forma simultânea.

Em estudos de validação e correlação de medidas, a unidade experimental pode ser cada cometa, cada animal ou cada grupo. Para a avaliação de tratamentos, idealmente, a unidade deve ser cada animal (27, 32). A ausência de linearidade dose-resposta encontrada nesse estudo pode ser explicada pelo baixo número de animais por grupo. Para um estudo voltado à análise da substância-teste é recomendado um número maior de animais e investigação de diversas concentrações dos tratamentos (16, 27).

Substâncias genotóxicas podem promover diferentes lesões ao DNA, por diferentes mecanismos (33). As alterações promovidas por altas concentrações de alguns genotóxicos podem gerar maior ocorrência de lesões tipo *crosslink*, promovendo redução na migração do DNA lesado e, conseqüentemente, redução de parâmetros do teste do cometa (33-35).

Desde que as fórmulas para extração dos parâmetros dos cometas sejam as mesmas para ambos os métodos, essa constatação sugere que as diferentes técnicas de coloração possam evidenciar diferentes ligações proteicas ao DNA, e essa característica individual possa ser preferencialmente reveladora de diferentes tipos de dano.

Dessa forma, apesar de válidas ambas as técnicas, a comparação de estudos em que se utilizem diferentes corantes pode não ser adequada.

Ainda, a maneira como as colorações estabelecem a interação com o DNA são diferentes entre si. A coloração pela prata se liga a proteínas do DNA por meio de

uma reação de oxirredução e possui uma relação estequiométrica de 40 vezes entre a densidade da coloração e a concentração de DNA (6), já a coloração de fluorescência é um agente intercalante do DNA, não possui uma sequência de pares de bases de preferência para a ligação e apresenta uma relação de uma molécula para quatro ou cinco pares de base do DNA (36).

Outro elemento que pode diferenciar as interações dos corantes com o DNA é a sensibilidade de detecção de lesões. A coloração pela prata é três vezes mais sensível que o brometo de etídio e permite a detecção de partículas com até 0.01 ng de proteínas ou ácidos nucléicos (6, 8).

Há poucos estudos que avaliem a sensibilidade do *SYBR Gold* na marcação do DNA. McNamee e colaboradores demonstraram alta correlação entre a coloração de *SYBR Gold* e iodeto de propídio nos parâmetros comprimento da cauda e comprimento total do cometa. Também concluíram que o *SYBR Gold* possuía um ligeiro aumento na sensibilidade comparado ao iodeto de prodídio. Essa sensibilidade foi atribuída ao *SYBR Gold* por apresentar qualitativamente mais intensidade e persistência na coloração (37).

Entretanto não foi realizada a investigação de correlações de outros parâmetros devido à saturação da intensidade da região da cabeça para a coloração de *SYBR Gold* na câmera fotográfica utilizada, além de não descreverem suas características estequiométricas (37).

Há real necessidade de se conhecer a sensibilidade de detecção e a relação entre sua densidade óptica e a massa de DNA das partículas, pois esta relação estequiométrica permite estabelecer resultados quantitativos para sistemas de análise de imagem. Colorações imunohistoquímicas não possuem esta relação, portanto resultados quantitativos podem não representar sua relação dose-resposta (38). Por outro lado, a coloração de Feulgen é empregada na marcação de DNA e possui tal característica, devendo ser investigado posteriormente como candidato a corante para o teste de cometa (38).

Houve intensa correlação entre todos os parâmetros dos avaliadores entre si, e a maior discrepância ocorreu quanto à definição do comprimento da cauda, mas não quanto ao comprimento total, evidenciando que a definição do fim da cabeça e início da cauda é um conceito que precisa ser melhor definido entre os pesquisadores.

Tal indefinição conceitual pode comprometer o desenvolvimento de algoritmos automatizados que adotam critérios métricos rigorosos na determinação do

comprimento da cabeça e início da cauda. Dificultando a comparação dos resultados entre laboratórios que utilizam diferentes *softwares* para a análise (11).

No presente estudo, foi evidente a discriminação entre os grupos de substâncias testadas pelos três métodos de análise utilizados, destacando os parâmetros comprimento da cauda e classificação visual, quando analisados visualmente. Já para os sistemas automatizados, a porcentagem de DNA na cauda e o momento da cauda foram os melhores parâmetros.

De fato, esses são os parâmetros recomendados em estudos que se utilizem o teste do cometa, não havendo unanimidade entre os pesquisadores quanto à escolha da variável de análise (3,16,27).

Não há consenso quanto ao tratamento estatístico ideal na análise dos parâmetros do cometa (27, 32), a escolha do parâmetro e o método utilizado podem gerar interpretações diferentes dos resultados quando comparados entre laboratórios. Independentemente do teste escolhido, a identificação da diferença dos grupos testados com níveis de significância estatística podem favorecer a validade externa dos resultados (27). Porém, a medida da dimensão do efeito, com seu intervalo de confiança, e a diferença identificada entre os grupos, ou as tendências em função das concentrações dos tratamentos, podem substanciar o significado dos resultados (27, 32).

Em nossos resultados, observaram-se células com valores discrepantemente altos ou baixos dos parâmetros avaliados compondo até 3,5% das amostras, sendo consideradas verdadeiras *outliers*. Este fenômeno ocorreu tanto na análise manual, como na automatizada pela prata e fluorescência (dados não mostrados).

Podemos inferir que tais núcleos sofreram artefatos de processamento, ou se encontravam em metáfase, formando caudas longas e densas, e também, algumas células que não apresentaram migração do DNA. Optou-se pela inclusão desses valores da análise e utilização da mediana por sofrer interferência menor dos valores extremos que a média, além de que o objetivo do estudo era a correlação entre os métodos de avaliação, e a persistência desses *outliers* em todos os grupos não interferiria com tais resultados.

O uso da mediana, ou do terceiro quartil para representar os grupos é incentivada por alguns autores. Por outro lado, devido à teoria central do limite, como as amostras costumam ser numerosas (50-100 cometas), o uso da média é aceitável. Nenhuma dessas medidas, entretanto, representa adequadamente

distribuições bimodais ou extremamente desviadas, justificando a observação cuidadosa de cada comportamento amostral antes da análise dos dados (27).

A grande maioria dos parâmetros de genotoxicidade usados no teste do cometa apresenta distribuição não-paramétrica. Uma opção para a normalização das variáveis é a transformação numérica dos dados (logaritmo, $1/x$, raiz quadrada, Weibull), porém, o uso de testes não paramétricos na comparação de amostras é aceito, apesar da perda de poder estatístico em amostras reduzidas e maior taxa de erros tipo I em amostras maiores (27, 32).

A comparação entre as concentrações dos tratamentos a partir das matrizes de covariância dos cometas de cada grupo foi sugerida como uma alternativa para a análise dos dados, empregando modelos lineares generalizados ou modelos hierárquicos, adequadamente ajustados por estimadores robustos que minimizem o efeito dos *outliers*. São abordagens trabalhosas, mas, com grande poder discriminatório, podendo reduzir a necessidade amostral caso as variâncias internas sejam reduzidas. Entretanto, são modelos que sofrem grande interferência da homoscedasticidade e esfericidade das amostras (27).

A literatura cita muitas formas de se avaliar o teste do cometa, nenhuma delas foi estabelecida como a melhor, e o comportamento de cada parâmetro pode representar significados diferentes para o pesquisador (33). O percentual de DNA na cauda é uma medida adimensional que favorece a comparação numérica dos resultados entre laboratórios (3, 27). Além disso, diferentes técnicas de análise sofrem limitações inerentes aos próprios processos.

Na análise pela fluorescência, é largamente empregado o *software* Comet IV[®], que nos fornece vários parâmetros de avaliação. Entretanto, em alguns cometas, há certa dificuldade de identificar o centro da cabeça do nucleíode selecionado (Figura 6), forçando sua exclusão da análise. Tal eliminação pode representar um viés de seleção da amostra.

Da mesma forma como ocorre na coloração pela prata, quando há *background* (resíduos) próximo ao nucleíode este é analisado como parte do cometa, gerando leituras anômalas (Figura 7).

De forma geral, há restrita literatura relacionada ao estudo da metodologia de análise do teste do cometa, da linearidade dose-resposta dos parâmetros, dos comportamentos do teste frente a diferentes mecanismos e mesmo do estudo do significado ambiental de detecções de mínimos danos identificados.

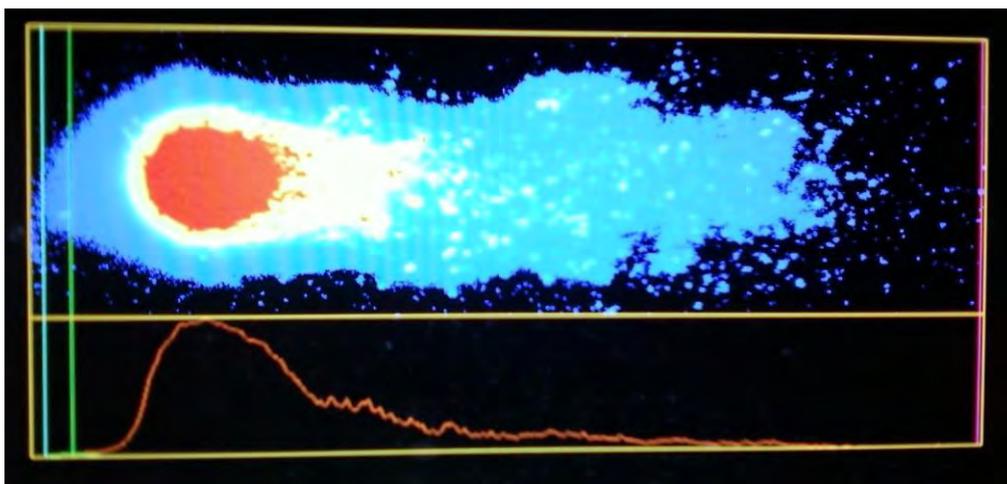


Figura 6: Fotografia da tela de saída do Software Comet IV. Dificuldade na identificação do centro da cabeça (linha verde) do nucleíode.

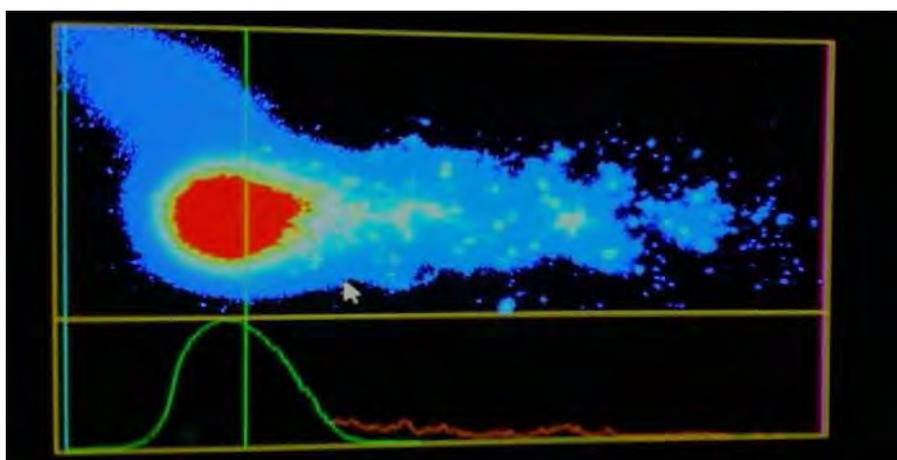


Figura 7: Inclusão de resíduos na identificação da cauda do cometa pela análise com software Comet IV.

No presente estudo encontramos algumas limitações, uma delas foi a perda de um grupo de animais devido à utilização de alta dose do genotóxico MNU que causou excesso de lesão ao DNA impossibilitando sua análise. A supressão desse grupo restringiu a investigação da tendência de detecção dos parâmetros dos cometas tratados com MNU.

O uso de sangue total do camundongo, ao invés de uma linhagem celular, como os linfócitos, foi um elemento que adicionou variabilidade à leitura dos testes. A reduzida disponibilidade de sangue por punção cardíaca (1 ml) dos animais e a necessidade de confecção de quatro lâminas por animal, desfavoreceram tal prática, levando à opção pelo sangue total.

O uso de animais maiores, ou mesmo sangue humano tratado com H_2O_2 seria uma opção para suplantar esse obstáculo, porém, como o objetivo do estudo fora a avaliação da correlação entre os métodos visual e os algoritmos desenvolvidos, não houve prejuízo na análise.

Outro aspecto limitante foi a falta da investigação da correlação entre a classificação visual da fluorescência e seus parâmetros da análise automatizada. Apesar de não estar relacionado aos objetivos do nosso estudo, esse conhecimento favoreceria a interpretação da ausência de correlação entre os sistemas automatizados corados pela prata e pela fluorescência.

Conclusões

Foram desenvolvidos dois algoritmos automatizados de análise de imagem para a avaliação quantitativa do teste do cometa corado pela prata, que se mostraram fortemente correlacionados à classificação visual.

Os avaliadores visuais do cometa corado pela prata apresentaram alta correlação e concordância de suas estimativas, ratificando a reprodutibilidade do método.

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 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.

Referências³

1. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol.* 2004 Mar;26(3):249-61.

³ Referências no formato Vancouver.

2. 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 Mar;175(1):184-91.
3. Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivao I, Giovannelli L, Kruszewski M, et al. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*. 2008 May;23(3):143-51.
4. Kawaguchi S, Nakamura T, Yamamoto A, Honda G, Sasaki YF. Is the comet assay a sensitive procedure for detecting genotoxicity? *J Nucleic Acids*. 2010;2010:541050.
5. Nadin SB, Vargas-Roig LM, Ciocca DR. A silver staining method for single-cell gel assay. *J Histochem Cytochem*. 2001 Sep;49(9):1183-6.
6. Merrill CR. Gel-staining techniques. *Methods Enzymol*. 1990;182:477-88.
7. Garcia O, Mandina T, Lamadrid AI, Diaz A, Remigio A, Gonzalez Y, 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 Nov 22;556(1-2):25-34.
8. Zhao R, Heng Z. [Improvement of the silver-stain and its test and verification in comet assay]. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2003 Mar;32(2):107-9.
9. Friauff W, Hartmann A, Suter W. Automatic analysis of slides processed in the Comet assay. *Mutagenesis*. 2001 Mar;16(2):133-7.
10. Helma C, Uhl M. A public domain image-analysis program for the single-cell gel-electrophoresis (comet) assay. *Mutat Res*. 2000 Mar 3;466(1):9-15.
11. Garcia O, Romero I, Gonzalez JE, Mandina T. Measurements of DNA damage on silver stained comets using free Internet software. *Mutat Res*. 2007 Mar 5;627(2):186-90.
12. Fukumasu H, Avanzo JL, Heidor R, Silva TC, Atroch A, Moreno FS, et al. Protective effects of guarana (*Paullinia cupana* Mart. var. *Sorbilis*) against DEN-induced DNA damage on mouse liver. *Food Chem Toxicol*. 2006 Jun;44(6):862-7.
13. Smith CC, Adkins DJ, Martin EA, O'Donovan MR. Recommendations for design of the rat comet assay. *Mutagenesis*. 2008 March;23(3);233–40.
14. Hartmann A, Herkommer K, Gluck M, Speit G. DNA-damaging effect of cyclophosphamide on human blood cells in vivo and in vitro studied with the single-cell gel test (comet assay). *Environ Mol Mutagen*. 1995;25(3):180-7.

15. Speit G, Hartmann A. The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis*. 1995 Nov;10(6):555-9.
16. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 2000;35(3):206-21.
17. McCarthy PJ, Sweetman SF, McKenna PG, McKelvey-Martin VJ. Evaluation of manual and image analysis quantification of DNA damage in the alkaline comet assay. *Mutagenesis*. 1997 Jul;12(4):209-14.
18. Collins TJ. ImageJ for microscopy. *Biotechniques*. 2007 Jul;43(1 Suppl):25-30.
19. Rank K, Unbehauen R. An adaptive recursive 2-D filter for removal of Gaussian noise in images. *IEEE Trans Image Process*. 1992;1(3):431-6.
20. Brianezi G, Miot HA. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. *J Bras Patol Med Lab*. 2009;45(4):325-34.
21. Subtract background. 2008 [updated 10/10/2010]; Available from: http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=gui:process:subtract_background.
22. Kobayashi K, Pillai KS, Sakuratani Y, Suzuki M, Jie W. Do we need to examine the quantitative data obtained from toxicity studies for both normality and homogeneity of variance? *J Environ Biol*. 2008 Jan;29(1):47-52.
23. Ludbrook J. Statistical techniques for comparing measurers and methods of measurement: a critical review. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002 Jul;29(7):527-36.
24. Vargha P. A critical discussion of intraclass correlation coefficients. *Stat Med*. 1997 Apr 15;16(7):821-3.
25. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis*. 2003 Jan;18(1):45-51.
26. Nascimento MG, de Oliveira ML, Lima AS, de Camargo JL. Effects of Diuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] on the urinary bladder of male Wistar rats. *Toxicology*. 2006 Jul 5;224(1-2):66-73.
27. Lovell DP, Omori T. Statistical issues in the use of the comet assay. *Mutagenesis*. 2008 May;23(3):171-82.

28. Integrated Risk Information System (IRIS). Environmental Criteria and Assessment Office, Office of Health and Environmental Assessment, Cincinnati, OH. U.S. EPA. 1994.
29. Faust RA. Toxicity summary for Silver. Oak Ridge: Chemical Hazard Evaluation and Communication Group, Biomedical and Environmental Information Analysis Section, Health and Safety Research Division, Oak Ridge National Laboratory; 1992.
30. A toxic death for ethidium bromide. Labnews Online Quick links. (Accessed 23/12/2010. http://www.labnews.co.uk/printer_friendly.php/1319/a-toxic-death-for-ethidium-bromide)
31. Kirsanov KI, Lesovaya EA, Yakubovskaya MG, Belitsky GA. SYBR Gold and SYBR Green II are not mutagenic in the Ames test. *Mutation Research*. 2010;699:1–4.
32. Duez P, Dehon G, Kumps A, Dubois J. Statistics of the Comet assay: a key to discriminate between genotoxic effects. *Mutagenesis*. 2003 Mar;18(2):159-66.
33. Miyamae Y, Zaizen K, Ohara K, Mine Y, Sasaki YF. Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens by the single cell electrophoresis (Comet) assay. 1. Relationship between the onset of DNA damage and the characteristics of mutagens. *Mutat Res*. 1998 Jul 31;415(3):229-35.
34. Pfuhler S, Wolf HU. Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline comet assay. *Environ Mol Mutagen*. 1996;27(3):196-201.
35. Merk O, Speit G. Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. *Environ Mol Mutagen*. 1999;33(2):167-72.
36. Vilhar B. Help! There is a comet in my computer! 2004 [cited 2010 10/10]; Available from: http://botanika.biologija.org/exp/comet/comet_guide01.pdf.
37. McNamee JP, McLean JR, Ferrarotto CL, Bellier PV. Comet assay: rapid processing of multiple samples. *Mutat Res*. 2000 Mar 3;466(1):63-9.
38. Meijer GA, Belien JA, van Diest PJ, Baak JP. Origins of ... image analysis in clinical pathology. *J Clin Pathol*. 1997 May;50(5):365-70.

PERSPECTIVAS

2. Perspectivas

A automatização de testes utilizados na pesquisa científica é uma necessidade justificada pelo volume de experimentos e a urgência da geração de resultados objetivos. É fundamental que a utilização de métodos automatizados seja fundamentada por estudos que validem sua eficiência.

O teste do cometa é usado há décadas, e a automatização de sua análise é um grande passo para incluí-lo nos testes de alta tecnologia e consolidá-lo nos protocolos de análise do risco toxicológico.

Além disso, o desenvolvimento e validação de métodos e protocolos de análise de imagem inéditos são passíveis de patente e do desenvolvimento de produtos específicos, promovendo inovação tecnológica para o País.

A coloração do ensaio do cometa pela prata, em relação às técnicas de fluorescência, apresenta vantagens inerentes à segurança e custo operacional, porém, seu emprego ainda não é tão difundido entre os laboratórios de investigação toxicológica.

Estudos que fundamentem a técnica, validem seus índices, avaliem sua reprodutibilidade interlaboratorial e comparem suas particularidades com outras colorações e ensaios toxicológicos podem substanciar a difusão do ensaio do cometa para pesquisadores com limitações orçamentárias ou tecnológicas.

Ademais, a alta sensibilidade do ensaio do cometa corado pela prata e a agilidade provida pela automatização favorecem seu emprego na estimativa do risco toxicológico, investigação de mecanismos e construção de modelos de genotoxicidade. Esses elementos substanciam a investigação simultânea de diversas concentrações das substâncias-teste, em diversos regimes de tratamento e em diferentes tecidos-alvo para melhor avaliação do risco ao sistema biológico.

Em contrapartida, o conhecimento das particularidades do teste, os mecanismos de ação das substâncias e de reparo incentivam a busca de novos protocolos para o ensaio, e o aprimoramento das colorações, visando relações mais equânimes entre a densidade óptica e o dano ao DNA.

A coloração de Feulgen é uma alternativa aos sais de prata para a marcação do DNA. Também apresenta baixo custo, é permanente, de rápida execução, tem alta afinidade ao DNA, possui menor depósito de resíduos no fundo da lâmina e

apresenta leitura óptica estequiométrica validada em tecidos, carecendo de estudos para o ensaio do cometa.

Marcações imunohistoquímicas de componentes nucleares também podem promover a investigação de danos específicos, porém, são mais trabalhosas e carecem de relação estequiométrica com a leitura óptica.

Por outro lado, no momento da captura da imagem, a focagem do microscópio óptico no centro do cometa, por apresentar breve profundidade de campo ($<5\mu\text{m}$) na magnificação de 40x, não permite a avaliação da totalidade do material genético corado. Dessa forma a investigação da relação de consumo da cabeça e crescimento da cauda pode, por esse fenômeno óptico, não ser proporcional (Figuras 12 a 14 – Apêndice 19).

Outra possibilidade para o comportamento não-linear da proporção cabeça/cauda em função das classes de cometa é a saturação do corante ou da leitura óptica na cabeça, devido à alta concentração e a conformação do DNA condensado.

O estudo da repercussão desses fenômenos nos parâmetros do cometa, nas diversas colorações, pode contribuir no seu conhecimento e interpretação, além da composição de modelos que descrevam seu comportamento.

A investigação sobre o desempenho dos resultados de sistemas de análise de imagem de diferentes laboratórios e colorações poderia ser adicionalmente comparada com validações cruzadas, empregando as mesmas concentrações de substâncias sabidamente genotóxicas para determinado tecido. Esses resultados permitiriam a avaliação da repetitividade, reprodutibilidade, validade interna e externa dos diferentes sistemas de avaliação dos parâmetros do teste do cometa.

Enfim, a difusão do ensaio do cometa impõe um conhecimento fundamentado sobre suas particularidades para a melhor indicação do uso, planejamento de experimentos, interpretação de seus resultados e retorno à sociedade.

APÊNDICES

Apêndices

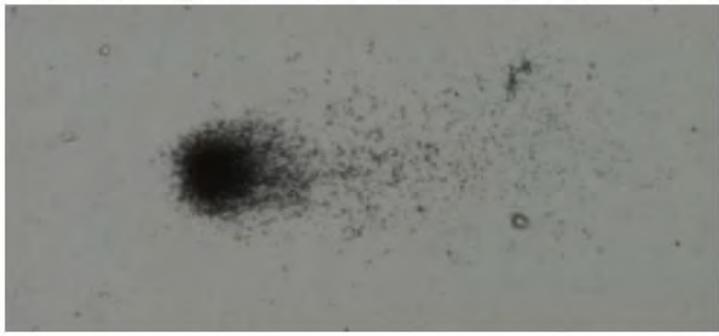
2.1. Apêndice 1 – Arquivo impresso para análise visual e métrica manual

Exemplo de arquivo impresso para análise visual dos três avaliadores. Foram realizadas impressões para todas as fotos selecionadas para análise.

600-64
Classificação visual (0-4): ____ | Comprimento da cauda: ____ (mm) | Comprimento Total: ____ (mm)



600-65
Classificação visual (0-4): ____ | Comprimento da cauda: ____ (mm) | Comprimento Total: ____ (mm)



600-66
Classificação visual (0-4): ____ | Comprimento da cauda: ____ (mm) | Comprimento Total: ____ (mm)



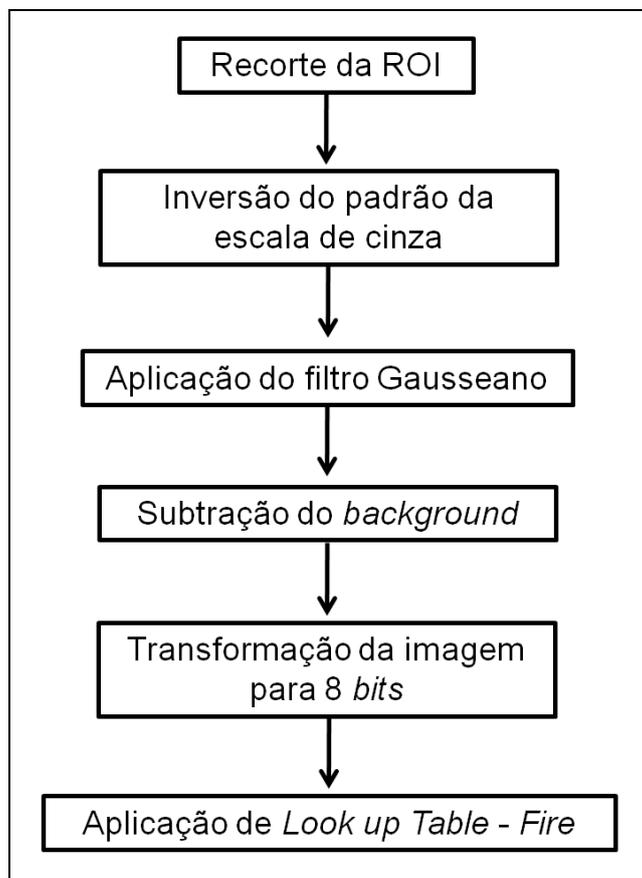
2.2. Apêndice 2 – Algoritmo 1

Algoritmo 1 desenvolvido para processamento e extração da informação das imagens dos nucleoides corados pela prata

2.2.1. Algoritmo 1

```
macro "Seleciona ROI [1]" {  
makeRectangle(122, 26, 1003, 481);  
}  
  
macro "Recorta ROI [2]" {  
run("Crop");  
}  
  
macro "Filtro Gausseano [3]" {  
run("Invert");  
run("Gaussian Blur...", "sigma=10");  
run("Subtract Background...", "rolling=250");  
run("8-bit");  
run("Fire");  
run("Profile Plot Options...", "width=450 height=200 minimum=0 maximum=0 do auto-close list interpolate draw");  
run("Select All");  
run("Plot Profile");  
}  
  
macro "Fecha ROI [4]" {  
run("Close");  
}  
  
macro "Abre prox imagem [5]" {  
run("Open Next");  
}
```

2.2.2. Fluxograma do algoritmo 1



2.3. Apêndice 3 – Algoritmo 2

2.3.1. Algoritmo 2

Algoritmo 2 desenvolvido para processamento e extração da informação das imagens dos nucleoides corados pela prata.

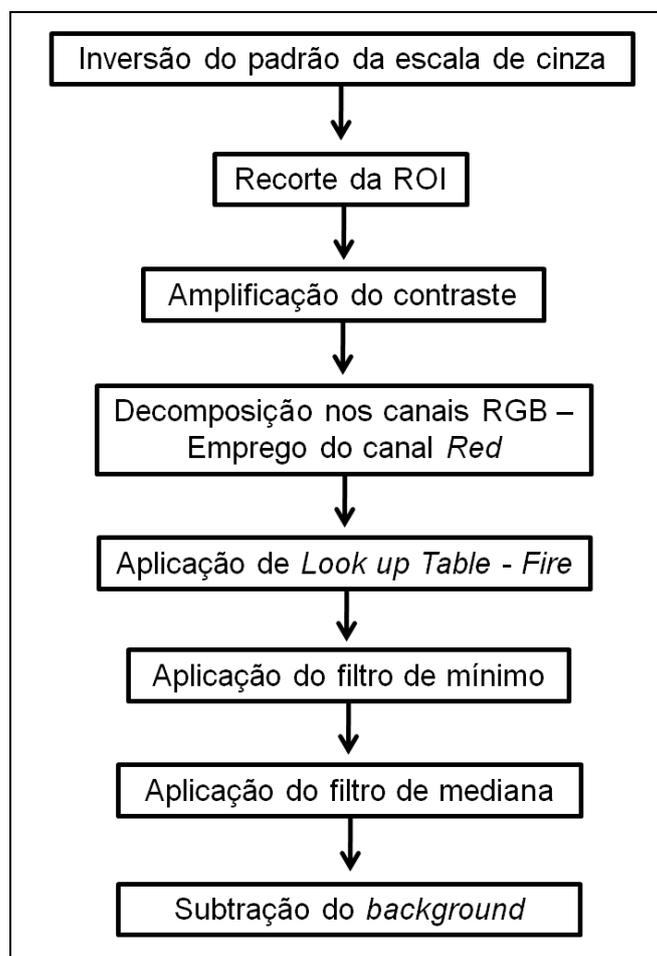
```
macro "Seleciona ROI [1]" {
makeRectangle(122, 26, 1003, 481);
}

macro "Recorta ROI [2]" {
run("Crop");
}

macro "Análise da distribuição do DNA [3]" {
run("Invert");
run("Enhance Contrast", "saturated=0.5");
run("RGB Split");
close();
close();
run("8-bit");
run("Fire");
run("Select All");
run("Minimum...", "radius=3");
run("Median...", "radius=20");
run("Subtract Background...", "rolling=100");
run("Profile Plot Options...", "width=450 height=200 minimum=0 maximum=0 do auto-close list interpolate draw");
run("Select All");
run("Plot Profile");
}

macro "Fecha ROI [4]" {
run("Close");
}
```

2.3.2. Fluxograma do algoritmo 2



2.4. Apêndice 4 – Mediana algoritmo 1

Tabela 7: Mediana e desvio interquartilico dos parâmetros avaliados pelo algoritmo 1.

		Comp. Cauda	Comp. Total	Cauda/Total	% DNA Cauda	Momento da Cauda
G1a	Animal 1	425.50±196.75	528.50±210.75	78.70±9.08	21.65±19.51	33.61±47.20
	Animal 2	281.00±125.50	403.50±134.75	70.16±10.61	4.30±12.77	3.79±13.31
	Total	322.50±185.25	437.50±193.75	74.25±11.66	11.41±21.30	13.97±33.25
G2 b	Animal 3	537.00±221.75	657.00±261.00	80.38±5.80	25.26±19.58	51.87±62.95
	Animal 4	594.50±214.75	715.00±217.75	81.58±5.74	28.15±17.03	71.05±72.82
	Total	561.50±206.25	689.50±217.25	80.98±5.93	26.85±18.56	54.87±71.47
G3b	Animal 5	500.00±173.50	633.00±183.75	79.54±5.89	29.11±18.12	67.95±70.23
	Animal 6	254.00±98.75	367.00±115.50	69.63±9.53	14.35±16.06	17.98±28.51
	Total	368.00±257.50	487.50±277.00	76.08±11.59	22.32±18.28	36.63±58.20
G5c	Animal 9	671.00±225.50	788.00±241.50	85.22±3.59	34.17±22.17	98.34±112.62
	Animal 10	532.50±167.00	665.50±180.75	81.07±5.42	36.93±18.13	101.00±78.14
	Total	609.00±241.75	731.00±254.75	83.39±5.69	35.28±20.63	100.17±96.16
G6c	Animal 11	463.00±181.50	571.00±187.00	80.40±7.09	23.37±16.20	38.34±55.41
	Animal 12	714.50±272.25	834.50±317.75	85.77±4.67	48.03±24.27	176.08±179.52
	Total	554.50±310.75	665.50±313.50	82.55±6.87	33.79±27.35	90.79±148.38
G7c	Animal 13	535.50±191.75	650.00±192.75	82.89±4.76	28.48±20.61	62.28±90.41
	Animal 14	624.00±354.50	788.00±344.50	82.76±8.01	51.42±15.54	207.66±121.47
	Total	570.50±224.75	700.00±218.50	82.83±7.13	41.08±24.26	134.91±149.12

^a Grupo controle; ^b Grupo MNU, ^c Grupo DEN

2.5. Apêndice 5 – Mediana algoritmo 2

Tabela 8: Mediana e desvio interquartilico dos parâmetros avaliados pelo algoritmo 2.

		Comp. Cauda	Comp. Total	Cauda/Total	% DNA Cauda	Momento da Cauda
G1a	Animal 1	313.00±303.00	411.50±329.50	76.79±17.10	14.92±14.61	16.55±28.64
	Animal 2	130.00±263.25	285.00±157.63	54.45±70.96	1.72±10.58	1.15±8.04
	Total	226.00±289.25	334.50±269.88	69.33±25.41	9.14±18.39	7.06±20.66
G2 b	Animal 3	231.00±289.00	332.50±303.50	70.89±16.86	16.07±20.23	19.34±32.49
	Animal 4	514.50±225.75	654.50±198.00	78.61±7.84	19.43±23.52	28.66±50.94
	Total	416.50±365.50	559.00±379.75	75.77±12.23	17.72±21.63	23.95±42.26
G3b	Animal 5	464.50±194.50	593.00±174.25	77.86±8.74	19.42±17.25	31.37±45.67
	Animal 6	191.00±76.25	293.50±90.50	66.50±9.13	12.25±15.29	11.82±16.77
	Total	291.50±276.00	403.50±300.75	71.72±12.86	15.22±16.76	16.86±26.56
G5c	Animal 9	504.00±450.25	594.00±454.25	83.37±12.15	23.17±19.18	36.90±50.45
	Animal 10	426.50±215.50	553.50±247.00	78.27±10.06	23.31±17.90	44.13±55.94
	Total	454.50±320.50	574.50±369.00	79.28±11.40	23.22±18.37	39.51±54.14
G6c	Animal 11	326.50±290.50	443.50±295.75	72.77±15.83	17.16±16.54	19.55±27.64
	Animal 12	740.00±310.75	863.00±330.50	86.95±3.34	37.58±20.59	94.37±108.90
	Total	541.00±476.75	646.00±472.25	82.43±16.67	27.10±24.65	48.89±81.87
G7c	Animal 13	532.00±345.50	634.50±332.75	82.87±11.75	20.66±16.99	35.49±46.10
	Animal 14	519.50±424.00	659.00±432.75	81.85±8.89	39.38±19.64	107.45±124.92
	Total	526.50±336.75	651.00±326.00	82.57±9.76	30.26±21.69	58.39±97.68

^a Grupo controle; ^b Grupo MNU, ^c Grupo DEN

2.6. Apêndice 6 – Mediana fluorescência

Tabela 9: Mediana e desvio interquartilico dos parâmetros avaliados pela fluorescência.

		Comp. Cauda	Comp. Total	Cauda/Total	% DNA Cauda	Momento da Cauda
G1 ^a	Animal 1	68.56±58.05	117.09±66.11	58.79±14.07	10.52±17.61	2.28±3.61
	Animal 2	65.03±34.38	123.96±41.75	53.28±11.99	10.52±20.01	2.21±4.26
	Total	65.62±39.88	120.43±52.06	56.61±14.05	10.52±19.08	2.28±3.89
G2 ^b	Animal 3	112.37±30.16	160.50±35.66	68.30±6.23	51.44±31.14	18.29±14.98
	Animal 4	108.44±26.23	162.47±26.23	65.04±6.56	44.63±25.56	14.82±11.73
	Total	109.42±29.86	162.27±29.76	66.42±8.17	48.32±30.36	15.65±13.66
G3 ^b	Animal 5	106.09±31.73	165.41±32.02	64.12±8.53	37.31±24.56	11.42±10.49
	Animal 6	150.88±45.09	204.12±48.52	73.59±6.77	65.49±25.03	31.91±22.42
	Total	124.55±52.06	178.77±51.96	70.05±10.67	49.70±33.19	18.43±21.33
G5 ^c	Animal 9	176.61±58.45	233.98±56.58	74.69±7.01	60.59±19.39	33.83±16.13
	Animal 10	171.31±53.73	225.53±49.70	74.92±7.50	41.71±33.77	20.05±19.61
	Total	172.68±53.83	229.85±52.55	74.72±7.33	53.25±30.55	27.18±22.52
G6 ^c	Animal 11	109.23±31.14	165.81±35.75	65.05±9.19	62.71±24.62	22.94±16.22
	Animal 12	148.52±42.43	203.33±45.18	73.50±6.30	76.65±13.38	44.48±16.75
	Total	126.91±53.93	184.27±51.47	70.17±10.05	70.66±24.62	31.79±26.09
G7 ^c	Animal 13	135.75±25.93	186.24±26.91	71.68±5.91	61.05±23.34	25.25±17.81
	Animal 14	112.37±31.73	184.86±38.60	59.95±9.70	52.20±18.73	18.89±7.76
	Total	122.98±32.71	185.85±31.53	67.19±12.04	56.11±21.33	20.65±13.86

^a Grupo controle; ^b Grupo MNU, ^c Grupo DEN

2.7. Apêndice 7 – Correlação entre avaliadores para algoritmo 1 e 2

Tabela 10: Coeficiente de correlação intraclassa para as medidas dos algoritmos 1 e 2 para 2 avaliadores

	Algoritmo 1	Algoritmo 2
Como. Cauda	0.79	0.88
Comp. Total	0.81	0.89
Cauda/Total	0.75	0.85
% DNA Cauda	0.95	0.99
Momento da Cauda	0.90	0.97

2.8. Apêndice 8 – Correlação algoritmo 1 e 2

Tabela 11: Coeficiente de correlação linear entre algoritmo 1 e algoritmo 2.

	Comp. Cauda	Comp. Total	Cauda/Total	% DNA Cauda	Momento da Cauda
Comp. Cauda	0.87	--	--	--	--
Comp. Total	--	0.78	--	--	--
Cauda/Total	--	--	0.94*	--	--
% DNA Cauda	--	--	--	0.98	--
Momento da Cauda	--	--	--	--	0.96*

Coeficiente de correlação de Pearson, exceto * coeficiente de correlação de Spearman;
 $p < 0.01$ para todos os parâmetros

2.9. Apêndice 9 – Correlação algoritmo 1 e fluorescência

Tabela 12: Coeficiente de correlação linear entre algoritmo 1 e fluorescência.

	Comp. Cauda	Comp. Total	Cauda/Total	% DNA Cauda	Momento da Cauda
Comp. Cauda	0.44	--	--	--	--
Comp. Total	--	0,47	--	--	--
Cauda/Total	--	--	0.43*	--	--
% DNA Cauda	--	--	--	0.51	--
Momento da Cauda	--	--	--	--	0.47

Coeficiente de correlação de Pearson, exceto * coeficiente de correlação de Spearman;
 $p \geq 0.09$ para todos os parâmetros

2.10. Apêndice 10 – Correlação algoritmo 2 e fluorescência

Tabela 13: Coeficiente de correlação linear entre algoritmo 2 e fluorescência

	Comp. Cauda	Comp. Total	Cauda/Total	% DNA Cauda	Momento da Cauda
Comp. Cauda	0.45	--	--	--	--
Comp. Total	--	0.44	--	--	--
Cauda/Total	--	--	0.49	--	--
% DNA Cauda	--	--	--	0.56	--
Momento da Cauda	--	--	--	--	0.49*

Coeficiente de correlação de Pearson, exceto * coeficiente de correlação de Spearman;
 $\rho \geq 0.06$ para todos os parâmetros

2.11. Apêndice 11 – CV% avaliação visual e métrica manual

Tabela 14: CV% dos avaliadores

	Comp. Cauda			Comp. Total			Cauda/Total			Class. visual		
	Av1	Av2	Av3	Av1	Av2	Av3	Av1	Av2	Av3	Av1	Av2	Av3
G1^a												
Animal 1	35.32	44.79	30.91	26.09	30.34	23.49	15.49	24.98	12.42	38.72	41.08	35.81
Animal 2	58.24	67.65	61.83	22.58	26.29	28.74	37.43	40.35	35.57	85.52	107.99	53.38
G2^b												
Animal 3	26.14	34.68	34.33	20.33	24.01	23.65	9.31	18.26	17.37	37.74	31.23	42.11
Animal 4	33.45	34.50	29.57	22.34	24.59	22.37	15.26	19.49	11.98	40.83	30.80	35.73
G3^b												
Animal 5	23.41	25.23	21.89	16.40	18.37	16.26	9.58	11.60	8.38	32.09	19.62	25.64
Animal 6	29.94	51.60	42.17	21.94	29.17	27.60	9.88	27.25	19.61	40.07	46.30	36.47
G5^c												
Animal 9	27.27	27.05	20.37	21.95	22.14	16.44	8.71	8.52	5.47	29.41	19.49	15.64
Animal 10	16.96	25.32	17.98	13.77	18.23	14.60	6.05	11.78	5.45	24.48	17.23	18.00
G6^c												
Animal 11	24.62	31.35	21.71	19.48	23.94	17.06	9.79	14.73	8.52	35.25	26.50	25.64
Animal 12	22.17	26.35	23.34	18.59	20.58	19.76	5.53	9.67	5.93	23.60	20.18	20.75
G7^c												
Animal 13	27.75	39.44	25.19	21.50	28.32	19.46	11.20	22.34	10.02	30.21	34.65	30.69
Animal 14	25.89	33.13	28.80	22.88	24.04	23.23	5.32	10.61	6.65	17.69	14.50	15.08

^a Grupo controle; ^b Grupo MNU, ^c Grupo DEN

2.12. Apêndice 12 – CV% algoritmo 1

Tabela 15: CV% do algoritmo 1.

		Comp. Cauda	Comp. Total	Cauda/Total	% DNA Cauda	Momento da Cauda
G1 ^a	Animal 1	38.01	30.84	14.32	62.80	91.41
	Animal 2	42.32	23.84	33.03	114.53	123.94
G2 ^b	Animal 3	30.53	26.39	7.32	53.97	79.52
	Animal 4	24.74	20.28	6.30	46.42	73.36
G3 ^b	Animal 5	24.75	20.34	6.66	43.99	66.50
	Animal 6	33.80	25.75	9.46	68.97	88.46
G5 ^c	Animal 9	25.58	22.78	4.53	43.77	71.59
	Animal 10	24.94	21.46	4.83	37.75	60.95
G6 ^c	Animal 11	27.26	23.01	6.81	52.42	84.64
	Animal 12	25.13	22.28	4.75	30.77	56.19
G7 ^c	Animal 13	27.75	23.90	7.13	48.15	84.66
	Animal 14	26.63	21.87	5.60	20.72	40.93

^a Grupo controle; ^b Grupo MNU, ^c Grupo DEN

2.13. Apêndice 13 – CV% algoritmo 2

Tabela 16: CV% do algoritmo 2.

		Comp. Cauda	Comp. Total	Cauda/Total	% DNA Cauda	Momento da Cauda
G1 ^a	Animal 1	60.61	48.50	22.75	70.59	104.54
	Animal 2	101.58	39.46	85.54	133.66	141.00
G2 ^b	Animal 3	67.41	52.95	20.15	69.62	118.94
	Animal 4	29.78	24.08	7.93	70.86	109.46
G3 ^b	Animal 5	33.33	25.64	14.30	61.36	88.68
	Animal 6	35.35	24.46	17.31	76.09	84.88
G5 ^c	Animal 9	48.26	41.88	9.67	59.96	85.37
	Animal 10	42.48	34.03	17.33	57.32	92.60
G6 ^c	Animal 11	57.84	41.84	26.96	65.06	107.56
	Animal 12	28.97	26.03	6.87	39.84	72.20
G7 ^c	Animal 13	45.72	39.39	11.04	58.67	107.79
	Animal 14	34.26	28.72	6.33	34.69	73.57

^a Grupo controle; ^b Grupo MNU, ^c Grupo DEN

2.14. Apêndice 14 – CV% fluorescência

Tabela 17: CV% da fluorescência

		Comp. Cauda	Comp. Total	Cauda/Total	% DNA Cauda	Momento da Cauda
G1 ^a	Animal 1	44.32	30.67	16.20	89.57	121.26
	Animal 2	34.10	22.55	14.88	96.99	112.86
G2 ^b	Animal 3	20.44	14.78	8.25	43.07	54.54
	Animal 4	18.44	11.89	9.45	40.62	50.32
G3 ^b	Animal 5	24.18	16.12	10.48	44.52	54.77
	Animal 6	20.77	15.91	7.56	30.26	48.73
G5 ^c	Animal 9	21.07	16.37	6.16	25.16	40.38
	Animal 10	25.83	19.70	11.52	53.77	64.48
G6 ^c	Animal 11	24.67	17.12	10.48	32.36	46.98
	Animal 12	23.99	17.17	8.91	23.57	37.80
G7 ^c	Animal 13	16.10	11.34	8.51	29.89	47.10
	Animal 14	22.00	15.17	11.49	27.91	38.80

^a Grupo controle; ^b Grupo MNU, ^c Grupo DEN

2.15. Apêndice 15 - Matriz de dispersão algoritmo 1 (cometa a cometa)

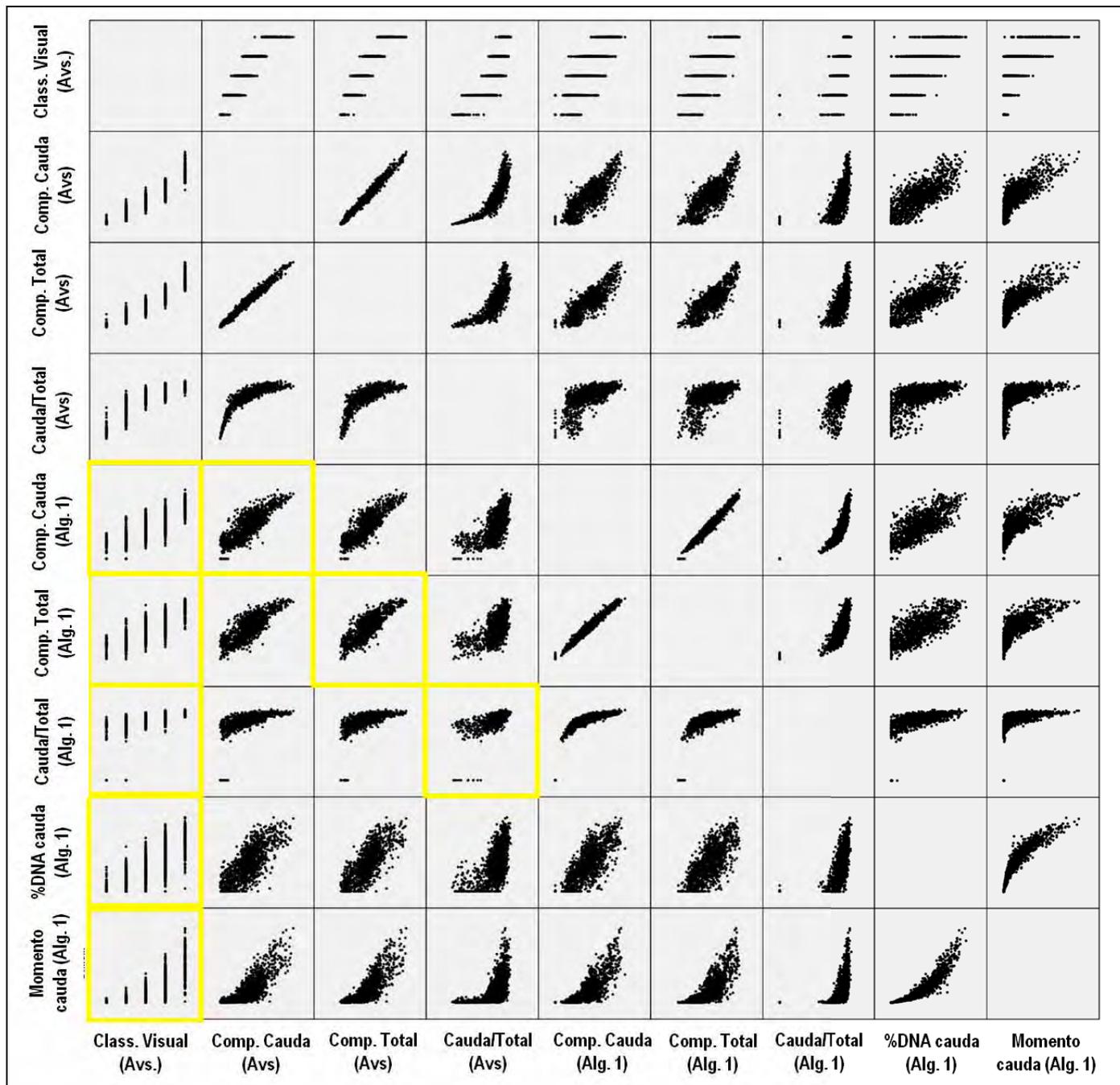


Figura 8: Matriz de dispersão dos parâmetros da avaliação visual e métrica e algoritmo 1 (cometa a cometa). Em destaque as correlações apresentadas na Tabela 3.

2.16. Apêndice 16 - Matriz de dispersão algoritmo 1 (mediana animal)

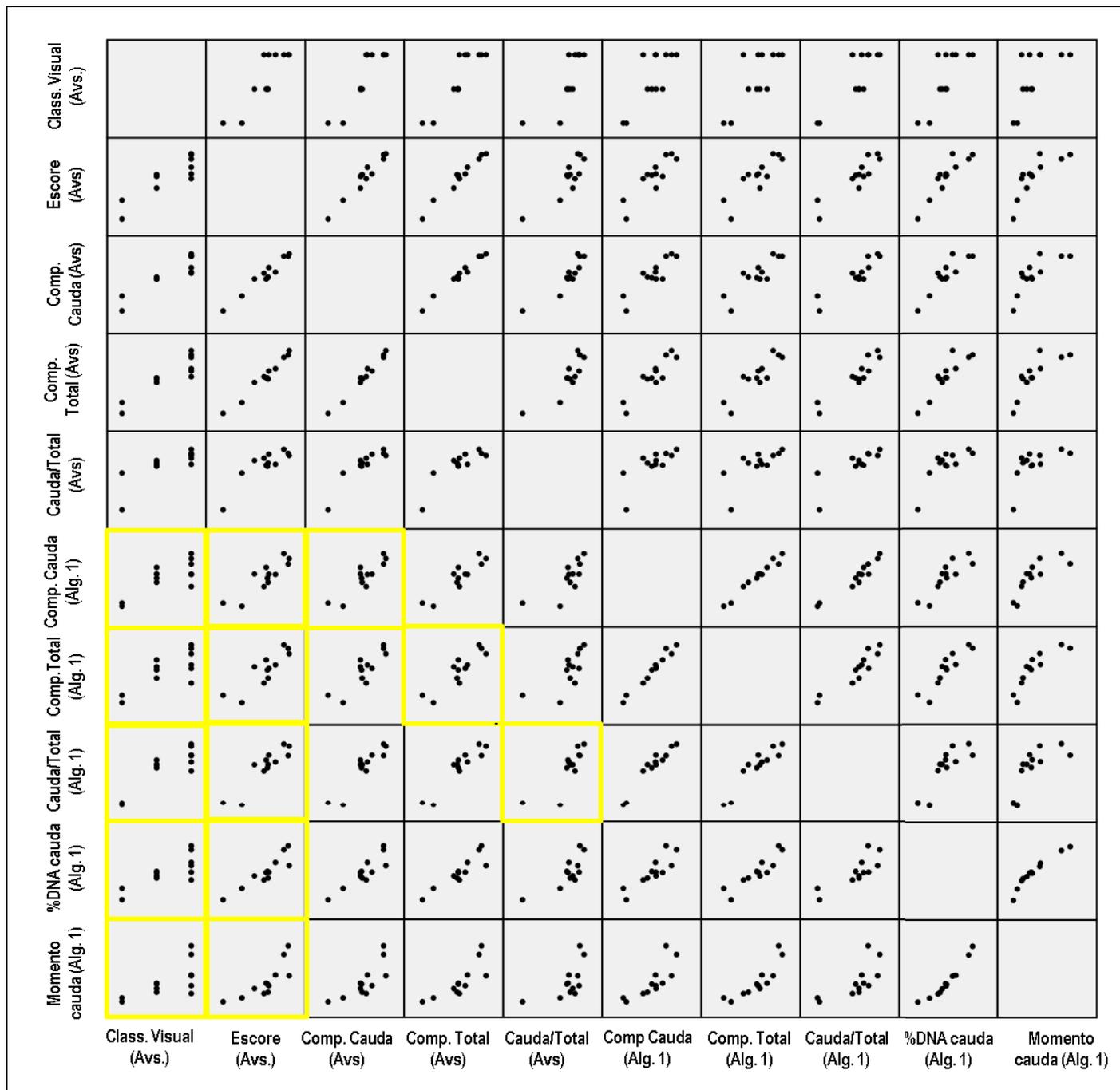


Figura 9: Matriz de dispersão dos parâmetros da avaliação visual e métrica e algoritmo 1 (mediana animal). Em destaque as correlações apresentadas na Tabela 4.

2.17. Apêndice 17 – Matriz de dispersão algoritmo 2 (cometa a cometa)

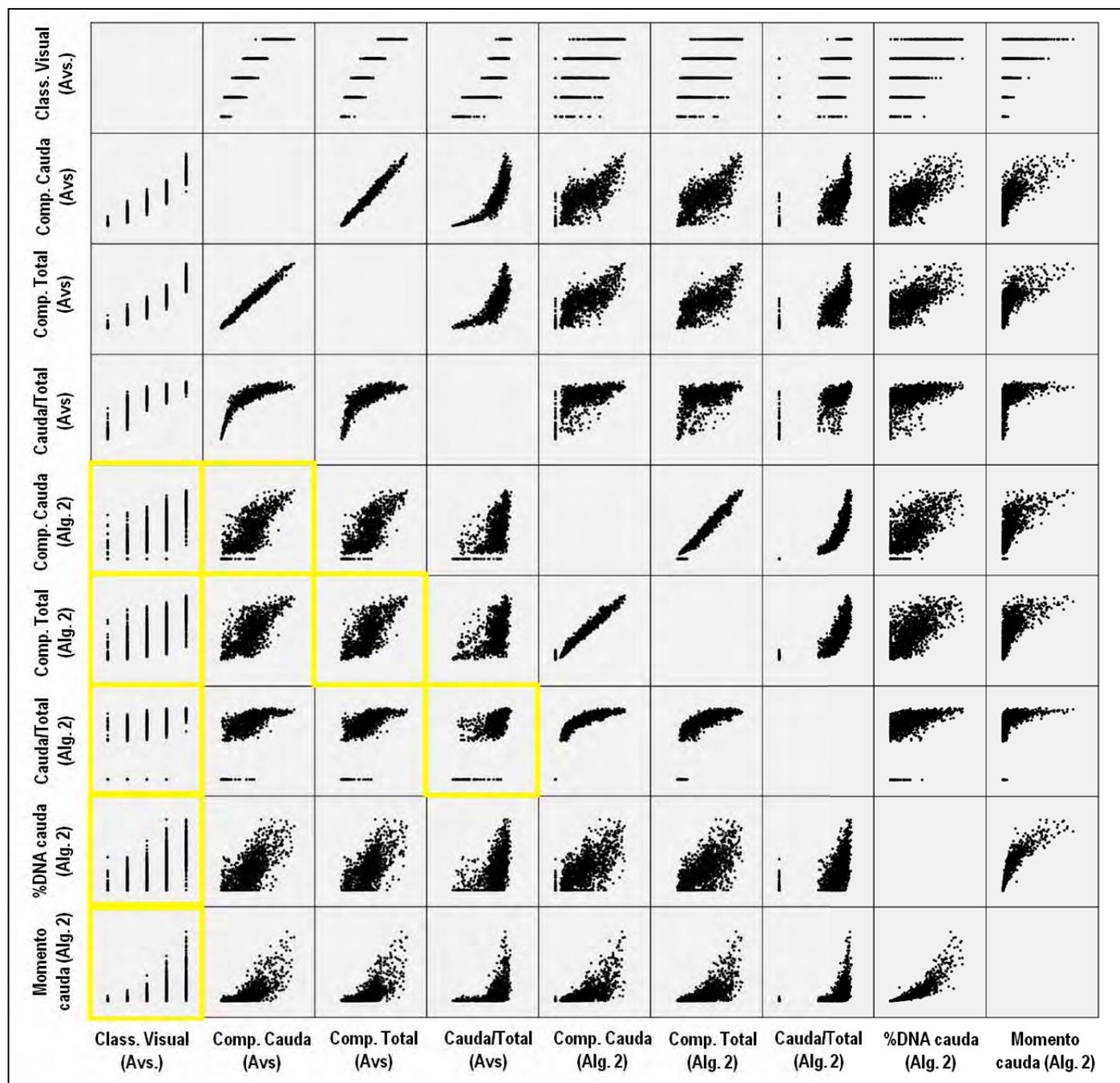


Figura 10: Matriz de dispersão dos parâmetros da avaliação visual e métrica e algoritmo 2 (cometa a cometa). Em destaque as correlações apresentadas na Tabela 5.

2.18. Apêndice 18 – Matriz de dispersão algoritmo 2 (mediana animal)

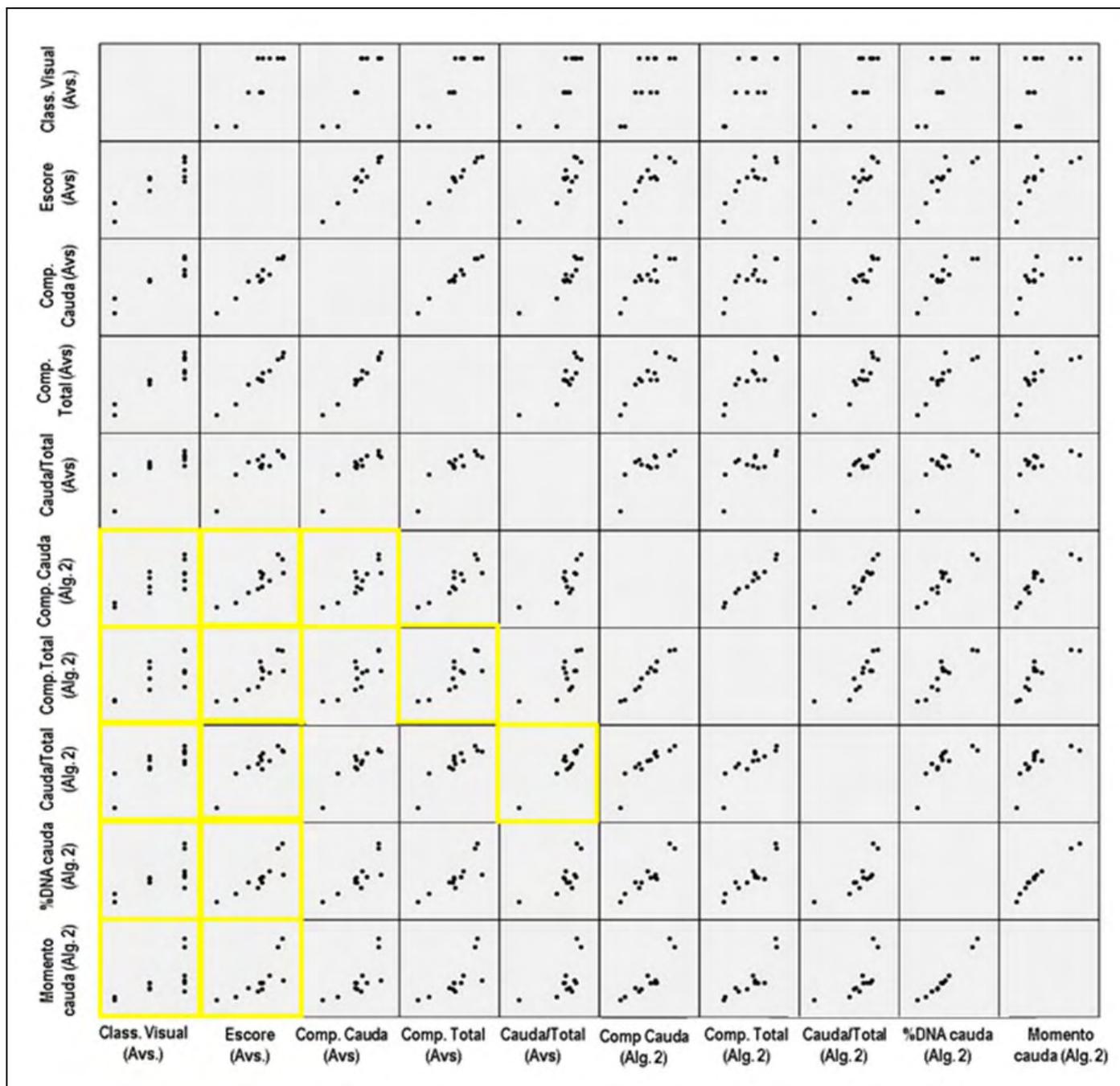


Figura 11: Matriz de dispersão dos parâmetros as avaliação visual e métrica e algoritmo 2 (mediana animal). Em destaque correlações apresentadas na Tabela 6.

2.19. Apêndice 19 – Intensidades da cabeça e da cauda de cometas de classes diferentes.

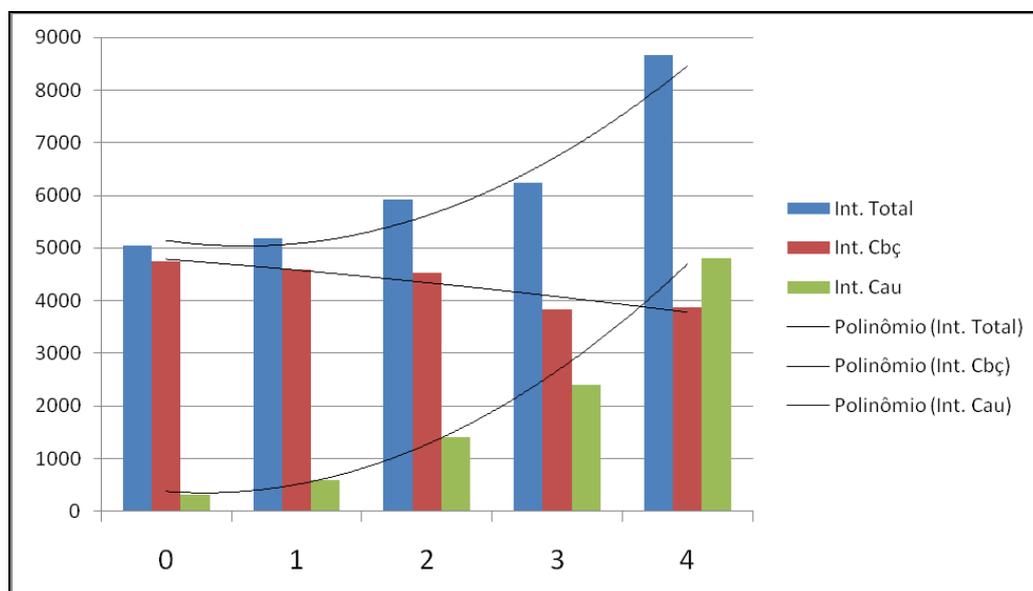


Figura 12: Gráfico representativo dos valores médios das intensidades dos pixels da cabeça, cauda e total de 20 cometas de cada classe, analisados pelo algoritmo 1. Evidencia-se incongruência (aumento) na quantidade total de DNA avaliado nas diferentes classes, assim como o aumento do DNA na cauda das classes mais elevadas não ocorre na mesma proporção de decréscimo do DNA da cabeça.

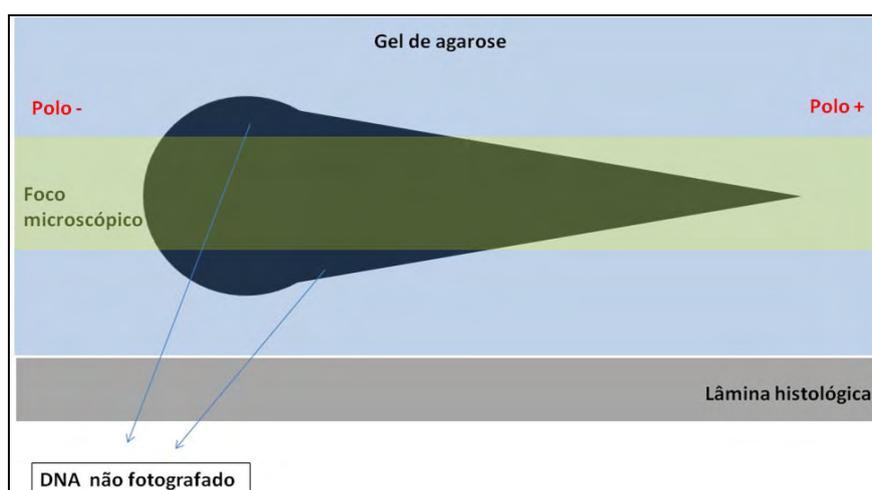


Figura 13. Representação esquemática da vista lateral de uma célula submetida ao teste do cometa. Evidencia-se que o material genético não é contido totalmente no foco microscópico, gerando uma imagem incompleta.



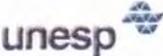
Figura 14: Representação fotográfica de um cometa corado pela prata em 3 profundidades de campo diferentes. Evidencia-se a perda da cauda nas profundidades extremas.

ANEXO

3. Anexo

3.1. Anexo 1 – Comitê de Ética

Aprovação no Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99



Comissão de Ética em Experimentação Animal



CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º **705** sobre o Projeto de Pesquisa “Desenvolvimento de um método de análise digital para o teste do cometa corado pela prata”, a ser conduzido por Gabrielli Brianezi, orientada pelo Prof. Dr. Hélio Amante Miot, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva que os “camundongos balb/c machos” são provenientes de Biotério convencional, sem condições de certificar a sanidade dos mesmos.

Projeto de Pesquisa Aprovado em 12 de fevereiro de 2.009



Prof. Dr.ª Regina Helena G. Martins
Presidente da CEEA



Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA