

SMART COMET: UMA ABORDAGEM AUTOMATIZADA PARA DETECÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE DANO CELULAR DISPONDO DO ENSAIO COMETA

Kenad W.A. Silva, Breno C. da Silva, Carlos G.N. de Carvalho

LABRA - Laboratório de Redes e Automação

UESPI - Universidade Estadual do Piauí

{kenadwanderson,brenocaetano,cgionc}@gmail.com

Fabício P. de M. do Amaral

LABMINBIO - Laboratório de Biologia Molecular e de Estudo de Injúrias Biológicas

UESPI - Universidade Estadual do Piauí

fabricao34amaral@gmail.com

Resumo – A detecção e classificação de danos nas imagens do ensaio cometa é um importante indicativo de alguns problemas de saúde, como por exemplo o câncer. No entanto, normalmente, a detecção e classificação de danos por meio deste tipo de ensaio são realizadas manualmente, decorrendo em erros e lentidão. Embora existam algumas abordagens automatizadas para esse problema, tais abordagens detectam as células e classificam seus danos com níveis de eficiência não tão satisfatório. Neste artigo, é proposto o SMART COMET, uma solução de detecção baseada em filtros morfológicos, detecção de borda e classificação usando um sistema especialista. Experimentos mostram resultados mais eficientes que outras abordagens presentes na literatura em imagens com borda de objetiva nos protocolos do ensaio cometa de nitrato de prata e GelRed. Adicionalmente, dispo de imagens sem borda da objetiva utilizando os protocolos de nitrato de prata e GelRed, o SMART COMET mostrou-se, também mais eficiente que outras abordagens propostas na literatura.

Palavras-chave – Automação, Visão Computacional, Sistema Especialista, Ensaio Cometa

Abstract – The detection and classification of damage to the comet assay images is an important indication of some health problems, such as cancer. However, typically, the detection and classification of damages by this type of assay are carried out manually but depends on errors and delays. Although there are some automated approaches to this problem, such approaches detect cells and classify their damage with not so satisfactory efficiency levels. In this article, we propose the SMART COMET, a detection solution based on morphological filters, edge detection and classification using an expert system. Experiments show more efficient results than other approaches in the literature images with objective edge in the comet assay protocols of silver nitrate and GelRed. Additionally, providing images without the lens edge using silver nitrate protocols and GelRed, SMART COMET proved also more efficient than other approaches proposed in the literature.

Keywords – Automation, Computer Vision, Expert System, Comet Assay.

1. INTRODUÇÃO

O entendimento dos processos moleculares que geram doenças crônicas, invariavelmente, abordam fatores ambientais. De fato, a exposição do ser vivo a agentes tóxicos pode interferir na harmônia e estabilidade do DNA [1]. Neste quesito, destacam-se os cânceres oriundos da exposição a carcinógenos [2]. A capacidade de detectar, precocemente, tais mecanismos aumenta as chances de se reverter a patogênese e, quando não, melhorar a qualidade de vida dos indivíduos envolvidos [3].

Um ensaio, em especial, é aceito como um método de detecção precoce das mudanças moleculares supracitadas - o teste do cometa, também conhecido como *Single-cell gel electrophoresis (SCGE)* [4]. Desenvolvido por Singh [5], é uma importante ferramenta utilizada nos estudos de biomonitoramento populacional [6] [3], ecotoxicológicos [7] [8], de conduta clínica [9], estudos pré-clínicos [10], dentre outros. É um ensaio muito sensível para a detecção de vários tipos de danos no DNA (quebra de fitas dupla ou simples, danos oxidativos, ligações cruzadas e sítios álcali-lábeis) induzidos por compostos genotóxicos e mutagênicos [11].

O procedimento é de fácil compreensão. De forma objetiva, células são incorporadas à um gel de agarose e lisadas. Este procedimento é seguido de tratamento eletroforético. Durante esta etapa há a migração do material oriundo da quebra do DNA para o ânodo, revelando a estrutura que nomeia o teste [5] [11] (*Figura 1*). Os cometas podem ser identificados e mensurados pelo método visual (classificação visual) (*Figura 1*) ou por *softwares* que analisam as imagens de forma automática [12] [13] [14]. Nessas análises, quanto maior o distanciamento da cauda em relação a cabeça, maior é o dano identificado [15].

O processamento através de *softwares*, aumenta a rapidez do teste e diminui as variáveis intrínsecas do observador. Além disso, proporcionam uma gama de dados não obtidos através do escore visual, como o percentual de DNA na cabeça e cauda [16].

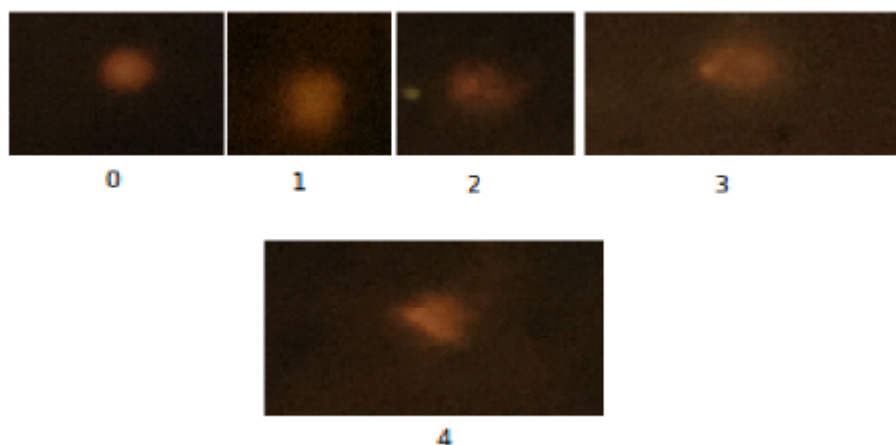


Figura 1: Exemplos de cometas encontrados após o processamento de lise, eletroforese e coloração com GelRed. Os números abaixo de cada imagem são os utilizados durante a classificação visual segundo Collins [12].

Neste contexto, o desenvolvimento de *softwares* capazes de avaliar automaticamente o ensaio do cometa deve ser estimulado, visto que os benefícios oriundos da introdução deste teste na rotina médica trariam benefícios [11].

Desde o início da definição dos primeiros protocolos do ensaio cometa, almejava-se um método eficiente para avaliação automática das imagens produzidas. Recentemente foram desenvolvidos *softwares* que apontam cada vez mais para uma solução ótima, como por exemplo, os sistemas desenvolvidos por Frieauff et al. [17], que buscavam uma forma de medir o momento da cauda. Kumaravel et al. [16], propõem sumarizar e analisar os parâmetros críticos necessários para uma avaliação razoável do ensaio cometa. Existe ainda a solução inovadora proposta por Gyori et al [14], chamada OpenComet, que utiliza um perfil de iluminação para estimar diversas características, entre elas o dano. Além disso, existe o *software* desenvolvido por Sreelatha et al [18], que definiu uma metodologia para avaliar o dano nas imagens geradas a partir do protocolo de nitrato de prata.

Essas técnicas empregadas fazem uso de funções básicas, oriundas da área de *Visão Computacional*, como correção de brilho e contraste, processos de eliminação de ruídos e realce de pontos relevantes [14] [18]. A maior parte dessas técnicas são empregadas em sistemas de grande aceitação na literatura, como por exemplo o CaspLab [13] e o OpenComet [14]. Contudo, o processo ainda é muito custoso, necessitando de uma grande quantidade de lâminas para se obter identificação de células e classificação de dano satisfatórias [19]. Na *Tabela 1* apresenta-se uma descrição sumária comparativa das características presentes em sistemas tradicionais para essa finalidade (CaspLab [13] e OpenComet [14]) com relação ao SMART COMET. Usando como parâmetros, os protocolos do ensaio cometa que podem ser utilizados, se as imagens podem ser ou não com sombra da objetiva, o tipo de ferramenta que utiliza para detecção e o tipo de ferramentas que utiliza para classificação.

Sistema	Tipos de protocolos aceitos	Imagens com sombra da objetiva	Ferramentas de detecção de cometas	Ferramentas de classificação
CaspLab	Protocolos semelhantes ao Nitrato de Prata e Imunofluorescência (em escala de cinza)	Sim	O operador detecta manualmente	Classificação inteligente baseada em perfil de iluminação
OpenComet	Protocolos semelhantes ao Nitrato de Prata e Imunofluorescência (em escala de cinza)	Sim	Correção de fundo, limiar adaptável segundo a imagem, filtros morfológicos, perfil de iluminação	Classificação inteligente baseada em perfil de iluminação
SMART COMET	Protocolos semelhantes ao Nitrato de Prata e Imunofluorescência	Sim	Filtros morfológicos, limiar auxiliado por histograma, detecção de contornos e filtro de tamanhos	Sistema especialista baseado em área

Tabela 1: Quadro comparativo entre CaspLab, OpenComet e SmartComet.

Diante disso, este trabalho propõe uma abordagem dispondo de técnicas de *Visão Computacional* (filtros morfológicos e detecção de contornos) para a etapa de identificação de células nas imagens obtidas por meio do ensaio cometa e de um *Sistema Especialista* modelado com base na classificação de Collins [19] [20] para a etapa de classificação.

2. SMART COMET

Nesta seção é abordada uma visão geral do ensaio cometa, uma técnica muito utilizada para classificação de danos em células. Além disso, é descrito um pouco sobre visão computacional para a identificação das células, bem como os sistemas especialistas que são utilizados para classificar os danos, de acordo com a abordagem proposta neste artigo.

2.1 Ensaio Cometa

As células humanas estão sendo constantemente expostas a todos os tipos de fatores prejudiciais e nocivos, que podem danificar o DNA. Este dano pode ser de causas externas ("Exógena"), raios solares e poeiras químicas por exemplo, ou de causas internas ("Endógena"), que fazem parte do processo natural de renovação celular [18].

Segundo a Agência Internacional para Pesquisas no Câncer (*International Agency for Research in Cancer - IARC*) a exposição exógena, principalmente relacionada a poluição, foi classificada como a principal causa para a carcinogênese [21]. Sendo de extrema importância para a mensuração e classificação deste tipo de dano, para não só definir as causas de câncer, mas também para o seu diagnóstico clínico. Um método comum para quantificar o dano celular é através do ensaio cometa, devido ser extremamente sensível, de baixo custo e rico em quantidades de dados resultantes.

O ensaio cometa consiste em expor nucleotídeos (núcleo celular), envolvidos em uma camada dupla de gel agarose de pontos de fusão diferentes, a um campo elétrico que irá quebrar o DNA e formar uma "cauda do cometa" compostas pelas partes de DNA que escaparam do núcleo [20]. Após uma coragem adequada, pode-se usar diversas técnicas para a classificação de dano celular [19].

Apesar de existirem diversos métodos para analisar os resultados do ensaio cometa, apenas dois são mais comumente usados: inspeção visual e análise digital de imagens [16] [22]. Apesar da inspeção visual apresentar-se viável e ser muito usada, ela requer critérios subjetivos do profissional que está analisando as imagens [13] [14], além de ser extremamente dispendiosa temporalmente. A solução alternativa para este tipo de problema está no processamento digital de imagens [22]. Como vantagem associada, tem-se a possibilidade de análise de um grande número de imagens, em um curto período de tempo [14] [17] [23], padronizando os resultados e reduzindo drasticamente o tempo.

2.2 Visão Computacional

Como parte essencial para a identificação automatizada de cometas e suas características, há a necessidade de uso da *Visão computacional*. Esta visa reconhecer diversas características em imagens, sendo capaz de extrai-las e possibilitando uma classificação adequada ao dano celular [14] [17] [23].

A *Visão Computacional* procura combinar imagens ou modificações diretas em imagens, com base em cenários anteriormente adquiridos [24]. Essas modificações diretas em imagens, são chamadas de técnicas de *Visão Computacional* de baixo nível ou processamento digital de imagens, que modificam os pixels (menores parte de uma imagem) de alguma forma, alterando suas características [24]. Essas técnicas podem ser divididas em três etapas básicas: aquisição, pré-processamento (redução de ruídos) e segmentação (total ou parcial) [25] [24].

Apesar das técnicas de processamento de imagens serem distintas entre si, quase sempre segue-se uma metodologia comum [26]. Inicialmente parte-se de uma imagem em um sistema de arquivo, aplica-se uma correção de fundo, como filtros morfológicos ou equalização de brilho e contraste, e por último, algum método matemático ou não, de extração de características, como a transformada de Hough, detecção de contornos ou mesmo uma binarização simples [26] [27].

Contudo, um sistema de *Visão Computacional* será um mecanismo antecessor a um sistema de classificação. Dentre as opções, pode-se apontar como uma melhor alternativa, o uso de um sistema especialista. O mesmo possui uma grande taxa de confiabilidade em aplicações cujas regras de decisão possam ser representadas pelas regras do tipo **Se Fato Então Consequência** [28] [29].

2.3 Sistema Especialista

Para a classificação do nível de dano celular foi implementado um sistema especialista baseado nas regras propostas por Collins [19]. Um sistema especialista é um programa especializado em uma área específica do conhecimento [29] [28] [30]. Tais sistemas ficaram conhecidos por sua capacidade de implementação fácil e rápida de uma base de conhecimento restrita, permitindo uma maior clareza na sua representação, na regra de decisão ou nos dados que apoiam esta decisão [28] [30].

Segundo Whitby (2004) [31], um sistema pode apresentar padrões de baixo raciocínio se possuir um conhecimento de alta confiança. É exatamente nesta classificação que o SMART COMET se enquadra. Por ser baseado nas regras propostas por Collins [19], o sistema especialista utilizado é bastante simples de implementar, mas possui alta confiabilidade nos resultados.

A base de regras do tipo **Se Fato Então Consequência** foram implementadas baseadas em Collins [19]. O sistema especialista tem como dados de entrada os valores da área do cometa e área do núcleo (saída do módulo de visão computacional), e como saída a classificação do dano celular em cada cometa identificado.

3. METODOLOGIA

Neste trabalho utilizou-se dois protocolos diferentes do ensaio cometa. O primeiro baseado na coloração de Nitrato de Prata, utilizando imagens disponíveis nos arquivos digitais do *Laboratório de Biologia Molecular e de Estudo de Injúrias Biológicas da Universidade Estadual do Piauí*. O segundo baseado no protocolo de coloração de GelRed.

Posteriormente, foram utilizadas ferramentas de visão computacional, inicialmente como pré-processamento das imagens com o intuito de eliminar ruídos e destacar características importantes das mesmas, para ao final serem utilizados algoritmos de detecção de contorno para a obtenção das áreas da cauda e cabeça do cometa. Por fim, um sistema especialista baseado nas regras de Collins foi implementado com a função de classificar o dano celular. Cada etapa supracitada é detalhada nas próximas subseções.

3.1 Preparação das Imagens

O teste do cometa segue basicamente a metodologia descrita por Singh [5], com alterações para a coloração GelRed. As lâminas são previamente cobertas por solução de agarose de ponto de fusão normal a 1,5%, sendo mantidas em temperatura ambiente até a sua solidificação. Coleta-se 40 μ L de amostra (ex. sangue total, fígado, hipocampo entre outros.) misturando-a com 120 μ L de agarose de baixo ponto de fusão a 1% para formar a suspensão de células.

Em seguida, a suspensão de células é aplicada rapidamente sobre a primeira camada de agarose, sendo a lâmina, então, coberta com a lamínula (24x60mm) e mantida em baixa temperatura por 5min até solidificar a agarose. Depois, a lamínula é retirada e a lâmina mergulhada em solução de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO; pH 10) a 4°C e protegida da luz por um tempo mínimo de 2 horas. Ao serem removidas da solução de lise, serão colocadas na posição horizontal na cuba de eletroforese e submetidas à corrida de eletroforese. Esta deve estar em um "banho de gelo", para manter a temperatura da eletroforese constante em torno dos 4°C.

A cuba será, então, preenchida com a solução de eletroforese (1mM EDTA, 300mM NaOH; pH>13) recém-preparada. Estas ficam em repouso por 20min para permitir o desenrolamento do DNA, o afrouxamento de suas ligações e a exposição dos sítios alcali-lábeis. A eletroforese é conduzida a 25V e 300mA por 20min. Todos esses passos são realizados na presença de baixa luminosidade. Após a eletroforese, as lâminas são retiradas da cuba e mergulhadas na solução de neutralização (0,4M tris; pH 7,5) por 5min. As lâminas são lavadas em água destilada e, após secas, são coradas em 4 μ L de GelRed numa concentração de 2:10.000 μ L. Então são levadas ao microscópio NIKON modelo LABOPHOT 2, quando são fotografadas por um sistema OPTON, composto por uma câmera digital CCD 5.0 mega pixel para imunofluorescência. Todas as imagens capturadas, juntamente com as imagens disponíveis nos arquivos digitais do *Laboratório de Biologia Molecular e de Estudo de Injúrias Biológicas da Universidade Estadual do Piauí*, formaram a base de testes utilizada pelo sistema de reconhecimento e classificação.

3.2 Sistema de Reconhecimento e Classificação

Após ter executado o ensaio cometa corretamente, imagens similares às apresentadas na *Figura 2* foram obtidas. As imagens superiores representam lâminas preparadas pelo método de nitrato de prata e as imagens inferiores, lâminas obtidas pelo método utilizando GelRed. Para o processo de identificação é necessário desenvolver um sistema capaz de identificar e reconhecer características importantes dos cometas e quantificar parâmetros desejados [14] [17] [23] [32]. Para este fim, utilizou-se a *framework OpenCV de Visão Computacional* devido sua praticidade, precisão e ao grande número de algoritmos implementados [27] [26].

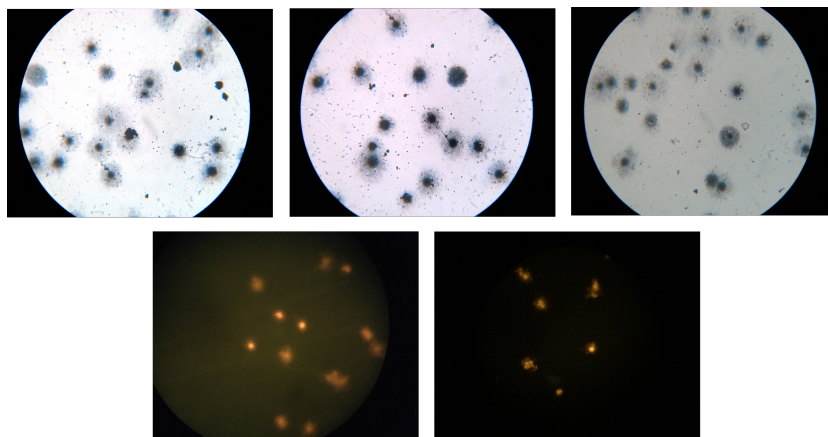


Figura 2: Algumas das imagens utilizadas neste trabalho.

Antes de prosseguir para as etapas de Visão Computacional de baixo nível (*Figura 3*), foi necessário definir características desejáveis nas imagens, ou seja, os pontos de interesses [27] [26]. Segundo Collins [19] é possível definir o dano celular como uma razão entre o diâmetro da "cauda" e da "cabeça" [20] [19]. Uma forma de fazer isso é através do padrão de iluminação

ou perfil de iluminação, aplicado diretamente [14] ou indiretamente, que é o caso deste trabalho. Este perfil de iluminação pode ser usado para determinar o conjunto *cauda-cabeça* como um todo, separando-o do fundo da imagem, e após esta etapa, pode-se utilizá-lo novamente para determinar apenas a *cabeça*. Sendo assim, há dois objetivos a serem alcançados:

1. Medir o conjunto *cauda-cabeça*, extraíndo o seu diâmetro;
2. Extrair o diâmetro da *cabeça do cometa* do conjunto total;

Após definido as características desejáveis e a aquisição de imagens por meio do teste do cometa, procedeu-se o pré-processamento, que foi executado de forma a eliminar ruídos [27], devido a necessidade de uma delimitação precisa dos cometas [18] [16] [14] [32]. Para este fim, foram usados os filtros morfológicos (erosão e dilatação), apesar de serem usualmente utilizados em imagens binárias [18] [26], como elemento de segmentação. Neste trabalho foi utilizado como uma etapa de pré-processamento [14].

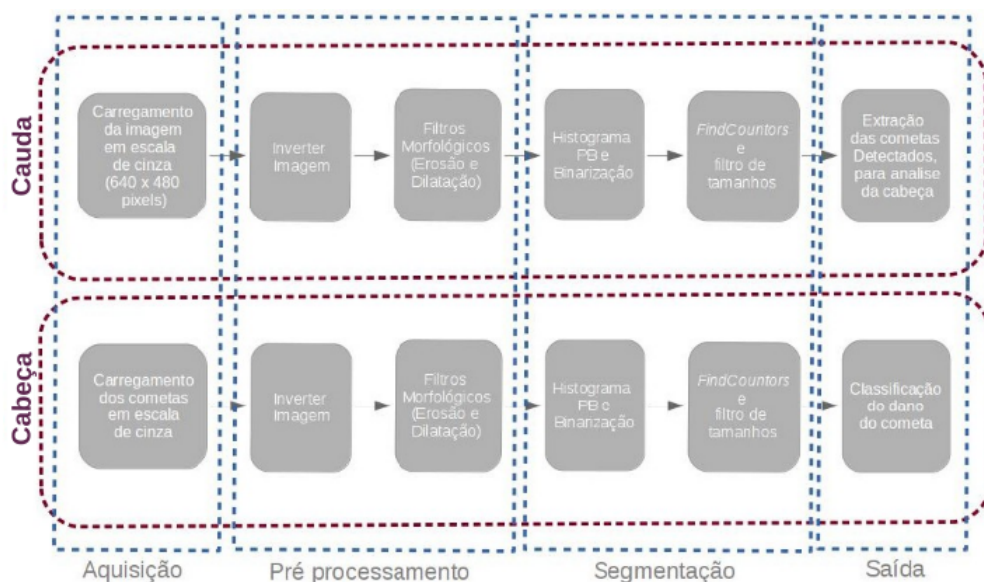


Figura 3: Modelagem da avaliação automática do cometa, com caracterização das etapas de *Visão Computacional*.

Estes filtros se baseiam em uma forma predefinida, também chamada de elemento estruturante, que é aplicada à vizinhança de um pixel âncora [26]. O objetivo deste filtro é realçar o contorno do cometa analisado, através de um processo de dilatação e contração [14] em uma imagem em escala de cinza.

Após o pré-processamento, é utilizada uma binarização dinâmica [14] [32]. Esta consiste em utilizar intensidades de pixels, calculados através da magnitude do histograma. O valor máximo de um gráfico de concentração de determinados valores de pixel (histograma) foram usados para definir o fundo da imagem [27] [26] [25], permitindo uma distinção plena entre cometas e fundo da imagem.

Com as imagens devidamente binarizadas, procede-se com o segundo passo da segmentação, que é a detecção de contornos, implementada na biblioteca OpenCV através do método *findContours* [27] [26]. O principal problema em se usar a detecção de contornos, não está propriamente no método de detecção, mas sim no método que o antecede: a binarização [26]. É difícil encontrar um limiar ótimo para eliminar todos os pontos indesejados [26], fazendo-se necessário uma etapa extra, dispondo de filtro de tamanhos.

O filtro de tamanhos funciona semelhante ao filtro de frequência [25] [24] [27] [26], não permitindo que caudas muito grandes ou muito pequenas sejam encaminhadas à etapa de detecção de cabeça. Esses cometas podem representar ruídos, como bolhas de ar ou colônias de bactérias, ou mesmo conjuntos de cometas sobrepostos, que são eliminados [14]. Além disso, o filtro de tamanhos tem por objetivo eliminar cometas, cuja a proporção do diâmetro longitudinal pelo diâmetro transversal, é muito diferente com relação aos outros cometas. Essa diferença é medida empiricamente, considerando os menores diâmetros (longitudinal e transversal) e os maiores diâmetros (longitudinal e transversal) em cada lâmina, separando em três grupos (representando 1/3 cada). Os cometas a serem considerados deverão estar posicionados no grupo central.

Na etapa seguinte, uma lista de coordenadas (x,y) representando o contorno do cometa é obtida, a qual detém a cauda (representada pelo próprio contorno do cometa) e a cabeça (geralmente imersa sobre o corpo do cometa). Tais coordenadas serão utilizadas para a extração do contorno da cabeça, através do mesmo processo usado na cauda. Observa-se que a cauda é representada pelo contorno do próprio cometa. Utilizando o conjunto de coordenadas da cabeça e da cauda, calcula-se a área, que em uma figura regular, proporcional ao seu diâmetro e portanto, a razão do diâmetro da classificação de Collins [20] [19] pode ser usada a partir da área no sistema de classificação.

Com o critério de Whitby [31], um sistema especialista pode ser muito simples, mas altamente confiável, se a base de regras for baseada em informações também confiáveis, ou seja, com baixa incerteza. A base de regras do tipo *Se Fato Então*

Consequência são implementadas baseadas em Collins [19]. Os dados de entrada são os obtidos pelo módulo de visão computacional (*área da cauda e área da cabeça*). Estas regras podem ser visualizadas abaixo. Note que o valor da proporção (*areaCauda/areaCabeca*) depende de cada tipo de dano. O algoritmo foi reduzido para representar somente a ideia que foi implementada no SMART COMET.

Entrada: *AreaCauda, AreaCabeca*
Saída: Classe de dano celular

```

1 inicio
2   se AreaCauda/AreaCabeca < 1 então
3     | DanoCelular = 0
4   fim
5   senão se AreaCauda/AreaCabeca < 1.5 então
6     | DanoCelular = 1
7   fim
8   senão se AreaCauda/AreaCabeca < 2.5 então
9     | DanoCelular = 2
10  fim
11  senão se AreaCauda/AreaCabeca < 3.5 então
12    | DanoCelular = 3
13  fim
14  senão
15    | DanoCelular = 4
16  fim
17 fim

```

3.3 Experimento

De posse do sistema de reconhecimento e classificação e das imagens do ensaio cometa de ambos os protocolos, foi necessário analisar algumas métricas de desempenho, para mensurar a capacidade do sistema frente a outras citadas na literatura. Neste caso o OpenComet [14], foi escolhido para realizar a comparação de desempenho devido ser mais recente e ter uma estrutura de reconhecimento mais semelhante ao SMART COMET. Por esta razão, aponta-se as seguintes etapas do experimento:

1. Foram submetidas 129 cometas do protocolo de nitrato de prata e 39 cometas do GelRed, com sombra da objetiva, ao SMART COMET e ao OpenComet e então anotados os resultados para análise de características posterior;
2. Foram submetidas também 129 cometas do protocolo de nitrato de prata e 39 cometas do GelRed, *sem* sombra da objetiva, ao SMART COMET e ao OpenComet e então anotados os resultados para análise de características posterior. Isto foi necessário devido à forma como o OpenComet trabalha de forma diferente quanto a presença ou ausência da sombra da objetiva;
3. Logo após, foram considerados os resultados das etapas anteriores, e agrupados de forma a obter as seguintes métricas:
 - (a) *Cometas* são todos os cometas presentes nas lâminas;
 - (b) *Quant. Cometas Identificados + Falsos Positivo* representam aquilo que os sistemas conseguiram extrair das lâminas;
 - (c) *Cometas Identificados* são os cometas reais (exceto os falsos positivos);
 - (d) *Falsos Positivos (FP)* são os ruídos identificados pelo sistema como sendo cometas; e
 - (e) *Taxa de Eficiência (%)* representa a porcentagem dos cometas identificados corretamente;

A etapa de classificação foi realizada sobre todos os cometas identificados pelos dois sistemas, incluindo os falsos positivo. Nos experimentos, os mesmos procedimentos foram realizados para testar os dois sistemas, tentando ser o mais fiel possível para cada um e obter um resultado mais justo.

4 RESULTADOS

Os resultados dos experimentos realizados são apresentados nas (*Tabelas 2 - 5*), sendo que a primeira coluna representa o Protocolo aplicado, a segunda coluna representam a Soma entre os Cometas Identificados e os Falsos Positivos. Na terceira coluna temos os Cometas Identificados, representando os cometas efetivos capturados. Na quarta coluna são representados os Falsos Positivos, que representam ruídos captados pelos sistemas. Na ultima coluna é apresentada a Taxa de Eficiência em porcentagem, que é a razão entre os Cometas Identificados e os Cometas Identificados acrescidos dos Falsos Positivos.

A *Tabela 2* representa os resultados da análise das imagens do SMART COMET com a sombra da objetiva. A *Tabela 3* é a representação dos resultados das imagens analisadas pelo OpenComet [14] com sombra da objetiva. Observando a terceira coluna

Protocolo	Cometas	Cometas Identificados + FP	Cometas Identificados	FP	Taxa de Eficiência (%)
Nitrato de Prata	129	99	56	43	57,57%
GelRed	39	17	16	1	94,12%

Tabela 2: Resultados da detecção de cometas dispondo do SMART COMET com sombra da objetiva.

Protocolo	Cometas	Cometas Identificados + FP	Cometas Identificados	FP	Taxa de Eficiência (%)
Nitrato de Prata	129	0	0	0	0,00%
GelRed	39	65	33	32	49,23%

Tabela 3: Resultados da detecção de cometas dispondo do OpenComet com sombra da objetiva.

das tabelas 2 e 3, nota-se que na presença da sombra da objetiva, o SMART COMET consegue superar o OpenComet usando os dois protocolos (nitrato de prata e GelRed). A Taxa de eficiência do primeiro é 57% para o nitrato de prata e 94,12% para o GelRed. Isso acontece porque o OpenComet tem grandes dificuldades em diferenciar os cometas da própria borda ocasionada pela objetiva. Embora o OpenComet tenha detectado mais cometas (Tabela 2) que o SMART COMET, a quantidade de Falsos Positivo, apresentada pelo OpenComet é bem mais elevada, atrapalhando sua eficiência.

Protocolo	Cometas	Cometas Identificados + FP	Cometas Identificados	FP	Taxa de Eficiência (%)
Nitrato de Prata	129	159	53	106	33,33%
GelRed	39	25	23	2	92,00%

Tabela 4: Resultados da detecção de cometas dispondo do SMART COMET sem sombra da objetiva.

Protocolo	Cometas	Cometas Identificados + FP	Cometas Identificados	FP	Taxa de Eficiência (%)
Nitrato de Prata	129	0	0	0	0,00%
GelRed	39	46	35	11	76,09%

Tabela 5: Resultados da detecção de cometas dispondo do OpenComet sem sombra da objetiva.

A Tabela 4 demonstra os resultados da análise das imagens do SMART COMET sem sombra da objetiva. E por último, a Tabela 5 apresenta os dados da análise das imagens do OpenComet [14] sem sombra da objetiva. Ainda sem a sombra da objetiva, o SMART COMET consegue superar o OpenComet nos dois protocolos, evidenciando que a solução proposta é mais eficiente na classificação dos cometas. Com base nos resultados das duas tabelas acima é possível ver que o SMART COMET alcança índices percentuais de 33,33% e 92,00%, respectivamente ao nitrato de prata e o GelRed, sendo maiores que os obtidos com o OpenComet. Novamente é possível observar que o OpenComet consegue detectar mais cometas que o SMART COMET, porém a taxa de Falsos Positivo novamente bem maior no OpenComet, comprometendo a classificação correta do nível do dano celular.

Um outro fato importante a ser observando nas quatro tabelas acima é uma tendência para que as imagens produzidas a partir do protocolo do GelRed, em ambas as soluções, tenha um reconhecimento mais eficiente dos cometas. Isso ocorre porque o protocolo do nitrato de prata acaba confundindo os algoritmos nas duas abordagens de detecção dos cometas, uma vez que alguns ruídos são considerados devido a semelhança com os próprios cometas. A quantidade maior de Falsos Positivos é proveniente de sujeiras e bactérias que são consideradas cometas equivocadamente pelas duas abordagens (OpenComet e SMART COMET). No caso do OpenComet, o protocolo de nitrato de prata pode causar uma Taxa de Eficiência nula (0,00%), inviabilizando sua adoção na classificação de danos celulares.

Foi observado ainda, que grande maioria dos Falsos Positivos encontrados eram provenientes do dano 4. No caso de imagens quadradas(sem sombra da objetiva), este dano representou 83,02% dos Falsos Positivos no protocolo de nitrato de prata, já no protocolo GelRed a taxa de Falsos Positivos foi 100% para o dano 4. Contudo, no caso das imagens circulares(com a sombra da objetiva), o protocolo de nitrato de prata para o dano 4 mostrou-se levemente mais eficiente, representado 79,07% dos Falsos Positivos. Já o GelRed, para imagens circulares, este dano apresentou 100% dos Falsos Positivos. Nas tabelas 6-9 apresentam os resultados da aplicação do sistema especialista para a classificação dos cometas detectados.

Para finalizar, deve ser destacado o bom desempenho do SMART COMET nos dois protocolos e nos dois cenários (com e sem sombra da objetiva), alcançando taxas próximas a limite superior, igualando-se à abordagem manual. Isto permite afirmar

	Sem Sombra			Com Sombra		
Tipo de Dano	Cometas Existentes	Cometas detectados	FP Classificados	Cometas Existentes	Cometas detectados	FP Classificados
Dano 0	22	27	8	22	21	4
Dano 1	13	16	6	13	9	2
Dano 2	7	9	0	7	9	1
Dano 3	8	10	4	8	12	2
Dano 4	79	97	88	79	48	34
TOTAL	129	159	106	129	99	43

Tabela 6: Resultados da classificação do tipo de dano utilizando SMART COMET com protocolo de nitrato de prata.

	Sem Sombra			Com Sombra		
Tipo de Dano	Cometas Existentes	Cometas detectados	FP Classificados	Cometas Existentes	Cometas detectados	FP Classificados
Dano 0	8	5	0	8	3	0
Dano 1	3	2	0	3	2	0
Dano 2	11	7	0	11	2	0
Dano 3	5	3	0	5	3	0
Dano 4	12	8	2	12	7	1
TOTAL	39	25	2	39	17	1

Tabela 7: Resultados da classificação do tipo de dano utilizando SMARTCOMET no protocolo de GelRed.

	Sem Sombra			Com Sombra		
Tipo de Dano	Cometas Existentes	Cometas detectados	FP Classificados	Cometas Existentes	Cometas detectados	FP Classificados
Dano 0	22	0	0	22	0	0
Dano 1	13	0	0	13	0	0
Dano 2	7	0	0	7	0	0
Dano 3	8	0	0	8	0	0
Dano 4	79	0	0	79	0	0
TOTAL	129	0	0	129	0	0

Tabela 8: Resultados da classificação do tipo de dano utilizando OPENCOMET no protocolo de nitrato de prata.

	Sem Sombra			Com Sombra		
Tipo de Dano	Cometas Existentes	Cometas detectados	FP Classificados	Cometas Existentes	Cometas detectados	FP Classificados
Dano 0	8	9	4	8	13	11
Dano 1	3	4	0	3	10	2
Dano 2	11	14	0	11	8	1
Dano 3	5	7	1	5	9	2
Dano 4	12	12	6	12	25	17
TOTAL	39	46	11	39	65	33

Tabela 9: Resultados da classificação do tipo de dano utilizando OPENCOMET no protocolo de GelRed.

que o SMART COMET está habilitado para substituir o procedimento convencional por um automatizado usando algoritmos que se aproximam dos resultados reais.

5. CONCLUSÃO

A busca por automatização do teste do cometa tem levado vários pesquisadores a desenvolverem abordagens computacionais que visam substituir o procedimento manual, a qual é propício ao erro e dispendioso. No entanto, as abordagens utilizadas até o momento não têm conseguido alcançar resultados com baixa taxa de erro. Diante disso, apresenta-se o SMART COMET, uma abordagem que consiste: 1) na utilização de filtros morfológicos utilizando-se da visão computacional para detectar os cometas

e 2) em adoção de sistemas especialistas para classificar o dano celular.

Experimentos realizados demonstram que o SMART COMET tem superado o OpenComet (abordagem mais recente na área) na classificação correta do dano celular. Embora o OpenComet consiga detectar mais células que o SMART COMET, muitos Falsos Positivos acabam prejudicando o desempenho daquela abordagem, inviabilizando a sua adoção em testes que envolvam o protocolo do nitrato de prata. O SMART COMET consegue atingir bons resultados no protocolo GelRed, chegando a alcançar Taxas de Eficiência próximas do procedimento manual, com índices acima de 92%, onde o OpenComet consegue 76%.

A quantidade maior de Falsos Positivos alcançadas pelo OpenComet demanda um acompanhamento mais criterioso por parte do analisador (pessoa que acompanha o teste automatizado). O OpenComet não conseguiu detectar nenhum cometa com o protocolo do nitrato de prata devido a gradação de luz na coloração ser bem mais suave, dificultando o reconhecimento. Além disso, os filtros morfológicos utilizados no SMART COMET eliminam grande parte das impurezas nas lâminas.

Como trabalhos futuros, pretende-se melhorar a identificação dos cometas no SMART COMET, para que seja possível classificar mais eficiente e rapidamente os danos celulares, para que a abordagem seja uma ótima alternativa na automatização de teste do cometa.

REFERÊNCIAS

- [1] C. López-Otín, M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano and G. Kroemer. “The hallmarks of aging”. *Cell*, vol. 153, no. 6, pp. 1194–1217, 2013.
- [2] S. Pavanello and M. Lotti. “Biological monitoring of carcinogens: current status and perspectives”. *Archives of toxicology*, vol. 86, no. 4, pp. 535–541, 2012.
- [3] M. Dusinska and A. R. Collins. “The comet assay in human biomonitoring: gene–environment interactions”. *Mutagenesis*, vol. 23, no. 3, pp. 191–205, 2008.
- [4] V. Gunasekarana, G. V. Raj and P. Chand. “A comprehensive review on clinical applications of comet assay”. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, vol. 9, no. 3, pp. GE01, 2015.
- [5] N. P. Singh, M. T. McCoy, R. R. Tice and E. L. Schneider. “A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells”. *Experimental cell research*, vol. 175, no. 1, pp. 184–191, 1988.
- [6] P. Møller, L. E. Knudsen, S. Loft and H. Wallin. “The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors”. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, vol. 9, no. 10, pp. 1005–1015, 2000.
- [7] S. Cotelle and J. Ferard. “Comet assay in genetic ecotoxicology: a review”. *Environmental and molecular mutagenesis*, vol. 34, no. 4, pp. 246–255, 1999.
- [8] A. N. Jha. “Ecotoxicological applications and significance of the comet assay”. *Mutagenesis*, vol. 23, no. 3, pp. 207–221, 2008.
- [9] D. J. McKenna, S. R. McKeown and V. J. McKelvey-Martin. “Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer”. *Mutagenesis*, vol. 23, no. 3, pp. 183–190, 2008.
- [10] C. A. Hobbs, L. Recio, M. Streicker, M. H. Boyle, J. Tanaka, A. Shiga and K. L. Witt. “Comet assay evaluation of six chemicals of known genotoxic potential in rats”. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 786, pp. 172–181, 2015.
- [11] A. Azqueta, J. Slyskova, S. Langie, I. O’Neill Gaivão and A. Collins. “Comet assay to measure DNA repair: approach and applications”. *Front Genet*, vol. 5, pp. 288, 2014.
- [12] A. R. Collins, M. Ai-Guo and S. J. Duthie. “The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells”. *Mutation Research/DNA Repair*, vol. 336, no. 1, pp. 69–77, 1995.
- [13] K. Końca, A. Lankoff, A. Banasik, H. Lisowska, T. Kuszewski, S. Gózdź, Z. Koza and A. Wojcik. “A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay”. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 534, no. 1, pp. 15–20, 2003.
- [14] B. M. Gyori, G. Venkatachalam, P. Thiagarajan, D. Hsu and M.-V. Clement. “OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis”. *Redox biology*, vol. 2, pp. 457–465, 2014.
- [15] P. L. Olive and J. P. Banáth. “The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells”. *NATURE PROTOCOLS-ELECTRONIC EDITION*-, vol. 1, no. 1, pp. 23, 2006.
- [16] T. Kumaravel, B. Vilhar, S. P. Faux and A. N. Jha. “Comet assay measurements: a perspective”. *Cell biology and toxicology*, vol. 25, no. 1, pp. 53–64, 2009.

- [17] W. Friauff, A. Hartmann and W. Suter. “Automatic analysis of slides processed in the Comet assay”. *Mutagenesis*, vol. 16, no. 2, pp. 133–137, 2001.
- [18] G. Sreelatha, A. Muraleedharan, P. Chand, R. P. Rajkumar and P. Sathidevi. “An Improved Automatic Detection of True Comets for DNA Damage Analysis”. *Procedia Computer Science*, vol. 46, pp. 135–142, 2015.
- [19] A. R. Collins, A. A. Oscoz, G. Brunborg, I. Gaivao, L. Giovannelli, M. Kruszewski, C. C. Smith and R. Štětina. “The comet assay: topical issues”. *Mutagenesis*, vol. 23, no. 3, pp. 143–151, 2008.
- [20] A. R. Collins. “The comet assay: a heavenly method!” *Mutagenesis*, vol. 30, no. 1, pp. 1–4, 2015.
- [21] P. Møller, J. G. Hemmingsen, D. M. Jensen, P. H. Danielsen, D. G. Karottki, K. Jantzen, M. Roursgaard, Y. Cao, A. Ker-manizadeh, H. Klingberg *et al.*. “Applications of the comet assay in particle toxicology: air pollution and engineered nanomaterials exposure”. *Mutagenesis*, vol. 30, no. 1, pp. 67–83, 2015.
- [22] A. Azqueta, S. Meier, C. Priestley, K. B. Gutzkow, G. Brunborg, J. Sallette, F. Soussaline and A. Collins. “The influence of scoring method on variability in results obtained with the comet assay”. *Mutagenesis*, vol. 26, no. 3, pp. 393–399, 2011.
- [23] W. Böcker, W. Rolf, T. Bauch, W. Müller and C. Streffer. “Automated comet assay analysis”. *Cytometry*, vol. 35, no. 2, pp. 134–144, 1999.
- [24] M. A. Fischler and O. Firschein. *Readings in Computer Vision: Issues, Problem, Principles, and Paradigms*. Morgan Kaufmann, 2014.
- [25] M. Sonka, V. Hlavac and R. Boyle. *Image processing, analysis, and machine vision*. Cengage Learning, 2014.
- [26] R. Laganière. *OpenCV 2 Computer Vision Application Programming Cookbook: Over 50 recipes to master this library of programming functions for real-time computer vision*. Packt Publishing Ltd, 2011.
- [27] G. Bradski and A. Kaehler. *Learning OpenCV: Computer vision with the OpenCV library*. ”O’Reilly Media, Inc.”, 2008.
- [28] G. V. Paiva. “APLICAÇÃO DE UM SISTEMA ESPECIALISTA PARA O DIAGNÓSTICO EM TEMPO REAL DAS CONDIÇÕES LIMITE DE OPERAÇÃO EM USINAS NUCLEARES”. Ph.D. thesis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2015.
- [29] A. L. B. Rossetto. “Proposta de um sistema especialista para diagnóstico de fase de Ciclo de Vida Organizacional (cvo) em micro e pequenas empresas”. 2015.
- [30] M. H. B. de Moraes Lopes and R. Higa. “Desenvolvimento de um sistema especialista para identificação de diagnósticos de enfermagem relacionados com a eliminação urinária”. *Rev Bras Enferm*, vol. 58, no. 1, pp. 27–32, 2005.
- [31] B. Whitby. *Inteligência Artificial: um guia para iniciantes*. Madras, 2004.
- [32] G. Brianezi, G. Amante and H. Miot. “Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata”. *J Bras Patol Med Lab*, vol. 45, no. 4, pp. 325–334, 2009.