

UNIVERSIDADE VILA VELHA – ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DETECÇÃO AUTOMÁTICA DE HIPÓXIA EM TECIDO RENAL
MARCADO COM HIF-1 α

ALINE RODRIGUES BUZIN

VILA VELHA
MARÇO / 2017

UNIVERSIDADE VILA VELHA – ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DETECÇÃO AUTOMÁTICA DE HIPÓXIA EM TECIDO RENAL
MARCADO COM HIF-1 α

Dissertação apresentada a Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

ALINE RODRIGUES BUZIN

VILA VELHA
MARÇO / 2017

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

B917d

Buzin, Aline Rodrigues.

Detecção automática de hipóxia em tecido renal marcado com HIF-1 α . / Aline Rodrigues Buzin. – 2017.

31 f.: il.

Orientador: Dominik Lenz.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Vila Velha, 2017.

Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Imagens - Análise.
I. Lenz, Dominik. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615

ALINE RODRIGUES BUZIN

**DETECÇÃO AUTOMÁTICA DE HIPÓXIA EM TECIDO RENAL
MARCADO COM HIF-1 α**

Dissertação apresentada a Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 06 de março de 2017,

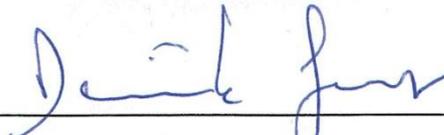
Banca Examinadora:



Manuel Campos Toimil (USC)



Fábio Ribeiro Braga (UVV)



**Dominik Lenz (UVV)
Orientador**

Dedico este trabalho aos meus pais José Geraldo Rodrigues Buzin e Leopoldina Aparecida Rodrigues, que sempre me apoiaram nos estudos e na realização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que me permitiu chegar até aqui, sem ele nada disso seria possível.

Ao meu orientador, Professor Dr. Dominik Lenz, por seu apoio e amizade que durante 5 anos me ensinou um pouco de todo seu conhecimento. Por sua dedicação e competência para que juntos pudéssemos realizar o melhor trabalho, aprimorando assim meu conhecimento.

A toda minha família que sempre me apoiou a continuar no caminho dos estudos. Em especial meus pais que não mediram esforços para que eu realizasse mais essa etapa. Obrigada mãe Leopoldina Aparecida Rodrigues e pai José Geraldo Rodrigues Buzin, sem vocês nada disso seria possível de se realizar.

A minha irmã Luana Rodrigues Buzin e cunhado Diogo Neres de Lima que sempre acreditaram na minha capacidade de ir além.

Ao meu sobrinho Miguel Buzin Neres pelos momentos de descontração e brincadeiras, sempre me perguntando titia você já vai para a escolinha.

A todos os professores do mestrado que de alguma forma contribuíram para minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida.

A todos os meus amigos, tanto antigos como os novos que o mestrado me concedeu, com vocês todo esse tempo se tornou mais leve para a realização do trabalho. Obrigada por poder contar sempre com vocês.

A Nayana que foi uma grande amiga e excelente companheira de laboratório, sempre me ajudando nas dificuldades, permitindo sempre uma troca de conhecimento entre a gente. Onde uma ajudava a outra nas dificuldades diárias, muito obrigada.

À Universidade Vila Velha e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas que abriu as portas para que eu pudesse está realizando meu mestrado.

Obrigada a todos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	3
2.1. Declaração de ética	3
2.2. Preparação das lâminas – Imuno-histoquímica	3
2.3. Material	4
2.4. Obtenção das imagens	4
2.5. Análise das imagens	4
2.6. Aprendizado da máquina	5
2.7. Análise estatística	6
3. RESULTADOS	7
4. DISCUSSÃO	11
5. CONCLUSÃO	13
6. REFERÊNCIAS	14
7. ANEXOS	18

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** Imagem apresentando somente HIF1 α (1), imagem sem a presença do HIF1 α (2) e imagem com e sem a presença do HIF1 α (3). A: imagem original, B: imagem fornecida pelo Score Image 8
- FIGURA 2** Observa-se que os métodos são comparáveis, pois quase todos os resultados estão entre as linhas das médias, demonstrando que não teve erro sistêmico 9
- FIGURA 3** A formação da curva representa a capacidade do software reconhecer e diferenciar os objetos 10

LISTA DE TABELA

TABELA 1	1) carregar imagens; 2) inversão da coloração da imagem para tons de cinza; 3) inversão da intensidade dos objetos – objeto de interesse deve ser mais claro; 4) identificação do primeiro objeto – núcleo; 5) identificação do segundo objeto - célula; 6) identificação do terceiro objeto – citoplasma; 7) mensuração de tamanho e forma do citoplasma - alvo do marcador; 8) mensuração da intensidade do citoplasma.....	4
-----------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---

RESUMO

BUZIN, Aline Rodrigues, Universidade Vila Velha – ES, março de 2017. **Deteção automática de hipóxia em tecido renal marcado com HIF-1 α** . Orientador: Dominik Lenz.

Objetivo: O objetivo deste estudo foi identificar o marcador HIF-1 α utilizando a citometria de imagem e auxiliar na contagem das células positivas (com HIF-1 α) e negativas (sem HIF-1 α) da mesma amostra. Metodologia: 17 imagens de tecidos renais de ratos da linhagem Wistar; Sendo no total 12.587 objetos (células) nas imagens para análise. As imagens adquiridas foram então analisadas através dos softwares livres CellProfiler (versão 2.1.1) e CellProfiler Analyst (versão 2.0). No software CellProfiler Analyst, houve uma separação com as classes do objeto, usando um classificador, sendo elas: 1) classe com HIF-1 α e 2) classe sem HIF-1 α . Resultados: Com os dados obtidos através de Score All, foi possível calcular o percentual de células que possuíam HIF-1 α e das que não possuíam; Dos 12.587 objetos da amostra, 6.773 (54%) tinham HIF-1 α e 5.814 (46%) não tinham HIF-1 α . Sendo os dados de sensibilidade 0,90, especificidade 0,84 e desvio padrão 0,10 e 0,12. Conclusão: A pesquisa mostra que o software livre CellProfiler, através do microscópio de luz, foi capaz de identificar o marcador, realizar a aprendizagem da máquina, e posterior contagem e separação de células em classes distintas (com e sem marcador HIF-1 α).

Palavras chaves: HIF-1 α . Hipóxia. Aprendizado da máquina. Análise de imagem.

ABSTRACT

BUZIN, Aline Rodrigues, University of Vila Velha – ES, march de 2017. **Automatic detection of hypoxia in renal tissue stained with HIF-1 α** . Orientador: Dominik Lenz.

Objective: The objective of this study was the identification of the stain HIFalpha using the Image Cytometry, and to help to count the positive cells (with HIF-1 α) and the negative cells (without HIF-1 α) from the same sample. Method: 17 images of renal tissues from male rats of Winstar lineage; overall, there were 12.587 objects (cells) in the images for analysis. The acquired images were then analyzed through the free softwares CellProfiler (version 2.1.1) and CellProfiler Analyst (version 2.0). In the software CellProfiler Analyst, there was a separation with the classes of the object, using a classifier, and the classes were: 1) class with HIF-1 α and 2) class without HIF-1 α . Results: With the data obtained through Score All, it was possible to calculate the percentage of cells that had HIF-1 α ; out of 12.587 objects of the sample, 6.773 (54%) had HIF-1 α and 5.814 (46%) did not have HIF-1 α . Data of sensibility 0.90, specificity 0.84 and standard deviation 0.10 and 0.12. Conclusion: The research shows that the free software CellProfiler, through the light microscope, was able to identify the stains, perform the machine's learning, and subsequently count and separate cells from distinct classes (with and without the stain of HIF-1 α).

Keywords: HIF-1 α . Hypoxia. Machine learning. Image analysis.

1. INTRODUÇÃO

A histologia compreende o estudo dos tecidos de organismos e a anatomia microscópica de células, enquanto histopatologia compreende o estudo das alterações e doenças do tecido. (HE et al., 2012; GIL et al., 2002; TITFORD, 2006). A análise manual dos tecidos ainda hoje, é a forma mais comum de diagnóstico histopatológico, esse processo requer grande experiência do analista (HE et al., 2012; CHAN et al., 2012), o que a torna não reprodutível, uma vez que, que cada analista pode chegar a diferentes interpretações acerca de uma mesma análise. Segundo Nelissen e colaboradores (2014), essa técnica demonstra-se cansativa e demorada.

Como meio de tornar mais ágeis análises e diagnósticos, surgiu a Citometria de Imagem, técnica que agrega conhecimentos da patologia humana e tecnologia de imagem e computador (HARDIE et al., 2002), tornando a técnica reprodutível. (MITTAG et al., 2005; REXHEPAJ et al., 2013). Estudos empregando histopatologia automática e software livre CellProfiler (CAPENTER et al., 2006), são novos e escassos, nota-se, que no Pubmed (11/2015) somente um artigo é descrito, este estudo por vez, associa análises de imagem e citopatologia (GONZÁLEZ et al., 2012). Evidenciando assim, a importância dessa pesquisa, sendo esta, desafiadora no meio científico.

Nos estudos e avaliações do tecido, muitos são os fenômenos e objetos de interesse. Para a identificação da isquemia/ hipóxia tecidual, por exemplo, o HIF1 α (fator de indução a hipóxia), marcador citoplasmático proposto por Beasley et al. (2002) e Filies et al. (2005), tem sido amplamente utilizado, por sua forte expressão como marcador independente, para taxa de sobrevida em pacientes portadores de carcinomas de cabeça e pescoço. Mendes et al. (2014) sugerem seu uso para células tumorais e peritumorais inflamatórias.

Recentemente, estudos afirmam ser possível a identificação da progressão de tumores de acordo com a expressão do HIF1 α e sua expressão, vem sendo associada ao mau prognóstico do câncer de mama, (BRITO et al., 2011). Ao estudarem a expressão do HIF1 α e do antígeno de proliferação nuclear em casos de carcinomas orais, Uehara e colaboradores (2009), encontraram maior índice de marcação do mesmo, nos pacientes que apresentavam metástase nos linfonodos regionais e com pior prognóstico.

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi a identificação do marcador HIF1 α por meio da Citometria de Imagem, bem como, auxiliar a contagem de células positivas (com HIF1 α) e negativas (sem HIF1 α) de uma mesma amostra.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Declaração de ética

As lâminas utilizadas foram cedidas pela Universidade Federal do Espírito Santos (UFES). Tendo estas aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA/UFES, protocolo número 050/2013 – anexo1).

2.2. Preparação das lâminas – Imuno-histoquímica

Seções de parafina em série de quatro micrômetros do rim foram coradas com anticorpo monoclonal anti-rato HIF-1 α (ab8366) (Abcam, UK, 1: 500). A coloração foi visualizada sob reação de peroxidase com tetracloridrato de 3,3-diaminobenzidina (DAB, Sigma Chemical Co., EUA). Os espécimes foram então ligeiramente contra corados com hematoxilina de Mayer, desidratados e baseados em xileno montados sob lâminas de vidro. A amostra de controlo positivo foi placenta humana, enquanto que o controlo negativo foi o mesmo material e incubou-se apenas com o diluente de anticorpo.

O teor de área de coloração positiva foi calculado em média em dez campos aleatórios através do córtex e da medula.

A morfometria assistida por computador foi realizada com um software de código aberto CellProfiler Analyst (<http://www.cellprofiler.org>, Imaging Platform, Broad Institute of MIT e Harvard, EUA) (Kamentsky et al., 2011), para estimar a relação contribuição de cada um dos corantes (DAB e hematoxilina) foram comparadas utilizando uma técnica de transformação de cor, com base na banda original vermelho-verde-azul (RGB) resultando num espectro de absorção que necessitava de ser separado.

O método é baseado em transformações ortonormais da imagem RGB original dependendo da informação de cor determinada pelo utilizador sobre as duas manchas (Rexhepaj et al., 2013, Ruifrock et al., 2001).

2.3. Material

17 imagens de tecido renal de ratos machos da linhagem Wistar. Sendo num total de 12.587 objetos (células) presentes nas imagens para análise.

2.4. Obtenção das imagens

As lâminas foram fotografadas utilizando microscópio com câmera acoplada (AxioCam MRC Zeiss. Vert. A1), na objetiva de 40x. As imagens foram armazenadas sem perda de qualidade, e salvas em formato de arquivo *.tif.

2.5. Análise das imagens

As imagens obtidas foram analisadas através dos softwares gratuitos CellProfiler (versão 2.1.1) e CellProfiler Analyst (versão 2.0). No software CellProfiler foi realizado a preparação do algoritmo (tabela 1) para posterior análise das imagens.

Tabela 1: Algoritmo CellProfiler para processamento das imagens.

1 LoadImages			
.tif	i1		
2 ColorToGray			
i1	i2		
3 Morph			
i2	i3	invert	
4 IdentifyPrimaryObjects			
i3	nuclei	10-40 pixels	automatic
5 IdentifySecondaryObjects			
i3	nuclei	cells	propagation automatic
6 IdentifyTertiaryObjects			
cells	nuclei	cytoplasm	
7 MeasureObjectsSizeShape			
cytoplasm			
8 MeasureObjectIntensity			
i3	cytoplasm		

Legenda

Ex: 1) carregar imagens; 2) inversão da coloração da imagem para tons de cinza; 3) inversão da intensidade dos objetos – objeto de interesse deve ser mais claro; 4) identificação do primeiro objeto – núcleo; 5) identificação do segundo objeto - célula; 6) identificação do terceiro objeto – citoplasma; 7) mensuração de tamanho e forma do citoplasma - alvo do marcador; 8) mensuração da intensidade do citoplasma.

Após, realizadas as análises no CellProfiler, o software salva todos os dados obtidos a partir da mesma, de acordo com a programação especificada. Tais dados são, exportados para o software CellProfiler Analyst através de um banco de dados no formato SQLite, o qual, seleciona o objeto a ser exportado, dessa forma, os dados do objeto citoplasma foram exportados. Exportar-se os dados do citoplasma, uma vez que, a marcação do HIF1 α ocorre no mesmo.

2.6. Aprendizado da máquina

No software CellProfiler Analyst foi realizada a separação das classes dos objetos com o classificador, sendo essas: 1) classe com HIF1 α e 2) classe sem HIF1 α . Tal separação, consiste em agrupar os objetos de uma mesma imagem de acordo com a sua característica. Objetos sem a presença de HIF1 α foram denominados: semHIF1 α e aqueles que apresentavam HIF1 α foram denominados: comHIF1 α . Após a separação dos objetos em suas classes, realizou-se o aprendizado da máquina que consiste em treinar o software para o reconhecimento de forma correta dos objetos, dentro de uma determinada imagem. Em seguida, calculou-se a sensibilidade e especificidade das amostras, que consisti em pedir ao software 100 objetos de cada classe. Com a ferramenta Score Image, foi possível verificar o resultado das imagens, esta permite que o analista veja toda a extensão da imagem e os objetos ali identificados de acordo com a separação realizada sob cada classe. Os dados gerados por outra ferramenta Score All dizem respeito, a quantidade total de objetos que possuem ou não possuem a presença de HIF1 α de acordo com a separação dada pelo analista. Foi possível ainda, realizar o cálculo da porcentagem de objetos de cada classe na imagem em questão.

2.7. Análise estatística

O teste de Bland-Altman foi realizado utilizando o Sigma Plot (versão 12.5, Systat Software Inc.), esse teste consiste em analisar a similaridade entre a contagem manual (padrão ouro) e a contagem automatizada, ou seja, a contagem realizada pelo analista entre a contagem fornecida pelo software CellProfiler Analyst.

A curva de ROC (Curve Operator Characteristic) demonstra o progresso de aprendizagem da máquina, ou seja a capacidade do software identificar e diferenciar os objetos verdadeiro positivo dos objetos falso positivo.

3. RESULTADOS

Com os dados obtidos através do Score All foi possível calcular a porcentagem de células que possuíam ou não a presença de HIF1 α , sendo que do total de 12.587 objetos da amostra, 6.773 (54%) possuíam o HIF1 α e 5.814 (46%) não possuía o HIF1 α .

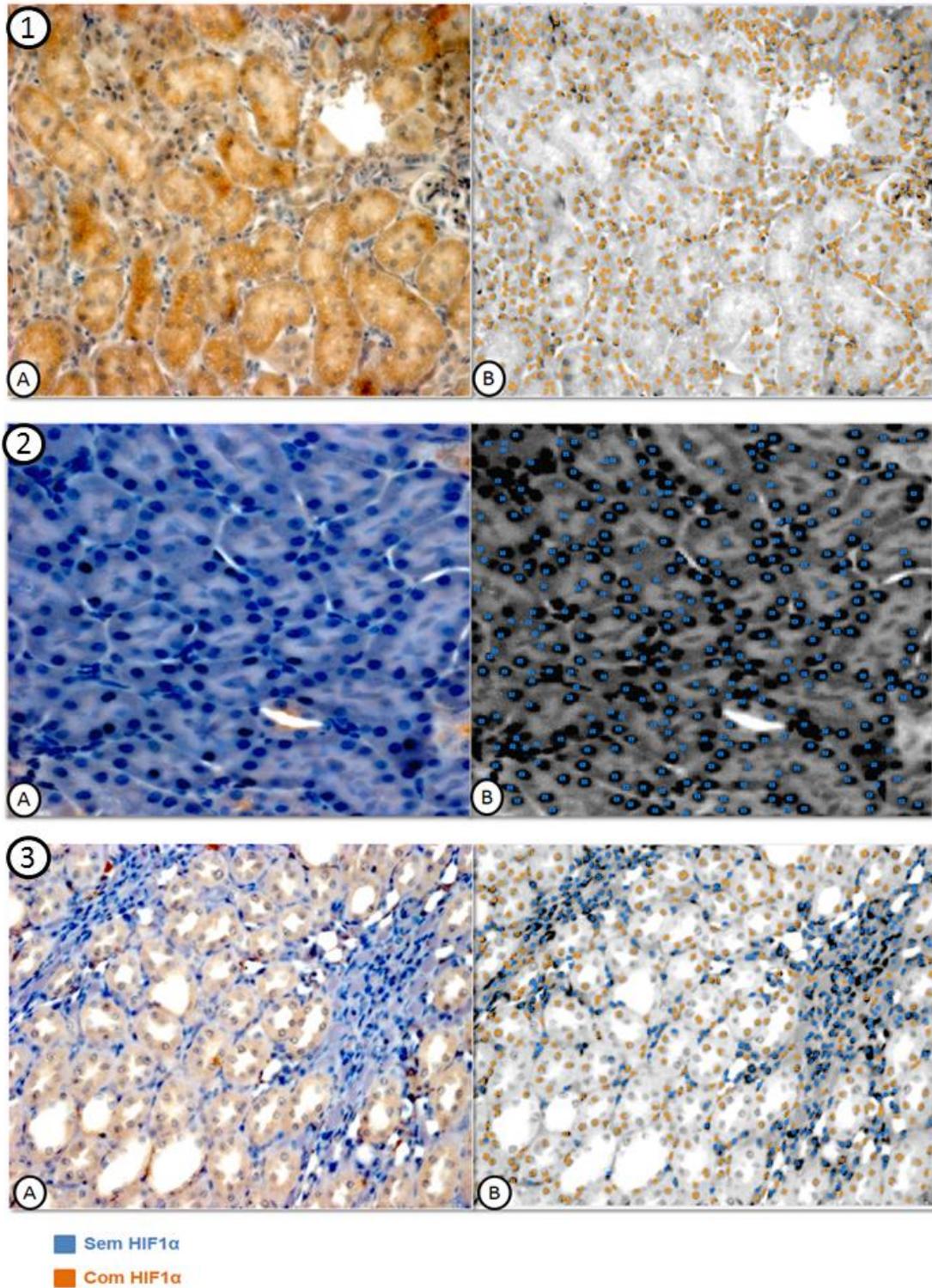
Dados de sensibilidade, especificidade e desvio padrão, também são demonstrados, com média de 0,90 de sensibilidade e 0,84 de especificidade, nota-se que o software reconhece e separa as classes celulares de forma correta, gerando resultados confiáveis. Os valores de desvio padrão para sensibilidade e especificidade foram respectivamente 0,10 e 0,12.

Dados de Score Image são demonstrados na Figura 1.

Dados de Bland-Altman são demonstrados na Figura 2.

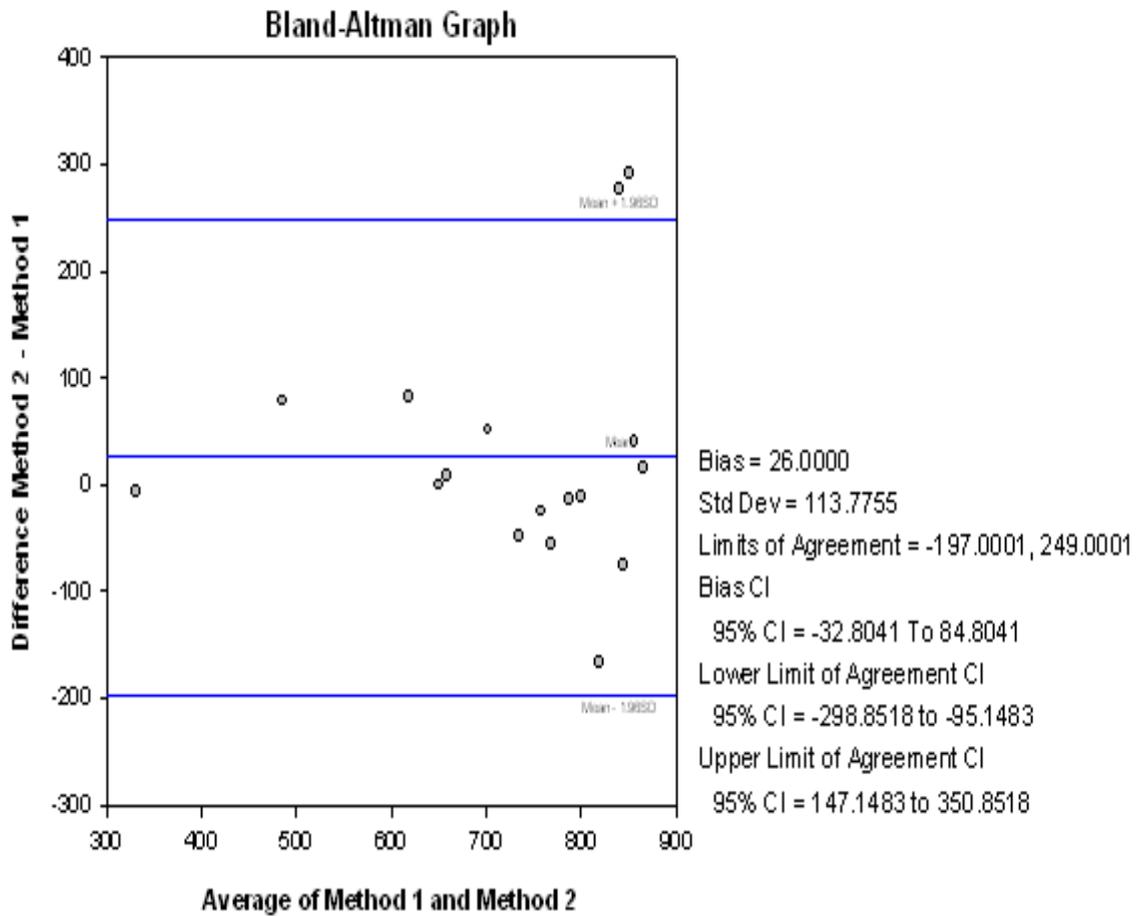
Dados da curva de ROC são demonstrados na Figura 3.

Figura 1



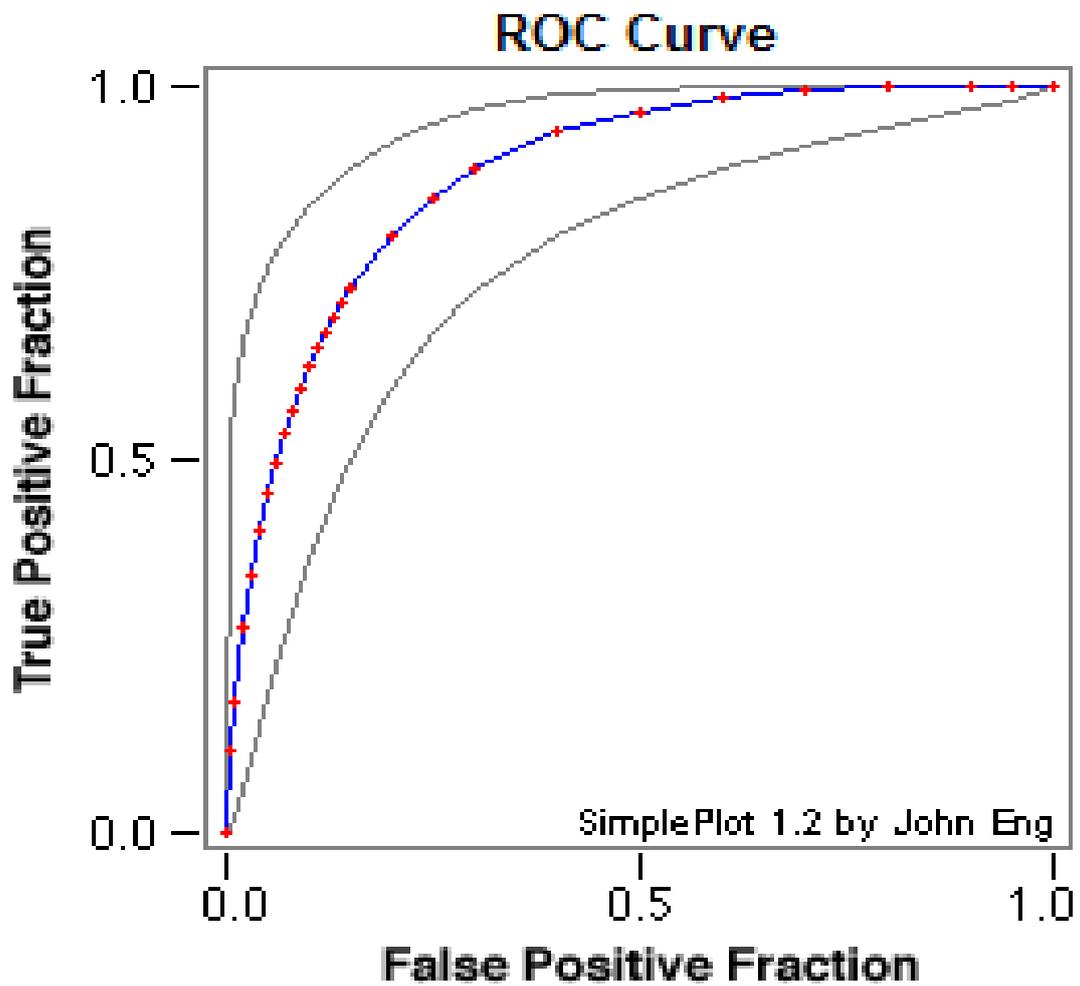
Legenda: imagem apresentando somente HIF1 α (1), imagem sem a presença do HIF1 α (2) e imagem com e sem a presença do HIF1 α (3). A: imagem original, B: imagem fornecida pelo Score Image.

Figura 2



Legenda: Esse gráfico demonstra que não teve erro sistêmico, pois quase todas as amostras estão entre as médias, o que significa que teve distribuição normal. E pôr a linha da média da diferença dos dois métodos está bem próximo do zero significa que os dois métodos são comparados.

Figura 3



Legenda: Esse gráfico demonstra embaixo da curva uma área de 85% que significa que o software consegue identificar e diferenciar de forma correta os falsos positivos dos verdadeiros positivos. Em contra partida se estivesse uma reta ao invés de curva significaria que o software não conseguiria diferenciar.

4. DISCUSSÃO

Ao conhecimento dos autores, este é o primeiro estudo combinando microscopia de luz, análise de imagem reprodutível e classificação celular baseado no aprendizado da máquina. Por meio da citometria de imagem, realizou-se a análise de imagem por célula, os resultados obtidos se deram através da porcentagem de células marcadas e não marcadas com HIF1 α . Kim e colaboradores (2013), analisaram a mancha do marcador e observaram a intensidade obtida através da mesma, enquanto Viray e colaboradores (2014), identificaram individualmente os núcleos, contaram e classificaram como malignos e benignos, obtendo dados percentuais dos núcleos malignos.

Nota-se que a Citometria de imagem é uma tecnologia recente, empregada nas análises laboratoriais de forma vantajosa, por se mostrar amplamente reprodutível (MITTAG et al., 2005; REXHEPAJ et al., 2013), ter custo significativamente mais baixo, uma vez que, necessita de menor volume de amostras e reagentes (GERSTNER et al., 2002; LAFFERS et al., 2006; LENZ et al., 2005a, 2005b; MITTAG et al., 2005, 2006), permitindo por sua vez, conjugar uma análise de alto rendimento com parâmetros morfológicos (TOZETTI et al., 2014; BUZIN et al., 2015). González e colaboradores (2012), afirmam que por meio da citometria de imagem é possível reconhecer automaticamente características nucleares, tais como: tamanho, forma e textura.

Além, da substituição de marcadores específicos por dados da morfologia celular, realizada por Buzin e colaboradores (2015). Assim, o uso de análise digital em amostras que utilizam imuno-histoquímica se mostra uma abordagem com maior precisão e reprodutibilidade (PLANCOULAINÉ et al., 2015), sendo a análise computadorizada de lâminas histológicas uma abordagem mais precisa, reprodutível e sensível, quando comparada análise visual, sendo esta, demorada e sujeita a variáveis tais como; variação da amostragem e analisador, e ilusões ópticas (NELISSEN et al., 2014). Higgins (2015), afirma que softwares de microscopia digital são mais confiáveis, uma vez que apresentam soluções de alta qualidade para consulta.

A metodologia desenvolvida para a pesquisa, através do software CellProfiler permite que o analista utilize apenas uma pequena porcentagem de objetos da amostra, assim, ao final tenha-se o resultado desejado. Em 2007 Lamprecht e colaboradores, relataram ser possível utilizar um pequeno número de imagens e processá-las automaticamente, dessa maneira, podem ser analisadas em um computador pessoal.

Trabalhos acerca dessa temática, foram descritos em estudos recentes, o software Diameter J é muito citado, este permite que os usuários determinem de forma rápida as características estruturais de por exemplo: nanofibras (HOTALING et al., 2015), em outro estudo foi desenvolvido um algoritmo rápido para identificação de células neuronais, permitindo uma caracterização completa da distribuição tridimensional complexa dos neurônios. (SILVESTRI et al., 2015).

Ragojanu e colaboradores (2015) abordam um novo software que permite a análise morfométrica detalhada de cancro em tecidos, sendo, uma análise quantitativa, com redução do tempo de análise e um aumento da reprodutibilidade dos dados, ao passo que, Choi e colaboradores (2015), desenvolveram uma técnica de medição automática de ASL, através de, um microscópio confocal, podendo ser aplicado a repetidas medidas de altura; está abordagem apresentou alta precisão, e uma maior taxa de transferência.

5. CONCLUSÃO

A pesquisa atesta que o software livre, CellProfiler através da microscopia de luz foi capaz de identificar os marcadores, realizar a aprendizagem da máquina, e subsequente contagem e separação de células de classes distintas (com e sem a marcação do HIF1 α). Dessa forma, a avaliação numérica das diferentes classes celulares apresenta aspecto quantitativo ao diagnóstico qualitativo do patologista. Uma vez que, pode ser realizada em todos os laboratórios, devido ao método apresentado utilizar microscopia de luz para suas análises.

6. REFERÊNCIAS

BEASLEY, N.J. et al. Hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in head and neck cancer: relationship to tumor biology and treatment outcome in surgically resected patients. *Cancer Research*. United Kingdom, v.62, n.9, p.2493-2497, 2002.

BRITO, L.G. et al. Expression of Hypoxia-inducible factor 1- α and vascular endothelial growth factor-C in locally advanced breast cancer patients. *Clinical Science*. Brazil, v.66, n.8, p.1313-1320, 2011.

BUZIN, A.R. et al. Replacement of specific markers for apoptosis and necrosis by nuclear morphology for affordable cytometry. *Journal of Immunological Methods*. Brazil, v.420, p.24-30, 2015.

CARPENTER, A.E. et al. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biology*. USA, v.7, n.10, 2006.

CHAN, L.L. et al. Novel image cytometric method for detection of physiological and metabolic changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. USA, v.39, n.11, p.1615-1623, 2012.

CHOI, H.C. et al. Automated acquisition and analysis of airway surface liquid height by confocal microscopy. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. South Korea, v.309, n.2, p.L109-L118, 2015.

FILLIES, T. et al. HIF1-alpha overexpression indicates a good prognosis in early stage squamous cell carcinomas of the oral floor. *BMC Cancer*. Germany, v.5, p.1-9, 2005.

GERSTNER, A.O. et al. Near-infrared dyes for six-color immunophenotyping by laser scanning cytometry. *Cytometry Part A*. Germany, v.48, n.3, p.115-123, 2002.

GIL, J.; WU, H.; WANG B.Y. Image analysis and morphometry in the diagnosis of breast cancer. *Microscopy Research and Technique*. New York, v.59, n.2, p.109-118, 2002.

GONZÁLEZ, J.E. et al. Quantitative image analysis of gamma-H2AX foci induced by ionizing radiation applying open source programs. *Analytical Quantitative Cytology and Histology*. Cuba, v.34, n.2, p.66-71, 2012.

HARDIE, D.C. et al. From pixels to pictograms: a beginners guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. Canada, v.50, n.6, p.735-749, 2002.

HE, L. et al. Histology image analysis for carcinoma detection and grading. *Comput Methods Programs Biomed*. USA, v.107, n.3, p.538-556, 2012.

HIGGINS, C. Applications and challenges of digital pathology and whole slide imaging. *Biotechnic&Histochemistry*. Pennsylvania, v.90, n.5, p.341-347, 2015.

HOTALING, N.A. et al. Diameter J: A validated open source nanofiber diameter measurement tool. *Biomaterials*. USA, v.61, p.327-338, 2015.

KAMENSKY, L. et al. Improved structure, function, and compatibility for CellProfiler: modular high-throughput image analysis software. *Bioinformatics*. USA, v.27, n.8, p.1179-1180, 2011.

KIM, B.W. et al. Prognostic assessment of hypoxia and metabolic markers in cervical using automated digital image analysis of immunochemistry. *Journal of Translational Medicine*. USA, v.11, n.1, p.185-196, 2013.

LAFFERS, W. et al. Iterative restaining as a pivotal tool for n-color immunophenotyping by slide-based cytometry. *Cytometry Part A*. Germany, v.69A, n.3, p.127-130, 2006.

LAMPRECHT, M.R. et al. CellProfiler: free, versatile software for automated biological image analysis. *Biotechniques*. USA, v.42, n.1, p.71-75, 2007.

LENZ, D. et al. Detection and quantification of endothelial progenitor cells by flow and laser scanning cytometry. *Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents*. Germany, v.19, n.3-4, p.180-187, 2005a.

LENZ, D. et al. Regenerative and predictive medicine of cardiovascular disease: the 9th Leipziger Workshop and the 2nd International Workshop on slide based cytometry. *Cytometry Part A*. Germany, v.64A, n.2, p.110-114, 2005b.

MENDES, S.O. et al. HIF-1alpha expression profile in intratumoral and peritumoral inflammatory cells as a prognostic marker for squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Plos One*. Brazil, v.9, n.1, p.1-6, 2014.

MITTAG, A. et al. Hyperchromatic cytometry principles for cytomics using slide based cytometry. *Cytometry Part A*. Germany, v.69A, n.7, p.691-703, 2006.

MITTAG, A. et al. Polychromatic (eight-color) slide-based cytometry for the phenotyping of leukocyte, NK, and NKT subsets. *Cytometry Part A*. Germany, v.65A, n.2, p.103-115, 2005.

NELISSEN, B.G. et al. SlideToolkit: an assistive toolset for the histological quantification of whole slide images. *PloS One*. The Netherlands, v.11, n.9, 2014.

PLANCOULAIN, B. et al. A methodology for comprehensive breast cancer Ki67 labeling index with intra-tumor heterogeneity appraisal based on hexagonal tiling of digital image analysis data. *VirchowsArchiv*. Lithuania, 2015.

REXHEPAJ, E. et al. A texture based pattern recognition approach to distinguish melanoma from non-melanoma cells in histopathological tissue microarray sections. *Plos One*. Sweden, v.8, n.5, p.1-15, 2013.

ROGOJANU, R. et al. Quantitative image analysis of epithelial and stromal area in histological sections of colorectal cancer: An emerging diagnostic tool. *BioMed Research International*. Austria, 2015.

RUIFROK A.C. et al. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*. USA, v.23, n.4, p.291-299, 2001.

SILVESTRI, L. et al. Quantitative neuroanatomy of all Purkinje cells with light sheet microscopy and high-throughput image analysis. *Frontiers in Neuroanatomy*. Italy, v.9, n.8, p.327-345, 2015.

TITFORD, M. A short history of histopathology technique. *Journal of Histotechnology*. USA, v.29, n.2, p.99-110, 2006.

TOZETTI, P.B. et al. Morphometry to identify subtypes of leukocytes. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy*. Brazil, v.7, n.2, p.69-75, 2014.

UEHARA, M. et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha in oral squamous cell carcinoma and its relation to prognosis. *Oral Oncology*. Japan, v.45, n.3, p.241-246, 2009.

VIRAY, H. et al. Automated objective determination of percentage of malignant nuclei for mutation testing. *Applied Immunohistochemistry Molecular Morphology*. Massachusetts, v.22, n.5, p.363-371, 2014.

7. ANEXOS

Anexo 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 050/2013, relativo ao projeto de pesquisa intitulado "**Efeitos do G-CSF em modelo experimental de isquemia/reperfusão renal.**", que tem como responsável o (a) docente **Breno Valentim Nogueira**, está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 20/12/13.

Presidente do
Comitê de Ética no Uso de Animais
CEUA/UFES

Prof. Dr. Douglas Severo Silveira
CRMV-ES 0589/Matricula 01546211
Presidente CEUA-UFES

Vitória (ES), 20 de dezembro de 2013.