

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

***CELL PROFILER*: FERRAMENTA PARA PADRONIZAÇÃO DE
DIAGNÓSTICO DO CARCINOMA PAPILÍFERO DA TIREÓIDE**

BRUNO HOSKEN POMBO

VILA VELHA-ES
ABRIL / 2015

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

***CELL PROFILER*: FERRAMENTA PARA PADRONIZAÇÃO DE
DIAGNÓSTICO DO CARCINOMA PAPILÍFERO DA TIREÓIDE**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BRUNO HOSKEN POMBO

VILA VELHA-ES
ABRIL / 2015

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

P788c Pombo, Bruno Hosken.

Cell profiler: ferramenta para padronização de diagnóstico do carcinoma papilífero da tireóide / Bruno Hosken Pombo. – 2015.

45 f. : il.

Orientadora: Dominik Lenz.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Vila Velha, 2015.

Inclui bibliografias.

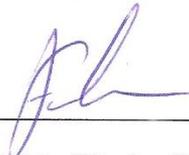
1. Software - Diagnóstico. 2. Glândula tireóide. 3. Câncer – Diagnóstico. I. Lenz, Dominik. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

BRUNO HOSKEN POMBO

**CELL PROFILER: FERRAMENTA PARA PADRONIZAÇÃO DE
DIAGNÓSTICO DO CARCINOMA PAPILÍFERO DA TIREÓIDE**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

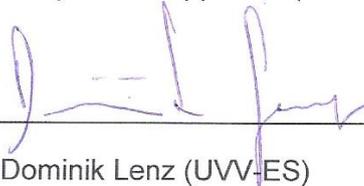
Aprovada em 17 de Abril de 2015,



Fabio Ribeiro Braga (UVV-ES)



Paola Alejandra Cappelletti (INCA)



Dominik Lenz (UVV-ES)

Orientador

Agradecimentos,

Agradeço a Deus, por me dar fé e acreditar que com Ele o fardo sempre é mais leve.

Agradeço ao programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da universidade Vila Velha pela possibilidade de aprimorar e ampliar meus conhecimentos.

Agradeço ao meu orientador Professor Dr. Dominik Lenz, pela perseverança e confiança depositadas em mim para realização deste projeto.

Agradeço à FAPES pelo fomento e incentivo à pesquisa no Estado do Espírito Santo.

Agradeço ao Hospital Santa Rita de Cássia, que manteve as portas sempre abertas para que me ajudando pudesse também ajudar outras pessoas.

Agradeço aos Doutores Allan Kardec de Castro Neto, Robson Dettmann Jarske, Marcos Vinícius Hoffman Cremasco, Wagner Fiori e à Doutora Nadja Zennig por possibilitarem o acesso ao precioso bem que é o conhecimento e também pela disposição ao próximo sem nada em troca.

Agradeço à minha família que inquestionavelmente avalizou minhas decisões e me deram coragem para seguir em frente.

Agradeço aos meus animais que me fazem sempre lembrar que para evoluir é preciso entender o mundo e se comunicar de uma forma que a maioria não compreende e que nada é mais sagrado que na vida, esteja ela onde estiver .

Agradeço à minha esposa, Roberta, rocha viva e alicerce da família, que me dá coragem para enfrentar qualquer desafio e saber que juntos somos em UM bem maior do que se fossemos apenas dois.

RESUMO

HOSKEN, Bruno Pombo, M. Sc., Universidade Vila Velha-ES, abril de 2015. **Cell Profiler: Ferramenta para padronização de diagnóstico do Carcinoma Papilífero da Tireóide.** Orientador: Prof. Dr. Dominik Lenz.

O CellProfiler (CP) é um software de análise de imagem modular, livre e de fácil manuseio, capaz de analisar milhares de células em poucos minutos. Quando associado com a CellProfilerAnalyst (CPA), um software que faz alto dimensionamento da imagem utilizando as informações do próprio CP, pode ser aplicado para o diagnóstico de inúmeras doenças. Como o carcinoma papilífero da tireóide (CPT) representa cerca de 80% de todos os tumores malignos da tireóide, o presente estudo propôs a utilização dos softwares CP e CPA no diagnóstico de CPT. Foram selecionadas amostras de biópsia de tireóide por punção aspirativa por agulha fina (PAAF) de pacientes com CPT e amostras de bócio nodular benigno que apresentavam áreas adjacentes de tecido normal. O tecido foi depositado em uma lâmina de vidro, fixado em álcool 95% e corado por *Papanicolaou*. Através da câmera de luz acoplada na ocular do microscópio óptico, as imagens das lâminas coradas foram salvas, sendo catalogadas e armazenadas em um banco de dados digital. Essas imagens foram processadas pelo CP que fez a identificação dos parâmetros morfológicos dos núcleos e preparou o arquivo em algoritmos para ser utilizado pelo CPA. Foram geradas 1339 imagens digitais das quais, foram selecionadas 698 imagens, sendo 349 imagens de células normais de tireóide e 349 imagens de células de carcinoma papilífero da tireóide. Isso garantiu um total de 1060 núcleos que correspondem a 560 núcleos das células de carcinoma papilífero e 500 núcleos das células normais de tireóide. Foi alcançada uma acurácia de 94,7%. Dentre os 560 núcleos classificados como positivos, 09 foram falsos positivos e dentre os 500 núcleos classificados como negativos 54 falsos negativos. A sensibilidade e especificidade do teste diagnóstico foram de 0,903 e 0,982 respectivamente. Obteve-se um valor preditivo positivo (VPP) de 0,98 e um valor preditivo negativo (VPN) de 0,90. A razão de verossimilhança positivo (LR+) foi de 50,17 e uma razão de verossimilhança negativa (LR-) foi de 0,098. Isso demonstra que o desempenho do teste diagnóstico foi adequado para diagnosticar o CPT.

Palavras-chave: *CellProfiler*®, *CellProfilerAnalyst*®, tireóide, carcinoma papilífero de tireóide.

ABSTRACT

HOSKEN, Bruno Pombo, M. Sc., Universidade Vila Velha-ES, april , 2015. ***Cell Profiler: Tool for standardization of diagnosis of papillary thyroid carcinoma.***

Advisor: Prof. Dr. Dominik Lenz.

The CellProfiler (CP) is a modular image analysis software, free and easy to use, able to analyze thousands of cells in minutes. When associated with CellProfilerAnalyst (CPA), a software that makes high image scaling using the information of the CP itself, can be applied to the diagnosis of many diseases. As papillary thyroid carcinoma (PTC) is about 80% of all malignant tumors of the thyroid, the present study proposed the use of CP and CPA software in the diagnosis of CPT. Thyroid biopsy samples were selected by fine needle aspiration (FNA) of patients with CPT and samples of benign nodular goiter presenting adjacent areas of normal tissue. The tissue was placed on a glass slide, fixed in 95% ethanol and stained with Papanicolaou. Through the light of camera attached to the eyepiece of the optical microscope, images of stained slides were saved, being cataloged and stored in a digital database. These images were processed by CP who made the identification of morphological parameters of the cores and prepared the file on algorithms for use by the CPA. 1339 digital images of which were generated, 698 images were selected, with 349 images of normal cells of the thyroid and 349 images of papillary thyroid carcinoma cells. This provided a total of 1060 nuclei corresponding to 560 nuclei of papillary carcinoma cells and 500 nuclei of normal thyroid cells. An accuracy of 94.7% was achieved. Among the 560 nuclei classified as positive, 09 were positive and false from the 500 nuclei classified as negative 54 false negative. The sensitivity and specificity of the diagnostic test were 0.903 and 0.982 respectively. Gave a positive predictive value (PPV) of 0.98 and a negative predictive value (NPV) of 0.90. The ratio of positive likelihood (LR +) was 50.17 and a negative likelihood ratio (LR) was 0.098. This demonstrates that the performance of the diagnostic test was adequate to diagnose PTC.

Keywords: *CellProfiler*®, *CellProfilerAnalyst*®, thyroid, papillary thyroid carcinoma

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Glândula tireóide e estruturas relacionadas.....	13
Figura 1.3 - Arranjo <i>sincicial like</i> no carcinoma papilífero da tireóide.....	17
Figura 3.3.1 - Conversão e inversão da imagem de tecido normal.....	24
Figura 3.3.2 - Conversão e inversão da imagem de tecido com CPT.....	24
Figura 3.3.3 - Ilustração dos parâmetros nucleares.....	25
Figura 3.3.4 – Ações específicas de cada fase do estabelecimento do algoritmo de mensuração e formatação do banco de dados de imagens.....	26
Figura 3.4.1 - Princípio do treinamento do <i>Cell Profiler Analyst</i> ®.....	28
Figura 3.4.2 - Seleção randômica de células para início do treinamento do CPA.....	29
Figura 3.4.3 - Classificação em fenótipo positivo e negativo das células selecionadas na figura 3.4.2.....	30
Figura 3.4.4 - Reconhecimento da célula de fenótipo positivo (azul) e negativo (laranja) pelo <i>software</i>	31
Figura 3.4.5 - Seleção de 100 imagens positivas/papilíferas após o treinamento do CPA.....	32
Figura 3.4.6 - Classificação das 100 imagens positivas/papilíferas após o treinamento do CPA.....	33
Figura 3.4.7 - Seleção de 100 imagens negativas/normais-não papilíferas após o treinamento do CPA.....	34
Figura 3.4.8 - Classificação das 100 imagens negativas/normais-não papilíferas após o treinamento do CPA.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Possíveis causas de nódulos tireoidianos e achados sugestivos de malignidade.....	11
Tabela 3 - Programação do CellProfiler®.....	27
Tabela 4 - Sensibilidade e especificidade da padronização do <i>software</i>	36

LISTA DE SIGLAS

CAT	carcinoma anaplásico da tireóide
CFT	carcinoma folicular da tireóide
CMT	carcinoma medular da tireóide
CP	do inglês <i>CellProfiler</i> ®
CPA	do inglês <i>CellProfilerAnalyst</i> ®
CPT	carcinoma papilífero da tireóide
CPDT	carcinoma pouco diferenciado da tireóide
CVAN	coeficiente de variação da área nuclear
ICIN	inclusões citoplasmáticas intranucleares
LR+	do inglês <i>likelihood ratios positive</i>
LR-	do inglês <i>likelihood ratios negative</i>
PAAF	punção aspirativa por agulha fina
RLS	do inglês <i>ratio between largest and smallest diameter</i>
RNAi	do inglês <i>ribonucleic acid interference</i>
VPP	valor preditivo positivo
VPN	valor preditivo negativo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Glândula tireóide	13
1.2	Câncer primário da tireóide.....	14
1.3	Carcinoma papilífero da tireóide	15
1.4	Punção aspirativa por agulha fina	17
1.5	Análise de imagem de alto rendimento	18
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo geral	21
2.2	Objetivos específicos	21
3	METODOLOGIA.....	22
3.1	Aquisição da amostra	22
3.2	Preparação da amostra.....	22
3.3	Identificação de parâmetros morfológicos no programa <i>CellProfiler</i> ®.....	23
3.4	Análise dos parâmetros morfológicos no programa <i>CellProfiler Analyst</i> ®	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5	CONCLUSÕES	37
6	REFERÊNCIAS	38
7	ANEXOS.....	42
7.1	Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Hemoterapia, Hematologia e Terapia Celular, 2013.....	42
7.2	Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Hemoterapia, Hematologia e Terapia Celular, 2013.....	43
7.3	Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia celular, 2013.....	44

1 INTRODUÇÃO

Nódulos tireoidianos são muito comuns na prática clínica. A prevalência dos nódulos tireoidianos identificados pela palpação é em torno de 3-7%, mas esse valor aumenta para 76% quando avaliado pela ultrassonografia. Os nódulos tireoidianos são mais comuns em idosos, mulheres e em áreas com deficiência de iodo e com história de exposição à radiação na infância. A importância clínica desses nódulos é o risco de malignidade [GRIEBELER & GHARIB, 2014].

A maioria dos nódulos é benigna e aproximadamente 5% é maligno, entretanto, o câncer primário de tireóide é a neoplasia endócrina mais comum [OMUR & BARAN, 2014] e por isso a atenção deve ser direcionada para os achados que aumentam o potencial de malignidade (Tabela 1) [GRIEBELER & GHARIB, 2014].

Tabela 1: Possíveis causas de nódulos tireoidianos e achados sugestivos de malignidade

Causas de nódulos tireoidianos	Achados que aumentam o potencial de malignidade
Bócio nodular benigno	História prévia de irradiação de cabeça e pescoço
Tireoidite	Historia familiar de carcinoma medular de tireóide
Cistos	Exposição prévia a radiação (Chernobyl)
Câncer primário de tireóide	Idade < 14 ou > 70 anos
Carcinoma papilar	Crescimento rápido do nódulo
Carcinoma folicular	Adenopatia cervical
Carcinoma medular	Nódulo solitário firme
Carcinoma anaplásico	Nódulo frio na cintilografia/sólido na ultrassonografia
Câncer metastático	Disfonia, disfagia, dispnéia persistente
Linfoma	Paralisia da corda vocal

Fonte: GRIEBELER & GHARIB, 2014. MAREK, 2014.

O protocolo padrão de diagnóstico de nódulos tireoidianos consiste em: história do paciente, incluindo a existência prévia e o tratamento de uma doença benigna da tireóide; exame clínico; exames laboratoriais; ultrassonografia da tireóide; cintilografia; e biópsia aspirativa com agulha fina [MAREK, 2014].

A punção aspirativa por agulha fina (PAAF) guiada por ultrassonografia são ferramentas fundamentais no manejo pré-operatório dos nódulos tireoidianos, aumentando a precisão e o diagnóstico de nódulos não perceptíveis ao exame

clínico, porém devem ser usados com critério, e não como rastreio [GHARIB & PAPINI, 2007; SINNA & EZZAT, 2012].

A minoria dos pacientes com nódulos malignos apresentam achados clínicos sugestivos, portanto, é necessário desenvolver métodos diagnósticos mais precisos para reduzir cirurgias desnecessárias, além de diminuir consideravelmente os custos com procedimentos em saúde [HEGEDUS, 2004].

Estes tumores geralmente possuem alteração genética, tornando o uso de biomarcadores moleculares de malignidade e o uso de terapias alvo uma ferramenta promissora, mas que ainda permanecem em fase de pesquisa para que se possa ser usado [NIKIFOROV, 2008].

Com o recente advento dos scanners digitais, lâminas de tecidos de histopatologia podem ser digitalizadas e armazenadas. Consequentemente, os tecidos de histopatologia digitalizados tornaram-se passíveis de aplicação em análise de imagem computadorizado, promovendo um aumento no desenvolvimento de algoritmos para análises de alto rendimento aplicadas ao diagnóstico, prognóstico e para complementar o parecer do patologista. [GURCAN, 2009]

A busca por diagnósticos mais precisos por muitas vezes esbarra no alto custo dos exames existentes, portanto desenvolver métodos eficientes e baratos que possam ser replicáveis e de simples manuseio pode melhorar muito a qualidade de vida, bem como auxiliar no diagnóstico precoce de doenças em pessoas em qualquer tipo de serviço de saúde, reduzindo custos e podendo diminuir a morbimortalidade de doenças potencialmente tratáveis.

O programa *CellProlifer*® é um programa livre, capaz de analisar milhares de células em poucos minutos e potencialmente replicável, necessitando de poucos equipamentos relativamente baratos como um computador, uma câmera digital e um microscópio óptico, podendo ser aplicado para diagnóstico em quase todo tipo de serviço de saúde básica [CARPENTER et al.; 2006].

1.1 Glândula Tireóide

A glândula tireóide encontra-se intimamente relacionada com estruturas vitais do pescoço, tais como o esôfago cervical, nervo laríngeo recorrente, nervo laríngeo superior, glândulas paratireóides e grandes vasos [ESTRELA, LEÃO, JOTZ, 2011]. Localiza-se anteriormente à cartilagem cricóide e à traquéia, ligeiramente inferior à cartilagem tireóide, margeada pelo músculo esternocleidomastóide e pela artéria carótida. As glândulas paratireóides superior e inferior se encontram em estreita proximidade a tireóide (Figura 1) [RITCHIE & BALASUBRAMANIAN, 2011].

Ela é composta por dois lobos laterais unidos por um istmo, pesando cerca de 15-25 g em adultos. Os lobos laterais da tireóide medem cerca de 4 cm da porção superior à inferior, 15-20 mm de largura e a espessura de 20-39 mm [MOHEBATI & SHAHA, 2012]. Os lobos laterais podem ser delimitados a partir da face lateral da cartilagem tireóide até o nível do sexto anel traqueal. O istmo se sobrepõe ao segundo e terceiro anéis da traquéia. A glândula toda está contida dentro da fáscia pré-traqueal e uma camada de fáscia profunda que ancora a glândula posteriormente com a traquéia e a laringofaringe. A glândula tem uma cápsula fibrosa externa, a partir do qual partem septos separando a mesma em lobos e lóbulos [RITCHIE & BALASUBRAMANIAN, 2011].

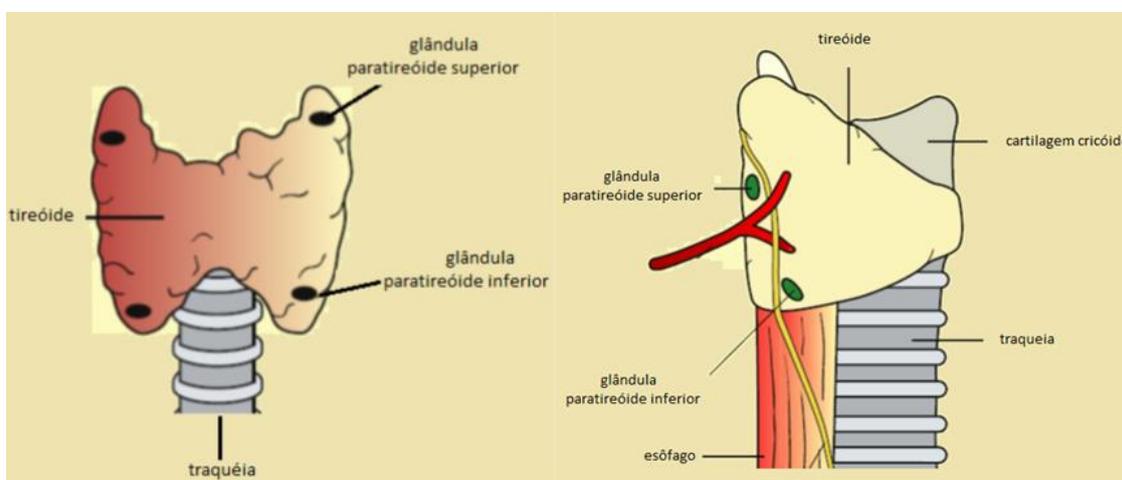


Figura 1.1:Glândula tireóide estruturas relacionadas
Fonte:RITCHIE & BALASUBRAMANIAN, 2011.

A glândula tireóide consiste em folículos tireoidianos esféricos que contêm colóide, repletos de tireoglobulina. As células parafoliculares estão localizadas entre os folículos tireoidianos e sintetizam e secretam calcitonina [RITCHIE & BALASUBRAMANIAN, 2011].

1.2 Câncer primário de tireóide

A classificação histopatológica do câncer de tireóide é importante para o manejo do paciente e para determinar o curso clínico da doença. Os subtipos histológicos derivados das células foliculares da tireóide compreendem o carcinoma folicular da tireóide (CFT), carcinoma papilífero da tireóide (CPT), carcinoma pouco diferenciado da tireóide (CPDT) e carcinoma anaplásico da tireóide (CAT). O CFT e o CPT são classificados como carcinomas diferenciados da tireóide [OMUR & BARAN, 2014].

Os carcinomas foliculares são responsáveis por 10-15% dos casos de câncer de tireóide. Eles são geralmente unifocais e têm uma frequência muito menor de envolvimento de linfonodos (<5%) ao contrário do CPT que apresenta metástases distantes, principalmente para pulmão e osso (20%) [FAGIN & MITSIADES, 2008; FAQUIN et al.; 2009].

O carcinoma papilífero representa cerca de 80% de todos os tumores malignos da tireóide. A incidência global desse subtipo está aumentando, por razões que permanecem obscuras, mas que em parte pode ser reflexo de um diagnóstico precoce, alterações no estilo de vida ou até de um sobre diagnóstico [DAVIES & WELCH, 2014; PELLEGRITI et al, 2013].

Estes tumores são de crescimento lento e o diagnóstico patológico se baseia principalmente na morfologia nuclear das células. Diferentes variantes estão descritas, dependendo dos padrões de crescimento, dos tipos celulares e reações estromais [FAGIN & MITSIADES, 2008].

O carcinoma pouco diferenciado da tireóide tem uma gravidade intermediária entre os carcinomas diferenciados e o carcinoma anaplásico. Ele é caracterizado por um padrão infiltrativo de crescimento, necrose, índice mitótico elevado e invasão vascular. O carcinoma anaplásico da tireóide, também chamado de carcinoma indiferenciado de tireóide, são tumores altamente malignos, composto por células indiferenciadas, são geralmente grandes, invasivos e de aparência heterogênea [FAGIN & MITSIADES, 2008].

Já o carcinoma medular da tireóide (CMT) é o subtipo histológico derivado de células parafoliculares ou células C que incluem o tumor neuroendócrino familiar [OMUR & BARAN, 2014].

1.3 Carcinoma papilífero de tireóide

A arquitetura papilar pode estar presente no carcinoma papilífero da tireóide, mas não é necessária para o diagnóstico. As células foliculares são organizadas em papilas e/ou monocamadas *sincicial-like*. As células foliculares alteradas exibem características nucleares específicas como: (1) núcleos aumentados; (2) núcleos às vezes ovais ou irregulares; (3) estrias nucleares longitudinais; (4) inclusões citoplasmáticas intranucleares (ICIN); (5) núcleos pálidos com cromatina em vidro fosco; (6) micronúcleolos marginalmente colocados, solitários ou múltiplos [AUGER et al.; 2009].

As características que definem CPT são vistas nos núcleos. Os núcleos podem ser redondos ou ovais, mas são muitas vezes altamente irregulares no contorno. Apesar de algumas alterações nucleares típicas ajudarem a definir CPT, nenhuma delas é patognomônica para um diagnóstico de CPT, necessitando da associação de um variado número de achados concomitantes [CHAN, 2002].

A cromatina do núcleo geralmente é pálida em vidro fosco em vez de escuro e grosseiramente texturizado como o núcleo da célula folicular benigna. Inclusões citoplasmáticas intranucleares (ICIN) são vistas em 50-100% dos aspirados de CPT. Elas não são específicas porque são vistas no carcinoma medular da tireóide, no carcinoma pouco diferenciado, no carcinoma anaplásico da tireóide e muito raramente, nos nódulos benignos da tireóide [RENSHAW; 2002].

As células do CPT variam em tamanho, de médio a grande, e forma (cubóide, colunar, poligonal, às vezes em forma de fuso). Os limites celulares são geralmente bem demarcados. A quantidade e a textura do citoplasma também variam muito [AUGER et al.; 2009].

Corpos de *psammoma* são vistos em menor frequência em amostras de PAAF (4-20%) do que nas amostras histológicas (40-60%). Eles podem ser solitários ou múltiplos, isolados ou ligados às células. Sozinho os corpos de *psammoma*, isto é, não associado com células alteradas, não são específicos e podem ser vistos no carcinoma medular da tireóide, na tireoidite linfocítica, doença de Graves e no bócio nodular [AUGER et al.; 2009].

O fundo do folículo geralmente contém colóide relativamente escasso, normalmente limpo e restos necróticos é incomum. Macrófagos corados com hemossiderina, representando hemorragia e alteração cística, são comuns e podem ser abundantes [AUGER et al.; 2009].

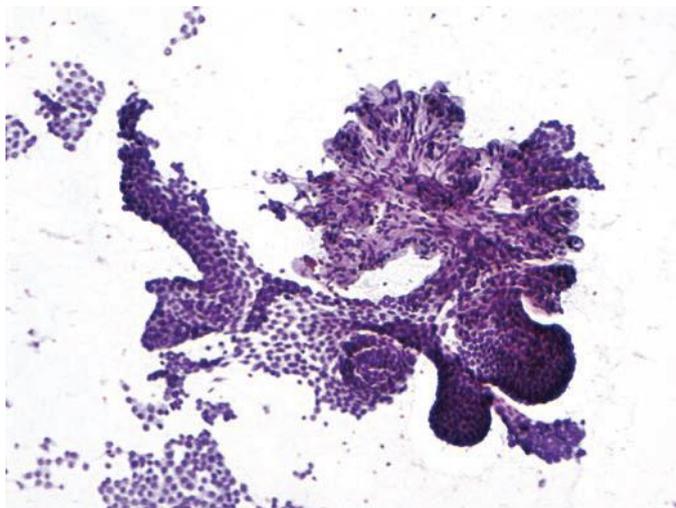


Figura 1.3:Arranjo *syncytiallike* no carcinoma papilífero da tireóide
Fonte: AUGER et al.; 2009.

1.4 Punção aspirativa por agulha fina

A punção aspirativa por agulha fina da glândula tireóide é reconhecido como padrão ouro para a avaliação dos nódulos da tireóide, com o objetivo principal de confirmar lesões benignas [SINNA & EZZAT, 2012]. O uso rotineiro de PAAF tem reduzido o número de procedimentos cirúrgicos desnecessários para nódulos tireoidianos e dobrou o percentual de cânceres de tireóide encontrados em amostras histopatológicas, além de resultar na detecção do câncer de tireóide em fases iniciais [LEW et al.; 2011].

Ali e Cibas publicaram em 2009, o Sistema Bethesda de padronização do laudo citopatológico da tireóide em seis diferentes categorias: (1) amostra insatisfatória, (2) nódulo benigno, (3) atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado, (4) neoplasia folicular ou nódulo suspeito de neoplasia folicular, (5) lesão suspeita de malignidade e (6) nódulo maligno.

A análise das amostras de tecidos é fundamental para o diagnóstico, classificação e prognóstico. Atualmente a avaliação das amostras é realizada manualmente através da visualização que requer especialistas altamente qualificados, sendo muitas vezes demorado e subjetivo ao observador [ALILOUA, KOVALEVB, TAIMOURICA, 2013].

1.5 Análise de imagem de alto rendimento

A análise de imagem data de tempos tão antigos quanto o próprio microscópio, mas o uso de computadores para realizar esta tarefa surge a pouco mais de meio século [MEIJER, et al.; 1997].

Com o crescente aumento do volume de imagens, tanto na rotina clínica quanto em pesquisa e desenvolvimento, exige-se um grau crescente de automação nos processos de análise de imagens [ALILOUA, KOVALEVB, TAIMOURICA, 2013].

Microscópios automatizados podem coletar imagens digitais a um ritmo espantoso e analisam as imagens de forma automatizada, podendo medir fenótipos biológicos de forma confiável, tornando-se uma ferramenta poderosa para avaliar uma grande variedade de questões biológicas em microscopia [LJOSA, 2009].

A captura de imagens pela câmera digital acoplada a um microscópio divide o campo de visão para uma grade de pixels. A intensidade da luz absorvida por um pixel é registrada em um pixel de valor numérico. A imagem digital que o computador tem que trabalhar agora é uma grade de números, onde cada um indica a intensidade da luz no campo de visão. O papel da análise de imagem é transformar essas grades de números em medições de relevante valor biológico, tal como o número de células, núcleos, quantidade de DNA e a presença de morfologias biologicamente relevantes [LJOSA, 2009].

No entanto, existe um estrangulamento na fase de análise de imagem. Além disso, os principais desafios permanecem no desenvolvimento de algoritmos de análise da imagem em si. Para a identificação precisa da célula é necessário extrair medidas significativas a partir das imagens, mas os *softwares* existentes muitas vezes falham na análise das amostras de células, o que limita severamente a utilização até o momento e restringe a análise à inspeção visual [CARPENTER et al.; 2006].

A análise de imagem de alto rendimento torna-se impraticável, a menos que um especialista de análise de imagem desenvolva uma solução personalizada ou que os pacotes comerciais sejam utilizados com os seus algoritmos internos para um conjunto limitado de funções celulares e para um conjunto limitado de tipos de células. Existe uma clara necessidade de uma plataforma livre, poderosa, flexível e de alto rendimento de análise de imagens de células [CARPENTER et al.; 2006].

O *CellProfiler*®(CP) é um *software* de análise de imagem modular livre que é capaz de lidar com centenas de milhares de imagens. O *software* contém métodos já desenvolvidos para muitos tipos de células, além de satisfazer as seguintes necessidades: (1) algoritmos avançados de análise de imagens que são capazes de identificar com precisão as células aglomeradas; (2) uma concepção modular, flexível, permitindo a análise de novos ensaios e fenótipos; (3) livre acesso e (4) fácil manuseio [CARPENTER et al.; 2006].

Para suprir as necessidades de analisar imagens baseadas em lâminas é necessário conhecimento computacional para extrair informações dos bancos de dados. Para tanto, muitos pesquisadores experientes são capazes de analisar inúmeros dados, porém apresentam limitação quanto ao uso de programas de computador. Por esse motivo desenvolveram o *CellProfileAnalyst*® (CPA) que é um *software* que faz um alto dimensionamento da imagem utilizando as informações do banco de dados, sendo ele flexível e de fácil operação [JONES et al.; 2008].

A aplicação de programas de reconhecimento de padrões para a interpretação da coloração histológica contribuiu para uma diminuição do preconceito na interpretação analisador dependente e está revolucionando a forma de analisar a heterogeneidade fenotípica em um grande número de amostras. No entanto, estas

análises automatizadas ainda necessitam de padronização por meio de protocolos reprodutíveis [ALMENDRO, MARUSYK & POLYAK, 2013].

Portanto o desenvolvimento de padrões de análise utilizando o programa *Cell ProfilerAnalyst*® pode ser uma alternativa viável e precisa no diagnóstico e rastreo de inúmeras doenças a um público consideravelmente elevado, levando a rapidez diagnóstica a populações hoje privadas de tais serviços. Além de propiciar um diagnóstico de alta precisão, de baixo custo, reprodutível, arquivo médico legal, compartilhamento de imagens e armazenamento de forma digital.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Diagnóstico do carcinoma papilífero de tireóide através dos programas *CellProfiler*® e *CellProfilerAnalyst*®.

2.2 Objetivos específicos

- Utilizar os programas *CellProfiler*® e *CellProfilerAnalyst*® para reconhecer as diferenças morfológicas do carcinoma papilífero de tireoide.
- Comparar o resultado do *CellProfileAnalyst*® com a análise histopatológica ou análise citológica (anatomopatologista *expert*);

3 METODOLOGIA

3.1 Aquisição da Amostra

Foram selecionadas sete amostras de biópsia de tireóide por PAAF de pacientes com carcinoma papilífero da tireóide e oito amostras de bócio nodular benigno que apresentavam áreas adjacentes de tecido normal, encaminhadas para o laboratório de patologia do Hospital Santa Rita de Cássia na Grande Vitória, durante o período de agosto-dezembro de 2014.

O estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Vila Velha obedecendo às diretrizes de pesquisas envolvendo seres humanos do Conselho Nacional de Saúde (Res. nº 196/1996), sendo aprovado sob o protocolo de pesquisa nº 804745.

3.2 Preparação da Amostra

O tecido foi depositado em uma lâmina de vidro, fixado em álcool 95% e corado por *Papanicolaou* para observação em microscópio óptico com objetiva de aumento de 100x sob óleo de imersão. Através da câmera de luz (Samsung SDC14®) acoplada na ocular do microscópio óptico, as imagens das lâminas coradas foram salvas como *.bmp usando nomes apropriados, sendo catalogadas e armazenadas em um banco de dados digital [WANG, et al.; 2005; NAGASHIMA, 1998].

A partir das amostras obtidas foram geradas 1339 imagens digitais das quais, foram selecionadas 698 imagens, sendo 349 imagens de células normais de tireóide e 349 imagens de células de carcinoma papilífero da tireóide. Isso garantiu um total de 1060 núcleos que correspondem a 560 núcleos das células de carcinoma papilífero e 500 núcleos das células normais de tireóide. Todas as amostras foram analisadas e diagnosticadas por patologistas.

3.3 Identificação dos parâmetros morfológicos no programa CellProfiler®

Inicialmente as imagens originais capturadas no microscópio óptico foram convertidas para tons de cinza e as intensidades foram invertidas em uma imagem negativa da escala de cinza. Isso resultou em núcleos brilhantes que são utilizados pelo *software* para medir e delimitar os objetos de interesse.

A área do objeto após ser delimitada foi isolada, excluindo todas as interferências de imagens da lâmina original. Com isso formou-se uma imagem de fundo negro com o objeto destacado em colorido. Se houver mais de um núcleo na imagem, o software os distingue separadamente, como dois objetos distintos. Essa conversão ocorreu nas imagens de tecido normal e tecido com CPT (Figuras 3.3.1 e 3.3.2).

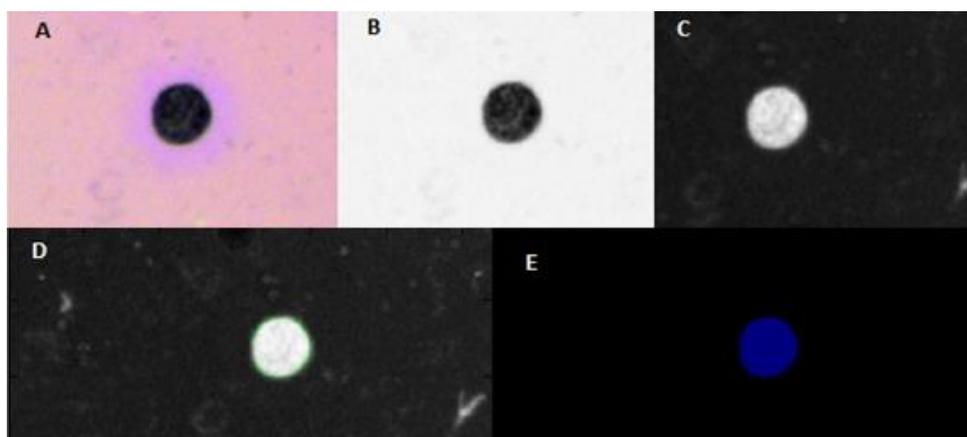


Figura 3.3.1: Conversão e inversão da imagem de tecido normal. **A:** imagem primária colorida. **B:** imagem A em escala de cinza. **C:** imagem B invertida (brilhante). **D:** Imagem brilhante delimitada. **E:** imagem marcada e isolada das interferências da lâmina.

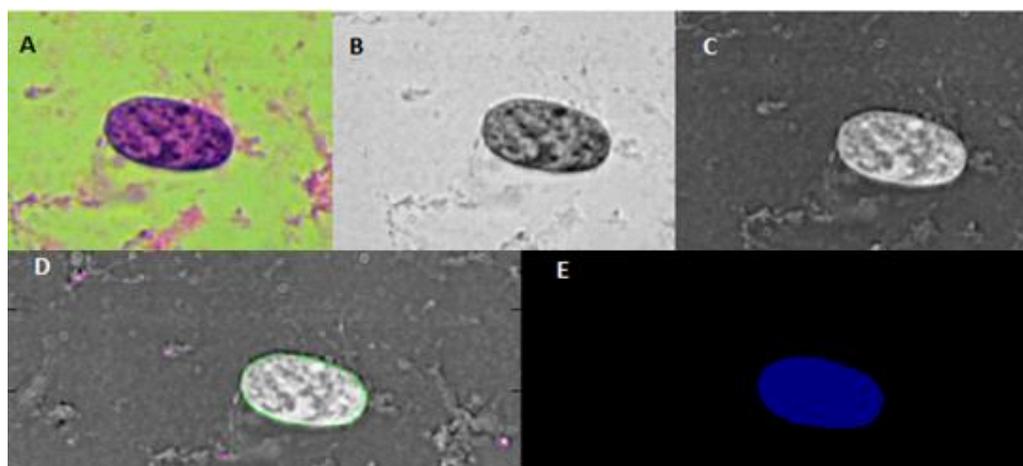


Figura 3.3.2: Conversão e inversão da imagem de tecido com CPT. **A:** imagem primária colorida. **B:** imagem A em escala de cinza. **C:** imagem B invertida (brilhante). **D:** Imagem brilhante delimitada. **E:** imagem marcada e isolada das interferências da lâmina.

O programa mediu para cada célula identificada, parâmetros como, área nuclear, perímetro nuclear, proporção entre o maior e o menor diâmetro dos núcleos (razão LS), e o coeficiente de variação da área nuclear ($CVAN: \text{desvio padrão da área nuclear} / \text{área nuclear média} \times 100$) e forma nuclear (Figura 3.3.3) [WANG, 2005; NAGASHIMA, 1998]. Outras características como textura, intensidade e granulação do núcleo também foram medidas [CARPENTER, 2006; LAMPRECHT, SABATINI & CARPENTER, 2007].

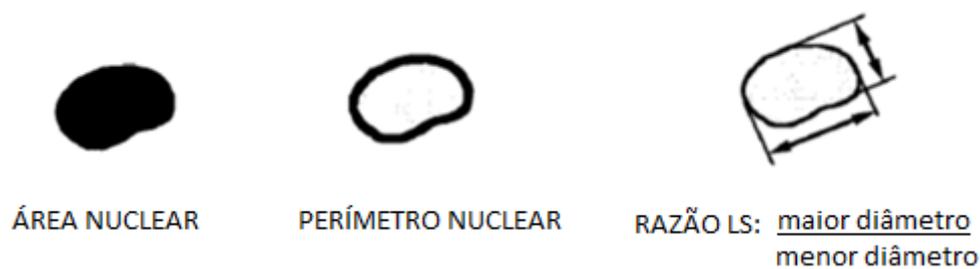


Figura 3.3.3: Ilustração dos parâmetros nucleares
Fonte: NAGASHIMA, 1998. LS: proporção entre o maior e o menor diâmetro dos núcleos.

Todos estes parâmetros foram estabelecidos por algoritmos criados pelo próprio *software* que os utilizaram para diferenciar o fenótipo positivo e negativo. O CP se apresenta em módulos, e esses módulos formam os algoritmos específicos para esse estudo. Esses algoritmos foram estabelecidos em uma sequência no CP. Cada fase desta sequência se desdobra em ações específicas de formação do algoritmo que será estabelecido para mensuração e formatação das imagens do banco de dados (Figura 3.3.4. e Tabela 3).

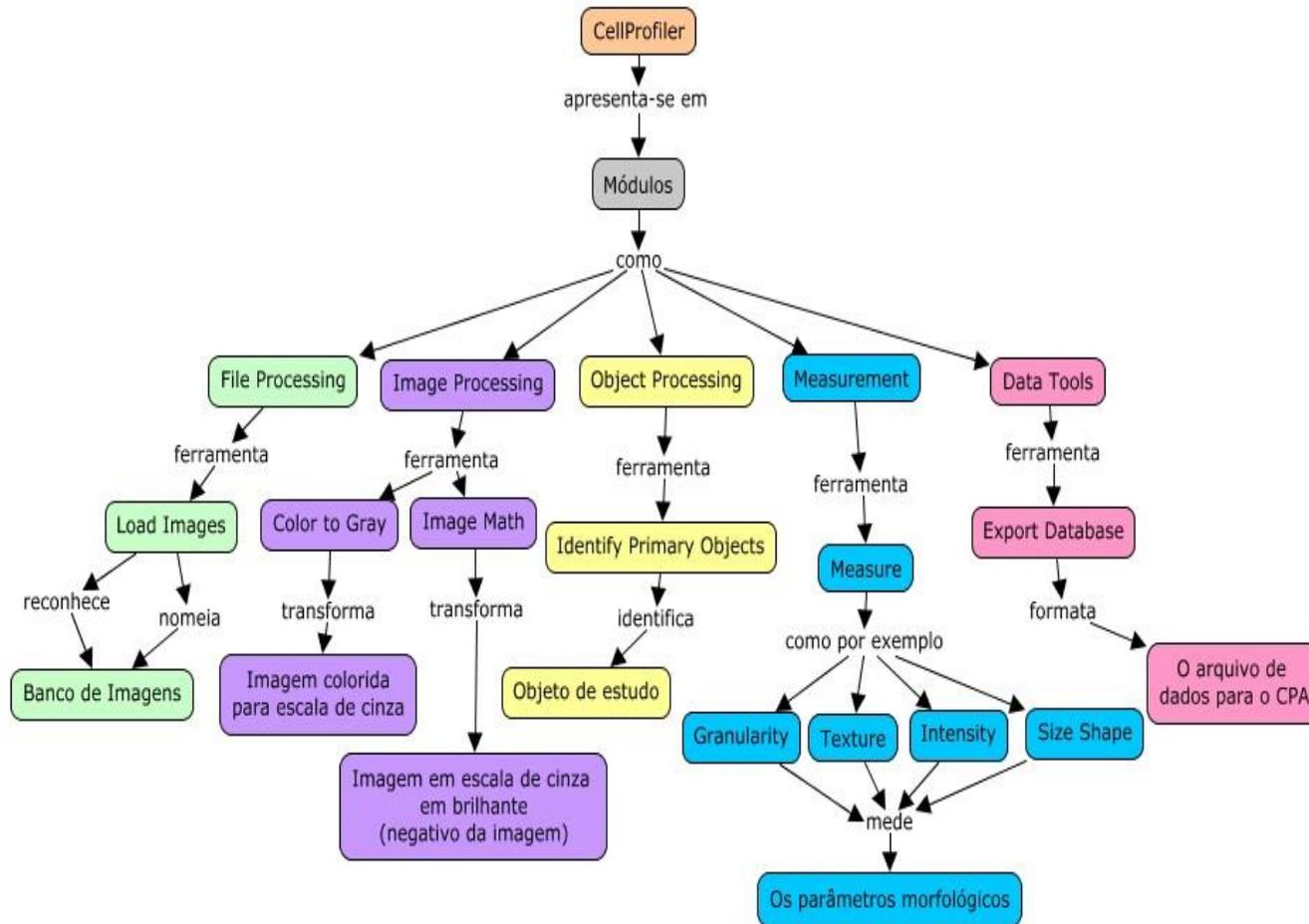


Figura 3.3.4: Ações específicas de cada fase do estabelecimento do algoritmo de mensuração e formatação do banco de dados de imagens.

Tabela 3: Programação do *CellProfiler*®

Modulo principal*	Modulo secundário	Ações
<i>EDIT</i>	<i>Browse for images</i>	Seleciona as imagens de interesse do seu arquivo original
<i>FILE PROCESSING</i>	<i>Load images</i>	Insere o parâmetro comum à todas as imagens (.bmp). Nomeia a imagem e define o padrão da pasta de entrada do seu arquivo
<i>IMAGE PROCESSING</i>	<i>Color to gray</i>	Transforma a imagem colorida em escala de cinza. Seleciona a imagem de entrada (colorida) nomeada anteriormente. Nomeia a imagem de saída (cinza).
<i>IMAGE PROCESSING</i>	<i>Image math</i>	Inverte a imagem cinza para brilhante (negativo). Seleciona a imagem de entrada (cinza) e Nomeia a imagem de saída invertida (brilhante)
<i>OBJECT PROCESSING</i>	<i>Identify primary objects</i>	Neste espaço o usuário seleciona a imagem de entrada (brilhante), Nomeia o objeto primário (núcleo). Insere o valor mínimo e máximo do tamanho do objeto a ser identificado (70-300). Seleciona o limiar estratégico em modo automático
<i>MEASUREMENT</i>	<i>Measure object size shape</i>	Seleciona o objeto primário nomeado anteriormente como núcleo.
<i>MEASUREMENT</i>	<i>Measure texture</i>	Seleciona a imagem a ser medida (brilhante). Seleciona o objeto (núcleo).
<i>MEASUREMENT</i>	<i>Measure image intensity</i>	Seleciona a imagem a ser medida (brilhante). Mede a intensidade somente do objeto selecionado (núcleo).
<i>MEASUREMENT</i>	<i>Measure image area occupied</i>	Seleciona a imagem binária a ser medida (brilhante).
<i>MEASUREMENT</i>	<i>Measure granularity</i>	Seleciona a imagem a ser medida (brilhante). Mantém as especificações originais do programa.
<i>VIEW OUTPUT SETTING</i>		Define o padrão da pasta de entrada, da pasta de saída. Nomeia a database. Seleciona o formato da database (matlab).
<i>DATA TOOLS</i>	<i>Export database</i>	Seleciona o tipo de databse (SQLite) para exportação para o CPA.

* Para cada modulo primário deve-se solicitar o *ajust modular* (+).

Após a mensuração dos parâmetros das imagens, os dados foram formatados pelo CP no formato *MATLAB* para ser reconhecido pelo CPA. Sendo assim, os dados foram exportados para análise no programa *CellProfilerAnalyst*®.

3.4 Análise dos parâmetros morfológicos no programa *CellProfilerAnalyst*®

Após a importação do banco de dados gerado pelo programa *CellProfiler*®, as células foram identificadas pelo *CellProfilerAnalyst*® que gerou um perfil citológico de cada célula. Esse perfil citológico consiste de um conjunto de números que descrevem as características das células. Em seguida, foram identificadas algumas células como positiva, por exemplo, que exibem o fenótipo de interesse e negativa, por exemplo, as células sem o fenótipo (Figura 3.4) [JONES, et al.; 2009]. Essa classificação das células de acordo com o parâmetro de interesse foi realizada conforme descrito por JONES, 2008.

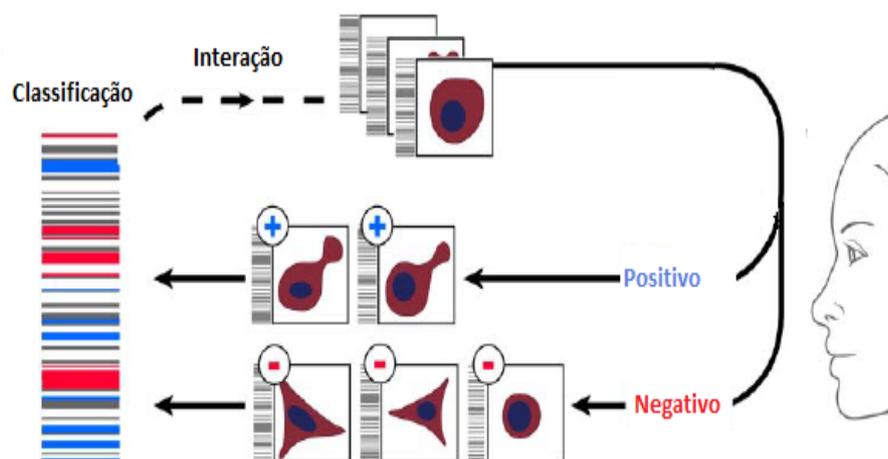


Figura 3.4.1: Princípio do treinamento do *Cell Profiler Analyst*®
Fonte: JONES, et al.; 2009

Após a exportação do banco de dados do *CellProfiler*® para o *CellProfilerAnalyst*® os fenótipos de interesse foram classificados. O treinamento se deu primeiramente com um pequeno lote de células de forma randômica (20 imagens), as quais foram escolhidas aleatoriamente pelo *software* como mostra a figura 3.4.2.

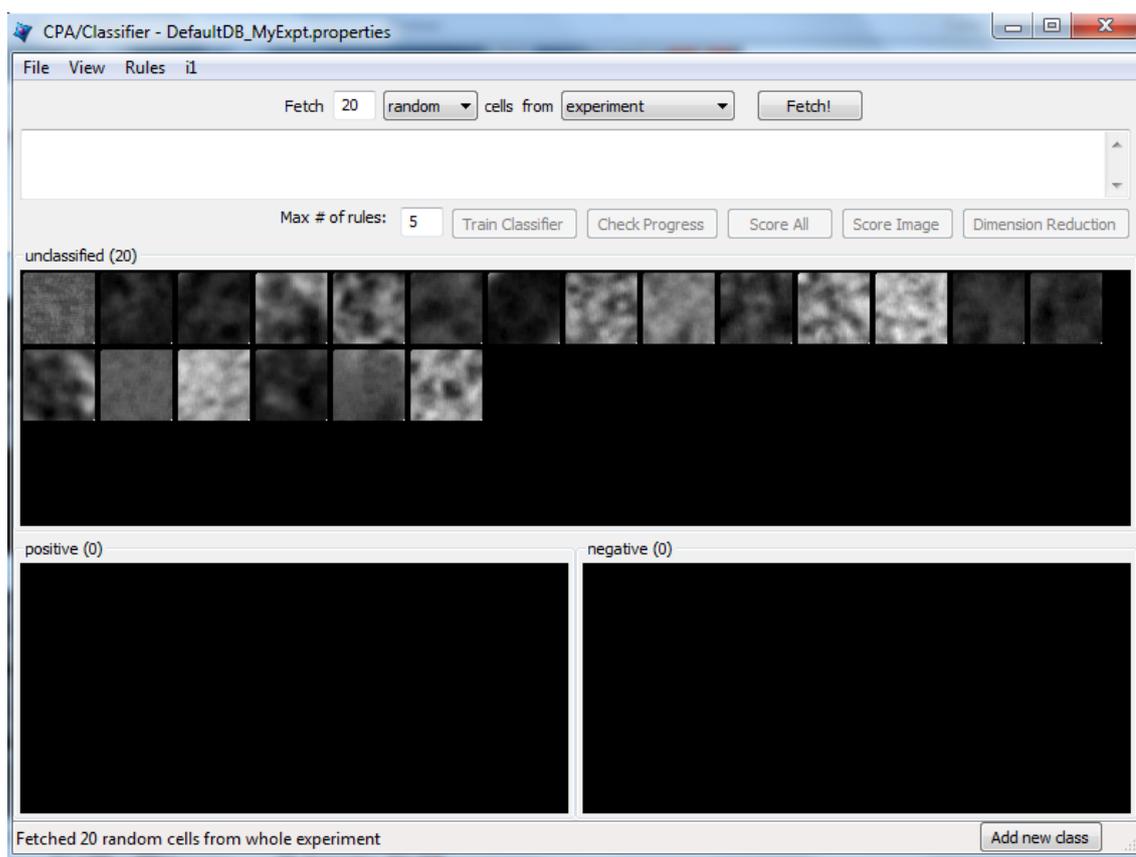


Figura 3.4.2: Seleção randômica de células para início do treinamento do CPA

Após a apresentação das 20 células, realizou-se a seleção das imagens, classificando-as como positivas (fenótipo papilífero) ou negativas (fenótipo normal/não papilífero). Essa seleção foi feita abrindo cada uma das 20 imagens e arrastando-as para os respectivos campos de treinamento do programa (Figura 3.4.3).

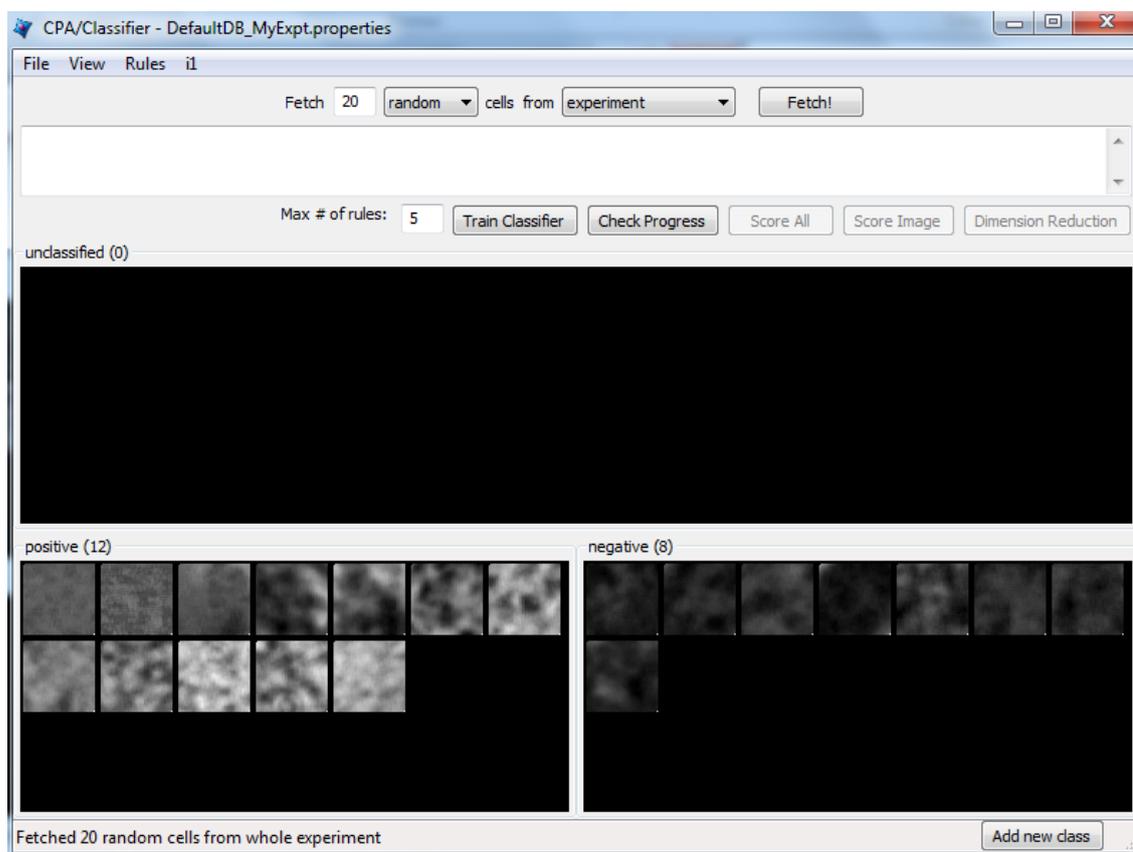


Figura 3.4.3: Classificação em fenótipo positivo e negativo das células seleccionadas na figura 3.4.2.

Em seguida foi realizado o primeiro treinamento utilizando o classificador do CPA. Após o primeiro treinamento, solicitou-se o fenótipo de interesse e classificou novamente as células como positivas ou negativas, corrigindo os erros de classificação, arrastando as imagens para o local correspondente ao seu fenótipo, refinando assim, o treinamento do CPA.

Esse processo foi repetido cinco vezes e em cada treinamento o CPA gerou uma regra que determina os parâmetros que serão utilizados pelo próprio *software* para definir entre fenótipo positivo ou negativo.

Após o treinamento foi confirmada a classificação feita pelo CPA através da visualização da marcação presente no objeto de estudo, como mostra a figura 3.4.4.

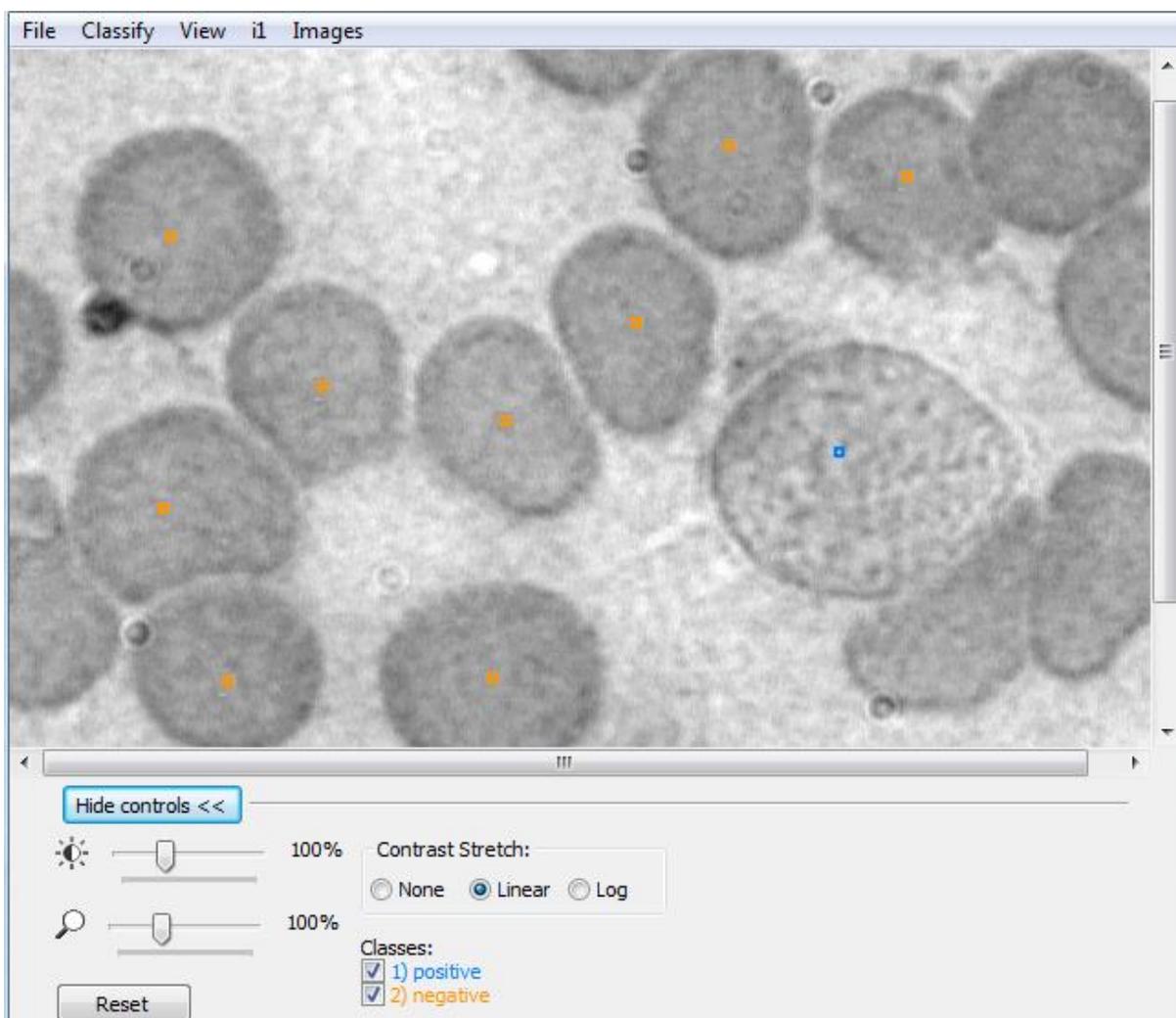


Figura 3.4.4: Reconhecimento da célula de fenótipo positivo (azul) e negativo (laranja) pelo *software*.

Em seguida avaliou-se a acurácia do processo pelo próprio programa. Foi alcançada uma acurácia mínima de 94,7%. Isso possibilitou classificar as demais imagens do banco de dados com esse software, garantindo que a classificação do banco de dados seja compatível com a avaliação histológica.

Além, para confirmarmos os resultados obtidos com o treinamento, foi feita uma seleção de 100 imagens pelo programa e em seguida solicitou o fenótipo positivo, como mostrado na figura 3.4.5. Todas as imagens foram abertas e somente duas células não correspondiam ao fenótipo de positivo como mostra na figura 3.4.6.

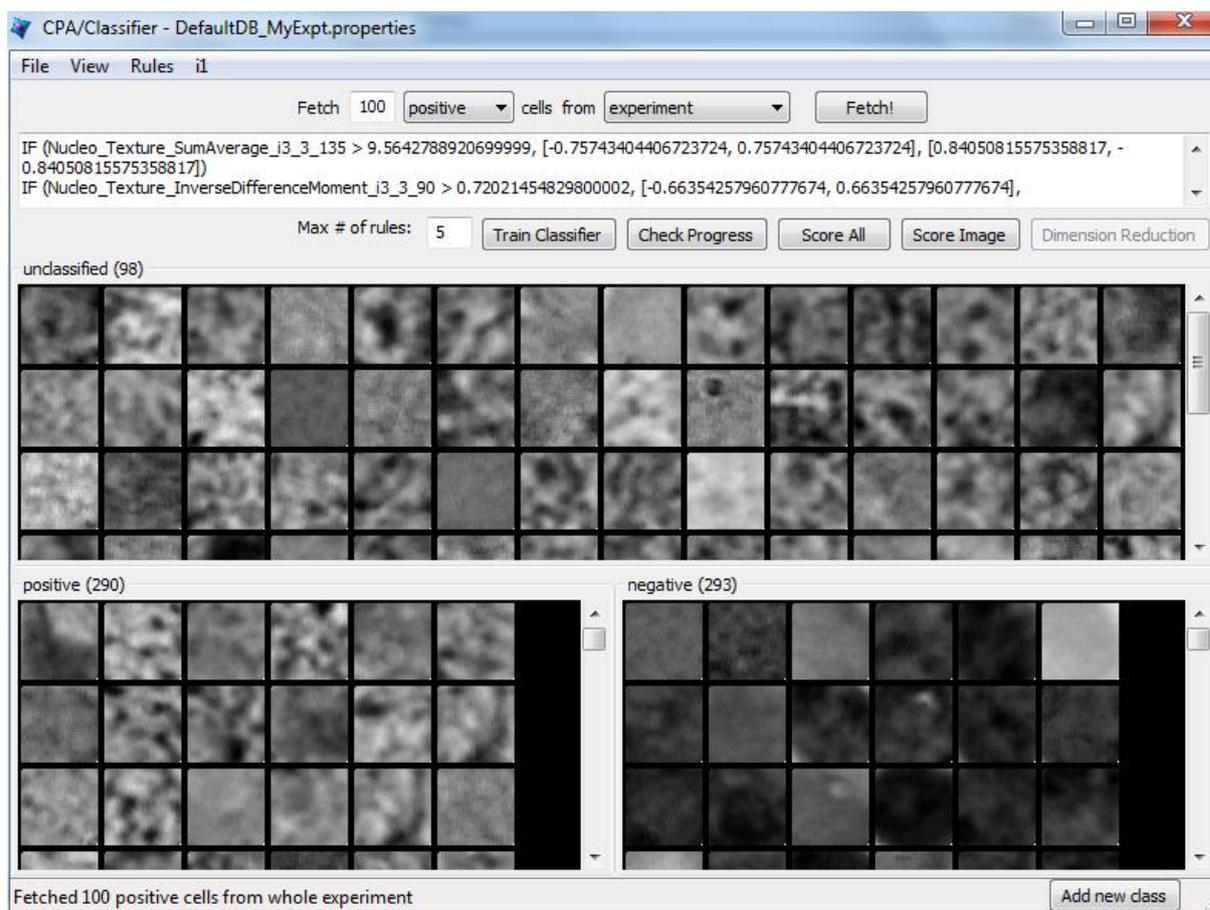


Figura 3.4.5: Seleção de 100 imagens positivas/papilíferas após o treinamento do CPA.

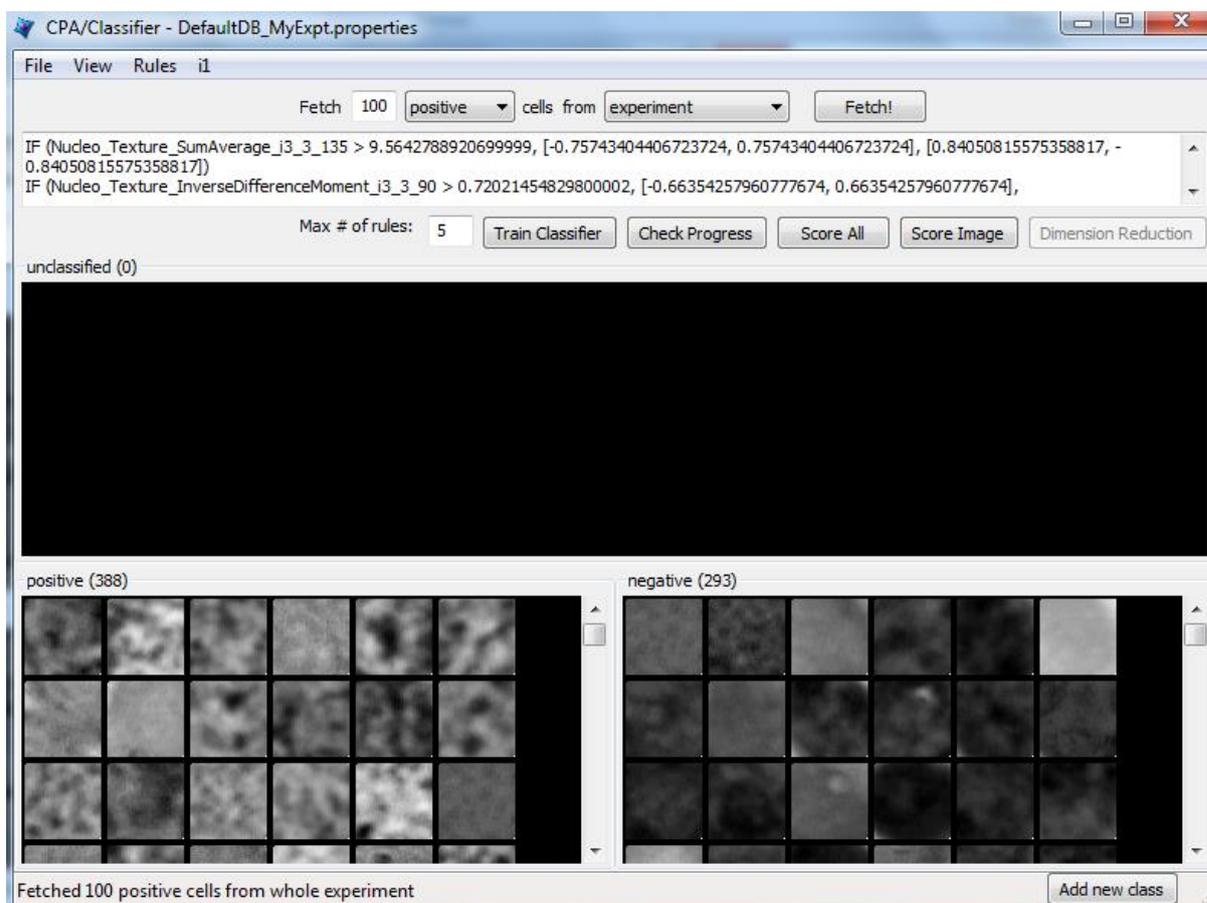


Figura 3.4.6: Classificação das 100 imagens positivas/papilíferas após o treinamento do CPA. **A:** imagens positivas. **B:** imagens negativas.

Outra seleção de 100 imagens foi feita pelo programa, porém agora, solicitou-se o fenótipo normal/não papilífero, como mostrado na figura 3.4.7.

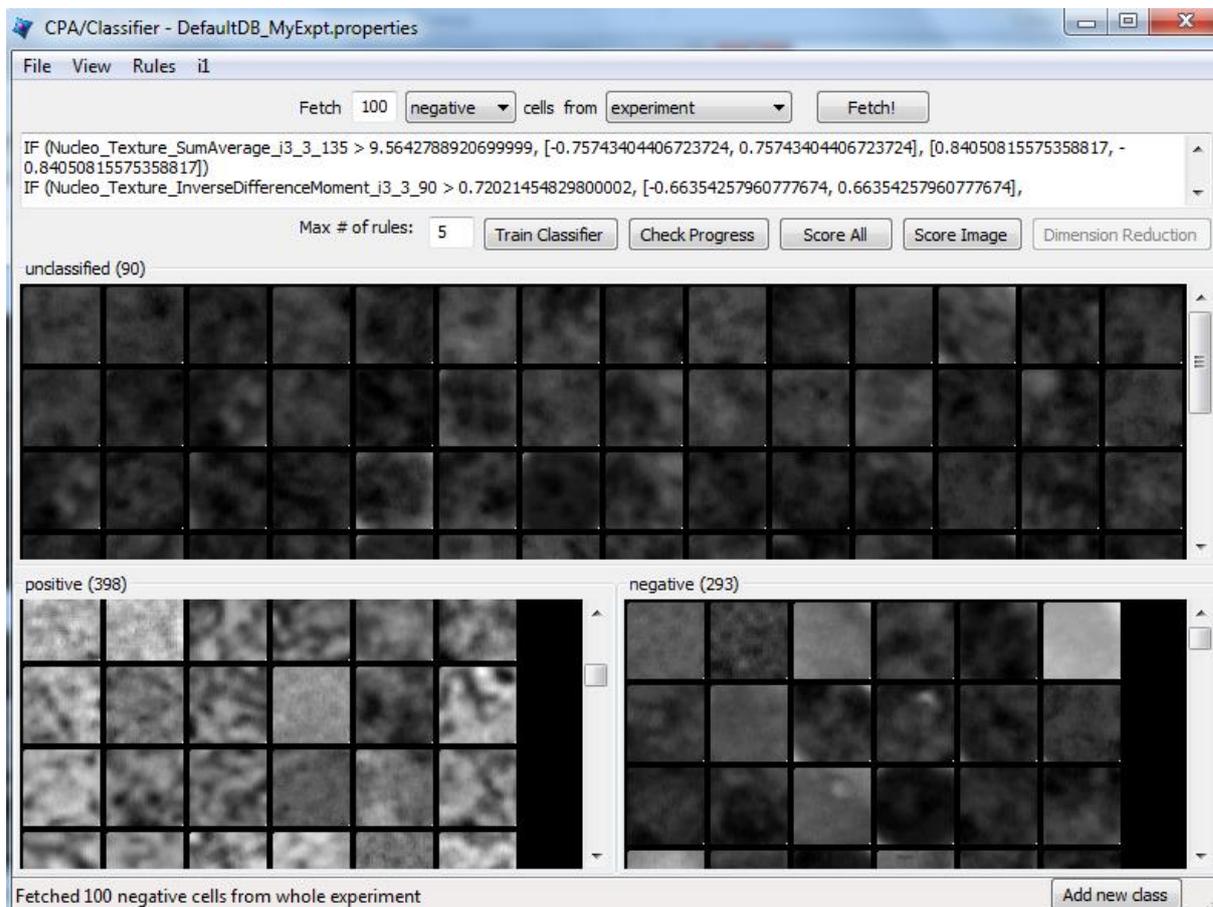


Figura 3.4.7: Seleção de 100 imagens negativas/normais-não papilíferas após o treinamento do CPA.

As imagens acima foram submetidas ao mesmo tratamento da seleção anteriormente citada e somente dez células não corresponderam ao fenótipo negativo como mostra na figura 3.4.8.

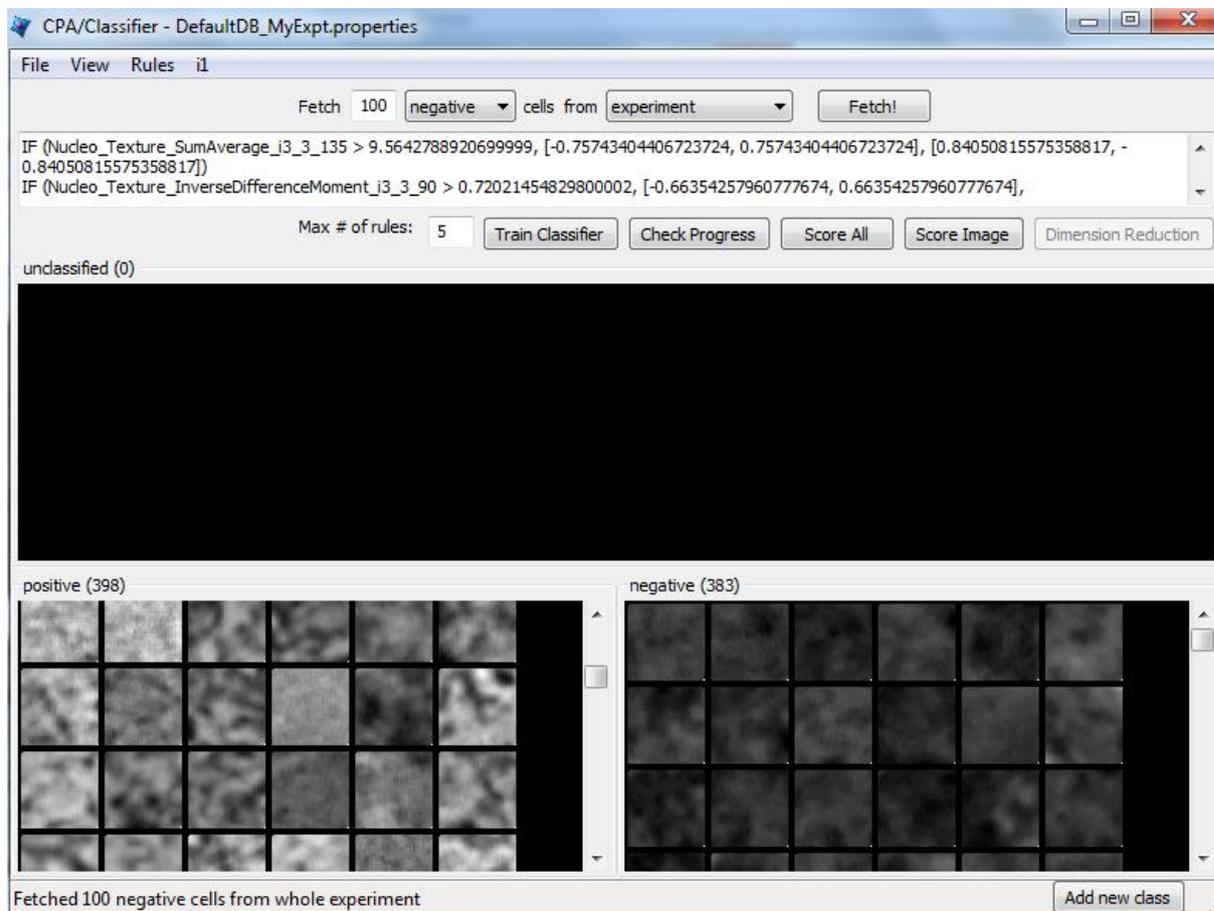


Figura 3.4.8: Classificação das 100 imagens negativas/normais-não papilíferas após o treinamento do CPA. **A:** seleção de imagens positivas. **B:** imagens negativas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado dessas seleções resultou em um valor equivalente aos valores obtidos durante o treinamento, confirmando a homogeneidade dos resultados quando solicitados.

A análise apresentou dentre os 560 núcleos classificados como positivos, 09 foram falsos positivo e dentre os 500 núcleos classificados como negativos 54 falsos negativo (Tabela 4).

A sensibilidade e especificidade do teste diagnóstico foram de 0,903 e 0,982 respectivamente. Com isso se obtém um valor preditivo positivo (VPP) de 0,98 e um valor preditivo negativo (VPN) de 0,90. Com esse resultado também é possível verificar que corresponde à uma razão de verossimilhança positivo (LR+) de 50,17 e uma razão de verossimilhança negativa (LR-) de 0,098.

Isso demonstra que o desempenho do teste diagnóstico foi adequado tanto para descartar uma doença, no caso da doença específica o CPT ou de diagnosticar a doença CPT.

Tabela 4: Sensibilidade e especificidade da padronização do *software*

	Positivos para carcinoma papilífero	Negativos para carcinoma papilífero
560 núcleos de carcinoma papilífero	506 (verdadeiro positivo)	54 (falso negativo)
500 núcleos normais da tireóide	09 (falso positivo)	491 (verdadeiro negativo)
Total 1060 núcleos	515 positivas	545 negativas

Apesar do número da amostra ser reduzido o número das imagens geradas foi satisfatório para alcançar um resultado confiável, semelhante ao observado no estudo de Wang e colaboradores, que apresentaram uma técnica de distinção entre os tipos nucleares do adenoma folicular e carcinoma folicular da tireóide, também utilizando um número de amostra reduzido.

5-CONCLUSÃO

Nos últimos 20 anos ocorreram avanços biológicos extraordinários impulsionados pelas novas ferramentas de análise de imagens biológicas, muitos dos quais dependem diretamente de métodos computacionais. O *CellProfiler*® consiste em um software projetado para melhorar usabilidade e funcionalidade, bem como a integração com outros softwares de imagem de acesso livre [ELICEIRI, et al.; 2012; KAMENSKY, et al.; 2011]. Além disso, é um programa que dispensa um operador altamente especializado em tecnologia da informação, podendo ser operado de forma simples e segura.

Nesse trabalho foi analisado restritamente o carcinoma papilífero da tireóide, obtendo um ótimo resultado quanto à exatidão das análises, e faz crer que o método é replicável para outros tipos histológicos de interesse, tendo um grande potencial a ser explorado em novas pesquisas.

Por fim é importante salientar que em nenhum momento é sugerido que o programa venha a substituir a análise do patologista, pelo contrário, na verdade, o grande potencial desse programa é justamente rastrear os possíveis casos suspeitos e direcioná-los ao patologista, uma vez que a análise pelo patologista é morosa e cansativa, alcançando algumas centenas de células, enquanto o *CellProfilerAnalyst*® pode avaliar milhares de células em curto espaço de tempo.

Além disso, o software pode ser usado para confirmação dos resultados obtidos pelo patologista, podendo ser uma ferramenta de confirmação do diagnóstico. O armazenamento digital em um HD pode dar celeridade e aumentar a eficiência do método diagnóstico, além de possibilitar uma revisão e confirmação de diagnósticos já feitos, dar mais precisão aos resultados, inclusive com aproveitamento médico legal e forense, compartilhar imagens e armazenar de forma digital por tempo indeterminado.

6 REFERÊNCIAS

ALI, S.Z.; CIBAS E.S. (Org.). **The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: definitions, criteria and explanatory notes**. New York: Springer, 2009.

ALILOUA, M.; KOVALEVB, V.; TAIMOURICA, V. Segmentation of cell nuclei in heterogeneous microscopy images: a reshapable templates approach. **Computerized Medical Imaging and Graphics**, v.37, p. 488-499, 2013.

ALMENDRO, V.; MARUSYK, A.; POLYAK, K. Cellular Heterogeneity and Molecular Evolution in Cancer. **Annual review of pathology**, v. 8, p.277–302, 2013.

AUGER, M., et al. Papillary Thyroid Carcinoma and Variants. In: ALI, S.Z.; CIBAS, E.S. **The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: definitions, criteria and explanatory notes**. New York: Springer, 2009, p.91-116.

CARPENTER, A. E., et al. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. **Genome Biology**, v. 7, n. 10, p. R100.1 – R100.11, 2006.

CHAN, J.K.C. Strict Criteria Should Be Applied in the Diagnosis of Encapsulated Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma. **American Society for Clinical Pathology**, v. 117, p.16-18, 2002.

DAVIES, L.; WELCH, H.G. Current Thyroid Cancer Trends in the United States. **JAMA Otolaryngology Head & Neck Surgery**, v.140, n.4, p. 317-322, 2014.

ELICEIRI, K.W., et al. Biological imaging software tools. **Nature Methods**, v.9, p. 697-712, 2012..

ESTRELA, F.; LEÃO, H.Z.; JOTZ, G.P. Anatomic relation between the external branch of the superior laryngeal nerve and the thyroid gland. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 77, n. 2, p. 249-258, 2011.

FAGIN, J.A.; MITSIADES, N. Molecular pathology of thyroid cancer: diagnostic and clinical implications. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 22, n. 6, p. 955–969, 2008.

FAQUIN, W.C., et al. Follicular Neoplasm, Hürthle CellType/Suspicious for a FollicularNeoplasm, Hürthle Cell Type.In: ALI, S.Z.; CIBAS, E.S. **The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: definitions, criteria and explanatory notes**. New York: Springer, 2009, p. 59-73.

GHARIB, H.; PAPINI, E. Thyroid Nodules: Clinical Importance, Assessment, and Treatment. **Endocrinology Metabolism Clinical of North American**, v. 36, p. 707–735, 2007.

GRIEBELER, M. L.; GHARIB, H. Thyroid nodules and câncer.In: BANDEIRA, F., et al. **Endocrinology and Diabetes:a problem-oriented approach**. New York: Springer, 2014, p.35-44.

GURCAN, M.N. Histopathological image analysis: a review. **IEEE Reviews on Biomedical Engineering**, v. 2, p. 147–171, 2009.

HEGEDUS, L. Clinical practice: the thyroid nodule. **New England Journal Medical**, v.351, n. 17, p.1764–71, 2004.

JONES, T.R. et al. CellProfiler Analyst: data exploration and analysis software for complex image-based screens. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 482, p. 1-16, 2008.

JONES, T.R. et al.Scoring diverse cellular morphologies in image-basedscreens with iterative feedback and machine learning. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.106, n.6, p.1826–1831, 2009.

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

LAMPRECHT, M.R.; SABATINI, D.M.; CARPENTER, A.E. CellProfiler™: free, versatile software for automated biological image analysis. **BioTechniques**, v. 42, p.71-75, 2007.

LEW, J.I.; et al. Fine Needle Aspiration of the Thyroid: Correlation with Final Histopathology in a Surgical Series of 797 Patients. **Journal of American College of Surgeons**, v. 213, n. 1, p. 188-194, 2011.

LJOSA, V.; CARPENTER, A.E. Introduction to the Quantitative Analysis of Two-Dimensional Fluorescence Microscopy Images for Cell-Based Screening. **PLoS Computational Biology**, v. 5, p. 1-10, 2009

MAREK, N. Thyroid nodules. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 28, p. 245–277, 2014.

MEIJER, G.A.; et al. Image analysis in clinical pathology. **Journal Clinical Pathology**, v. 50, p. 365-370, 1997.

MOHEBATI, A.; SHAHA, A.R. Anatomy of Thyroid and Parathyroid Glands and Neurovascular Relations. **Clinical Anatomy**, v. 25, p.19–31, 2012.

NAGASHIMA, T. Morphometry In the Cytologic Evaluation of Thyroid Follicular Lesions. **Cancer (cancer cytopathology)**, v.84, n.2, p.115-118.

NIKIFOROV, Y.I. Thyroid Carcinoma: Molecular Pathways and Therapeutic Targets. **Modern Pathology**, S. 2, p. S37–S43, 2008.

OMUR, O.; BARAN, Y. An update on molecular biology of thyroid cancers. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 90, p.233-252, 2014.

PELLEGRITI, G. et al. Worldwide Increasing Incidence of Thyroid Cancer: Update on Epidemiology and Risk Factors. **Journal of Cancer Epidemiology**, v.2013, p. 1-10, 2013.

RENSHAW, A.A. Focal Features of Papillary Carcinoma of the Thyroid in Fine-Needle Aspiration Material Are Strongly Associated With Papillary Carcinoma at Resection. **American Journal of Clinical Pathology**, v.118, p. 208-2010, 2002.

RITCHIE, J.E.; BALASUBRAMANIAN, S. Anatomy of the pituitary, thyroid, parathyroid and adrenal glands. **Surgery**, v. 29, n.9, p.403-407, 2011.

SINNA, E.A.; EZZAT, N. Diagnostic accuracy of fine needle aspiration cytology in thyroid lesions. **Journal of the Egyptian National Cancer Institute**, v.24, p. 63-70, 2012.

WANG, S.L., et al. Computerized nuclear morphometry in thyroid follicular neoplasms. **Pathology International**, v.55, p.703-706, 2005.

WANG, W.; OZOLEK, J. A.; ROHDE, G. K. Detection and Classification of Thyroid Follicular Lesions Based on Nuclear Structure from Histopathology Images. **Cytometry Part A**, v. 77^a, p. 485-494, 2010.

7 ANEXO:

7.1 Trabalho Apresentado no Congresso Brasileiro de Hemoterapia, Hematologia e Terapia Celular, 2013 –Brasília - DF

A CONTAGEM DIFERENCIAL DE GLÓBULOS REPRODUTÍVEL SEM CITÔMETRO OU MARCADORES ESPECÍFICOS COMO ALTERNATIVA PARA UMA CONTAGEM MANUAL

Hosken B¹, Bitencourt R¹, Tozetti PB¹, Neto EP¹, Falqueto T¹, Andrade TU¹, Endringer DC¹, LenzD¹

¹Universidade Vila Velha

Introdução: A contagem de glóbulos diferencial (DBCC) representa uma parte substancial na rotina clínica diária. Uma DBCC é conduzida manualmente ou usando técnicas de citometria e marcadores fluorescentes específicos. Citometria é de custo elevado. Uma contagem de células manual é tedioso, demorado e não é reproduzível. **Objetivo:** realizar um sistema automatizado de análise de alto rendimento de imagens de microscopia de luz de leucócitos com coloração inespecífica (hematoxilina-eosina, HE) e uma posterior classificação dos subgrupos (linfócitos, monócitos e neutrófilos). **Metodologia:** Amostras de sangue periférico coradas das com HE e analisadas em microscópio óptico(MO). Outra alíquota foi utilizada para a contagem de leucócitos, numa câmara de Neubauer e uma outra foi enviada a um laboratório de análises clínicas. Feitas 300 imagens, utilizando um MO e uma câmera digital e armazenadas em HD.Foi utilizada para a análise de imagem, o software livre Cellprofiler (CP) 2.0. Primeiro a análise foi realizada por contagem diferencial de leucócitos. A janela principal do CP permite ao usuário programar os pipelines (módulos) que serão de interesse para pesquisa. Cada conduta executa uma tarefa específica na imagem. Os módulos a seguir foram utilizados para o programa de análise: O arquivo de dados gerados durante a análise fornece dados morfológicos e intensidade para cada objeto identificado. Posteriormente, as amostras foram avaliadas estatisticamente. Dentro do arquivo excel fornecida pelo CP, cada linha representa um objeto identificado. Cada coluna representa um parâmetro de quantificação. Um citologista experiente e descreveu cada tipo de células (linfócitos, monócitos, neutrófilos) com base nas imagens dos objetos identificados e a imagem original. Neste ponto, foram excluídos os artefatos não celulares. Após identificação das células, o software Tanagra foi usado para encontrar os seus parâmetros, com os quais uma previsão das células de origens mais eficaz e preciso. Usando os parâmetros encontrados, gráficos foram feitos. Os melhores parâmetros e intervalos para cada tipo de célula de três amostras e uma média foram obtidos para estes parâmetros. Um filtro foi criado utilizando esta média, este filtro foi feito no programa Java SE. **Resultados:** Durante a análise das imagens de cor CP foram convertidos em tons de cinza e as intensidades foram invertidas, resultando em objetos brilhantes e fundo escuro. Subsequentemente, os objetos de interesse (leucócitos) foram identificados CP. Para cada identificação, parâmetros morfológicos e intensidade foram quantificados. Para a análise de imagem, foi utilizado o CP. A posterior classificação dos subtipos de leucócitos foi realizada utilizando o software Tanagra. Contagem de leucócitos por volume foi realizada por análise de imagem das amostras numa câmara de Neubauer. **Conclusão:** Todos os resultados foram comparados com os dos laboratórios hematológicos. Houve uma grande similaridade entre os resultados obtidos por ambos os métodos, $R^2 = 0,95$ para a contagem diferencial, e $r^2 = 0,89$ para a contagem total. Pode-se concluir que o DBCC usando MO, de corante não específico e análise de imagem avançado é precisa, reproduzível e menos dispendiosa quando comparada com outras técnicas. Os resultados mostraram uma forte correlação quando comparado aos métodos tradicionais.

7.2 Trabalhos Apresentado no Congresso Brasileiro de Hemoterapia, Hematologia e Terapia Celular, 2013 –Brasília - DF

CLASSIFICAÇÃO FENOTÍPICA DE CÉLULAS PELOS PROGRAMAS LIVRES CELL PROFILERE CELL PROFILER ANALYST BASEADAS NAS ANÁLISES COM PROGRAMA PAGO FEITO POR HAMILTON 2007

Hosken B¹, Bitencourt R¹, Moscon L¹, Cordeiro SG¹, Hamilton NA², LenzD¹
¹Universidade Vila Velha, ²University of Queensland

Introdução: Foi proposto um software livre para análise de imagem, CellProfiler (CP). Este programa é capaz de realizar análise de imagem reprodutível, de alto rendimento e definido pelo usuário. Além disso e de fácil manuseio. O CP tem sido amplamente utilizado para estudos biológicos. Em 2008, um novo software livre, CellProfilerAnalyst (CPA), foi liberado. Supõe-se para analisar as análises feitas anteriormente com CP. CPA está equipada com um classificador, entre outros, isto é, utilizando os dois programas livres, para uma classificação diagnóstica celular. Hamilton em 2007 já desenvolveu algoritmos para identificar e classificar diferentes proteínas celulares usando um software de alto custo e ou software que tinha de ser programado por especialistas de tecnologia de informação. Considerando que o nosso grupo produziram provas recentemente, que CP produz resultados comparáveis àqueles de software comercialmente disponível. Portanto, o nosso grupo poderia fazer a classificação de proteínas no trabalho citado usando os softwares livres CP e CPA. O objetivo do estudo era, portanto, comparar os resultados de Hamilton com os do nosso grupo sendo os resultados pelo menos comparáveis, a vantagem de CP e CPA seria óbvio. **Metodologia:** Foi utilizado um software gratuito CP e CPA versões CP r 1.710 e CPA r 11.710. As imagens analisadas para o presente estudo foram feitas e analisadas anteriormente por Hamilton e cedidas pelo mesmo. Para cada proteína de uma análise separada foi realizada. No entanto, exceto para o Golgi, o mesmo algoritmo foi utilizado ao longo de todas as análises. Durante cada análise um arquivo de dados foi criado automaticamente pelo software. Os dois arquivos foram fundidos (por exemplo, núcleo e Golgi, Retículo Endoplasmático e citoplasma). Exportar-se os arquivos mesclados para a análise posterior com CPA que classifica as duas classes de uma só vez. O progresso da aprendizagem de máquina pode ser verificado com o “progresscheck”. Após a criação de um conjunto de treinamento de pelo menos 50 células por classe, o usuário ordenou o programa exibir 100 células de cada classe. Com os falsos positivos e negativos, foram calculados a sensibilidade e especificidade. **Resultados:** O presente estudo teve como objetivo comparar os resultados de Hamilton com os de nosso trabalho. Hamilton produziu uma elevada sensibilidade e especificidade. Diferente de Hamilton, um software livre foi utilizado para a análise e classificação de imagem. O software foi utilizado por biólogos, sem conhecimento profundo em informática. Usando CP analisamos as mesmas imagens fornecidas por Hamilton. As proteínas foram identificadas e classificadas com êxito. A diferenciação e análise estatística subsequente foram realizadas com CPA. O programa de treinamento tem alcançado resultados significativos, com sensibilidade e especificidade média de 0,9802 e especificidade média de 0,9741. **Discussão:** Usando CP e software livre versátil, analisamos as mesmas imagens fornecidas por Hamilton. As proteínas foram identificadas e classificadas com êxito. O programa teve resultados com sensibilidade média de 0,9802 e especificidade média de 0,9741. Software utilizado nesta pesquisa é gratuito. Provavelmente o computador nunca será uma ferramenta para diagnosticar, mas é um bom método para confirmar o diagnóstico de um patologista.

7.3 Trabalhos Apresentado no Congresso Brasileiro de Hemoterapia, Hematologia e Terapia Celular, 2013 –Brasília - DF

CELL PROFILER: FERRAMENTA PARA PADRONIZAÇÃO DE DIAGNÓSTICO DE LINFOMADIFUSO DE GRANDES CÉLULAS

Hosken B¹, Bitencourt R¹, Cardoso L¹, Buzin A¹, LenzD¹

¹Universidade Vila Velha,

Introdução: A busca por diagnósticos mais precisos muitas vezes esbarra no alto custo dos exames existentes. Os métodos de citometria, por exemplo, são relativamente caros e por muitas vezes inviáveis em muitos serviços de saúde. Já as análises por microscopia observador dependente é morosa, tediosa e insipiente quanto ao número de células analisadas, resumindo a algumas centenas. Portanto, desenvolver métodos eficientes e baratos que possam ser replicáveis e de simples manuseio podem melhorar a qualidade de vida, auxiliar no diagnóstico precoce em qualquer tipo de serviço de saúde, reduzindo custos e podendo diminuir a morbi-mortalidade. Assim, aplicação de programas de reconhecimento de padrões, como o Cell Profiler®, para a interpretação da coloração histológica está revolucionando a forma de analisar a heterogeneidade fenotípica. Esse programa é software de análise de imagem modular de livre acesso, capaz de analisar milhares de células em poucos minutos e potencialmente replicável. O software contém métodos já desenvolvidos para muitos tipos de células, além de satisfazer as seguintes necessidades: algoritmos avançados de análise de imagens que são capazes de identificar com precisão as células aglomeradas; uma concepção modular, flexível, permitindo a análise de novos ensaios e fenótipos e uma interface amigável. **OBJETIVO:** Padronizar o programa Cell Profiler® para identificação das características morfológicas subcelulares de linfoma difuso de grandes células B (LDGCB). **Metodologia:** O tecido enviado para citologia será depositado em uma lâmina de vidro, fixado e corado por hematoxilina e eosina para observação no microscópio óptico. As imagens serão salvas como, sendo catalogadas e armazenadas em um banco de dados digital. A avaliação morfológica está baseada na classificação WHO da Organização Mundial de Saúde para o diagnóstico de LDGCB. Controles negativos serão utilizados durante toda análise. Os parâmetros morfológicos subcelulares serão coletados no Cell Profiler® e o programa medirá um grande número de parâmetros para cada célula identificada ou compartimento subcelular, como área, perímetro, solidez, fator de forma, extensão, número de Euler, excentricidade, orientação e menor comprimento do eixo principal. Após a análise das imagens, os dados serão exportados para um banco de dados para análise no programa Cell Profiler Analyst® e as células de interesse serão identificadas através da classificação das células como positivas ou negativas para o parâmetro de interesse. **Conclusão:** o desenvolvimento de padrões de análise utilizando o programa analítico Cell Profiler pode ser uma alternativa viável e precisa no diagnóstico e rastreamento de inúmeras doenças, propiciando um diagnóstico de alta precisão, de baixo custo, rápido, reprodutível, arquivo médico legal, compartilhamento de imagens e armazenamento de forma digital.

