

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

**UTILIZAÇÃO DO CELLPROFILER COMO FERRAMENTA NO  
DIAGNÓSTICO CITOPATOLÓGICO DE CÉLULAS DE COLO DE  
ÚTERO**

**LEONARDO MOREIRA MOSCON**

**VILA VELHA  
JULHO / 2014**

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

**UTILIZAÇÃO DO CELLPROFILER COMO FERRAMENTA NO  
DIAGNÓSTICO CITOPATOLÓGICO DE CÉLULAS DE COLO DE  
ÚTERO**

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

**LEONARDO MOREIRA MOSCON**

**VILA VELHA**  
**JULHO / 2014**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

M896u Moscon, Leonardo Moreira.

Utilização do cellprofiler como ferramenta no diagnóstico citopatológico de células de colo de útero / Leonardo Moreira Moscon. – 2014.

28 f.: il.

Orientador: Dominik Lenz.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Vila Velha, 2014.

Inclui bibliografias.

1.Útero – Doenças - Diagnóstico. 2. Colo uterino. 3. Diagnóstico por imagem. 4. Esfregaço vaginal. I. Lenz, Dominik. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 616.99466

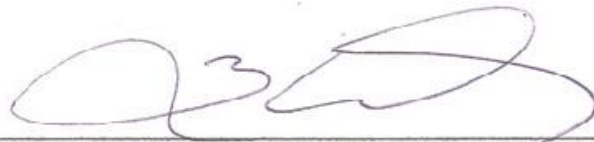
**LEONARDO MOREIRA MOSCON**

**UTILIZAÇÃO DO CELLPROFILER COMO FERRAMENTA NO DIAGNÓSTICO  
CITOPATOLÓGICO DE CÉLULAS DE COLO DE ÚTERO**

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

Aprovada em 25 de julho 2014,

Banca Examinadora:



---

**Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira - UFES**



---

**Prof. Dr. Fábio Ribeiro Braga - UVV**



---

**Prof. Dr. Dominik Lenz - UVV**

(Orientador)

“As pessoas felizes lembram o passado com gratidão,  
alegram-se com o presente e encaram o futuro sem medo.”

Epicuro

Agradecimentos à Fundação de Amparo a Pesquisa do Espírito Santo (FAPES), pela bolsa de estudos e financiamento deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, pois se não fosse da vontade dele nada disso seria possível.

Aos meus pais, pelos ensinamentos da vida, valores e educação.

A todos os professores do Mestrado, pela competência, pelos ensinamentos e pela amizade.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Dominik Lenz por desde o início acreditar em mim, pela amizade e ensinamentos.

À minha esposa Claudilene, pelo amor, companheirismo e compreensão que sempre teve comigo, pelo apoio e por nunca me deixar desistir mesmo quando parecia ser impossível.

Ao Prof. Dr. Tadeu Uggere de Andrade pela oportunidade e compreensão.

Aos colegas do mestrado, principalmente Rogério Piontkowski pela grande colaboração para a realização deste estudo.

## RESUMO

MOSCON, Leonardo Moreira, M.Sc., Universidade Vila Velha – ES, julho de 2014.  
**Utilização do cellprofiler como ferramenta no diagnóstico citopatológico de células de colo de útero.** Orientador: Dominik Lenz.

Tendo em vista o aumento da incidência do câncer de colo de útero no Brasil e no mundo, novas técnicas complementares vêm sendo estudadas para auxiliar os exames citopatológicos, a citometria de imagem automatizada tem demonstrado ser um método com elevadas taxas de sensibilidade e especificidade e de baixo custo podendo ser utilizado no diagnóstico citológico. O objetivo deste trabalho foi verificar o diagnóstico da citopatologia por imagem de células de colo de útero de forma reprodutível e automatizada utilizando programa livre em lâminas coradas por papanicolaou. Este estudo foi dividido em 2 ensaios experimentais, foram obtidas 15 amostras de lâminas de células de colo de útero, no ensaio experimental 01, coradas pela técnica de Papanicolaou e diagnóstico conhecido. As amostras foram divididas em 3 grupos de 5 lâminas cada: células normais (CN), células com alterações de baixo grau (BG) e células com alterações de alto grau (AG). Imagens celulares foram produzidas criando um banco de dados de 167 imagens que analisadas pelo cellprofiler utilizando algoritmo desenvolvido permitiu a identificação morfológica nuclear e citoplasmática e determinação de medidas quantitativas para cada imagem. Com os dados numéricos gerados o cellprofiler analyst (CPA) foi treinado para classificar automaticamente os 3 tipos de classes celulares. No ensaio experimental 02 a partir da amostra de 30 lâminas foram produzidas 244 imagens de 885 células que foram classificadas com o CPA e comparadas com a citopatologia. Foram observados elevadas taxas de especificidade e sensibilidade nos grupos: CN-BG (99%,99%) e CN-AG (98%,97%) respectivamente enquanto que a especificidade e sensibilidade no grupo BG-AG foi (78%, 79%) respectivamente. O presente estudo baseou-se na identificação de um método de diagnóstico e diferenciação celular automatizado utilizando software livre. Neste contexto, os benefícios para a população inclusa neste estudo ainda foram experimentais, mas visualizaram sua aplicação em rotinas laboratoriais a médio e longo prazo.

**Palavras-chave:** Papanicolaou, células de colo de útero, cellprofiler, citometria de imagem automatizado.



## ABSTRACT

The incidence of cervical cancer in Brazil and the world is increasing. New complementary techniques have been developed to verify the diagnosis of cytopathology. Image cytometry has proven high rates of sensitivity and specificity and low cost and can be used in cytological diagnosis. The objective of this study was to perform an automated reproducible analysis of cervix cells using cells stained with Papanicolaou and free software. This study was divided into two experimental tests, 15 samples of layers of cells of the cervix were obtained in 01 experimental protocol, stained by the Papanicolaou technique and known diagnosis. The samples were divided into 3 groups of 5 each laminae: normal cells (CN), cells with low grade alterations (BG) and cells with high grade alterations (GA). Cell images were produced by creating a database of 167 images analyzed by cellprofiler identifying nuclei and cytoplasm of each cell and quantifying numerous parameters for each object respectively. With the numerical data generated cellprofiler the analyst has been trained to automatically identify and differ three classes of cells. In the experimental protocol 02 from the sample of 30 slides were produced 244 images from 885 cells that were classified with the CPA and compared with the diagnosis of cytopathology. CN-BG (99%, 99%) and CN-Ag (98%, 97%) respectively, while the specificity and sensitivity to BG-AG group was (78% 79: high levels of specificity and sensitivity were observed in the groups %) respectively. The present study was based on the identification of diagnostic and automated cell differentiation using free software. In this context, the benefits for the population included in this study were still experimental, but viewed their application in laboratory routines in the medium and long term.

**Key words:** Pap smear, cervical cells, cellprofiler, automated image cytometry.

## SUMÁRIO

**RESUMO**

**ABSTRACT**

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>15</b>
2.1 ENSAIO EXPERIMENTAL 01 .....	15
2.1.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	15
2.1.2 PRODUÇÃO DE IMAGEM CELULAR .....	15
2.1.3 DESENVOLVIMENTO DO ALGORITMO.....	15
2.1.4 TREINAMENTO DO CLASSIFICADOR .....	18
2.1.5 CÁLCULO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE .....	19
2.2 ENSAIO EXPERIMENTAL 02.....	19
2.2.1 CLASSIFICAÇÃO CELULAR E DIAGNÓSTICO AUTOMATIZADO .....	19
2.3 LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....	20
<b>3 RESULTADOS.....</b>	<b>21</b>
3.1 CLASSIFICAÇÃO CELULAR E DIAGNÓSTICO AUTOMATIZADO .....	21
<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>24</b>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>6 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>28</b>

## ENCARTE DE PUBLICAÇÃO

### Utilização do cellprofiler como ferramenta no diagnóstico citopatológico de células de colo de útero

Leonardo Moreira Moscon<sup>a</sup>, Tadeu Uggere de Andrade<sup>a</sup>, Denise Coutinho Endringer<sup>a</sup>, Dominik Lenz<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Farmácia, Universidade Vila Velha, Espírito Santo, Brasil

\*Endereço para correspondência

#### **Correspondência:**

Prof. Dr. Dominik Lenz

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Vila Velha / UVV-ES. Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, Vila Velha, Espírito Santo, Brasil, 29102-770.

Tel.: 55-27-30636636; Fax: 55-27-988122630; e-mail: [dominik.lenz@uvv.br](mailto:dominik.lenz@uvv.br)

## 1 INTRODUÇÃO

A incidência de câncer de colo de útero vem aumentando ao longo dos anos, sendo a principal causa de mortalidade e considerado um problema de saúde pública mundial (Adefuye & Sales, 2012). Segundo Lucena et al. (2011) é o terceiro tipo de câncer mais prevalente no mundo, e no Brasil tem uma incidência anual de 18 casos para cada 100 mil mulheres. Estratégias de combate a essa doença e seus fatores de risco são adotadas no país, na qual exames são ofertados gratuitamente à população feminina considerada de maior risco (Dias et al., 2010).

Os fatores de riscos associados ao câncer de colo de útero (DCU), na maioria das vezes, estão relacionados com a presença de infecção, sendo a principal associada ao papilomavírus humano (HPV), fumo, número de parceiros sexuais, condições sócio-econômicas e início precoce da atividade sexual (Datusus, 2014). O DCU é uma displasia celular que começa no cérvix, a parte baixa do útero, de progressão lenta, portanto o estudo e conhecimento aprofundado dos fatores de risco ligados ao DCU permitem a prevenção primária e secundária desta doença (Lucena et al., 2011).

A educação sexual e o incentivo ao uso de preservativos são medidas de prevenção primária adotadas no país a bastante tempo, em 2014 o Ministério da Saúde lançou como meta a vacinação de 80% da população feminina com idade entre 9 e 11 anos contra o HPV, utilizando a vacina quadrivalente, que confere proteção contra quatro subtipos (6, 11, 16 e 18) do HPV, com eficácia de 98%, conforme recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS), visto que os subtipos 16 e 18 são responsáveis por cerca de 70% dos casos de câncer de colo do útero em todo mundo (Americo, 2014).

A prevenção secundária do DCU consiste em estratégias de diagnóstico precoce de lesões de colo de útero antes de se tornarem invasivas através de técnicas de rastreamento, possibilitando assim um considerável aumento na probabilidade de cura (Pinho & Junior, 2003). No Brasil foi instituído o exame citopatológico de

Papanicolaou como principal instrumento de detecção precoce deste tipo de câncer, em 1988, pelo Ministério da Saúde (MS), por meio do Instituto Nacional do Câncer (Hackenhaar et al., 2006; INCA, 2013).

O exame citopatológico conhecido como Papanicolaou é uma técnica de detecção para diagnóstico precoce do câncer cérvico-uterino, de baixo custo, e estabelece um diagnóstico preciso que poderá ou não estar de acordo com outras provas diagnósticas, principalmente com estudos histopatológicos que irão demonstrar a presença ou não de lesões pré-cancerosas, sendo assim o exame tem um papel preponderante na prevenção (Carvalho, 1993).

Diversos estudos vêm mostrando importante papel do exame de Papanicolaou na diminuição da incidência, mortalidade e morbidade de mulheres entre 25 e 59 anos ou que tenham iniciado atividade sexual antes desta faixa etária (Coskun et al., 2013; Cohen & Coco, 2014). Entretanto estudos como Oliveira et al. (2010), demonstram que, no Brasil, embora a adesão e o conhecimento ao exame tenham sido relativamente altos, ainda são insuficientes para produzirem impacto na redução das taxas de incidência e mortalidade por câncer do colo uterino na população feminina.

A citopatologia ainda é considerada ideal, na nossa população, para o rastreamento do câncer do colo do útero, entretanto a taxa de falso negativo da citopatologia pode variar até 30% na dependência da subjetividade (intra e inter observadores) e por vários fatores, desde a coleta do material, fixação e coloração da lâmina, leitura do esfregaço e, finalmente, a interpretação do exame. A sensibilidade da citopatologia varia entre os diferentes estudos, mas pode ser considerada em torno de 70% (Eliseu, 2008).

Para um teste ser escolhido para rastreamento é necessário ter alta sensibilidade. O exame de Papanicolaou é descrito como tendo sensibilidade de 30% a 95% (Mat-Isa et al., 2008) . No entanto, os resultados falso-negativos são responsáveis por cerca de 10% dos casos de câncer invasivo que progridem a partir de lesões pré-neoplásicas não detectadas em exames anteriores (Pinho & França Junior, 2003).

Técnicas como o teste de Papanicolaou mesmo consideradas atuais, apresentam baixa sensibilidade e reprodutibilidade, visto que o exame citológico usualmente utiliza a inspeção visual humana, que limita o diagnóstico de forma subjetiva e qualitativa (Gerstner et al., 2006). A citometria de imagem é uma das novas tecnologias que vem sendo utilizada com sucesso em países desenvolvidos, como complemento para análises laboratoriais de rotina (Gonçalves et al., 2007; Carpenter et al., 2006).

Estudos envolvendo a citometria de imagem e tentativas de automatizar a análise visual celular começaram a algumas décadas em busca de resultados quantitativos, reprodutíveis e de alta velocidade. Com isso numerosos programas de computador comerciais e livres foram desenvolvidos para análise de imagens, mas muitos deles caros ou específicos demais, ou seja, com um único propósito, ou ainda mesmo que livre, porém difíceis de programar exigindo do pesquisador conhecimentos específicos de programação (Lamprecht et al., 2007). Tendo em vista essa grande e crescente necessidade dos pesquisadores foi criado o Cellprofiler, um programa gratuito e de código aberto capaz de promover análises de imagens automatizadas de forma precisa e de fácil utilização (Kamentsky et al., 2011).

Goda et al. (2013) em um estudo recente utiliza a citometria de imagem automatizada e de alta velocidade para a detecção celular de câncer de mama com taxas de falso positivo de uma em um milhão. Meng et al. (2013) utiliza a aneuploidia do DNA como biomarcador de câncer e faz um estudo comparativo entre o diagnóstico citológico convencional e utilizando a citometria de imagem automatizada obtendo elevadas taxas sensibilidade e especificidade. Ambos os estudos mostram que a citometria de imagem automatizada é um método simples, eficaz e de baixo custo podendo ser utilizado no diagnóstico citológico.

O presente estudo realizou o exame citopatológico de Papanicolaou de forma quantitativa e automatizada utilizando um programa de análise de imagens livre a partir do treinamento do mesmo para diagnosticar as diferentes classes de células de colo de útero com elevado grau de sensibilidade e especificidade. Portanto, o objetivo deste estudo foi verificar o diagnóstico da citopatologia por imagem de

células de colo de útero de forma reprodutível e automatizada utilizando programa livre em lâminas coradas por Papanicolaou.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi do tipo experimental e realizado no departamento de pesquisa e pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Vila Velha e foi dividido em 2 ensaios experimentais diferentes.

*2.1 ENSAIO EXPERIMENTAL 01:* Obtenção de imagem celular, identificação morfológica nuclear e citoplasmática e determinação de medidas quantitativas para cada imagem.

### *2.1.1. Obtenção das amostras*

Foram obtidas 15 amostras de lâminas de células de colo de útero de 15 pacientes coradas pela técnica de Papanicolaou e diagnóstico conhecido, arquivadas no Laboratório do Hospital da Polícia Militar do Espírito Santo (HPM/ES) durante o ano de 2013. As amostras foram divididas em 3 grupos de 5 lâminas cada: células normais (CN), células com alterações de baixo grau (BG) e células com alterações de alto grau (AG).

### *2.1.2. Produção de imagem celular*

Utilizando um microscópio óptico modelo Leica dmls na objetiva de 40x, com uma câmera digital Samsung SDC-415 acoplada foram capturadas imagens celulares. Para cada lâmina de cada grupo foram produzidas diversas imagens identificadas conforme classificação de diagnóstico já conhecido formando assim um banco de dados com 167 imagens.

*2.1.3. Desenvolvimento do algoritmo para identificação automática do núcleo e citoplasma e gerar dados numéricos da morfologia das células.*

Com as imagens celulares produzidas o banco de dados foi exportado para o programa livre cellprofiler 2.0 r11710 e utilizando as ferramentas disponíveis do programa foi criado um algoritmo (Tabela 1) que permitiu medir e identificar cada célula através de diversos parâmetros como área, forma, intensidade de cor do



núcleo e o citoplasma. Através destas medidas foram gerados pelo cellprofiler dados numéricos para cada grupo de células.

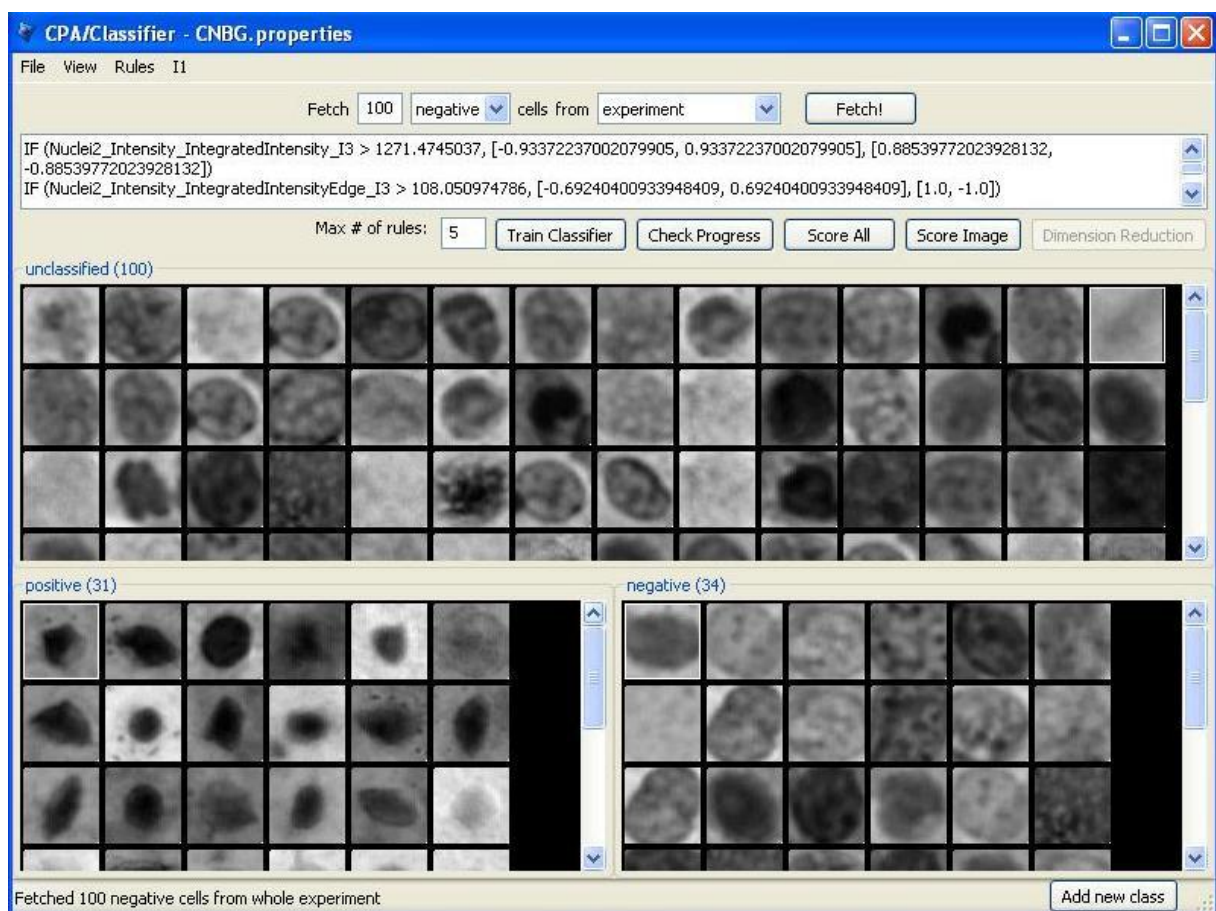
**Tabela 1.** Processo de análise utilizando o cellprofiler (algoritmo).

PROCESSO	ALGORITMO	DESCRIÇÃO
Processando o arquivo	Carregando as imagens (LoadImages)	Com as imagens celulares originais produzidas o banco de dados foi exportado para o programa livre cellprofiler 2.0 r11710 e nomeadas imagem 1 (I1).
Processando Imagem	Coverter imagem com cor para cinza (ColorToGray).	I1 foram convertidas para o sistema de cores preto e branco e renomeadas (I2).
Processando Imagem	Inversão das cores da imagem (ImageMath)	As cores de I2 foram invertidas e renomeadas (I3).
Processando Objeto	Identificação do objeto primário (IdentifyPrimaryObjects).	Utilizando I3 foi feita a identificação do objeto primário tomando como parâmetro o núcleo, com valores mínimos de 45 e máximos de 120 de diâmetro do objeto em unidades de pixel, pelo método limiar de Mog Global.
Medição do Objeto	Medir tamanho e forma do objeto (MeasureObjectSizeShape).	Após a identificação do núcleo foi feita a medida numérica do

		tamanho e forma.
Processando Objeto	Filtar objeto (FilterObject).	Foi aplicado um filtro para excluir pequenos fragmentos que não eram núcleos.
Processando Objeto	Identificação do objeto secundário (IdentifySecondaryObjects).	Foi feita a identificação do objeto secundário utilizando o método de distancia-N expandindo o objeto primário em 50 pixels nomeando de célula.
Processando Objeto	Identificação do objeto Terciário (IdentifyTertiaryObjects).	Para a identificação do objeto terciário o objeto primário (núcleo) foi excluído do objeto secundário (célula) sendo a imagem originada chamada de citoplasma.
Medição do Objeto	Medir tamanho e forma do objeto (MeasureObjectSizeShape),  Medir Intensity do objeto (MeasureObjectIntensity).	A partir dos três objetos identificados foi possível medir e identificar cada célula através de diversos parâmetros como área, forma, intensidade de cor do núcleo e o citoplasma.

#### 2.1.4. Treinamento do Classificador

Os dados numéricos gerados pelo cellprofiler para cada grupo celular foram analisados pelo cellprofiler analyst 2.0 r11710 (CPA). Através de treinamento do programa foi ensinado a classificar a imagem corretamente em células normais (CN), células com alterações de baixo grau (BG) e células com alterações de alto grau (AG), conforme diagnóstico pré-estabelecido por um citopatologista experiente (Figura 1).



**Figura 1.** Treinamento do classificador (CPA). Positivo- Células Normais, Negativo – células atípicas.

### 2.1.5. Cálculo da sensibilidade e especificidade

Todas as imagens produzidas foram exportadas para o CPA, e analisadas de forma agrupada: CN-BG, CN-AG e BG-AG. Após o treinamento do CPA foi dado o comando para exibir 100 células (objeto identificado) de cada tipo de classe celular (normal, baixo e alto grau) conforme agrupamento e com os eventos falso positivo e falso negativo, foram calculados a sensibilidade e especificidade (Tozetti et al., 2014).

Sensibilidade =  $\text{Eventos positivos verdadeiros} / (\text{Eventos positivos verdadeiros} + \text{eventos falso negativo})$

Especificidade =  $\text{Eventos negativos verdadeiros} / (\text{Eventos negativos verdadeiros} + \text{eventos falso positivos})$

## 2.2 ENSAIO EXPERIMENTAL 02: Classificação celular e comparação do diagnóstico citopatológico com diagnóstico celular por imagem automatizado.

Foram utilizadas 30 amostras de lâminas de células de colo de útero de 30 pacientes coradas pela técnica de Papanicolaou, arquivadas no Laboratório do Hospital da Polícia Militar do Espírito Santo (HPM/ES) durante o ano de 2013. Utilizando um microscópio óptico modelo Leica dmls com uma câmera digital Samsung SDC-415 acoplada foram produzidas imagens celulares. A partir da amostra foram capturadas 244 imagens de 885 células. Através do Cellprofiler e o algoritmo para identificação automática desenvolvido conforme o ensaio experimental 01 as imagens das amostras foram analisadas gerando parâmetros numéricos do núcleo e citoplasma de cada célula. Todas as imagens juntamente com os parâmetros produzidos foram exportadas para o CPA.

### 2.2.1 – Classificação celular e diagnóstico automatizado.

Utilizando o CPA classificador treinado conforme o protocolo experimental 01 todas as imagens da amostra foram classificadas em células normais e células atípicas

(baixo grau + alto grau). Com a classificação de cada imagem foi dado o diagnóstico de cada lâmina e comparado com o diagnóstico citopatológico (tabela 2).

Todas as imagens classificadas como células atípicas (CA) foram analisadas no cellprofiler com algoritmo BG-AG de forma agrupada e exportado para o CPA classificador, estas foram classificadas em BG e AG e comparadas com a citopatologia (tabela 4).

### *2.3 - Local de realização dos experimentos.*

Toda parte de captura de imagem celular, desenvolvimento do algoritmo, treinamento do classificador e diagnóstico automatizado foi realizado no Laboratório de estudos experimentais do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UVV e aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sob parecer número 562.105.

### 3. RESULTADOS

Após o treinamento do CPA utilizando o algoritmo de identificação celular desenvolvido no ensaio experimental 01, foram observados elevadas taxas de especificidade e sensibilidade nos grupos: CN-BG (99%,99%) e CN-AG (98%,97%) respectivamente, enquanto que a especificidade e sensibilidade no grupo BG-AG foi (78%, 79%) respectivamente.

#### *3.1 - Classificação Celular e diagnóstico automatizado.*

O cellprofiler, como esperado e de acordo com os resultados de sensibilidade e especificidade encontrados após o treinamento do CPA, foi capaz de identificar e classificar as amostras conforme a tabela 2 quando comparado ao diagnóstico citopatológico. Foi observada elevada especificidade e sensibilidade (tabela 3), na classificação celular das imagens das amostras em células normais e células atípicas. O grupo de imagens de células atípicas foi classificado em células de baixo grau e células de alto grau tendo os resultados de especificidade e sensibilidade expressos na tabela 4.

TABELA 2 – Comparação entre o diagnóstico citopatológico e cellprofiler.

AMOSTRA	CITOPATOLOGIA	CELLPROFILER	LOCAL AMOSTRA
1	NORMAL	NORMAL	CÉRVIX
2	ATÍPICA	ATÍPICA	CÉRVIX
3	ATÍPICA	ATÍPICA	CÉRVIX
4	NORMAL	NORMAL	CÉRVIX
5	NORMAL	NORMAL	CÉRVIX
6	NORMAL	NORMAL	CÉRVIX
7	ATÍPICA	ATÍPICA	CÉRVIX
8	ATÍPICA	NORMAL	CÉRVIX
9	ATÍPICA	ATÍPICA	CÉRVIX
10	ATÍPICA	ATÍPICA	CÉRVIX
11	ATÍPICA	ATÍPICA	CÉRVIX
12	ATÍPICA	ATÍPICA	CÉRVIX
13	NORMAL	NORMAL	CÉRVIX
14	ATÍPICA	ATÍPICA	CÉRVIX
15	ATÍPICA	ATÍPICA	CÉRVIX
16	ATÍPICA	ATÍPICA	CÉRVIX
17	NORMAL	NORMAL	CÉRVIX
18	NORMAL	NORMAL	CÉRVIX
19	ATÍPICA	ATÍPICA	CÉRVIX
20	ATÍPICA	ATÍPICA	CÉRVIX
21	ATÍPICA	NORMAL	CÉRVIX
22	NORMAL	NORMAL	CÉRVIX
23	ATÍPICA	ATÍPICA	CÉRVIX
24	NORMAL	NORMAL	CÉRVIX
25	ATÍPICA	ATÍPICA	CÉRVIX
26	NORMAL	NORMAL	CÉRVIX
27	ATÍPICA	ATÍPICA	CÉRVIX
28	ATÍPICA	ATÍPICA	CÉRVIX
29	ATÍPICA	ATÍPICA	CÉRVIX
30	ATÍPICA	ATÍPICA	CÉRVIX

Amostras de lâminas de células de colo de útero coradas pela técnica de Papanicolaou.

Kappa = 0,857 , intervalo de 95% de confiança do Kappa,  $p < 0,001$ .

**TABELA 3.** Comparação da classificação por imagem entre o cellprofiler e a citopatologia.

Classe	CITOPATOLOGIA	CELLPROFILER		E	S	VPP	VPN
		IDENTIFICOU	ERROU/NI				
CN	62	60	2	0,97	----	----	0,88
CA	182	174	8	---	0,96	0,99	----
TOTAL	244	234	10				

CN = células normais, CA= células atípicas, NI= imagem não identificada, E= especificidade, S= sensibilidade, VPP = valor preditivo positivo, VPN = valor preditivo negativo, os valores representam a amostra de 244 imagens obtidas das 30 amostras de lâminas.

**TABELA 4.** Comparação da classificação por imagem de células atípicas entre o cellprofiler e a citopatologia.

Classe	CITOPATOLOGIA	CELLPROFILER		E	S	VPP	VPN
		IDENTIFICOU	ERROU/NI				
BG	75	49	26	0,66	----	----	0,71
AG	107	87	20	----	0,81	0,76	----
TOTAL	182	136	46				

BG = Baixo Grau , AG= Alto Grau, NI= imagem não identificada, E= especificidade, S= sensibilidade, VPP = valor preditivo positivo, VPN = valor preditivo negativo, os valores representam a amostra de 182 imagens classificadas como atípicas obtidas das 30 amostras de lâminas.

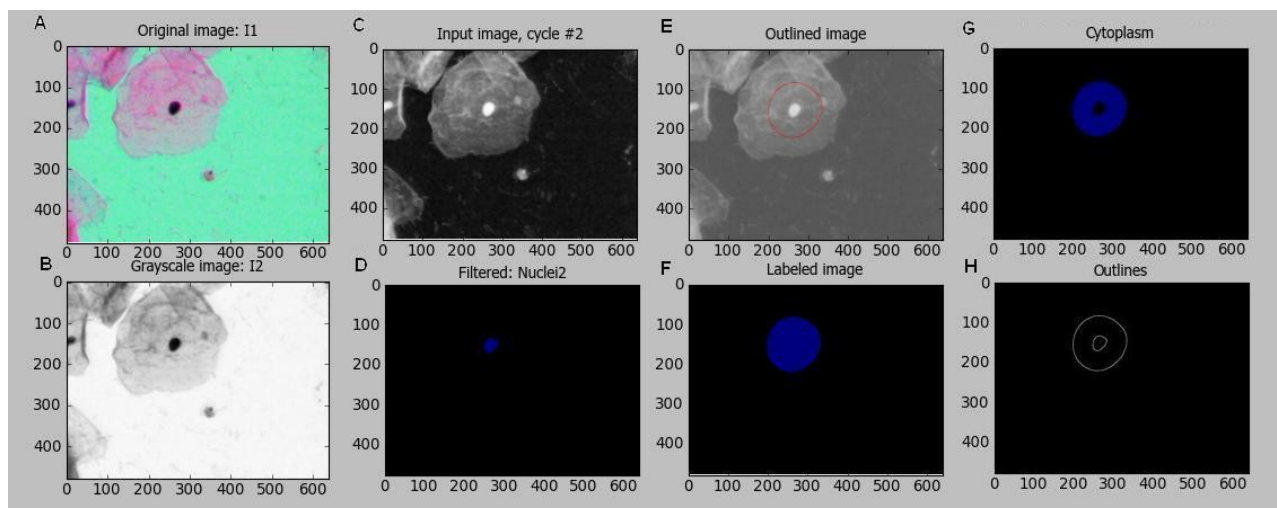


#### 4. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que foi possível identificar e classificar imagens de células de colo de útero de forma automatizada com elevado grau de sensibilidade e especificidade utilizando um algoritmo de identificação desenvolvido por um programa de análise de imagens gratuito e livre.

O algoritmo de identificação desenvolvido no protocolo experimental 01 utilizou como parâmetro primário o núcleo celular através da quantificação da intensidade de cor e medidas da área e forma. O citoplasma foi utilizado como objeto secundário de identificação no qual foram mensuradas área e forma, possibilitando fazer uma relação de proporção núcleo/citoplasma que foi tomado como parâmetro terciário de identificação. Muitos estudos consideram o DNA/conteúdo nuclear como um biomarcador de câncer, sendo assim utilizado como principal parâmetro de identificação (Bocking & Nguyen, 2004; Grote et al., 2004; Meng et al., 2013). Em estudo semelhante Laak et al. (2002) utilizou o núcleo de células epiteliais de colo de útero normais como parâmetro para classificar células normais e pré-malignas automaticamente e comparou com a citopatologia.

A intensidade da cor do núcleo, área e forma citoplasmática foram critérios de diferenciação entre classe de células de câncer de colo de útero no estudo realizado por Mat-Isa et al. (2008), onde semelhante a presente estudo as imagens dos núcleos foram convertidas para o sistema de cor preto e branco, no qual a intensidade da cor do núcleo foi possível de ser mensurada em uma escala de tons de cinza (Figura 2).



**Figura 2.** A – imagem original, B – imagem em preto-branco, C – inversão da cores D- identificação do núcleo, E – expansão do núcleo, F- identificação da célula inteira, G - identificação Citoplasma, H - relação núcleo/citoplasma.

Os resultados demonstraram que o programa teve facilidade em diferenciar e classificar células normais e atípicas, o que pode ser explicado pela grande diferença entre o tamanho do núcleo e a relação núcleo/citoplasma encontrada nestes tipos de classes celulares, entretanto o fato da proximidade de características entre células de alto e baixo grau culminam na dificuldade em diferenciá-la, além de as células de alto grau serem bem atípicas com grande variedade de tamanhos.

Vários estudos vêm sendo descritos na literatura buscando o diagnóstico por imagem automatizado de células de câncer, Gu et al. (2010) descreve citometria de imagem automatizado para o diagnóstico do carcinoma urotelial de bexiga utilizando marcadores de DNA. Baik et al. (2014) desenvolveu um algoritmo de classificação automática para lesões pré-malignas orais.

Todos esses estudos são grandes avanços e com excelentes resultados, porém utilizam programas pagos de código fechado e difícil programação ou marcadores celulares de elevado custo ou complexidade, enquanto o presente estudo produziu resultados elevados de sensibilidade e especificidade identificando e classificando células de colo de útero utilizando coloração simples já empregada que a do papanicolau, consideradas de baixo custo e fácil utilização ou seja não sendo

necessário mudança de rotinas laboratoriais e com programa livre e facilmente manuseado por qualquer citopatologista sem a necessidade de conhecimentos específicos de programação.

O cellprofiler vêm sendo utilizados em outros estudos de citometria por imagem automatizada que apresentam resultados que demonstram as vantagens da utilização deste programa comparada aos métodos de análise celular convencionais (Mittag et al., 2011; Tozetti et al., 2014). Comparado a citopatologia convencional o cellprofiler produz resultados quantitativos e reprodutíveis medindo simultaneamente e automaticamente varias parâmetros morfométricos celulares, enquanto que citopatologia convencional é qualitativa e subjetiva visto que o olho humano não é capaz identificar pequenas diferenças (Carpenter, 2006).

## 5. CONCLUSÃO

Foi possível extrair características de células de colo de útero automaticamente gerando dados numéricos que permitiu ao programa cellprofiler identificar e classificar de forma quantitativa e reprodutível as diferentes classes celulares, utilizando coloração simples e de baixo custo já existente na técnica de papanicolauo. Os benefícios para a população inclusa neste estudo ainda foram experimentais e não visa substituir a citopatologia convencional, a citometria de imagem automatizada pode ser aplicada nas rotinas laboratoriais a médio e longo prazo como um método complementar auxiliando na triagem e diminuindo um processo desgastante ao ser humano que demanda muitas horas de inspeção visual.

## 6. REFERÊNCIAS

Adefuye A, Sales K (2012). *Regulation of Inflammatory Pathways in Cancer and Infectious Disease of the Cervix*. Scientifica (Cairo). Volume 2012, Article ID 548150, 1-8.

Americo C (2014). Agência Saúde , *Vacinação contra HPV supera meta de 80%* . Disponível em : <http://u.saude.gov.br/cp8atmrk>, acesso em: 15 de junho de 2014.

Baik J, Ye Q, Zhang L, Poh C, Rosin M, Macaulay C, Guillaud M (2014). *Automated classification of oral premalignant lesions using image cytometry and Random Forests-based algorithms*. Cell Oncol (Dordr). PMID: 24817187.

Bocking A, Nguyen VQH (2004). *Diagnostic and Prognostic Use of DNA Image Cytometry in Cervical Squamous Intraepithelial Lesions and Invasive Carcinoma*. CANCER (CANCER CYTOPATHOLOGY), Volume 102, Number 1, 41-54

Carpenter AE, Jones TR, Lamprecht MR, Clarke C, Kang IH, Friman O, Guertin DA, Chang JH, Lindquist RA, Moffat J, Golland P, Sabatini DM (2006). *CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes Genome Biology*, Volume 7, Issue 10, Article R100.1 – 100.11

CARVALHO G (1993). *Citologia do Trato Genital Feminino*. Atheneu.

Cohen D, Coco A (2014). *Do Physicians Address Other Medical Problems During Preventive Gynecologic Visits?* JABFM Vol. 27 No. 1, 13-18.

Coskun S, Can H, Turan S (2013). *Knowledge about Cervical Cancer Risk Factors and Pap Smear Testing Behavior among Female Primary Health Care Workers: A Study from South Turkey*, Asian Pac J Cancer Prev.;14(11):6389-92.

DATASUS (2014). Departamento de Informática do SUS. *Prevenção do Câncer do Colo do útero*. Disponível em : [www2.datasus.gov.br](http://www2.datasus.gov.br), IN: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/manual\\_profissionaisdesaude.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/manual_profissionaisdesaude.pdf), acesso em: 10 de junho de 2014.

Dias MBK, Tomazelli JG, Assis M (2010). *Cervix Cancer Screening in Brazil: Analysis of Siscolo Data from 2002 to 2006 Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília, 19(3), 293-306.*

Eliseu MG (2008). *COBERTURA DO PREVENTIVO DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO NA REDE BÁSICA DE SAÚDE (SUS) MUNICÍPIO DE CRICIUMA – SC*, bib.unesc, 11-69.

Gerstner AOH, Thiele A, Tarnok A, Tannapfel A, Weber A, Bootz F (2006). *Prediction of Upper Aerodigestive Tract Cancer by Slide-Based Cytometry, Cytometry Part A DOI 10.1002/cyto.a, 582-587.*

Goda K, Di Carlo D, Jalali B (2013). *Ultrafast automated image cytometry for cancer detection. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. doi: 10.1109/EMBC.2013.6609454, 129-32.*

Gonçalves S, Haa P, Spada C, Fontana CS, Rangel L, Mendonça MAC, Carvalho CR (2007). *DNA content image cytometry of epithelial cells cervix RBAC, vol. 39(1): 71-78.*

Grote HJ, Nguyen HVQ, Leick AG, Bocking A (2004) *Identification of Progressive Cervical Epithelial Cell Abnormalities Using DNA Image Cytometry. CANCER (CANCER CYTOPATHOLOGY), volume 102, number 6, 373-379.*

Gu SY, Yong YS, Wang YH, Du YJ (2010). *The application of fluorescence in situ hybridization and automated image cytometry in the diagnosis of urothelial carcinoma of bladder. Zhonghua Wai Ke Za Zhi.15;48(12), 933-6.*

HACKENHAAR AA, Cesar JA, Domingues MR (2006). *Exame Citopatológico de Colo Uterino em Mulheres com Idade entre 20 e 59 anos em Pelotas, RS: prevalência, foco e fatores associados à sua não realização*. Revista Brasileira de Epidemiologia, São Paulo, v. 9, n. 1, 103-111.

INCA (2013). Instituto Nacional De Câncer (Brasil). *Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero*. Rio de Janeiro: INCA, 2013. Disponível em: [http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes/programas/site/home/nobrasil/programa\\_nacional\\_controle\\_cancer\\_colo\\_uterio/deteccao\\_precoce](http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes/programas/site/home/nobrasil/programa_nacional_controle_cancer_colo_uterio/deteccao_precoce), Acesso em: 02 dez. 2013.

Kamentsky L, Jones TR, Fraser A, Bray MA, Logan DJ, Madden KL, Ljosa V, Rueden C, Eliceiri KW, Carpenter AE (2011). Improved structure, function and compatibility for CellProfiler: modular high-throughput image analysis software BIOINFORMATICS APPLICATIONS NOTE Vol. 27 no. 8 , pages 1179–1180.

Laak JAVD, Siebers AG, Cuijpers VM, Pahlplatz MM, de Wilde PC, Hanselaar AG (2002) . *Automated identification of diploid reference cells in cervical smears using image analysis*. Cytometry. Apr 1;47(4), 256-64.

Lamprecht MR, Sabatini DM, Carpenter AE (2007). *CellProfiler™: free, versatile software for automated biological image analysis* *BioTechniques*, Vol. 42, No. 1, 71-75.

Lunena LT, Zãn DG, Crispim PTB, Ferrari JO (2011). *Fatores que influenciam a realização do exame preventivo do câncer cérvico-uterino em Porto Velho, Estado de Rondônia*, Brasil Rev Pan-Amaz Saude v.2 n.2 Ananindeua, 45-50.

Mat-Isa NA, Mashor MY, Othman HN (2008). *An automated cervical pre-cancerous diagnostic system*. Artificial Intelligence in Medicine, 42, 1-11.

Mittag A, Pinto FE, Endringer DC, Tarnok A, Lenz D (2011). *Cellular Analysis by Open-Source Software for Affordable Cytometry*, SCANNING VOL. 33, 1–8.

Meng Z, Shi J, Zhu C, Gu J, Zhou C (2013). *Automated quantification of DNA aneuploidy by image cytometry as an adjunct for the cytologic diagnosis of malignant effusion*. *Anal Cell Pathol (Amst)*. doi: 10.3233/ACP-130085, 107-15.

Oliveira AF, Cunha CLF, Viégas IF, Figueiredo IS, Brito LMO, Chein MBC (2010). *Estudo sobre a adesão ao exame citopatológico de papanicolau em um grupo de mulheres*. *Rev Pesq Saúde*,11(1), 32-37.

Pinho AA, Junior IF (2003). *Prevenção do câncer de colo do útero: um modelo teórico para analisar o acesso e a utilização do teste de Papanicolaou* *Rev. bras. saúde matern. infant.*, Recife, 3 (1): 95-112.

Tozetti PB, Lima EM, Nascimento AM, Endringer DC, Pinto FE, Andrade TU, Mittag A, Tarnok A, Lenz D (2014). *Morphometry to identify subtypes of leukocytes* *Hematol Oncol Stem Cell Ther* xx(xx) xxx Quarter 1-7