

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

**ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR UTILIZANDO SOFTWARE LIVRE E
MICROSCOPIA DE LUZ: UMA METODOLOGIA ALTERNATIVA, REPRODUTÍVEL E DE
CUSTO REDUZIDO**

SUELLEN GERONIMO CORDEIRO

VILA VELHA

JUNHO, 2013

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

**ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR UTILIZANDO SOFTWARE LIVRE E
MICROSCOPIA DE LUZ: UMA METODOLOGIA ALTERNATIVA, REPRODUTÍVEL E DE
CUSTO REDUZIDO**

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 Farmacêutica.

SUELLEN GERONIMO CORDEIRO

VILA VELHA
JUNHO, 2013

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

C794a Cordeiro, Suellen Geronimo.

Análise da viabilidade celular utilizando software livre e microscopia de luz : uma metodologia alternativa, reprodutível e de custo reduzido / Suellen Geronimo Cordeiro. – 2013.

51 f. : il.

Orientador: Dominik Lenz.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Vila Velha, 2013.

Inclui bibliografias.

1. Citologia – estudo e ensino . 2. Farmacologia - Pesquisa. 3. Tecnologia farmacêutica. 4. Software livre. I. Lenz, Dominik. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615.19

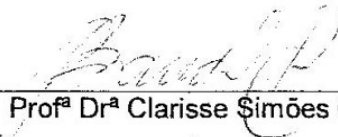
SUELLEN GERONIMO CORDEIRO

ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR UTILIZANDO SOFTWARE LIVRE E MICROSCOPIA
DE LUZ: UMA METODOLOGIA ALTERNATIVA, REPRODUTÍVEL E DE CUSTO
REDUZIDO

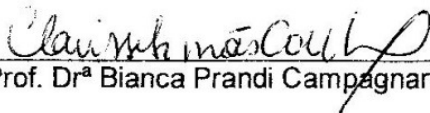
Dissertação apresentada à Universidade Vila
Velha, como pré-requisito do Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
para a obtenção do título de Mestre em
Ciências Farmacêutica.

Aprovada em 26 de junho de 2013


Banca examinadora



Profª Drª Clarisse Simões Coelho (UWV)



Prof. Drª Bianca Prandi Campagnaro (UWV)



Prof. Dr. Dominik Lenz (UWV)

(Orientador)

“Dedico esta dissertação a minha mãe, minha irmã, familiares e amigos por acreditarem nas minhas escolhas e estarem sempre presentes em minhas conquistas.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre iluminar meus caminhos e colocar pessoas maravilhosas na minha vida.

A minha mãe Nilzeth Geronimo Costa pela educação, confiança, sabedoria e imenso amor que me foi transmitida, serei eternamente grata a sua dedicação.

A minha princesinha, irmã, Myllena Geronimo dos Santos que tanto sentiu pelas ausências diárias, mas já visualiza caminhos futuros semelhantes.

Ao meu pai Haroldo Cordeiro Filho pelo incentivo e apoio nesta caminhada.

Ao meu padrasto Cleilson Sousa dos Santos pelo incentivo.

Meus padrinhos Geilza Costa Martins e José Alberto Martins pelo carinho.

Aos meus familiares que sempre presentes, em cada etapa da minha vida, torceram para esta vitória.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Espírito Santo por financiar esta pesquisa e contribuir substancialmente com o crescimento e formação de novos pesquisadores no estado.

Ao prof^{Dr} Dominik Lenz pelas orientações e conhecimentos que me foram transmitidos, bem como pela amizade criada.

A prof^aDr^a Denise C. Endringer por ter acreditado na minha capacidade e na amizade que surgiu a partir de uma aula de Métodos Físico-Químico de Análise II e de sua presença em minha banca de tese de conclusão de curso.

A prof^aDr^a Fernanda C. R. Lessa por ter aceitado coorientar este trabalho, contribuindo substancialmente para a conclusão do mesmo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, por terem cedido os equipamentos para análises da citometria, principalmente a professora Dr^a Silvana Meyreles, e Dr^a Bianca Campagnaro e doutoranda Marcella.

À Universidade Vila Velha por terem fornecido condições propícias a elaboração desta pesquisa, principalmente ao laboratório de ictiologia e o laboratório de cultura de células.

Aos meus amigos que de Laboratório Mirian, Ewelyne, Andrews, Gírlândia, Pablo Luciano que vivenciaram os desesperos e compartilharam as alegrias, bem como a aluna de iniciação científica Aline e Paula.

Em fim, a todos que me acompanharam nesta caminhada.

"Todo o futuro da nossa espécie, todo o governo das sociedades, toda a prosperidade moral e material das nações dependem da ciência, como a vida do homem depende do ar. Ora, a ciência é toda observação, toda exatidão, toda verificação experimental. Perceber os fenômenos, discernir as relações, comparar as analogias e as dessemelhanças, classificar as realidades, e induzir as leis, eis a ciência; eis, portanto, o alvo que a educação deve ter em mira. Espertar na inteligência nascente as faculdades cujo concurso se requer nesses processos de descobrir e assimilar a verdade". *Autor desconhecido*

RESUMO

CORDEIRO Suellen GeronimoMsc,Universidade Vila Velha-ES, junho de 2013.: **Análise da viabilidade celular utilizando software livre e microscopia de luz: uma metodologia alternativa, reprodutível e custo reduzido.** Orientador: Dominik Lenz. Coorientador: Fernanda Campos Rosetti Lessa.

A análise de viabilidade celular tem desenvolvido substancialmente com a evolução de bioengenharia. Normalmente, estas análises são realizadas pela técnica de citometria de fluxo, que necessitam de equipamentos de custo elevado no mercado. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência da utilização de microscopia de luz, corantes não específicos e *software* livre quando comparados à citometria de fluxo. Foi avaliada a viabilidade celular da linhagem Hepa 1c1c7 frente à ação do hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio em três concentrações diferentes. As células foram coradas com *Giemsa Azul de Tripán*, em lâminas. As imagens foram registradas pelo microscópio invertido acoplado a câmera de 3,0MP, identificadas usando *software Cellprofiler* e diferenciadas pelos *CellprofilerAnalyst*. Análise estatística empregada foi teste *t-student*, com grau de confiança $p < 0,05$. A especificidade entre as análises variou de $0,83 \pm 0,03$ a $0,99 \pm 0,01$ e sensibilidade média de $0,81 \pm 0,02$ a $0,99 \pm 0,01$. A correlação entre os métodos foi de $r^2 = 0,99$. Conclui-se, que o método de análise de imagem apresenta neste trabalho confiabilidade semelhante ao de citometria.

Palavras-chave: *Cellprofile. CellprofilerAnalyst. Viabilidade celular. Azul de Tripán. Giemsa. Citometria Fluxo.*

ABSTRACT

Cordeiro Suellen Geronimo M.Sc, Universidade Vila Velha-ES, junho de 2013.: **Live-dead cell assay using free software and light microscopy: reproducible and inexpensive method.** Adiser: Dominik Lenz. Co-adiser: Fernanda Campos Rosetti Lessa.

The cell viability analysis has evolved substantially with the development of bioengineering. Usually, these analyzes are performed by using flow cytometry, which requires equipment with substantial costs. This study evaluated the efficiency of the use of light microscopy, non-specific dyes and free *software* when compared to flow cytometry. Cell viability was assessed in Hepa 1c1c7 lineage the action of sodium hypochlorite and hydrogen peroxide, at three different concentrations. Cells were stained with *Giemsa* and trypan blue. Using pictures were taken an inverted microscope coupled to a 3.0 MP camera, identified by the *software* "*Cellprofiler*" and differentiated by "*CellprofilerAnalyst*". Statistical analysis was performed with student's t test, with confidence level $p < 0.05$. The specificity of the analyzes ranged from 0.83 ± 0.03 to 0.99 ± 0.01 and the mean sensitivity ranged from 0.81 ± 0.02 to 0.99 ± 0.01 . The correlation between the methods was $r^2 = 0.99$. The t-student test showed a significant difference between the concentrations used and between samples when compared to the control group. To conclude, the method of image analysis present this work similar to reability cytometric.

Key-board: Cellprofiler. *CellprofilerAnalyst*. Cell viability. Blue Tripan, *Giemsa*. Flow Citometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Apresentação de 100 células aleatórias carregadas pelo <i>CellprofilerAnalyst</i>	21
Figura 2	Treinamento do <i>CellprofilerAnalyst</i> para diferenciar os grupos de células vivas e células mortas.....	21
Figura 3	Imagem de células coradas com <i>Giemsa</i> e <i>Azul de Tripán</i> ...	24
Figura 4	Objetos identificados automaticamente pelo <i>Cellprofiler</i>	25
Figura 5	Apresentação de 100 células vivas e 100 células mortas diferenciadas pelo <i>CellprofilerAnalyst</i>	26
Figura 6	Regressão linear dos resultados obtidos entre citometria e análise de imagem.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comandos utilizados para identificação das células no <i>Cellprofiler</i> , respectivamente.	20
Tabela 2	Porcentagem média de células viáveis obtida pela avaliação inicial de citotoxicidade pela técnica colorimétrica nas diferentes concentrações.....	23
Tabela 3	Porcentagem média de células viáveis obtida pela técnica de citometria de fluxo.....	24
Tabela 4	Especificidade média obtida na diferenciação celular realizada pelo CPA.....	26
Tabela 5	Sensibilidade média obtida na diferenciação celular realizada pelo CPA.....	26
Tabela 6	Porcentagem média de células viáveis obtidas nova metodologia nos diferentes grupos e concentrações.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AI- Análise de imagem

C₁ – Concentração 1

C₂ Concentração 2

C₃ – Concentração 3

CF - Citometria de Fluxo

CI – Citometria de imagem

CP – *Cellprofiler*

CPA – *CellprofilerAnalyst*

CELL– Células

DOXO – Cloridrato de doxorrubicina 100µg/mL

HIPO – Hipoclorito de sódio comercial 2,0-2,5% (Q-bou)

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio 30-35% (PA)

PBS – Solução Tampão de Fosfato

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

CAPÍTULO.....	14
Resumo.....	15
Introdução	16
Procedimentos experimentais.....	18
Resultados.....	23
Discussão.....	28
Conclusão	30
REFERÊNCIA.....	31
APÊNDICE.....	33
ANEXO Normas técnica da revista.....	34

CAPÍTULO

ANALISE DA VIABILIDADE CELULAR UTILIZANDO *SOFTWARE* LIVRE E
MICROSCOPIA DE LUZ: UMA METODOLOGIA ALTERNATIVA,
REPRODUTÍVEL E DE CUSTO REDUZIDO

S G Cordeiro¹

F R C Lessa^{1,*}

B P Campagnaro^{1,2}

D Lenz^{1,*}

¹ Universidade Vila Velha – UVV. 29102-920, Vila Velha, ES, Brasil.

² Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, 29043-900, Vitória, ES, Brasil.

* Autor para correspondência: Universidade Vila Velha; Avenida Comissário José Dantas de Melo, nº21, Boa Vista, Vila Velha – ES. CEP 29102-920;+55 (27) 3421-2001, e-mail: dominic.lenz@uvv.br(D Lenz)

ANALISE DA VIABILIDADE CELULAR UTILIZANDO *SOFTWARE* LIVRE E MICROSCOPIA DE LUZ: UMA METODOLOGIA ALTERNATIVA, REPRODUTÍVEL E DE CUSTO REDUZIDO

RESUMO

Objetivo: Comparar a qualidade da utilização de microscopia de luz, corantes não específicos e *software* livre frente à citometria de fluxo, técnica de referência. **Método:** Avaliou-se a viabilidade celular da linhagem Hepa 1c1c7 frente à ação de hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio, em três concentrações diferentes. As células foram coradas com *Giemsa* e *Azul de Tripán*, em lâminas de vidro. As imagens foram capturadas com auxílio em microscópio invertido acoplado à câmera de 3,0MP, identificadas pelo *software Cellprofiler* e diferenciadas empregando pelos *CellprofilerAnalyst*. Análise estatística empregada foi teste *t-student*, com grau de confiança $p < 0,05$. **Resultados:** A especificidade das análises variou de $0,85 \pm 0,01$ a $0,99 \pm 0,01$ e sensibilidade média de $0,81 \pm 0,02$ a $0,99 \pm 0,01$. A correlação entre os métodos foi de $r^2 = 0,99$. **Conclusão:** o método de análise de imagem apresenta confiabilidade semelhante quando comparados a citometria, por obter resultados convergentes aos da técnica de referência, podendo ser capaz de auxiliar laboratórios de análises clínicas e experimentais em testes de viabilidade, com equipamentos de baixo custo.

Palavras-chave: Viabilidade celular. *Azul de Tripán*. *Giemsa*. *Cellprofiler*, *CellprofilerAnalyst*. Citometria de fluxo.

INTRODUÇÃO

A análise de imagens e a evolução da bioengenharia têm impulsionado o aprimoramento de técnicas para auxiliar na determinação da viabilidade celular, bem como pesquisadores e patologistas na interpretação de dados ^{[1][2]}.

Uma das principais técnicas de análise de viabilidade é a citometria, que existe de dois tipos: citometria de fluxo (CF) e citometria de imagem (CI)^[3]. Ambas analisam, classificam e quantificam partículas, por meio de marcadores fluorescentes^[4]. Na CI, as células são fixadas em lâminas e automaticamente fotografadas, facilitando a reavaliação, isto não ocorre na CF, pois as células são analisadas em suspensão ^[5]. Tais ferramentas são utilizadas em testes como: síndrome da imunodeficiência ^[6], oncologia veterinária^[7], análise vegetal^{[8].[9]} e monitoramento de fármacos ^[10].

Shapiro e Perlmutter (2006) propuseram a utilização de microscopia de fluorescência, corantes específicos e *software* pago como alternativa de análise celular. Atualmente, programa para análise biológica como o *Cellprofiler* (CP), está disponível gratuitamente na internet, tornando-se uma ferramenta importante para auxiliar na análise de imagens, reduzindo assim os custos com tais análises ^[11].

Cellprofiler é amplamente empregado e tem se tornado um importante aliado das análises de automatização^[12]. É um *software* versátil, livre, que fornece inúmeros parâmetros para identificação celular, como área, textura e intensidade dos objetos identificados ^[13]. Relatos mostram que o *software* foi utilizado em análises celulares com marcadores específicos para análise de fenótipos^[14] e na diferenciação de células sanguíneas^[12]. Desta forma, o emprego do *software* poderá ser uma alternativa à análise da viabilidade celular, realizada pelo citômetro.

Os mecanismos de morte celular se caracterizam por uma resposta celular a uma perturbação nas suas condições naturais de sobrevivência^[15]. Na apoptose, morfologicamente são visualizadas áreas celulares menores, deformação na membrana plasmática, dilatação do retículo endoplasmático e formação de corpos apoptóticos^[16]. Os mecanismos de necrose (oncoses) são

característicos pela desintegração da membrana plasmática^[17]. O emprego de corantes que possam identificar algumas, ou cada uma, destas etapas torna-se essencial para análise de viabilidade celular.

Técnicas colorimétricas são empregados na análise de sensibilidade celular a fármacos e na análise de viabilidade para quimioterápicos^[18]. Neste ensaio as células viáveis convertem o 3,4,5-dimethylthiazol-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) em um precipitado de formazano púrpura^[19]. Tais cristais após serem dissolvidos são avaliados, em leitores de placas, com comprimento de onda específico.^[19]

Corantes não específicos podem ser utilizados como marcadores celulares devido a seletividade da membrana celular que juntamente com a diferença de afinidade molecular dos corantes tornam plausíveis o processo de coloração com este tipo de marcador^[11]. A hematoxilina e a eosina podem ser utilizadas em esfregaço sanguíneo^[20]. *Azul de Tripán* é utilizado em análise de viabilidade por conseguir penetrar a membrana das células inviáveis, já o *Giemsa* conhecido por marcar células vivas^[21].

Istoposto, o objetivo deste trabalho é avaliar a viabilidade celular utilizando corantes não-específicos, *software* livre e microscopia de luz. Tais resultados serão comparados com a técnica decitometria de fluxo, para a verificação da qualidade da análise de imagem.

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Cultivo Celular

Células hepatoma de rato (Hepa1c1c7, ATCC-CRL1830) adquirida no Banco de Células do Rio de Janeiro foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* – low glucose, suplementado a 10% com soro fetal bovino (Gibco, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY), acrescido de 10 mL/L de solução penicilina-estreptomicina-l-glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e mantidas em incubadora (Sanyo Eletronic/COM-19AIC-UV) a 37°C e 5% CO₂.

Análise colorimétrica

5,0x10³ células foram incubadas em placa de 96 poços. As amostras de hipoclorito de sódio (HIPO) (Biotech) foram testadas nas concentrações C₁=0,30 µg/mL; C₂= 0,90 µg/mL; C₃=1,30 µg/mL e as de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Suprapuro - Sigma-Aldrich) em C₁=3,50 µg/mL C₂=10,5 µg/mL C₃=16,5 µg/mL, todas testadas em triplicatas. A placa foi mantida em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ por 48h. Após este período, foi adicionada solução de MTT 0,01g/mL (Sigma-Aldrich) e mantidas nas mesmas condições por 4h. Em seguida, foi dissolvido em álcool isopropílico acidificado com ácido clorídrico 0,04M e avaliado em leitor de ELISA (Thermoplate TP-Reader a 595nm)^[22].

Análise por citometria fluxo

Alíquotas de suspensão celular, com densidade celular 1x10⁶ células/mL foram transferidas para tubos de microtitulação, tipo eppendorf's. As amostras de HIPO (Biotech) foram testadas nas concentrações C₁=0,3 µg/mL; C₂= 0,90 µg/mL; C₃=1,30 µg/mL e as de (H₂O₂) (Suprapuro - Sigma-Aldrich) em C₁=3,50 µg/mL C₂=10,5 µg/mL C₃= 16,5 µg/mL, todas testadas em triplicatas. Deixadas em repouso por 1 min^[23]. Posteriormente, foram centrifugadas a 153g por 5min e lavadas com 1mL de solução salina de tampão fosfato (PBS) refrigerado. Em seguida, foram adicionados 200 µL de PBS e 4 µL de iodeto de propídio, mantendo em repouso por 15 min, ao abrigo

da luz. A percentagem de células viáveis foram determinadas ao longo de 10.000 eventos. Os dados foram adquiridos por um sistema FACScan equipado com um laser de argônio e um de hélio-neônio (He-NE:633nm) de 488 nm analisados com o auxílio de citometria de fluxo de FCS4 (De Novo Software, Los Angeles, CA).

Determinação por análise de imagem

Alíquotas de 1×10^6 células foram transferidas para tubos, de microtitulação tipo eppendorf. As amostras de HIPO (Biotech) foram testadas nas concentrações $C_1=0,3\mu\text{g/mL}$; $C_2=0,90\mu\text{g/mL}$; $C_3=1,30\mu\text{g/mL}$ e H_2O_2 (Suprapuro - Sigma-Aldrich) em $C_1=3,50\mu\text{g/mL}$ $C_2=10,5\mu\text{g/mL}$ $C_3=16,5\mu\text{g/mL}$, todas testadas em triplicatas^[23]. Os tubos foram centrifugados por 5 min a 153g, em seguida o sobrenadante foi retirado e as células homogeneizadas em 30 μL PBS e 10 μL desta solução foi retirado e transferido para a lâmina de vidro. A coloração foi realizada adicionando-se 20 μL de *GIEMSA* (Sigma -Aldrich) e 20 μL de *Azul de Tripán* 0,2% (Sigma-Aldrich) respectivamente.

Registros celular

As imagens foram registradas em microscópio óptico invertido (LGD 3 – Eikonál do Brasil), acoplado a um computador (positivo/intel premium) e uma câmera para microscópio (3,0MP - CE), em objetiva 40x, obtidas em intensidade 24 Bits, tamanho 2,25 MB e área 1024x768 pixels. Para o reconhecimento celular utilizou-se o *software* livre *Cellprofile* 2.0 (r11710) e a diferenciação celular foi realizada automaticamente pelo *software* *CellprofilerAnalyst* 2.0 (r11710) (CPA), ambos disponíveis no site www.Cellprofiler.org.

Identificação celular

A identificação celular realizada pelo *Cellprofiler* seguiu a ordem dos algoritmos expostos a baixo, a fim de criar um pipeline e propites. Os algoritmos foram,

para a identificação do objeto primário (cell), definidos de acordo com a característica do objetodeanálise, como pode ser observado na tabela 1:

Tabela 1: Comandos utilizados para identificação das células nos *Cellprofiler*

LoadImages	as imagens de formato .bmp foram carregadas e chamadas de i1.
Color to Gray	as imagens policromáticas (i1) transformaram-se em dicromática (i2).
Invert for Printing	a intensidade do pixel de i2 foram invertidas e chamou-se de i3
IdentifyPrimaryObjects	os limites de área 25 a 55 e o algoritmo em Otsu Global foram determinados e os objetos identificados chamados de “cell”
MeasureObjectSizeShape	a área dos objetos chamados de “cell” e mais de 72 parâmetros para a identificação foram determinados pelo <i>software</i> .
FilterObject	os objetos “cell” foram filtrados pelo fator de correção, o formato, e renomeadas de “cell 2” as células filtradas.
MeasureObjectSizeShape	a área dos objetos e mais de 72 parâmetros para a identificação foram reprocessados para os objetos nomeados “cell 2”.
MeasureObjectIntensity	a intensidade do pixel do “cell 2” foram calculados pelo CP.
Export data base	as análises dos objetos “cell 2” foram exportadas num criando um proprites e o pipeline. Ambos arquivos devem ser salvos na mesma pasta que as imagens originais.

Diferenciação celular

O arquivo criado na análise do CP foi carregado pelo CPA e dois grupos de células foram nomeados – células vivas e células mortas. Em seguida,

programa carregou 100 células vivas. Na figura 1, observam-se células vivas e mortas aleatoriamente. Posteriormente, o treinamento do *software* foi realizado de modo que o operador fornecesse parâmetros morfológicos característicos do grupo de células vivas e mortas, separadamente. Na figura 2, as células foram devidamente separadas pelo usuário e o *software*, finalmente, treinado.

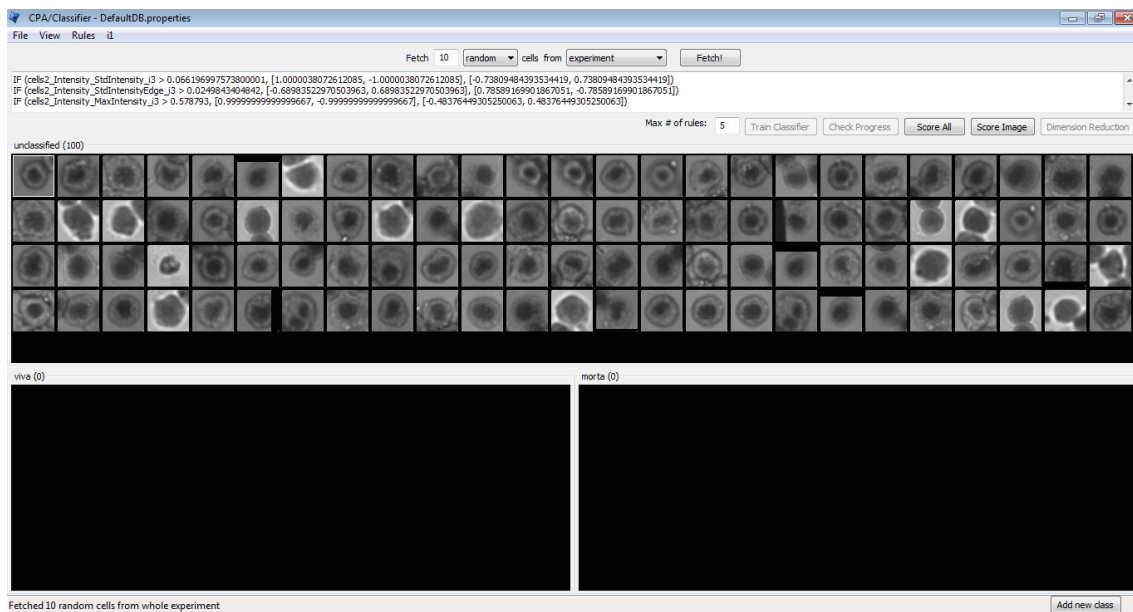


Figura 1: Apresentação de 100 células aleatórias carregadas pelo *CellProfilerAnalyst*.

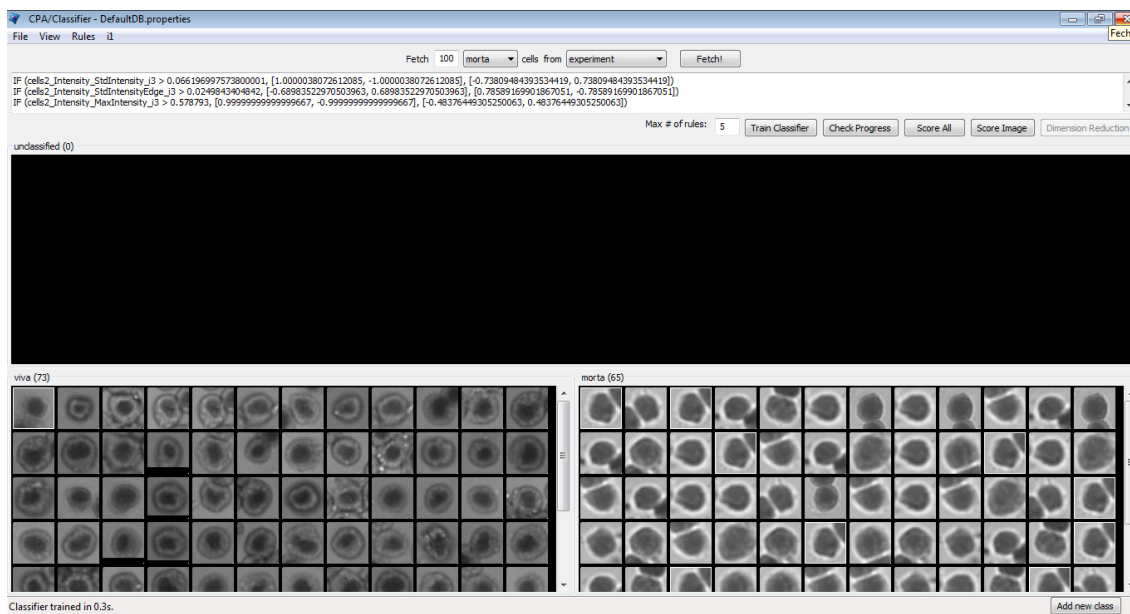


FIGURA 2: Treinamento do *CellprofilerAnalyst* para diferenciar os grupos de células vivas e células mortas

Análise estatística

Os resultados da viabilidade celular foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) da porcentagem. Os dados de viabilidade foram submetidos a regressão linear e a significância da diferença entre as médias foi determinada por teste t-student, com significância aceita quando $p < 0,05$. Foram utilizados os *softwares* excel[®] e sigmaplot[®].

RESULTADOS

Avaliação inicial do efeito citotóxico das substâncias de HIPOe H₂O₂ pela técnica de colorimétrica

Os resultados iniciais de citotoxicidade realizado pela técnica colorimétrica para as substâncias usadas, nas concentrações C₁, C₂ e C₃, estão apresentados na tabela 2. Observa-se que todas as três substâncias escolhidas foram citotóxicas, nas três concentrações. Observa-se que o PBS não foi citotóxico.

Tabela 2: Porcentagem média de células vivas obtidas, pela avaliação inicial do efeito citotóxico, pela técnica colorimétrica nas diferentes amostras e concentrações

	C ₁	C ₂	C ₃
PBS	93,97 ± 4,86	90,51 ± 2,86	89,77 ± 9,52

HIPO	85,42 ±0,82	80,21 ± 0,22	59,07 ± 0,23
H ₂ O ₂	66,60 ±0,49	43,87 ± 2,28	43,58 ± 0,38

Determinação da viabilidade celular pela técnica de citometria de fluxo

Os resultados da análise de citometria de fluxo estão descritos na tabela 3. Os dados informados indicam a porcentagem de células viáveis frente às diferentes substâncias e concentrações, descritas anteriormente.

Tabela 3: Porcentagem média de células viáveis obtidos na citometria de fluxo

	C ₁	C ₂	C ₃
Cell	95,3±4,13	92,33±2,04	93,95±1,38
PBS	96,9± 2,27 ^{b, c}	95,22±0,83 ^{a, c}	94,13±1,07 ^{a, b}
HIPO	88,15 ± 0,78 ^c	98,82±0,53 ^c	96,59±2,90 ^{a, b}
H ₂ O ₂	98,5 ±0,81 ^{b, c}	92,67±4,42 ^{a, c}	90,84±4,44 ^{a, b}

Letras diferentes na mesma linha obtiveram diferença significativa ($p < 0.05$). Onde: C₁: a; C₂: b; C₃: c.

Determinação da viabilidade celular utilizando a técnica de análise de imagem

As células coradas com *Giemsa* e *Azul de Tripán* obtiveram diferenciação de viabilidade observada na figura 3. Onde o *GIEMSA* corou o núcleo das células e o *Azul de Tripán* corou o citoplasma das células mortas.

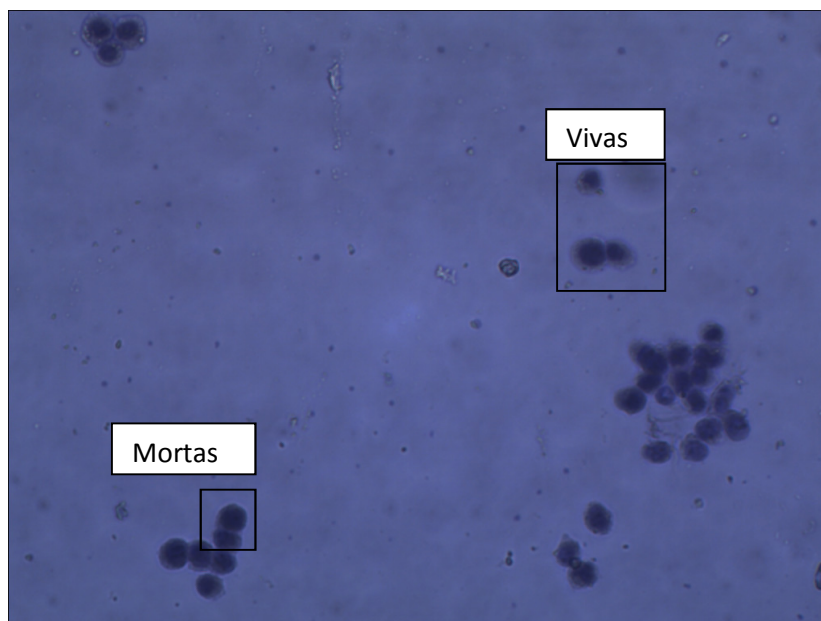


Figura 3: Imagem de células coradas com *Giemsa* e *Azul de Tripán*

A determinação dos algoritmos, definidos neste trabalho, foram suficientes para que o *Cellprofiler* identificasse as células e quantificasse os parâmetros morfológicos das mesmas. A figura 4 apresenta o resultado da identificação dos automáticas dos objetos, realizada pelo CP.

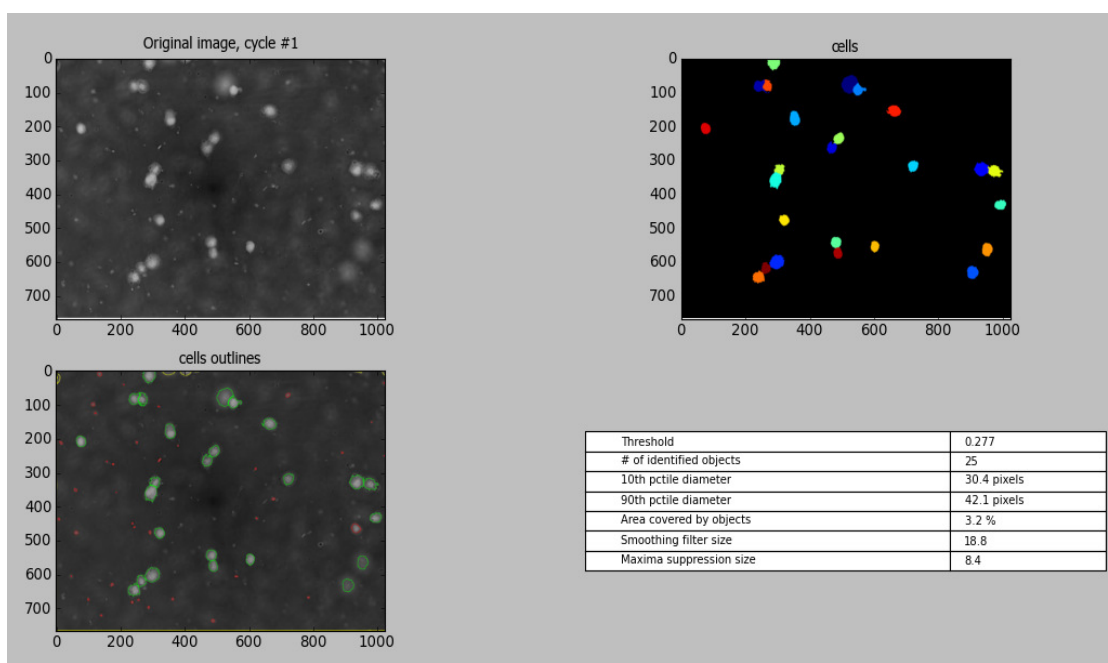


Figura 4: Objetos identificados automaticamente pelo *Cellprofiler*

A diferenciação automática das células vivas e mortas, obtida pelo CPA, pode ser visualizada na figura 4, onde após o treinamento do *software* as células foram facilmente identificadas.

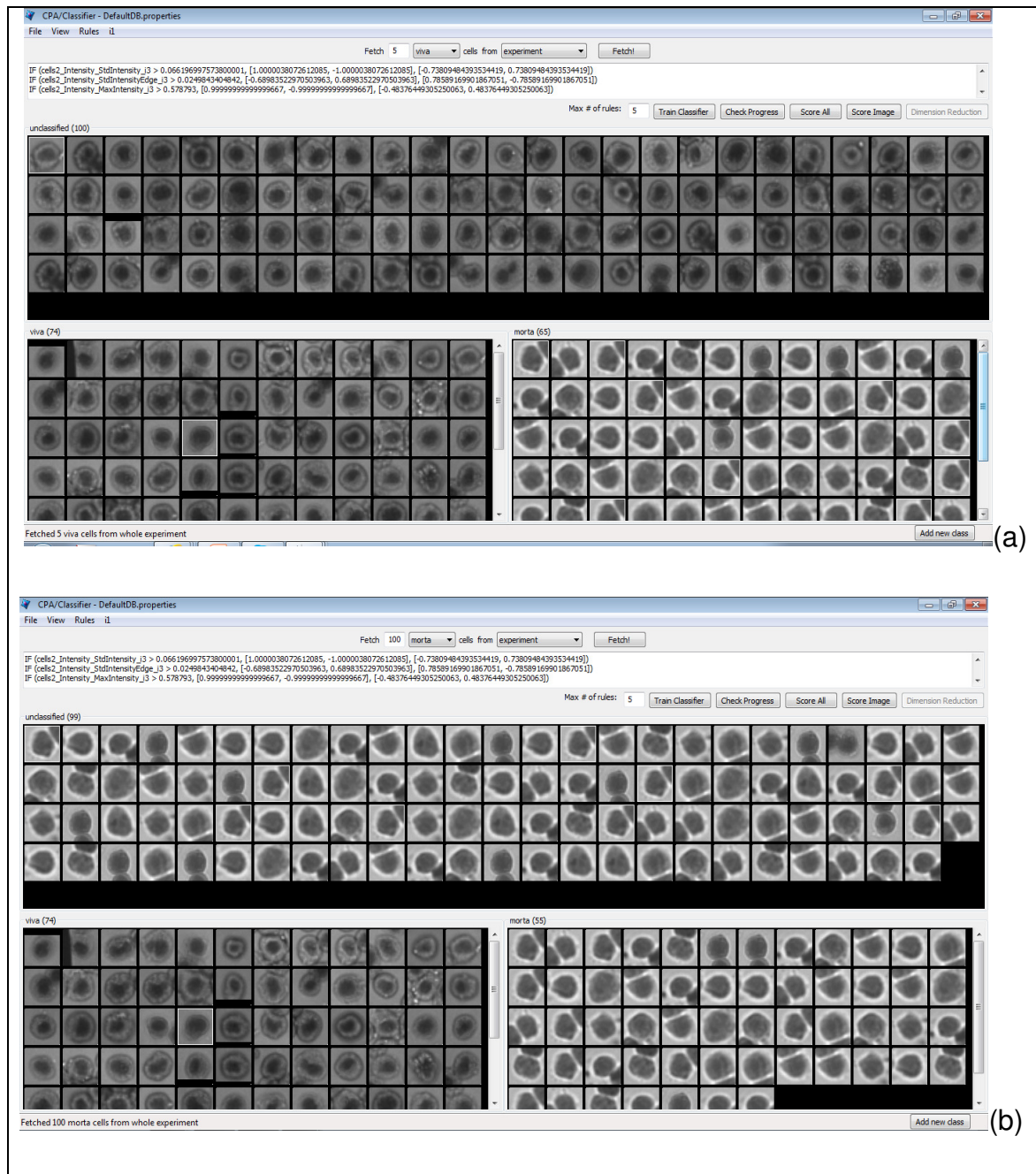


Figura 5: Apresentação de 100 células vivas e 100 células mortas diferenciadas pelo CPA. (a) apresentação de 100 células vivas; (b) apresentação de células mortas.

Os resultados da análise de especificidade e sensibilidade estão expostos nas tabelas 4 e 5, respectivamente. Foram calculados com base na diferenciação apresentada pelo CPA. Observa-se que os valores obtidos empregando-se o *software* foram homogêneos, para as diferentes concentrações e amostras, de especificidade e sensibilidade. Estes cálculos foram realizados para avaliar a precisão e exatidão do CPA. Avaliando a capacidade que o programa possui em identificar verdadeiros positivos e falsos positivos.

Tabela 4: Especificidade média obtida na diferenciação celular realizada pelo *CellprofilerAnalyst*

	Especificidade		
	C ₁	C ₂	C ₃
Cell	0,99 ±0,01	0,93 ±0,02	0,92±0,01
PBS	0,96±0,02	0,96 ±0,02	0,91 ±0,02
HIPO	0,94±0,02	0,87±0,02	0,98±0,02
H ₂ O ₂	0,96±0,01	0,90 ±0,01	0,85 ±0,01

Não houve diferença significativa nas especificidades adquiridas pela nova metodologia ($p < 0,05$).

Tabela 5: Sensibilidade média obtida na diferenciação celular realizada pelo *CellprofilerAnalyst*.

	Sensibilidade		
	C ₁	C ₂	C ₃
Cell	0,99 ± 0,01	0,96±0,01	0,93±0,02
PBS	0,98 ± 0,02	0,85 ±0,01	0,99 ±0,01
HIPO	0,99 ± 0,01	0,81 ±0,02	0,96 ±0,02
H ₂ O ₂	0,93 ± 0,03	0,88 ±0,01	0,89 ±0,01

Não houve diferença significativa nas sensibilidades adquiridas pela nova metodologia ($p < 0,05$).

As percentagens médias das viabilidades obtidas, pela nova metodologia, estão apresentadas na tabela 6. A quantidade de célula viva, morta e total foi fornecida pelo próprio CPA..

Tabela 6: Porcentagem média de células vivas obtidas pela análise de imagem, nos diferentes grupos e concentrações.

	C ₁	C ₂	C ₃
Cell	95,55±1,27 ^{b,c}	95,76± 3,13 ^{a,c}	96,66± 2,08 ^{a,b}
PBS*	94,91±1,75 ^{b,c}	94,63± 3,00 ^{a,c}	96,99±0,97 ^{a,b}
HIPO*	85,78±5,97 ^{b,c}	92,41 ± 2,01 ^{a,c}	91,45 ± 6,97 ^{a,b}
H ₂ O ₂ *	87,17±1,00 ^{b,c}	89,93 ± 0,33 ^{a,c}	91,08± 6,46 ^{a,b}

Houve diferença significativa na viabilidade celular obtida pelas amostras (PBS, HIPO, H₂O₂) quando comparada ao grupo controle (Cell), para p<0,05, (*) Indicam diferença das amostras comparadas ao controle. Letras diferentes na mesma linha correspondem à diferença significativa (p<0.05). Onde: C₁: a; C₂:b; C₃:c.

Na Figura 5 apresenta-se a regressão linear dos resultados obtidos com a citometria e a nova metodologia. Nesta, observa-se que os dados obtidos na análise de imagem comparados ao da citometria, resultou numa forte correlação, com $r^2=0,99$.

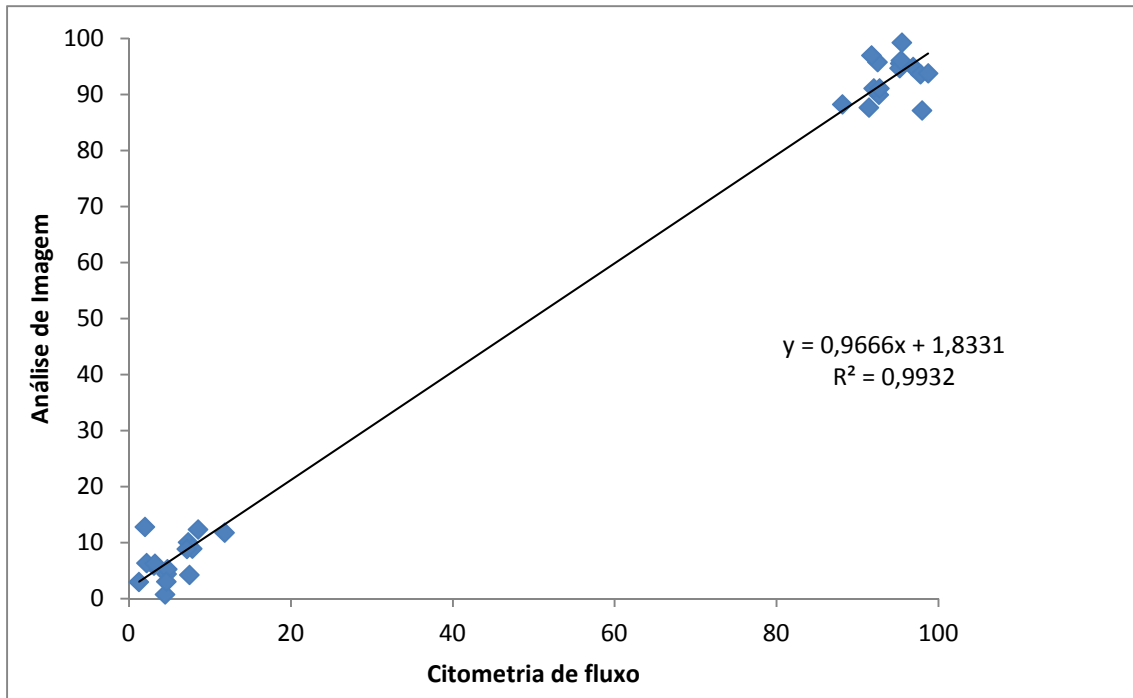


Figura 5: Regressão linear dos resultados obtidos entre citometria e análise de imagens.

DISCUSSÃO

O PBS não apresentou citotoxicidade, conforme o esperado Marks e colaboradores (1992), no ensaio de proliferação celular via oxidação do MTT. Por outro lado, foi observado o efeito citotóxico para o H_2O_2 e HIPO, conforme previamente demonstrado para outras linhagens celulares. Zhang, Torabinejad e Li (2003) avaliaram a citotoxicidade das mesmas substâncias, pela técnica do MTT, frente a fibroblastos (L929) e observaram que ambas foram citotóxicas, convergindo com os resultados apresentados na tabela 2.

Técnicas de análise celular como aCF e CI possuem rápida identificação e diferenciação celular, sendo muito utilizados em análises experimentais e clínicas^[4]. Entretanto, estes métodos necessitam de equipamentos relativamente caros e corantes específicos, o que torna a técnica restrita a centros de pesquisas e laboratórios patológicos com significativo investimento^[11]. Não obstante, os valores de viabilidade resultante da análise de imagem e citometria, nesta pesquisa, divergiram do observado no MTT. Fatores como tempo de exposição das células a droga e concentração podem

ter interferido nos resultados. Rossi e colaboradores (2007) avaliaram o poder desinfetante de algumas drogas em tempos e concentrações diferentes, e constataram que o tempo de contato, necessário, para a desinfecção é maior quanto menor for a concentração da droga ativa.

Na figura 3, obteve-se marcação celular condizentes com a literatura. Segundo a literatura, o *GIEMSA* corante básico interage com o núcleo das células^[21]. Já, o *Azul de Tripán* é um corante ácido e penetra células mortas, por apresentarem suas membranas desintegradas^[21]. Assim, as diferentes características químicas dos corantes, utilizados neste experimento, proporcionaram condições suficientes à análise de viabilidade e identificação das células pelo *softwareCellprofiler*. O mesmo foi observado por Akhter (2011) quando avaliou a viabilidade do congelamento de sêmen de búfalo, com os dois corantes. Wu e colaboradores (2011) utilizaram a mesma técnica para avaliar a viabilidade do tratamento de linhagem celular de rato IEC-6.

O sucesso da coloração, dos diferentes grupos celulares, tornou viável a análise realizada pelo *software CP*. As identificações das células seguiram a ordem de comando listada na tabela 1. Lamprecht e colaboradores (2007) utilizaram as imagens disponíveis no site do programa e identificaram todos os objetos presentes, criando uma sequência de comandos para cada análise. Carpenter e colaboradores (2006) utilizaram o programa para identificar e quantificar fenótipos celulares. O *software* disponibiliza recursos para diferentes tipos de análises, cabe ao usuário ordenar os comandos de forma correta e maximizar suas análises, corrigindo o tamanho da imagem, pixel, formato, filtro e tamanho da área do objeto. Mittag e colaboradores (2011) quando utilizaram o *Cellprofiler* em análises para diferenciar células sanguíneas comparando a identificação celular realizada pelo *iCyst* e o *CP*.

CP está corriqueiramente associado à identificação das células e *software CPA* direcionado a diferenciação de grupos e dados estatísticos. Na tabela 4 e 5, constam resultados de sensibilidade e especificidade sem diferença significativa entre as amostras e grupos. Osaka e colaboradores (2012) compararam a precisão do *CPA* com o *softwareiBACHIE* e verificam que o mesmo obteve resultados rápidos e precisos, convergindo com os resultados

desta pesquisa. Jones e colaboradores descreveram possíveis recursos estatísticos que podem ser realizados, com sucesso, pelo CPA. Misselwitz e colaboradores (2010) confirmam qualidade da diferenciação celular realizada pelo CPA, mas ressalta que o mesmo só é capaz de identificar dois grupos, limitando um pouco a dissipação do *software*.

Na tabela 6, consta a porcentagem média de células viáveis obtidas na análise de imagem. Observa-se que os valores, obtidos na análise de imagem foram semelhantes aos obtidos na técnica de citometria. Shapiro e Perlmutter (2006) buscaram uma técnica alternativa a citometria, para análise de imagem, utilizando *software* pago e obtiveram resultados similares a análise padrão.

Na figura 5, observa-se que a comparação, da análise de imagem e a citometria, resultou num $r^2 = 0,99$, porém os valores, de viabilidade, divergiram dos obtidos no MTT. Tal fato pode ser explicado, pela diferença técnica na preparação da amostra. A metodologia do MTT seguiu o protocolo de Mosmann (1983), já a citometria e análise de imagem seguiram o protocolo modificado de Woronzoff-Dashkoff (2002). Não obstante, as técnicas realizadas com a mesma metodologia apresentaram resultados convergentes, remetendo, a análise de imagem, numa possível técnica alternativa a citometria.

A nova técnica de análise de imagem, proposta por esta pesquisa, apresenta vantagens importantes, como: a utilização de corantes baratos, a reprodutibilidade do método, a utilização de equipamentos comuns em laboratórios experimentais e clínicos e a possibilidade de compactar resultados para reprocessamento de dados. Apesar dessas vantagens, o tempo necessário para a análise da nova metodologia é um pouco maior do que a técnica de citometria, mas nada que comprometa sua utilização.

Infere-se que a utilização de um *software* livre, associado à microscopia de luz e de corantes de baixo custo na identificação da viabilidade celular torna-se uma ferramenta importante para países subdesenvolvidos que possuem alta prevalência de doenças infectocontagiosas. Laboratórios de pesquisas que lidam com pequenas quantidades de amostras e necessitam de realizarem análises morfológicas, que também, podem fazer uso deste método.

CONCLUSÃO

Sumariando, a microscopia de luz, os corantes *Giemsa* e *Azul de Tripán*, juntamente com o *Cellprofiler*, software livre e acessível, foi eficiente na identificação e diferenciação celular. O teste de regressão mostrou que o novo método obteve resultados convergentes com os obtidos na citometria, porém o mesmo não ocorreu com a técnica colorimétrica. Cabe ressaltar, que a automatização das análises não tem o intuito de substituir um patologista, mas servirá de auxílio e suporte ao mesmo, nas análises clínicas e experimentais.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Züchner T, Failla AV, Meixner AJ. **Light microscopy with doughnut modes: a concept to detect, characterize, and manipulate individual nanoobjects.** *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 2011, **23**:5274–93.
2. Nolan JP, Yang L. **The flow of cytometry into systems biology.** *Briefings in functional genomics & proteomics*. 2007. **2**:81–90.
3. Davey HM. **Life, death, and in-between: meanings and methods in microbiology.** *Applied and environmental microbiology*. 2011. **16**:5571–6.
4. Mach WJ, Thimmesch AR, Orr J a, Slusser JG, Pierce JD. **Flow cytometry and laser scanning cytometry, a comparison of techniques.** *Journal of clinical monitoring and computing*. 2010. **4**:251–9.
5. Darzynkiewicz Z, Smolewski P, Holden E, Luther E, Henriksen M, François M, et al. **Laser scanning cytometry for automation of the micronucleus assay.** *Mutagenesis*. 2011. **1**:153–61.
6. Spidlen J, Gentleman RC, Haaland PD, Meur NLE, Ochs MF, Schmitt C, et al: **Data standards for flow cytometry.** 2006;10(2):209–14.
7. Reggeti F, Bienzle D. Flow cytometry in veterinary oncology. *Veterinary pathology [Internet]*. 2011. **1**:223–35.

8. Galbraith DW. **Cytometry and plant sciences: a personal retrospective.** Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology. 2004.1:37–44.
9. Ochatt SJ. **Flow cytometry in plant breeding.** Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology. 2008.7:581–98.
10. Hedley DW, Chow S, Goolsby C, Shankey TV. **Pharmacodynamic monitoring of molecular-targeted agents in the peripheral blood of leukemia patients using flow cytometry.** Toxicologic pathology.
11. Shapiro HM, Perlmutter NG. **Personal Cytometers : Slow Flow or No Flow ?.**Cytometry Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology. 2006.630:620–30.2008.1:133–9.
12. Kametsky L, Jones TR, Fraser A, Bray M-A, Logan DJ, Madden KL, et al. **Improved structure, function and compatibility for *Cellprofiler*: modular high-throughput image analysis software.** Bioinformatics. 2011. 8:1179–80
13. Mittag A, Pinto FE, Endringer DC, Tarnok A, Lenz D. **Cellular analysis by open-source software for affordable cytometry.** Scanning. 2011.1:33–40.
14. Lamprecht M, Sabatini D, Carpenter A. ***Cellprofiler*TM: free, versatile software for automated biological image analysis.** BioTechniques. 2007.1:71–5.
15. Carpenter AE, Jones TR, Lamprecht MR, Clarke C, Kang IH, Friman O, et al. **CellProfiler: image analysis software for identifying and**
16. Gorczyca W. **Cytometric analyses to distinguish death processes. Endocrine-related cancer .**1999.1:17–9.quantifying cell phenotypes. Genome Biology.2006.10:R100.
17. Grütter MG. **Caspases: key players in programmed cell death.** Current opinion in structural biology. 2000.6:649–55.
18. Hsiao WLW, Mo Z, Fang M, Shi X, Wang F. assessed by the MTT and the Comet assays. 2000;471:45–55.
19. Lü L, Zhang L, Wai MSM, Yew DTW, Xu J. **Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury.** Toxicology in vitro : an international journal.Elsevier Ltd; 2012.4:636–44
20. Misselwitz B, Strittmatter G, Periaswamy B, Schlumberger MC, Rout S, Horvath P, et al: **Enhanced CellClassifier: a multi-class classification tool for microscopy images.** BMC Bioinformatics. 2010.1:30.

21. Schmolze DB, Standley C, Fogarty KE, Fischer AH: Advances in Microscopy Techniques. Archives of Pathology.
22. Choy CK, Cho P, Boost MV : **Cytotoxicity of rigid gas-permeable lens care solutions.** Clin Exp Optom. 2013 3. doi: 10.1111/cxo.12039
23. Mosmann T: **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.**J. Immunol. Methods. 1983.**65**:55–63.
24. Marks DC, Belov L, Davey MW, Davey RA, Kidman AD.**The MTT viability assay for citotoxicity testing in multidrug-resistant human leukemic cells.** Leukemia Research.1992.16(12):165-1173
25. Zhang W, Torabinejad M, Li Y: **Evaluation of cototoxicity of MTAD using the MTT-tetrazolium method.**J Endod. 2003.29(10) 694-7
26. Rossi S, Antonelli M, Mezzanott V, Nurizzo C: **Peracetic acid disinfection a feasible alternative to wastewater chlorination.** Water Reviron Res.2001.79(4):341-50
27. Akhter S, Ansari MS, Rakha BA, Andradi SM, Khalid M, Ullah N: **Effect of low density lipopróteins in extender of freezability and fertility of buffalo (bubalus bubalis) bull semen.** Therigenology.2011.76(4):759-64
28. Wu XW, Wang H, Wang H, Wan QX, Jin X, Sun Y, Wu D, Cao JJ, Peng X: **Effects of intestinal trefoil factor combined with mucin on function of burn serum treated intestinal epithelial cells.** Zhonghua Shao Shang Za Zi.2011.27(5):341-6
29. Osaka I, Hills JM, Kiewerg SL, Shinogle HE, Moore DS, Hefty PS: **An automated image-based method for rapid analysis of chlamidia infection as a tool for screening antchlmidial agents.** Antimicrobial Agents and chemotherapy.2012.**26**.4184-4188
30. Woronzoff-Dashkoff KK: **The wright-Giemsa stain.** Secrets revealed. Clinics in laboratory medicine. 2002.**1**:15–23.

AGRADECIMENTO

Esta pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Espírito Santo (FAPES). Agradecimentos ao laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular Fisiopatologias Cardiovasculares da UFES pelas análises de citometria.

ERRATA

Segundo as normas da revista, as figuras e tabelas devem ser inseridas separadamente, mas para melhor compreensão da dissertação deixou-se as imagens junto aos resultados.

APÊNDICE

Segundo a revista as figuras devem ser inseridas nesta seção.

ANEXO - Normas técnicas da revista

Titlepage

The title page should:

provide the title of the article

list the full names, institutional addresses and email addresses for all authors

indicate the corresponding author

Please note:

abbreviations within the title should be avoided

Abstract

The Abstract of the manuscript should not exceed 350 words and must be structured into separate sections: **Background**, the context and purpose of the study; **Results**, the main findings; **Conclusions**, brief summary and potential

implications. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract.

Keywords

Three to ten keywords representing the main content of the article.

Background

The Background section should be written in a way that is accessible to researchers without specialist knowledge in that area and must clearly state - and, if helpful, illustrate - the background to the research and its aims. The section should end with a brief statement of what is being reported in the article.

Results and discussion

The Results and discussion may be combined into a single section or presented separately. The Results and discussion sections may also be broken into subsections with short, informative headings.

Conclusions

This should state clearly the main conclusions of the research and give a clear explanation of their importance and relevance. Summary illustrations may be included.

Methods

The methods section should include the design of the study, the type of materials involved, a clear description of all comparisons, and the type of analysis used, to enable replication.

For studies involving human participants a statement detailing ethical approval and consent should be included in the methods section. For further details of the journal's editorial policies and ethical guidelines see ['About this journal'](#).

For further details of the journal's data-release policy, see the policy section in ['About this journal'](#).

Availability of supporting data

BMC Bioinformatics encourages authors to deposit the data set(s) supporting the results reported in submitted manuscripts in a publicly-accessible data repository, when it is not possible to publish them as additional files. This section should only be included when supporting data are available and must include the name of the repository and the permanent identifier or accession number and persistent hyperlink(s) for the data set(s). The following format is required:

"The data set(s) supporting the results of this article is(are) available in the [repository name] repository, [unique persistent identifier and hyperlink to dataset(s) in http:// format]."

Where all supporting data are included in the article or additional files the following format is required:

"The data set(s) supporting the results of this article is(are) included within the article (and its additional file(s))"

We also recommend that the data set(s) be cited, where appropriate in the manuscript, and included in the reference list.

A list of available scientific research data repositories can be found [here](#). A list of all BioMed Central journals that require or encourage this section to be included in research articles can be found [here](#).

List of abbreviations

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations can be provided, which should precede the competing interests and authors' contributions.

Competing interests

A competing interest exists when your interpretation of data or presentation of information may be influenced by your personal or financial relationship with

other people or organizations. Authors must disclose any financial competing interests; they should also reveal any non-financial competing interests that may cause them embarrassment were they to become public after the publication of the manuscript.

Authors are required to complete a declaration of competing interests. All competing interests that are declared will be listed at the end of published articles. Where an author gives no competing interests, the listing will read 'The author(s) declare that they have no competing interests'.

When completing your declaration, please consider the following questions:

Financial competing interests

In the past five years have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? Is such an organization financing this manuscript (including the article-processing charge)? If so, please specify.

Do you hold any stocks or shares in an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? If so, please specify.

Do you hold or are you currently applying for any patents relating to the content of the manuscript? Have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that holds or has applied for patents relating to the content of the manuscript? If so, please specify.

Do you have any other financial competing interests? If so, please specify.

Non-financial competing interests

Are there any non-financial competing interests (political, personal, religious, ideological, academic, intellectual, commercial or any other) to declare in relation to this manuscript? If so, please specify.

If you are unsure as to whether you, or one your co-authors, has a competing interest please discuss it with the editorial office.

Authors' contributions

In order to give appropriate credit to each author of a paper, the individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section.

An 'author' is generally considered to be someone who has made substantive intellectual contributions to a published study. To qualify as an author one should 1) have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) have been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; and 3) have given final approval of the version to be published. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group, alone, does not justify authorship.

We suggest the following kind of format (please use initials to refer to each author's contribution): AB carried out the molecular genetic studies, participated in the sequence alignment and drafted the manuscript. JY carried out the immunoassays. MT participated in the sequence alignment. ES participated in the design of the study and performed the statistical analysis. FG conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support.

Authors' information

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and

understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

Acknowledgements

Please acknowledge anyone who contributed towards the article by making substantial contributions to conception, design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data, or who was involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content, but who does not meet the **criteria** for authorship. Please also include the source(s) of funding for each author, and for the manuscript preparation. Authors must describe the role of the funding body, if any, in design, in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. Please also acknowledge anyone who contributed materials essential for the study. If a language editor has made significant revision of the manuscript, we recommend that you acknowledge the editor by name, where possible.

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

Endnotes

Endnotes should be designated within the text using a superscript lowercase letter and all notes (along with their corresponding letter) should be included in the Endnotes section. Please format this section in a paragraph rather than a list.

References

All references, including URLs, must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. Each reference must have an individual reference number.

Please avoid excessive referencing. If automatic numbering systems are used, the reference numbers must be finalized and the bibliography must be fully formatted before submission.

Only articles, datasets and abstracts that have been published or are in press, or are available through public e-print/preprint servers, may be cited; unpublished abstracts, unpublished data and personal communications should not be included in the reference list, but may be included in the text and referred to as "unpublished observations" or "personal communications" giving the names of the involved researchers. Obtaining permission to quote personal communications and unpublished data from the cited colleagues is the responsibility of the author. Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted. Journal abbreviations follow Index Medicus/MEDLINE. Citations in the reference list should include all named authors, up to the first 30 before adding '*et al.*'.

Any *in press* articles cited within the references and necessary for the reviewers' assessment of the manuscript should be made available if requested by the editorial office.

Style files are available for use with popular bibliographic management *software*:

[BibTeX](#)

[EndNote style file](#)

[Reference Manager](#)

[Zotero](#)

Examples of the *BMC Bioinformatics* reference style are shown [below](#). Please ensure that the reference style is followed precisely; if the references are not in the correct style they may have to be retyped and carefully proofread.

All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within

the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, in the following format: **The Mouse Tumor Biology Database** [<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>]. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

Examples of the *BMC Bioinformatics* reference style

Article within a journal
Koonin EV, Altschul SF, Bork P: **BRCA1 protein products: functional motifs**. *Nat Genet* 1996, **13**:266-267.

Article within a journal supplement
Orengo CA, Bray JE, Hubbard T, LoConte L, Sillitoe I: **Analysis and assessment of ab initio three-dimensional prediction, secondary structure, and contacts prediction**. *Proteins* 1999, **43**(Suppl 3):149-170.

In press article
Kharitonov SA, Barnes PJ: **Clinical aspects of exhaled nitric oxide**. *Eur Respir J*, in press.

Published abstract
Zvaifler NJ, Burger JA, Marinova-Mutafchieva L, Taylor P, Maini RN: **Mesenchymal cells, stromal derived factor-1 and rheumatoid arthritis [abstract]**. *Arthritis Rheum* 1999, **42**:s250.

Article within conference proceedings
Jones X: **Zeolites and synthetic mechanisms**. In *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore*. Edited by Smith Y. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996:16-27.

Book chapter, or article within a book
Schnepf E: **From prey via endosymbiont to plastids: comparative studies in dinoflagellates**. In *Origins of Plastids. Volume 2*. 2nd edition. Edited by Lewin RA. New York: Chapman and Hall; 1993:53-76.

Whole issue of journal

Ponder B, Johnston S, Chodosh L (Eds): **Innovative oncology**. In *Breast Cancer Res* 1998, **10**:1-72.

Whole conference proceedings

Smith Y (Ed): *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore*. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996.

Complete book

Margulis L: *Origin of Eukaryotic Cells*. New Haven: Yale University Press; 1970.

Monograph or book in a series

Hunninghake GW, Gadek JE: **The alveolar macrophage**. In *Cultured Human Cells and Tissues*. Edited by Harris TJR. New York: Academic Press; 1995:54-56. [Stoner G (Series Editor): *Methods and Perspectives in Cell Biology*, vol 1.]

Book with institutional author

Advisory Committee on Genetic Modification: *Annual Report*. London; 1999.

PhD thesis

Kohavi R: **Wrappers for performance enhancement and oblivious decision graphs**. *PhD thesis*. Stanford University, Computer Science Department; 1995.

Link / URL

The Mouse Tumor Biology Database

[<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>]

Link / URL with author(s)

Neylon C: Open Research Computation: an ordinary journal with extraordinary aims.

[http://blogs.openaccesscentral.com/blogs/bmcblog/entry/open_research_computation_an_ordinary]

Dataset with persistent identifier

Zheng, L-Y; Guo, X-S; He, B; Sun, L-J; Peng, Y; Dong, S-S; Liu, T-F; Jiang, S; Ramachandran, S; Liu, C-M; Jing, H-C (2011): **Genome data from sweet and**

grain sorghum (Sorghum bicolor). *GigaScience*.
<http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

Preparing illustrations and figures

Illustrations should be provided as separate files, not embedded in the text file. Each figure should include a single illustration and should fit on a single page in portrait format. If a figure consists of separate parts, it is important that a single composite illustration file be submitted which contains all parts of the figure. There is no charge for the use of color figures.

Please read our [figure preparation guidelines](#) for detailed instructions on maximising the quality of your [figures](#).

Formats

The following file formats can be accepted:

PDF (preferred format for diagrams)

DOCX/DOC (single page only)

PPTX/PPT (single slide only)

EPS

PNG (preferred format for photos or images)

TIFF

JPEG

BMP

Figure legends

The legends should be included in the main manuscript text file at the end of the document, rather than being a part of the figure file. For each figure, the following information should be provided: Figure number (in sequence, using

Arabic numerals - i.e. Figure 1, 2, 3 etc); short title of figure (maximum 15 words); detailed legend, up to 300 words.

Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures or tables that have previously been published elsewhere.

Preparing a personal cover page

If you wish to do so, you may submit an image which, in the event of publication, will be used to create a cover page for the PDF version of your article. The cover page will also display the journal logo, article title and citation details. The image may either be a figure from your manuscript or another relevant image. You must have permission from the copyright to reproduce the image. Images that do not meet our requirements will not be used.

Images must be 300dpi and 155mm square (1831 x 1831 pixels for a raster image).

Allowable formats - EPS, PDF (for line drawings), PNG, TIFF (for photographs and screen dumps), JPEG, BMP, DOC, PPT, CDX, TGF (ISIS/Draw).

Preparing tables

Each table should be numbered and cited in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, 2, 3 etc.). Tables should also have a title (above the table) that summarizes the whole table; it should be no longer than 15 words. Detailed legends may then follow, but they should be concise. Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

Smaller tables considered to be integral to the manuscript can be pasted into the end of the document text file, in A4 portrait or landscape format. These will be typeset and displayed in the final published form of the article. Such tables should be formatted using the 'Table object' in a word processing program to ensure that columns of data are kept aligned when the file is sent electronically for review; this will not always be the case if columns are generated by simply

using tabs to separate text. Columns and rows of data should be made visibly distinct by ensuring that the borders of each cell display as black lines. Commas should not be used to indicate numerical values. Color and shading may not be used; parts of the table can be highlighted using symbols or bold text, the meaning of which should be explained in a table legend. Tables should not be embedded as figures or spreadsheet files.

Larger datasets or tables too wide for a portrait page can be uploaded separately as additional files. Additional files will not be displayed in the final, laid-out PDF of the article, but a link will be provided to the files as supplied by the author.

Tabular data provided as additional files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls) or comma separated values (.csv). As with all files, please use the standard file extensions.

Preparing additional files

Although *BMC Bioinformatics* does not restrict the length and quantity of data included in an article, we encourage authors to provide datasets, tables, movies, or other information as additional files.

Please note: All Additional files **will be published** along with the article. Do not include files such as patient consent forms, certificates of language editing, or revised versions of the main manuscript document with tracked changes. Such files should be sent by email to editorial@biomedcentral.com, quoting the Manuscript ID number.

Results that would otherwise be indicated as "data not shown" can and should be included as additional files. Since many weblinks and URLs rapidly become broken, *BMC Bioinformatics* requires that supporting data are included as additional files, or deposited in a recognized repository. Please do not link to data on a personal/departmental website. The maximum file size for additional files is 20 MB each, and files will be virus-scanned on submission.

Additional files can be in any format, and will be downloadable from the final published article as supplied by the author. reuse *e.g.* We recommend CSV rather than PDF for tabular data.

Certain supported files formats are recognized and can be displayed to the user in the browser. These include most movie formats (for users with the Quicktime plugin), mini-websites prepared according to our guidelines, chemical structure files (MOL, PDB), geographic data files (KML).

If additional material is provided, please list the following information in a separate section of the manuscript text:

File name (e.g. Additional file 1)

File format including the correct file extension for example .pdf, .xls, .txt, .pptx (including name and a URL of an appropriate viewer if format is unusual)

Title of data

Description of data

Additional files should be named "Additional file 1" and so on and should be referenced explicitly by file name within the body of the article, e.g. 'An additional movie file shows this in more detail [see Additional file 1]'.

Additional file formats

Ideally, file formats for additional files should not be platform-specific, and should be viewable using free or widely available tools. The following are examples of suitable formats.

Additional documentation

PDF (Adode Acrobat)

Animations

SWF (Shockwave Flash)

Movies

MP4 (MPEG 4)

MOV (Quicktime)

Tabular data

XLS, XLSX (Excel Spreadsheet)

CSV (Comma separated values)

As with figure files, files should be given the standard file extensions.

Mini-websites

Small self-contained websites can be submitted as additional files, in such a way that they will be browsable from within the full text HTML version of the article. In order to do this, please follow these instructions:

Create a folder containing a starting file called index.html (or index.htm) in the root.

Put all files necessary for viewing the mini-website within the folder, or sub-folders.

Ensure that all links are relative (ie "images/picture.jpg" rather than "/images/picture.jpg" or "http://yourdomain.net/images/picture.jpg" or "C:\Documents and Settings\username\My Documents\mini-website\images\picture.jpg") and no link is longer than 255 characters.

Access the index.html file and browse around the mini-website, to ensure that the most commonly used browsers (Internet Explorer and Firefox) are able to view all parts of the mini-website without problems, it is ideal to check this on a different machine.

Compress the folder into a ZIP, check the file size is under 20 MB, ensure that index.html is in the root of the ZIP, and that the file has .zip extension, then submit as an additional file with your article.

Style and language

General

Currently, *BMC Bioinformatics* can only accept manuscripts written in English. Spelling should be US English or British English, but not a mixture.

There is no explicit limit on the length of articles submitted, but authors are encouraged to be concise.

BMC Bioinformatics will not edit submitted manuscripts for style or language; reviewers may advise rejection of a manuscript if it is compromised by grammatical errors. Authors are advised to write clearly and simply, and to have their article checked by colleagues before submission. In-house copyediting will be minimal. Non-native speakers of English may choose to make use of a copyediting service.

Language editing

For authors who wish to have the language in their manuscript edited by a native-English speaker with scientific expertise, BioMed Central recommends [Edanz](#). BioMed Central has arranged a 10% discount to the fee charged to BioMed Central authors by Edanz. Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication. Please contact [Edanz](#) directly to make arrangements for editing, and for pricing and payment details.

Help and advice on scientific writing

The abstract is one of the most important parts of a manuscript. For guidance, please visit our page on [Writing titles and abstracts for scientific articles](#).

Tim Albert has produced for BioMed Central a [list of tips](#) for writing a scientific manuscript. [American Scientist](#) also provides a list of resources for science writing. For more detailed guidance on preparing a manuscript and writing in English, please visit the [BioMed Central author academy](#).

Abbreviations

Abbreviations should be used as sparingly as possible. They should be defined when first used and a list of abbreviations can be provided following the main manuscript text.

Typography

Please use double line spacing.

Type the text unjustified, without hyphenating words at line breaks.

Use hard returns only to end headings and paragraphs, not to rearrange lines.

Capitalize only the first word, and proper nouns, in the title.

All pages should be numbered.

Use the *BMC Bioinformatics* [reference format](#).

Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted.

Please do not format the text in multiple columns.

Greek and other special characters may be included. If you are unable to reproduce a particular special character, please type out the name of the symbol in full. **Please ensure that all special characters used are embedded in the text, otherwise they will be lost during conversion to PDF.**

Genes, mutations, genotypes, and alleles should be indicated in italics, and authors are required to use approved gene symbols, names, and formatting. Protein products should be in plain type