UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA E INFORMÁTICA INDUSTRIAL (CPGEI)

Joyce Cristiane Klock

MONTAGEM DE CARIÓTIPO DE PEIXES ASSISTIDA POR COMPUTADOR

DISSERTAÇÃO

CURITIBA
2017

Joyce Cristiane Klock

MONTAGEM DE CARIÓTIPO DE PEIXES ASSISTIDA POR COMPUTADOR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências – Área de Concentração: Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Kurt Schneider
Coorientador: Prof. Dr. Daniel Blanco

CURITIBA
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

K66m Klock, Joyce Cristiane
2017 Montagem de cariótipo de peixes assistida por computador / Joyce Cristiane Klock.-- 2017.
55 f.: il.; 30 cm.

Disponível também via World Wide Web.
Texto em português, com resumo em inglês.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e informática Industrial, Curitiba. Área de Concentração: Engenharia Biomédica, 2017.
Bibliografia: f. 51-52.

1. Cariótipos. 2. Citotaxonomia. 3. Cromossomos - Contagem. 4. Loricarídeo. 5. Processamento de imagens. 6. Modelos matemáticos. 7. Métodos de simulação. 8. Engenharia biomédica. 9. Engenharia elétrica - Dissertações. I. Schneider, Fábio Kurt, orient. II. Blanco, Daniel, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial. IV. Título.

CDD: Ed. 22 -- 621.3

Biblioteca Central do Câmpus Curitiba - UTFPR

Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação

TERMO DE APROVAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº 767

A Dissertação de Mestrado intitulada **"Montagem de Cariótipo de Peixes Assistida por Computador"** defendida em sessão pública pelo(a) candidato(a) **Joyce Cristiane Klock**, no dia 30 de agosto de 2017, foi julgada para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Engenharia Biomédica, e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial

BANCA EXAMINADORA:

Prof(a). Dr(a). Fábio Kurt Schneider – (UTFPR)

Prof(a). Dr(a). Leonilda Correia dos Santos - (UNIOESTE)

Prof(a). Dr(a). Gilberto Branco – (UTFPR)

A via original deste documento encontra-se arquivada na Secretaria do Programa, contendo a assinatura da Coordenação após a entrega da versão corrigida do trabalho.

Curitiba, 30 de agosto de 2017.

Dedico esse trabalho a minha mãe Marilene, ao meu marido Claudio Roberto e aos meus filhos Stela, Sarah e João Guilherme pelo apoio e amor.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, Pai amoroso e bondoso que me deu a oportunidade da vida e agradeço a Ele as oportunidades de aprendizado e crescimento que me oferece todos os dias.

Aos amigos espirituais que me acompanham desde sempre, dando-me forças, fé e coragem para superar os desafios de cada dia. Um agradecimento especial a minha querida Clara. Irmã, muito obrigada por iluminar meu caminho!!

Ao meu orientador e professor Fábio, que me convidou a fazer esse mestrado com uma visão de interdisciplinaridade, possibilitando a uma profissional da saúde se tornar mestre em Engenharia Biomédica. Sua presença em minha vida contribuiu para meu progresso profissional e pessoal. Foi um grande desafio para todos nós! Obrigado por não ter desistido de mim!!

Ao meu coorientador e professor Daniel, pelo apoio e confiança. Obrigado por todo o suporte nesse projeto.

Ao professor Gilberto Branco pelo apoio e por ser exemplo para mim de pessoa íntegra e professor dedicado. Muito obrigado!!

A professora e amiga Leonilda pelo apoio incondicional, sua orientação segura e sua amizade. Seu entusiasmo em fazer pesquisa é um exemplo para mim e me deu forças para continuar a caminhada científica. Parabéns por sua garra e determinação!!

Ao professor e amigo João Fabro, pelo apoio e o carinho da sua querida família. Vocês são muito especiais! Muito obrigado!!

Aos meus companheiros de estudos, Walter, Luciana, Joaquim e Neusa, pelos momentos agradáveis e também pela atenção e apoio nos momentos de dificuldades que passamos juntos. Sinto saudades de nossas conversas. Muito obrigado a vocês!!

A Universidade Tecnológica do Paraná por me possibilitar cursar um mestrado em Engenharia Biomédica em uma instituição pública.

A minha mãe Marilene pelo seu amor e dedicação desde quando eu estava em seu ventre. Minha mãe é uma heroína, pois superou todas as dificuldades, que não foram poucas, sempre com muita força e coragem. Agradeço pelo seu amor a meu marido e meus filhos e por toda ajuda em todos os sentidos enquanto moramos em Curitiba. Sem sua colaboração diária esse trabalho não seria concluído. A você minha mãe guerreira minha eterna gratidão! Amo você!!

Ao meu marido Claudio Roberto pelo seu esforço e trabalho de tantos anos, sem você este trabalho não existiria, pois ele é fruto do seu. Muito obrigado pela paciência em me ensinar a arte de pesquisar. Agradeço pelo nosso amor incondicional, pois ele foi o alicerce seguro para superarmos mais esse grande desafio de nossas vidas. Amo você!!

Aos meus filhos queridos Stela, Sarah e João Guilherme, pela compreensão nos momentos de ausência, pela paciência nos momentos de nervosismo e pelo enorme amor que me oferecem todos os dias em seus sorrisos e abraços. A mami ama demais vocês!!

Aos meus queridos sogros Maria Alice e Valentim Sebastião, que são meus pais do coração, pois desde quando entrei em suas vidas, sempre me amaram e amam como filha. Muito obrigado pela ajuda em todos os sentidos, sua colaboração diária possibilitou a conclusão desse trabalho. A vocês, meus pais do coração, minha eterna gratidão! Amo vocês!!

A minhas irmãs Juliane, Larissa e Paola por aceitarem caminhar comigo nessa existência e por compartilharem os momentos bons e não tão bons da vida. Pelo seu apoio, carinho e companheirismo dedicados a mim durante esse trabalho. Muito obrigada manas! Amo vocês!!

Agradeço o apoio e carinho dos meus sobrinhos Isadora, Regina, Maiara, Julia, Maria Luiza, Rennan, Ana Caroline e Melissa, dos meus cunhados Rodrigo, Caio, Marcia Regina, Carlos Renato, Marcio Rodrigo, Juliane, Michelle e Joacir.

As profissionais Lorete e Dionéia pelo seu trabalho e apoio nos momentos mais difíceis desse processo. Nossas conversas e reflexões foram muito importantes para que eu tivesse condições para realizar e concluir esse trabalho. A vocês o meu muito obrigada!!

A todos meus amigos queridos de Foz e de Curitiba pelo apoio, carinho e estímulo nesses anos todos, vocês foram fundamentais nessa caminhada. Meu muito obrigado a todos!!

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”.
Chico Xavier

Resumo

KLOCK, Joyce Cristiane. **Montagem de cariótipo de peixes assistida por computador**.2017. 55 páginas. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica e Informática Industrial) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

A obtenção de cariótipos de peixes desempenha um papel importante em estudos de citotaxonomia e evolução cromossômica das espécies. No entanto poucos sistemas semi ou completamente automatizados para a obtenção de cariótipo de peixes estão disponíveis. Este trabalho propõe e avalia uma ferramenta baseada em imagens que auxilie a montagem de cariótipos de peixes. As espécies analisadas foram *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794); *Hypostomus ancistroides* (Ihering, 1911) e *Parauchenipterus galeatus* (Linnaeus, 1766); popularmente conhecidas como traíra, cascudo e bagre sapo, respectivamente. Um total de 100 metáfases mitóticas foram analisadas por dois métodos: 1 – geração semiautomática de cariótipo e 2 - geração automática de cariótipo. Os resultados foram analisados por meio da correlação de Pearson, gráficos de diferenças e tabelas de contagens. A avaliação do sistema foi feita utilizando-se como referência a média das contagens feitas por quatro usuários. No método 1 quatro usuários realizaram contagens nas 100 metáfases apresentando correlação interobservador de $r \geq 0.997$. O número total de cromossomos identificados pelo método 1 foi 4348 e para o método 2 foi 4135, excluindo 1,3% de falsos positivos, resultando em uma identificação automática de aproximadamente 95,1% dos cromossomos presentes nas imagens. Os falsos negativos representam 4,9% do total de cromossomos. A correlação entre os dois métodos foi de $r = 0.93$. Os resultados indicam que a ferramenta pode ser inserida no procedimento de cariotipagem de peixes para acelerar o processo com níveis aceitáveis de exatidão.

Palavras-chave: cariotipagem de peixes assistida por computador, cariótipo, *Hoplias malabaricus, Hypostomus ancistroides, Parauchenipterus galeatus.*

Abstract

KLOCK, Joyce Cristiane. **Computer assisted fish karyotyping**.2017. 55 páginas. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica e Informática Industrial) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

Fish karyotyping plays an important role in studies of cytotaxonomy and chromosomic evolution of species. However, few semi or completely automated fish karyotyping systems are available. This work proposes and evaluates an image-based tool to assist fish karyotyping. The analyzed species were *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794), *Hypostomus ancistroides* (Ihering, 1911), and *Parauchenipterus galeatus* (Linnaeus, 1766). In Portuguese, these species are commonly refered to as traíra, cascudo and bagre sapo, respectively. A total of 100 metaphases were analyzed by two methods: (1) semi-automatic karyotype generation and (2) automatic karyotype generation. The results were analyzed using Pearson correlation, difference graphs and counting tables. The reference used for the evaluation of the system was the average of the counts made by four experts. In method 1, four users performed counts on the 100 metaphases with interobserver correlation of $r \geq 0.997$. The total number of chromosomes identified by method 1 was 4348 and method 2 was 4135, excluding 1,3% false positives, resulting in an automatic identification of approximately 95,1% of the chromosomes present in the images. False negatives represent 4,9% of the total chromossomes. The correlation between the methods was $r = 0.93$. The results indicate that the tool can be introduced for fish karyotyping procedures contributing for accelerating the process with acceptable accuracy.

Keywords: computer assisted fish karyotyping, *Hoplias malabaricus*, *Hypostomus ancistroides*, karyotype, *Parauchenipterus galeatus*.

Lista de Figuras

Figura 1 – Ciclo mitótico. 19

Figura 2 - Estrutura de um cromossomo. 21

Figura 3 - Classificação de cromossomos. 22

Figura 4 - Cariótipo de peixe. (a) Metáfase; (b) Cariótipo final. 24

Figura 5 - Cariótipo de peixe com identificação de duas classes de cromossomos. 24

Figura 6 - Frasco “Ependorf” com a ressuspensão. 27

Figura 7 - Preparação da lâmina. 28

Figura 8 - Secagem da lâmina. 28

Figura 9 - Lâminas coradas. 29

Figura 10 - Microscópio Olympus BX51 com câmera fotográfica Olympus DP72. 29

Figura 11 – Abertura do sistema. 32

Figura 12 – Seleção da imagem a ser processada. 32

Figura 13 – Contagem dos cromossomos. 33

Figura 14 – Separação dos cromossomos justapostos. 33

Figura 15 – Separação dos cromossomos justapostos utilizando zoom. 34

Figura 16 – Limpeza de artefatos. 34

Figura 17 – Marcação da limpeza de área. 35

Figura 18 – Gravação da imagem. 35

Figura 19 – Interface para classificação dos cromossomos. 36

Figura 20 – Imagem de cromossomos com um núcleo interfásico. 37

Figura 21 – Imagem de cromossomos com pouco artefatos. 38

Figura 22 – Imagem de cromossomos com muitos artefatos. 38

Figura 23 – Análise automática. 39

Figura 24 – Análise semiautomática. 40

Figura 25 – Contagem assistida por computador comparada com os resultados da contagem automática. 41

Figura 26 – Gráfico de diferenças entre a contagem Automática e a Média da Contagem Assistida. 42

Figura 27 – Distribuição das Contagens realizadas pelos quatro usuários. 46

Figura 28 – Exemplos de falso positivo. 47

Figura 29 – Exemplos de cromossomos justapostos. 48

Lista de Tabelas

Tabela 1. Classificação dos cromossomos. 24

Tabela 2. Informações gravadas sobre as contagens de cromossomos. 36

Tabela 3. Total de cromossomos contados nos dois métodos. 41

Tabela 4. Informações gravadas sobre o processamento das imagens. 43

Tabela 5. Total de cromossomos contados pelos quatro usuários. 45

Tabela 6. Correlação das contagens realizadas pelos quatro usuários. 45

Tabela 7. Número de imagens com uso da opção Linha e da opção Limpar área. 47

Tabela 8. Total de cromossomos contados, excluindo falsos positivos. 47

Tabela 9. Resultado final das análises. 48

Tabela 10. Informações das contagens de cromossomos em 100 imagens analisadas. 53

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 16
1.1. MOTIVAÇÃO 16
1.2. OBJETIVOS 17
1.2.1. Objetivo Geral 17
1.2.2. Objetivos Específicos 18
2. REVISÃO SOBRE CONCEITOS CITOGENÉTICOS 19
2.1. CROMOSSOMO 19
2.1.1. Estrutura do Cromossomo 20
2.1.2. Classes de Cromossomos 21
2.2. CARIÓTIPO 22
2.2.1. Montagem manual de Cariótipo de Peixe 23
3. MATERIAIS E MÉTODOS 26
3.1. OBTENÇÃO DE MITOSES POR TRATAMENTO “VIVO” 26
3.2. SISTEMA DE GERAÇÃO AUTOMÁTICA E SEMIAUTOMÁTICA DE CARIÓTIPO DE PEIXE 30
3.2.1. Análise automática e semiautomática 31
3.3. AVALIAÇÃO DO SISTEMA DE GERAÇÃO AUTOMÁTICA E SEMIAUTOMÁTICA DE CARIÓTIPO DE PEIXE 36
3.3.1. Análise Automática 39
3.3.2. Análise Semiautomática 40
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES 41
4.1. ANÁLISE AUTOMÁTICA E SEMIAUTOMÁTICA 41
5. CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS 49
5.1. CONCLUSÕES 49
5.2. TRABALHOS FUTUROS 49
5.2.1. Desenvolver e avaliar métodos automáticos para classificação e pareamento de cromossomos 49

5.2.2. Realizar estudos para avaliar a possibilidade de melhorar o foco e o contraste das imagens geradas a partir das lâminas com as metáfases. 50
5.2.3. Avaliar a disponibilização do sistema usando outras plataformas 50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 51
APÊNDICE A – CONTAGENS DOS CROMOSSOMOS REALIZADAS PELOS QUATRO USUÁRIOS 53

1. INTRODUÇÃO

Este capítulo tem a função de introduzir o trabalho desse Mestrado mencionando a motivação para a sua realização, bem como o objetivo principal e seus objetivos específicos.

1.1. MOTIVAÇÃO

Conhecer e estudar a evolução cromossômica e a de sequências espécie-específicas é de grande importância para a taxonomia de espécies. Neste contexto, há uma ciência que desde seu início, uniu conhecimentos da citologia e da genética, dando origem a uma área comum, chamada citogenética. Essa ciência atualmente compreende todo e qualquer estudo relativo ao cromossomo, bem como sua morfologia, organização, função e replicação, levando em consideração a sua variação e evolução (GUERRA, 1988). Este campo de estudo surgiu no início do século XX quando os cientistas perceberam que os cromossomos são os carreadores dos genes. A citogenética é o estudo dos cromossomos e o seu papel na hereditariedade (O'CONNOR, 2008).

No âmbito da ciência chamada Genética, o termo cariótipo é a descrição das características do conjunto cromossômico de uma espécie (GUERRA, 1988), ou seja, compreende os cromossomos pareados e alinhados de forma decrescente, separados por morfologia. O estudo do cariótipo de diversos organismos tem como objetivos observar variações numéricas, detectar características a partir de sua estrutura e estudar a evolução das espécies e de sequências específicas.

O processo de montagem de um cariótipo é conhecido como cariotipagem e é obtido através de uma fotomicrografia de uma célula em fase de divisão celular na fase de metáfase mitótica. A cariotipagem envolve o pareamento dos cromossomos homólogos e a ordenação decrescente dos cromossomos pareados separados por morfologia, provendo a visualização genômica dos cromossomos de um indivíduo. A maior aplicabilidade da citogenética de peixes, se refere aos estudos de evolução cromossômica e citotaxonomia (ARTONI; VICARI; BERTOLLO, 2000). Os peixes formam um grande grupo de organismos, cerca de 50% dos vertebrados (CARVALHO;

OLIVEIRA; FORESTI, 1998) e constituem um dos grupos mais favoráveis para estudos genéticos e citogenéticos pois podem ser considerados como a base da evolução para os anfíbios, répteis, pássaros e mamíferos (DENTON, 1973). A maior aplicabilidade da citogenética de peixes, refere-se aos estudos evolutivos (ARTONI; VICARI; BERTOLLO, 2000), e desta forma traz resultados importantes para os estudos evolutivos dos organismos em geral.

Tais estudos se demonstram de grande importância, no entanto poucos sistemas semi ou completamente automatizados para a obtenção de cariótipo de peixes são encontrados na literatura. Em estudo na literatura, encontrou-se um sistema de montagem de cariótipo de peixe baseado em Conjuntos Difusos (FARIA, 2006). Assim como também um sistema para análise e montagem de cariótipo de peixe, feito de maneira manual (BRESSANE-NETO et al., 2005). Dois trabalhos voltados para a solução do problema em questão, mas que não estão disponíveis para uso da comunidade científica. Devido a isso há uma grande necessidade de se obter uma ferramenta semi ou completamente automatizada para esse fim.

A Engenharia Biomédica que reúne princípios e conceitos das ciências exatas e das ciências biológicas, desenvolvendo abordagens inovadoras aplicadas ao desenvolvimento de sistemas de análise, será de grande importância na resolução desse problema. De posse desse entendimento e compreensão, este trabalho visa unir os conhecimentos da citogenética de peixes com os conhecimentos de ciência da computação, para o desenvolvimento de uma ferramenta baseada em imagens que auxilie a montagem do cariótipo de peixe, a partir de uma fotomicrografia de células de peixe em divisão (metáfase), feita pelos citogeneticistas.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo Geral

O principal objetivo deste trabalho é especificar e avaliar um sistema baseado em imagens que auxilie a geração do cariótipo de peixe, a partir de uma fotomicrografia de células de peixe em divisão (metáfase mitótica).

1.2.2. Objetivos Específicos

- Descrever os passos para a obtenção do cariótipo, para o desenvolvimento de uma ferramenta computacional, levando em consideração as etapas do processo manual para a cariotipagem.
- Avaliar os resultados obtidos depois da utilização do sistema desenvolvido para a geração do cariótipo.

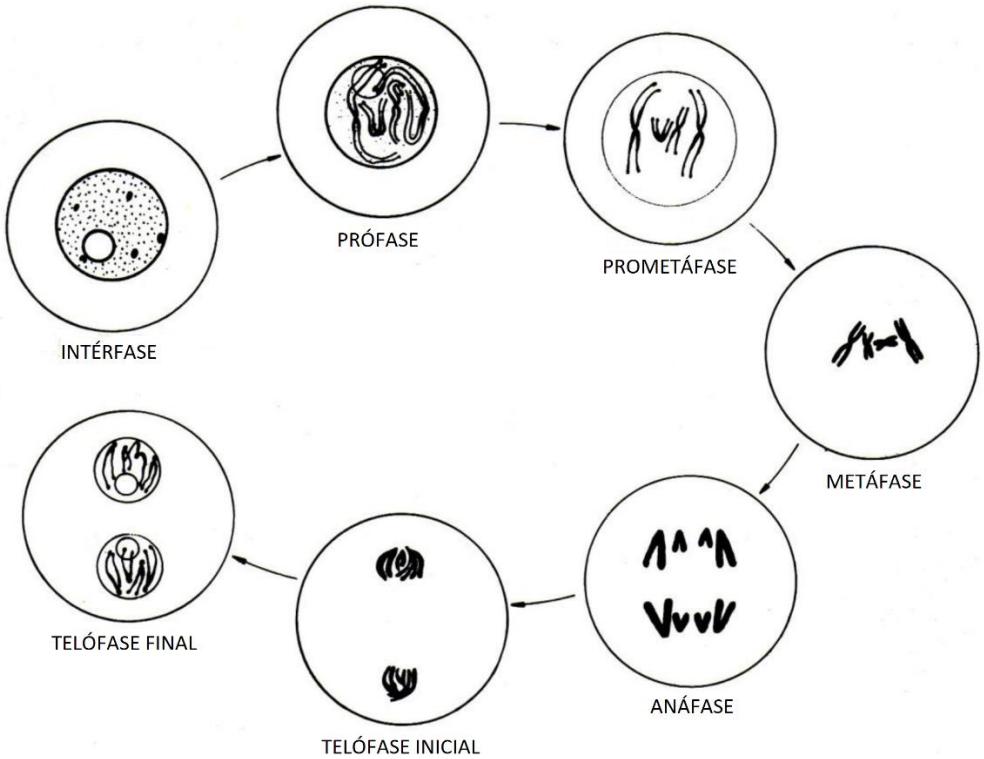
2. REVISÃO SOBRE CONCEITOS CITOGENÉTICOS

Neste capítulo apresenta-se uma introdução sobre os conceitos relacionados à citogenética. Para tal entendimento, é necessário apresentar conceitos básicos sobre a genética, bem como sobre cromossomos, sua estrutura e classificação. Assim como também sobre o Cariótipo, tema diretamente relacionado com o objetivo geral desse trabalho.

2.1. CROMOSSOMO

A genética é o estudo dos genes em todos os seus níveis.Teve seu início nos anos de 1860, com o trabalho intitulado “Ensaios com plantas híbridas” de Gregor Michael Mendel, conhecido como o “Pai da Genética Clássica”. O gene é uma região funcional da longa molécula de DNA (Desoxirribonucleico), que constitui a estrutura fundamental de um cromossomo (GRIFFITHS, A. J. F., WESSLER, S. R., LEWONTIN, R. C., CARROLL, 2009).

Figura 1 – Ciclo mitótico.



Fonte: Adaptado de GUERRA (1988)

A citogenética atualmente compreende todo e qualquer estudo relativo ao cromossomo, bem como sua morfologia, organização, função e replicação, levando em consideração a sua variação e evolução(GUERRA, 1988).

Na maioria das vezes, quando se refere a um cromossomo em citogenética, refere-se a um cromossomo metafásico mitótico. Isso deve-se ao fato que os cromossomos são mais facilmente analisados e observados durante a metáfase, devido ao seu maior grau de condensação e individualização.

Existem dois processos básicos da divisão celular dos eucariotos, a meiose que reduz a quantidade de cromossomos e dá origem aos gametas e a mitose que mantem constante a quantidade dos cromossomos. As etapas do processo tanto da mitose quanto da meiose são as mesmas. Ambos os processos de divisão celular apresentam as principais fases que são a Prófase, Metáfase, Anáfase e Telófase. Cada ciclo se inicia na Prófase e termina da Telófase, como mostra a Figura 1.

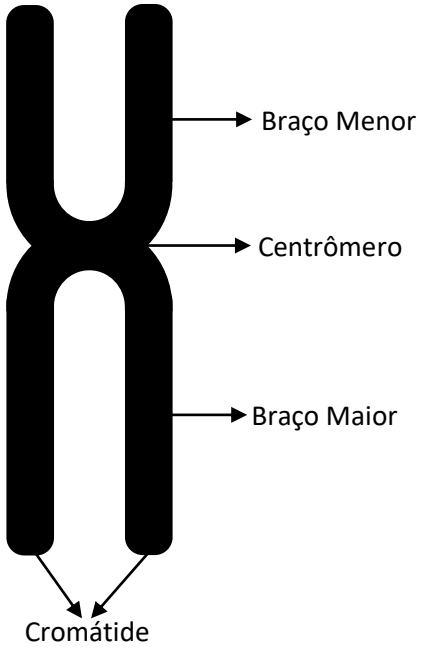
Quando o núcleo não está se dividindo ele se encontra em Intérfase, nessa fase os cromossomos se encontram total ou parcialmente descondensados. A Intérfase é o período entre duas divisões, onde a célula duplica seu material genético e suas organelas. A Prófase é a fase mais longa do processo de divisão, nessa fase forma-se por condensação o cromossomo metafásico. O aspecto final dessa fase, como os cromossomos já bem condensados e bem espalhados pelo núcleo é conhecido como prometáfase. Em seguida ocorre a Metáfase, os cromossomos se encontram alinhados em uma placa metafásica, aonde eles estão em seu grau máximo de condensação. Na Anáfase ocorre a formação dos cromossomos-filhos ou cromossomos-irmãos. No início da Telófase os cromossomos se apresentam fortemente condensados e agregados, formando núcleos pequenos e bem densos, não sendo possível distingui-los (GUERRA, 1988)

2.1.1. Estrutura do Cromossomo

Cada cromossomo metafásico é sempre formado por duas subunidades paralelas chamadas cromátides. Cada uma delas é constituída por um filamento que contém material genético, o DNA (Desoxirribonucleico), associados a proteínas e RNA (Ribonucleico). As cromátides são ligadas entre si por uma região mais delgada e fracamente corada chamada constrição primária ou centrômero. O centrômero divide

cada cromátide em dois segmentos, os chamados braços cromossômicos. O braço localizado na parte superior ao centrômero é o braço menor, e o localizado na parte inferior é o braço maior. (GUERRA, 1988). A Figura 2 apresenta uma representação do centrômero e dos braços de um cromossomo.

Figura 2 - Estrutura de um cromossomo.



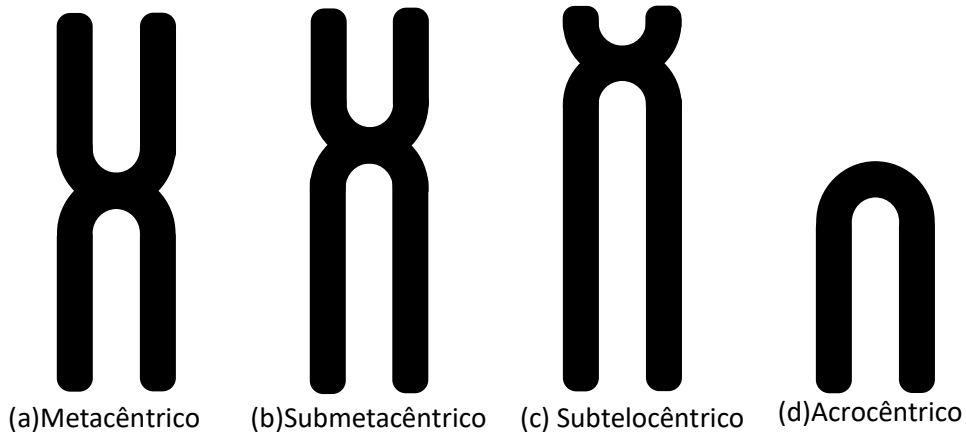
2.1.2. Classes de Cromossomos

O centrômero pode se localizar em qualquer posição entre o meio e a extremidade do cromossomo. Assim, dependendo da posição do centrômero os cromossomos são classificados em 4 classes possíveis, representadas na Figura 3 e definidas a seguir:

- **Metacêntrico:** o centrômero se encontra no meio, ou aproximadamente no meio, resultando em dois braços aproximadamente iguais. Figura 3 (a).
- **Submetacêntrico:** o centrômero se encontra deslocado para a parte superior. Figura 3 (b).
- **Subtelocêntrico:** o centrômero se encontra próximo da extremidade do cromossomo, resultando em um único braço. Figura 3 (c).
- **Acrocêntrico:** o centrômero se encontra em uma das extremidades. Figura 3 (d).

A classificação dos cromossomos é dada conforme os parâmetros indicados na Tabela 1.

Figura 3 - Classificação de cromossomos.



2.2. CARIÓTIPO

A palavra Karyotype é derivada da palavra Grega “Karyon” que significa núcleo e “typos” que significa imprimir. O cariótipo é a descrição das características do conjunto cromossômico de uma espécie (GUERRA, 1988).

O cariótipo pode ser representado por um cariograma que é uma representação esquemática utilizando valores médios da posição do centrômero, do tamanho do cromossomo e no caso dos peixes do número de cromossomos.

Para a obtenção de um cariótipo é necessário considerar três características. A primeira é a posição do centrômero, que permite a sua classificação nas quatro classes já apresentadas. A segunda é o tamanho do cromossomo, que varia de acordo com a espécie. Há uma variedade muito grande no tamanho dos cromossomos, principalmente nas espécies de peixes. O tamanho é uma informação muito importante visto que os cromossomos são dispostos em ordem decrescente de tamanho, em cada uma das classes morfológicas. E a terceira é o número de cromossomos, que em geral é constante, mas no caso específico dos peixes pode variar dentro de uma mesma entidade biológica.

O processo de montagem de um cariótipo, é uma tarefa muito importante, para caracterizar geneticamente os seres vivos, estudar a evolução cromossômica e detectar anormalidades e variações nos cromossomos. Mas essa tarefa é repetitiva, subjetiva, morosa, está sujeita a erro e exige um profissional experiente.

2.2.1. Montagem manual de Cariótipo de Peixe

Para se obter a montagem do Cariótipo de Peixe é necessário obter uma fotomicrografia de uma célula de peixe no estágio de metáfase mitótica. A imagem adquirida, geralmente apresenta artefatos e baixo contraste.

Em seguida é necessário recortar cada cromossomo da imagem para ser analisado individualmente. A posição do centrômero é determinada pelo citogeneticista. Nos casos de cromossomos acrocêntricos, cromossomos muito pequenos, cromossomos muito tortos e no caso de sobreposição exige do citogeneticista muita experiência para a identificação e caracterização destes cromossomos.

Depois de determinar o centrômero de cada cromossomo, é necessário medir o tamanho dos braços do cromossomo com um paquímetro. Utiliza-se esse aparelho para obter várias medidas dos segmentos e no final soma-se todos os segmentos para a obtenção da medida final.

A partir do tamanho dos braços do cromossomo, é calculada a RB (Razão entre braços). A Razão entre os braços é a divisão entre o tamanho do braço maior do cromossomo pelo braço menor, conforme mostra a equação a seguir:

$$RB = \frac{comprimento\ braço\ maior}{comprimento\ braço\ menor}$$

E também é calculado o IC (Índice Centromérico), que é a razão entre o tamanho do braço menor pelo tamanho total do cromossomo, multiplicado por cem, como mostra a equação a seguir:

$$CI = \frac{comprimento\ braço\ menor}{tamanho\ do\ cromossomo} * 100$$

Assim, de acordo com o valor da RB cada cromossomo é classificado nas quatro classes possíveis (metacêntrico, submetacêntrico, subtelocêntrico e acrocêntrico), conforme a razão entre braços (LEVAN; FREDGA; SANDBERG, 1964), onde o limite da razão entre braços (RB) é dado conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Classificação dos cromossomos.

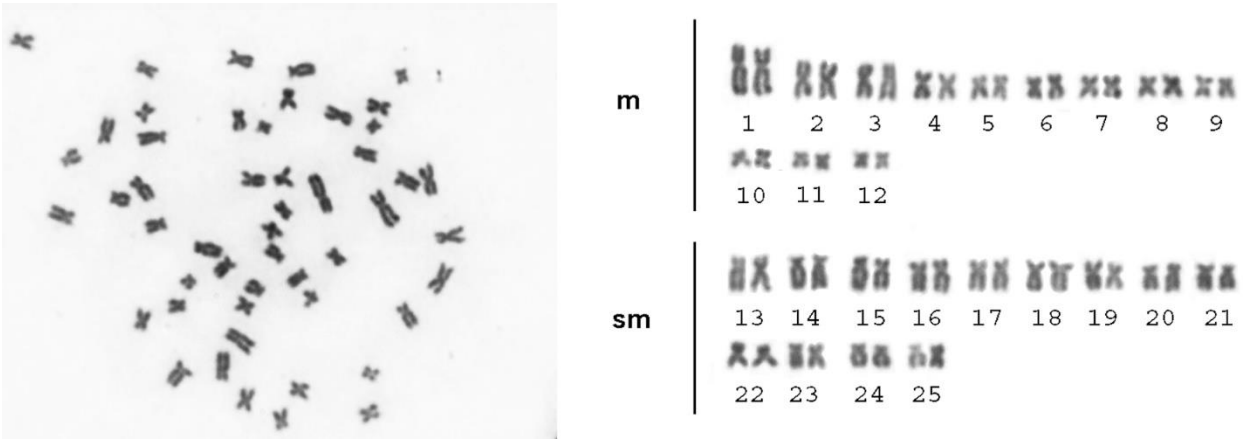
Razão entre braços – RB	Classificação
1,00-1,70	metacêntrico (m)
1,71-3,00	submetacêntrico (sm)
3,01-7,00	subtelocêntrico (st)
>7,00	acrocêntrico (a)

Depois da etapa de classificação, os cromossomos de uma mesma classe precisam ser ordenados de forma decrescente com relação ao seu tamanho e pareados de acordo com a similaridade das características. Ao final desse processo obtém-se o cariótipo, como mostra Figura 4.

Figura 4 - Cariótipo de peixe. (a) Metáfase; (b) Cariótipo final.

Fonte: FARIA (2006)

Figura 5 - Cariótipo de peixe com identificação de duas classes de cromossomos.



Dependendo da espécie estudada e do escopo do estudo genético a ser realizado, outras classes de cromossomos podem ser consideradas, (ABRAHAM;

PRASAD, 1983; ANDREATA et al., 1993; LEVAN; FREDGA; SANDBERG, 1964). A Figura 5 apresenta um exemplo onde apenas duas classes de cromossomos foram analisadas (BLANCO, 2010).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados Materiais e Métodos, envolvendo todo o processo para a montagem de Cariótipo de Peixe realizado neste trabalho, desde a obtenção dos exemplares de peixe até o desenvolvimento e avaliação do sistema de geração automático e semiautomático.

3.1. OBTENÇÃO DE MITOSES POR TRATAMENTO “VIVO”

Para obtenção de mitoses por tratamento “vivo”, os exemplares foram capturados com tarrafas, redes de espera e varas de pesca. Os peixes capturados foram transportados vivos, em condições de oxigenação e temperatura adequadas, para o laboratório de Biodiversidade Molecular e Cromossômica de Peixes do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar. No laboratório foram mantidos em aquários climatizados, até serem processados para a obtenção dos cromossomos, seguindo as orientações do Comitê de Ética no Uso de Animais (Processo CEUA 07/2011) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Licença SISBIO 38532-21).

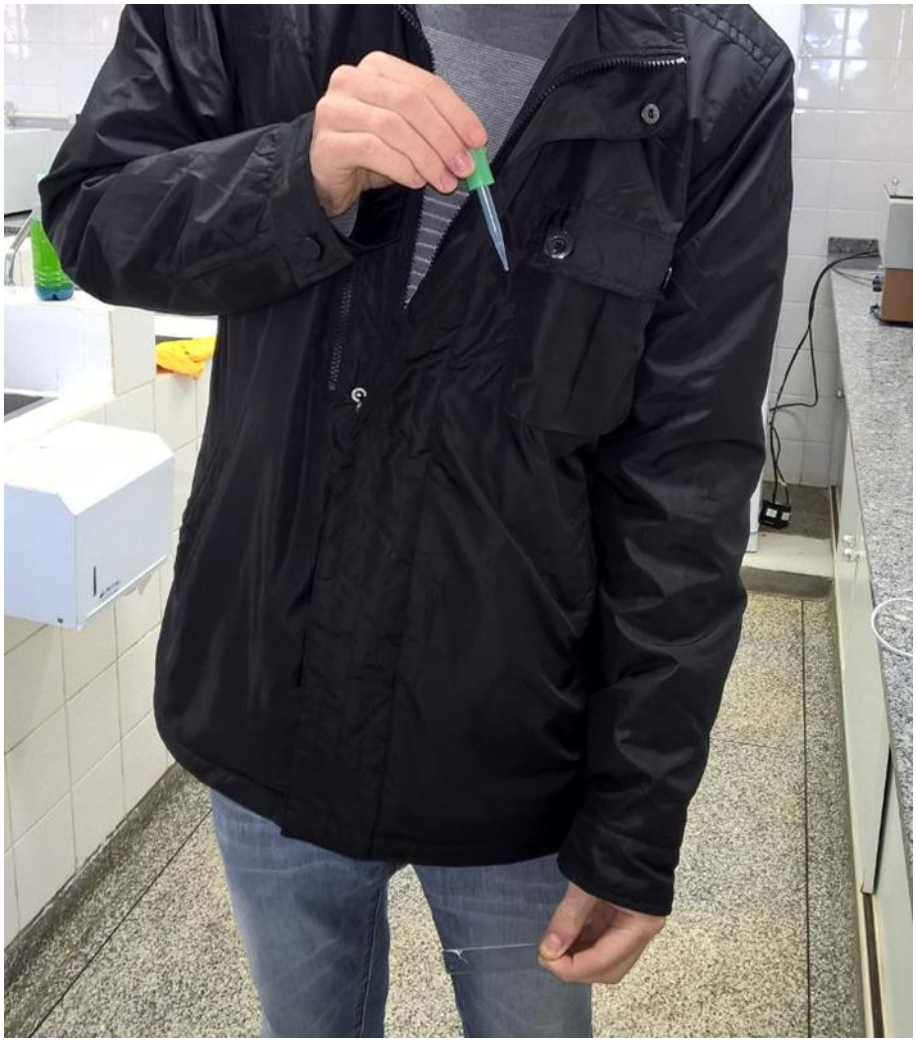
Os cromossomos foram obtidos segundo tratamento in vitro (FORESTI; OLIVEIRA; FORESTI DE ALMEIDA-TOLEDO, 1993), no qual fragmentos do rim foram colocados em 10 mL de solução salina de Hanks, em uma placa de Petri, dissociando bem o material. Posteriormente, a suspensão celular obtida foi transferida para um tubo de centrifuga, utilizando uma pipeta de Pasteur. Em seguida, adicionou-se de 1 – 2 gotas de solução de Colchicina 0,016 %, misturando-a bem com o material. O material foi então transferido para estufa a 36 ºC, por 30 minutos e centrifugado durante 10 minutos, a 500 – 800 rpm. O sobrenadante foi desprezado e adicionados 10 mL de solução hipotônica (KCl 0,075 M), misturando bem o material com uma pipeta Pasteur. Transferiu-se esse material novamente para estufa a 36 ºC, por mais 30 minutos. Posteriormente, adicionou-se cerca de 6 gotas de fixador (metanol; ácido acético – 3:1) misturando-as com o material repetidas vezes, deixando-o descansar por 5 minutos. O material foi centrifugado por 10 minutos a 500 – 800 rpm. O sobrenadante foi desprezado e, em seguida, adicionado 10 mL de fixador, misturando-o com o material

repetidas vezes. Seguiu-se nova centrifugação, por 10 minutos e repetida à fixação por mais duas vezes. O sobrenadante foi desprezado e o material diluído no fixador, de forma a se obter uma suspensão celular com material cromossômico fixado. Este material foi guardado em freezer, entre -4º e -10º, acondicionado em pequenos frascos tipo “Ependorff”, para posterior utilização, como mostra a Figura 6.

Figura 6 - Frasco “Ependorf” com a ressuspensão.

O preparo das lâminas foi realizado pingando-se três a quatro gotas da suspensão obtida em uma lâmina bem limpa previamente mantida em água destilada, aquecida entre 55 – 60ºC, por cerca de 1 minuto. O procedimento deve ser realizado segurando a pipeta Pasteur acima da lâmina a uma altura razoável para romper a membrana citoplasmática conforme mostrado na Figura 7.

Figura 7 - Preparação da lâmina.



O excesso de material foi eliminado inclinando-se um pouco a lâmina sobre um papel de filtro, seguindo-se a secagem diretamente ao ar, como mostra a Figura 8.

Figura 8 - Secagem da lâmina.

Figura 9 - Lâminas coradas.

Os cromossomos foram corados com Giemsa a 5%, em tampão fosfato (pH 6,8) durante 5 a 8 minutos, seguindo-se a lavagem da lâmina com água destilada e a secagem ao ar conforme visto na Figura 9.

As preparações cromossômicas obtidas foram capturadas, sob aumento de 100x com utilização de óleo de imersão, por meio de um microscópio de epifluorescência (Olympus BX51) acoplado à uma câmera de captura (Olympus DP72). O microscópio e a câmera fotográfica podem ser vistos na Figura 10.

Figura 10 - Microscópio Olympus BX51 com câmera fotográfica Olympus DP72.

Fonte: Adaptado de (OLYMPUS; INC; BRASIL, 2007)

3.2. SISTEMA DE GERAÇÃO AUTOMÁTICA E SEMIAUTOMÁTICA DE CARIÓTIPO DE PEIXE

Para se obter o cariótipo de peixe manualmente são necessárias várias etapas que apresentam algumas dificuldades, conforme apresentado no Capítulo 2, mas esse processo pode ser melhorado se for realizado com o auxílio do computador. Para isso foi desenvolvido um sistema de geração automática e semiautomática de cariótipo de peixe. Esse sistema auxilia os especialistas da área na montagem do cariótipo de peixes realizando parte das tarefas de maneira automática e semiautomática.

Para se iniciar a montagem do Cariótipo de Peixe é necessário obter uma fotomicrografia (imagem) de células de peixe no estágio de metáfase. As imagens capturadas têm resolução de 1392x1040 pixels e foram gravadas usando o formato JPG (Joint Photographic Experts Group).

Posteriormente, é necessário fazer a segmentação dessa imagem. Segmentar uma imagem significa particionar essa imagem em partes ou objetos que a compõem. Na maioria das aplicações a segmentação é a fase mais importante e mais difícil no processamento digital de imagens (MAURICIO, 2017). Essa fase é uma das mais difíceis, pois as imagens podem apresentar baixo contraste, ruídos, artefatos, cromossomos justapostos e às vezes cromossomos sobrepostos.

A partir do resultado da segmentação, com base nas características das áreas segmentadas, os cromossomos são identificados, contados, extraídos e verticalizados sendo finalmente ordenados em função do seu tamanho. O sistema ainda disponibiliza uma interface para que o usuário possa realizar a classificação dos cromossomos.

Essa análise foi feita utilizando-se uma ferramenta computacional desenvolvida pelo grupo de pesquisa para este fim. A ferramenta utiliza como base o algoritmo elaborado por Mauricio em sua tese (MAURICIO, 2017). O algoritmo em questão possui características autoconfiguráveis para identificar hemácias de diferentes espécies, conforme pode ser visto em (MAURICIO et al., 2017). Estas características foram utilizadas com modificações adequadas às especificidades para identificação e contagem de cromossomos.

O software Matlab (The MathWorks, Inc., Massachusetts, EUA) foi utilizado para a implementação do algoritmo viabilizando também uma interface gráfica para a realização das análises.

3.2.1. Análise automática e semiautomática

O processo de cariotipagem de peixe neste sistema consiste dos seguintes passos: (1) usuário seleciona e carrega no sistema a imagem a ser processada. Etapa que pode ser visualizada na Figura 11 e na Figura 12. (2) O sistema define um limiar inicial que é calculado automaticamente para a segmentação e posterior contagem dos cromossomos segmentados. (3) O usuário, a partir de uma análise visual da contagem automática dos cromossomos, decide pela necessidade de ajustar o Limiar com o "Slider"(Barra). O objetivo do controle assistido do limiar é obter o máximo de cromossomos automaticamente identificados. Uma representação do uso desta etapa é apresentada na Figura 13. (4) O usuário pode utilizar uma opção disponível de criar linhas divisórias para cromossomos que ficaram justapostos na imagem segmentada e que o usuário reconhece ser dois cromossomos e não um cromossomo único. A linha pode ser desenhada na imagem colorida ou na imagem binária (branco e preto). Etapa que pode ser visualizada na Figura 14. Se necessário aplicar o zoom para facilitar o desenho da linha. Como pode ser visualizado na Figura 15. (5) Uma quinta etapa consiste em realizar a limpeza de artefatos contados erroneamente, se necessário, (opção "Limpar área" no menu “Processar”). Esta etapa que pode ser visualizada na Figura 16 e na Figura 17. (6) Gravação dos resultados após verificação se todos os cromossomos foram identificados, contados e extraídos corretamente, como pode ser visualizado na Figura 18. O sistema grava as informações da contagem em uma planilha, conforme Tabela 2.

Figura 11 – Abertura do sistema.

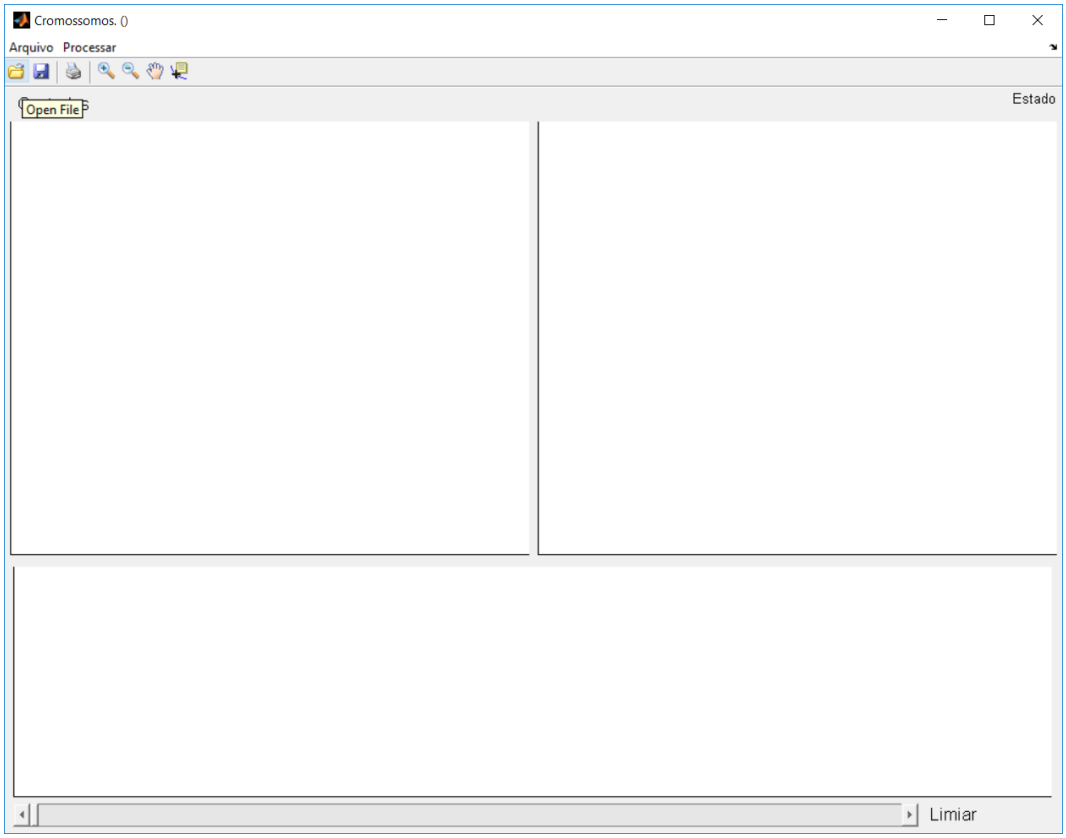


Figura 12 – Seleção da imagem a ser processada.

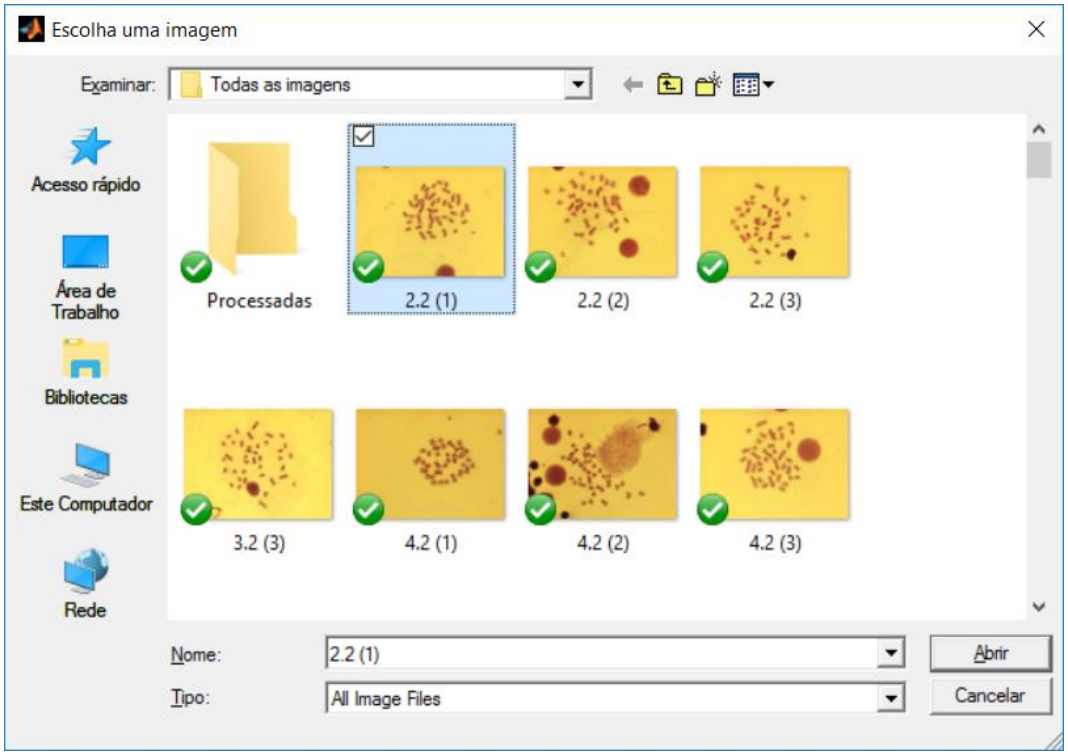


Figura 13 – Contagem dos cromossomos.

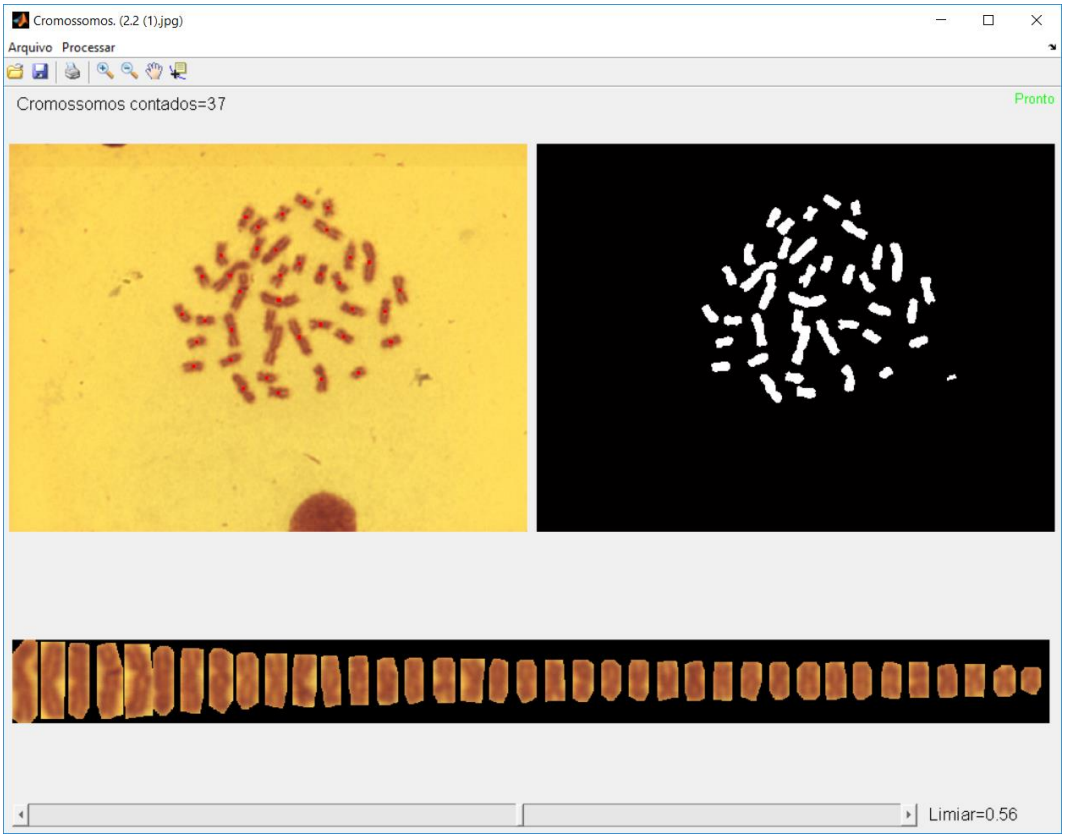
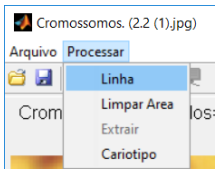


Figura 14 – Separação dos cromossomos justapostos.



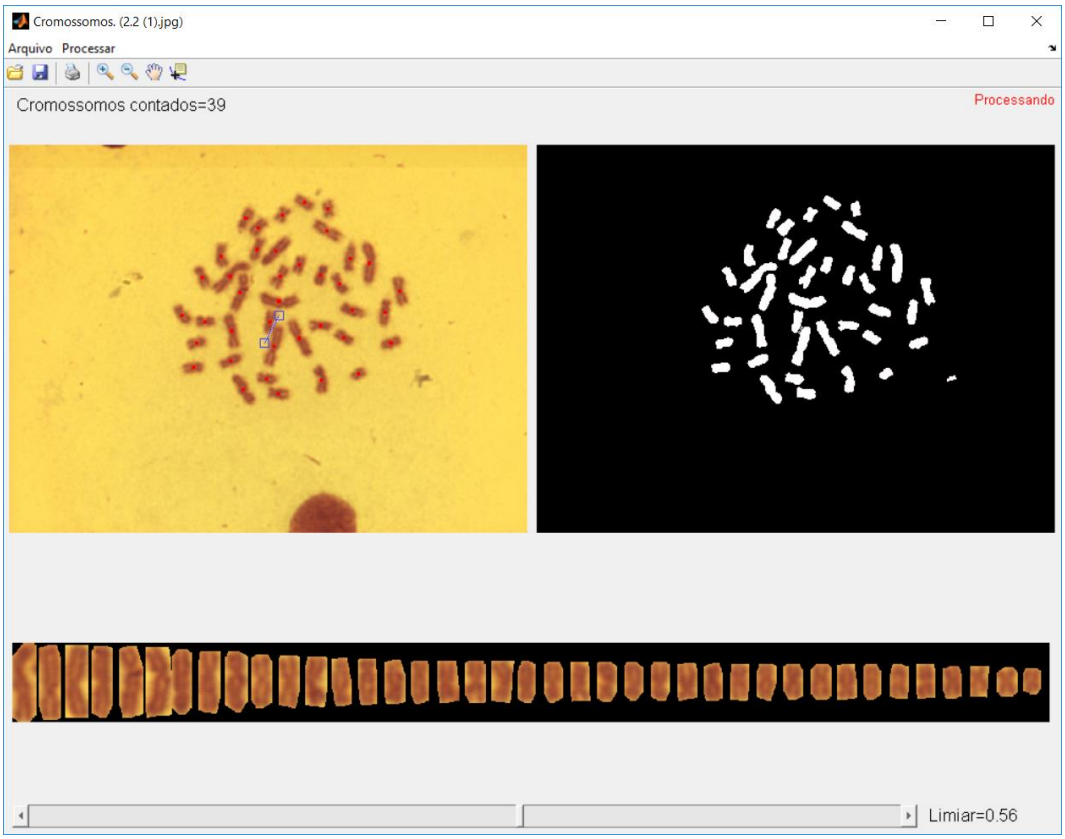


Figura 15 – Separação dos cromossomos justapostos utilizando zoom.

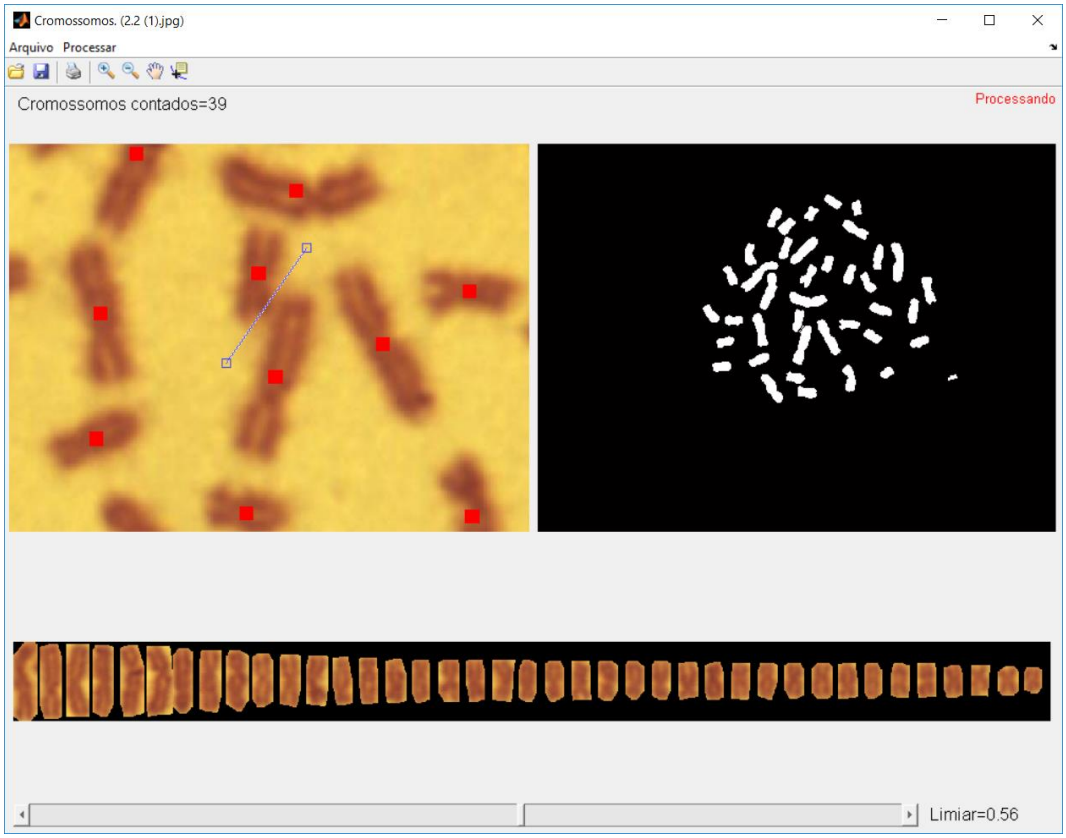


Figura 16 – Limpeza de artefatos.

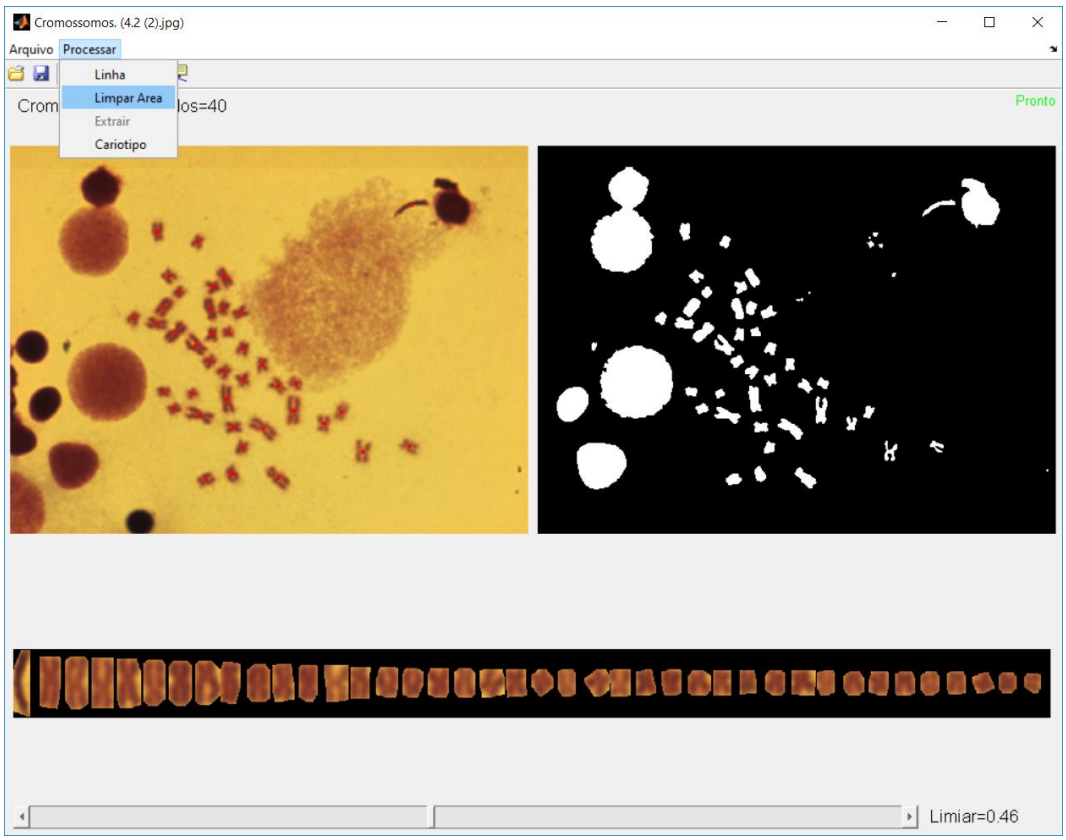


Figura 17 – Marcação da limpeza de área.

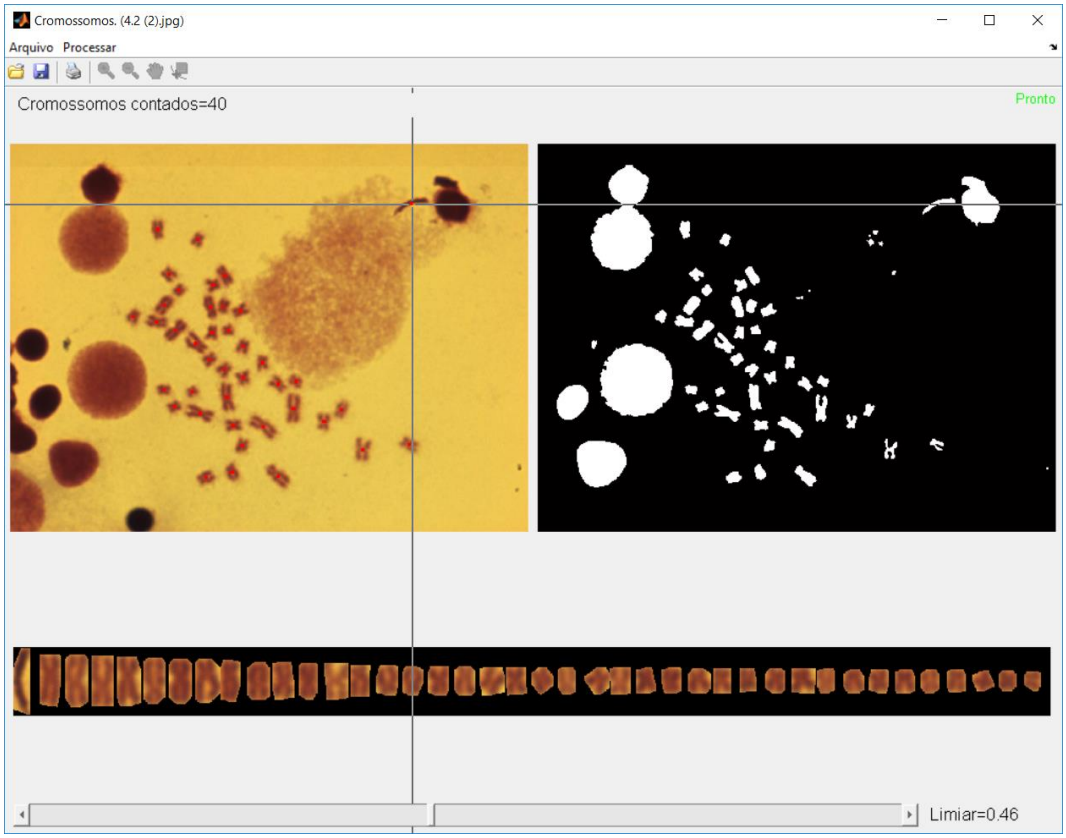


Figura 18 – Gravação da imagem.

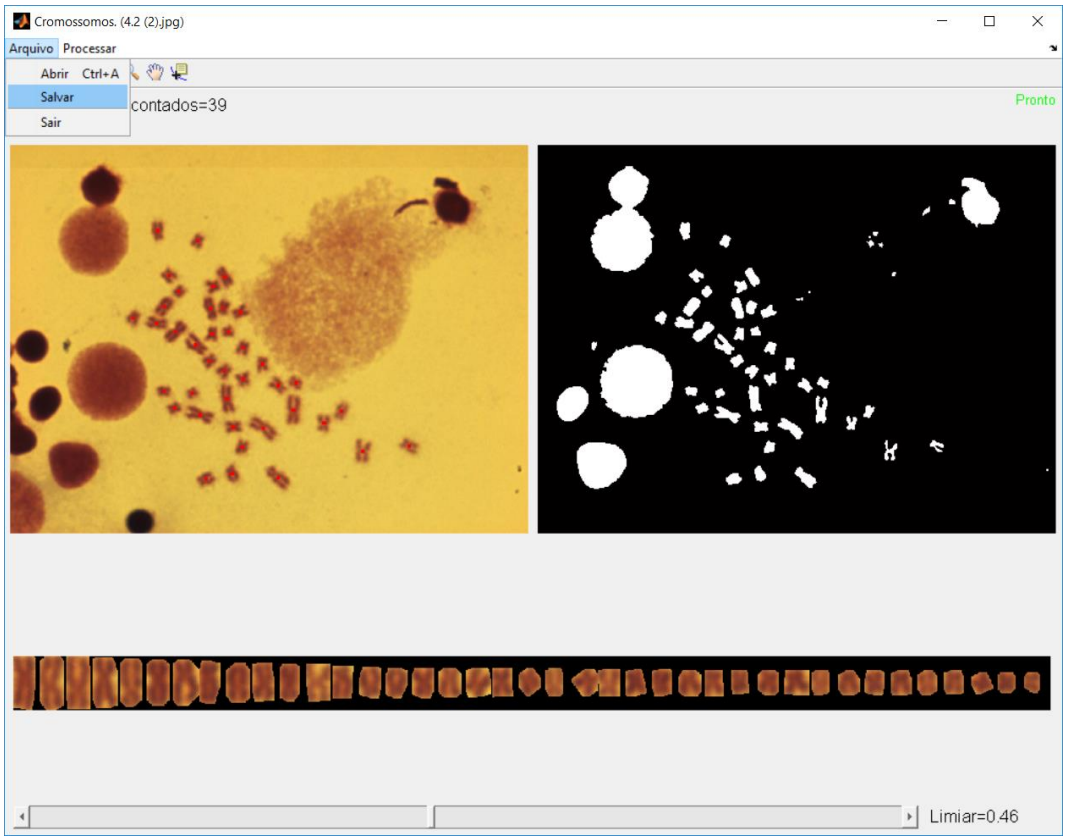
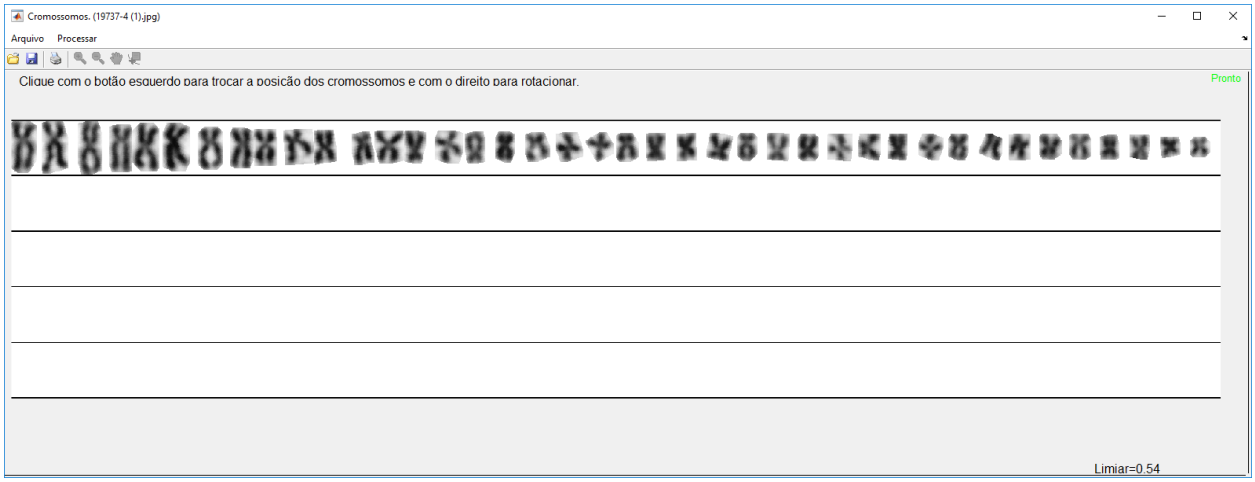


Tabela 2. Informações gravadas sobre as contagens de cromossomos.

Informação	Descrição
Imagem	Nome correspondente da imagem processada.
Limiar T	Valor do limiar escolhido pelo usuário para a segmentação da imagem.
Número de linhas desenhadas para separação	Número de linhas desenhadas para separação de cromossomos justapostos
Limpeza de área	Número de limpezas de artefatos contados erroneamente
Contagem Assistida	Resultado final da contagem de cromossomos feita pelo usuário com o auxílio do sistema
Contagem Automática	Resultado final da contagem automática de cromossomos

Usando os cromossomos extraídos, o sistema apresenta ao usuário uma interface, Figura 19, para auxiliar na classificação dos cromossomos e na montagem do cariótipo de maneira manual e interativa. A classificação dos cromossomos de maneira automática fará parte dos trabalhos futuros.

Figura 19 – Interface para classificação dos cromossomos.



3.3. AVALIAÇÃO DO SISTEMA DE GERAÇÃO AUTOMÁTICA E SEMIAUTOMÁTICA DE CARIÓTIPO DE PEIXE

Para avaliar o desempenho do sistema de geração automática e semiautomática de cariótipo de peixe foram selecionadas 100 imagens obtidas a partir de células de peixes no estágio de metáfase, cedidas por (BLANCO, 2012).Essas imagens foram analisadas de duas maneiras. A primeira de maneira automática feita

pela ferramenta computacional e a segunda de maneira semiautomática feita pelo usuário.

O conjunto de imagens avaliadas inclui diferentes espécies de peixes. As espécies analisadas foram *Hoplias malabaricus* (Traira); *Hypostomus ancistroides* (Cascudo) e *Parauchenipterus galeatus* (Bagre sapo). Nas imagens analisadas podem ser observadas diferenças na forma, tamanho e quantidade dos cromossomos, possuindo um mínimo de 34 e máximo de 54 cromossomos.

As características visuais das imagens são muito diferentes entre si. Além das diferenças entre as espécies de peixe, existem as diferenças de cor de fundo, devido ao uso de filtros no microscópio, e a presença de artefatos, ou seja, estruturas que não são cromossomos (núcleos interfásicos, precipitados de corante, resto de citoplasma, entre outros) e que dificultam a análise em questão. Esses artefatos podem ser principalmente o núcleo interfásico e restos celulares, que pode ser visualizado na Figura 20. Exemplos de imagens com artefatos podem ser visualizados na Figura 21 e Figura 22.

Figura 20 – Imagem de cromossomos com um núcleo interfásico.

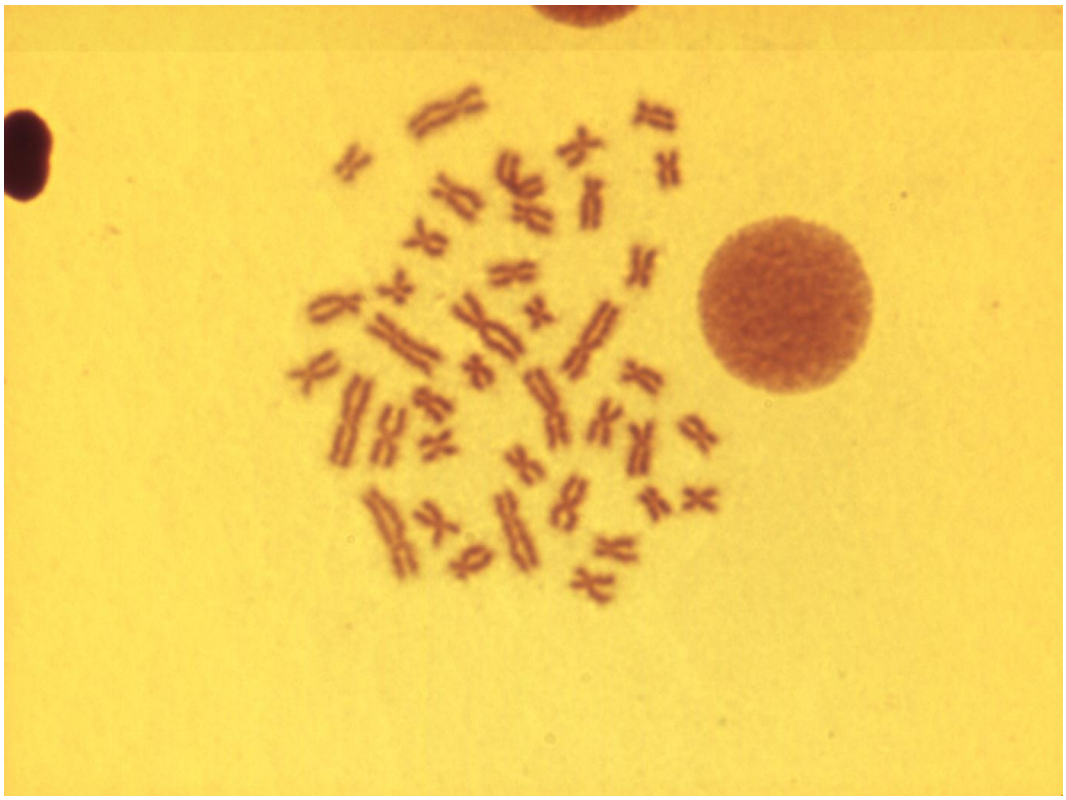


Figura 21 – Imagem de cromossomos com pouco artefatos.

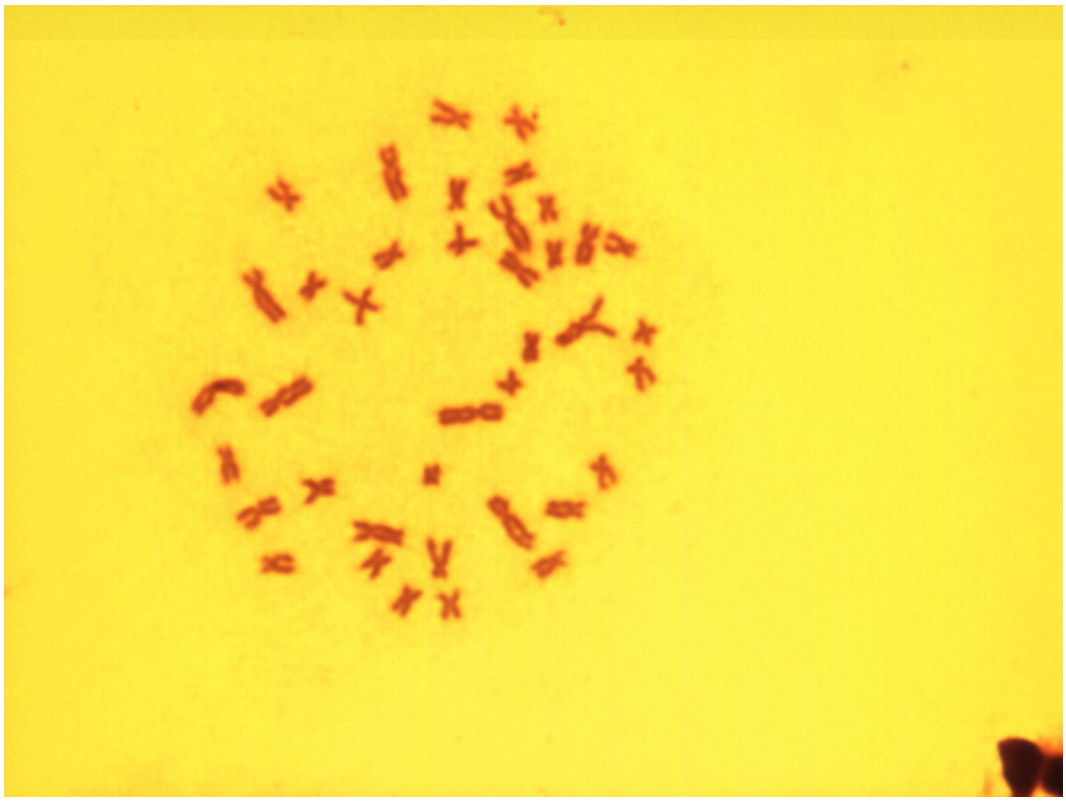
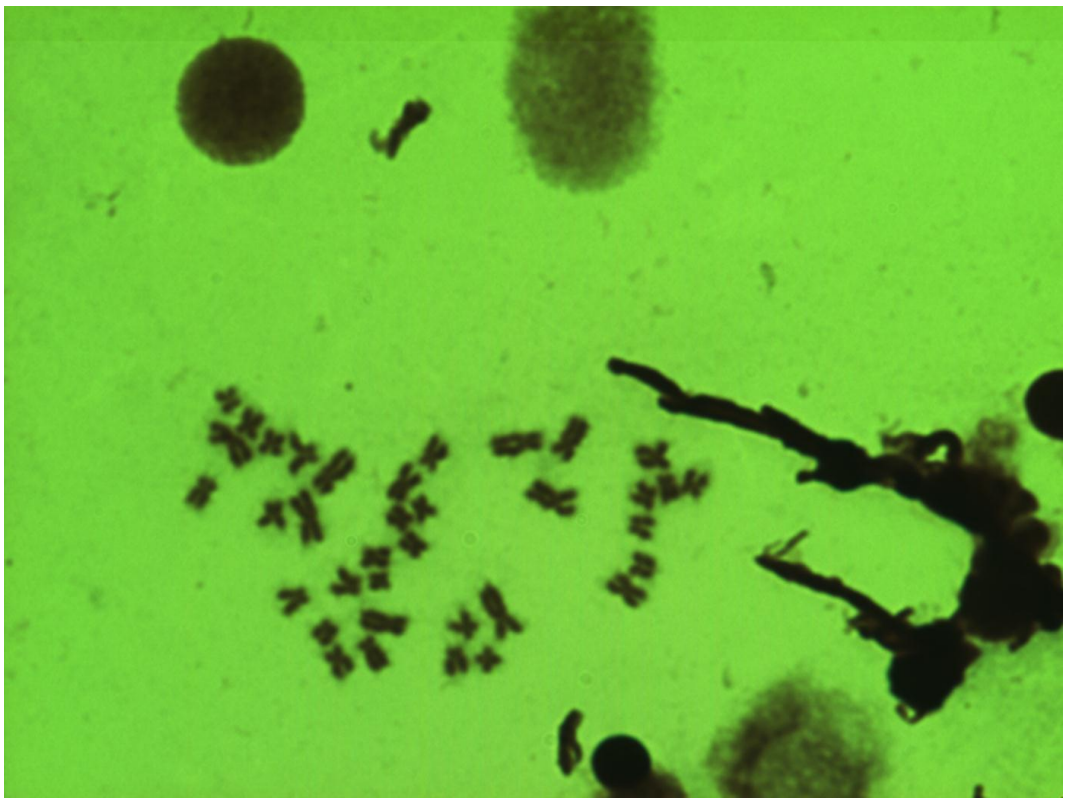


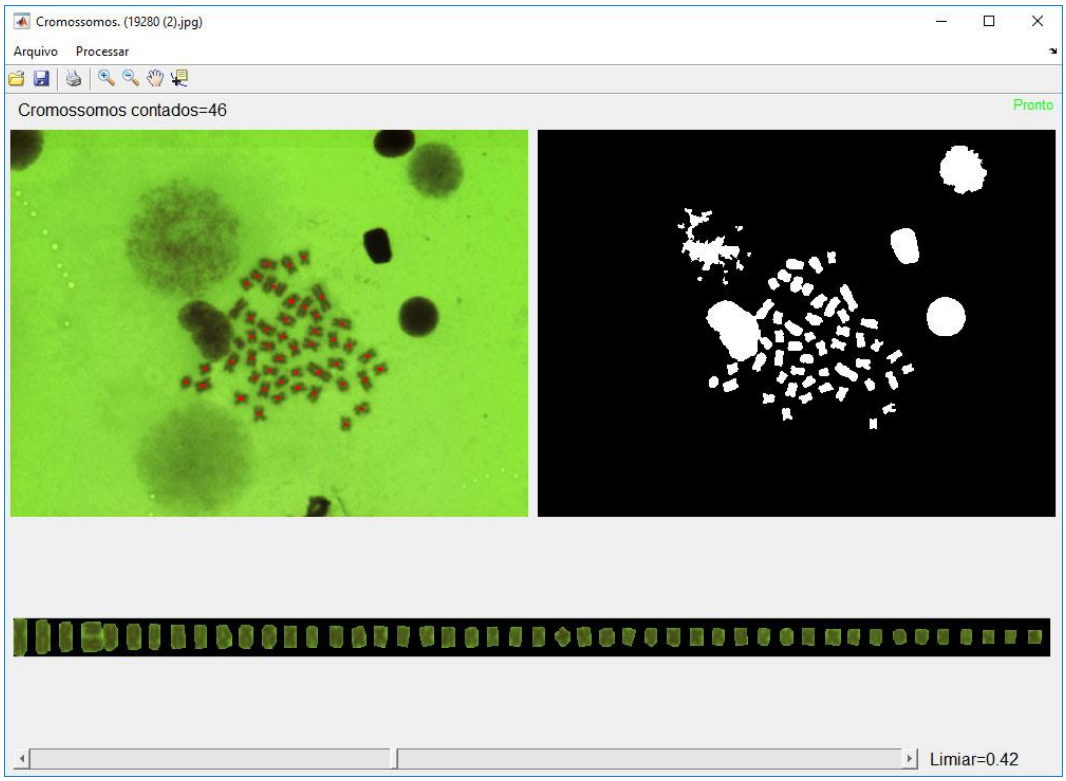
Figura 22 – Imagem de cromossomos com muitos artefatos.



3.3.1. Análise Automática

A análise feita automaticamente pelo algoritmo compreende as etapas de identificação, contagem, extração, verticalização e ordenação dos cromossomos analisados, a imagem gerada pelo sistema na análise automática pode ser visualizada na Figura 23.

Figura 23 – Análise automática.



A avaliação destas etapas automáticas foi feita comparando-se com os resultados obtidos por usuários da ferramenta através do método semiautomático.

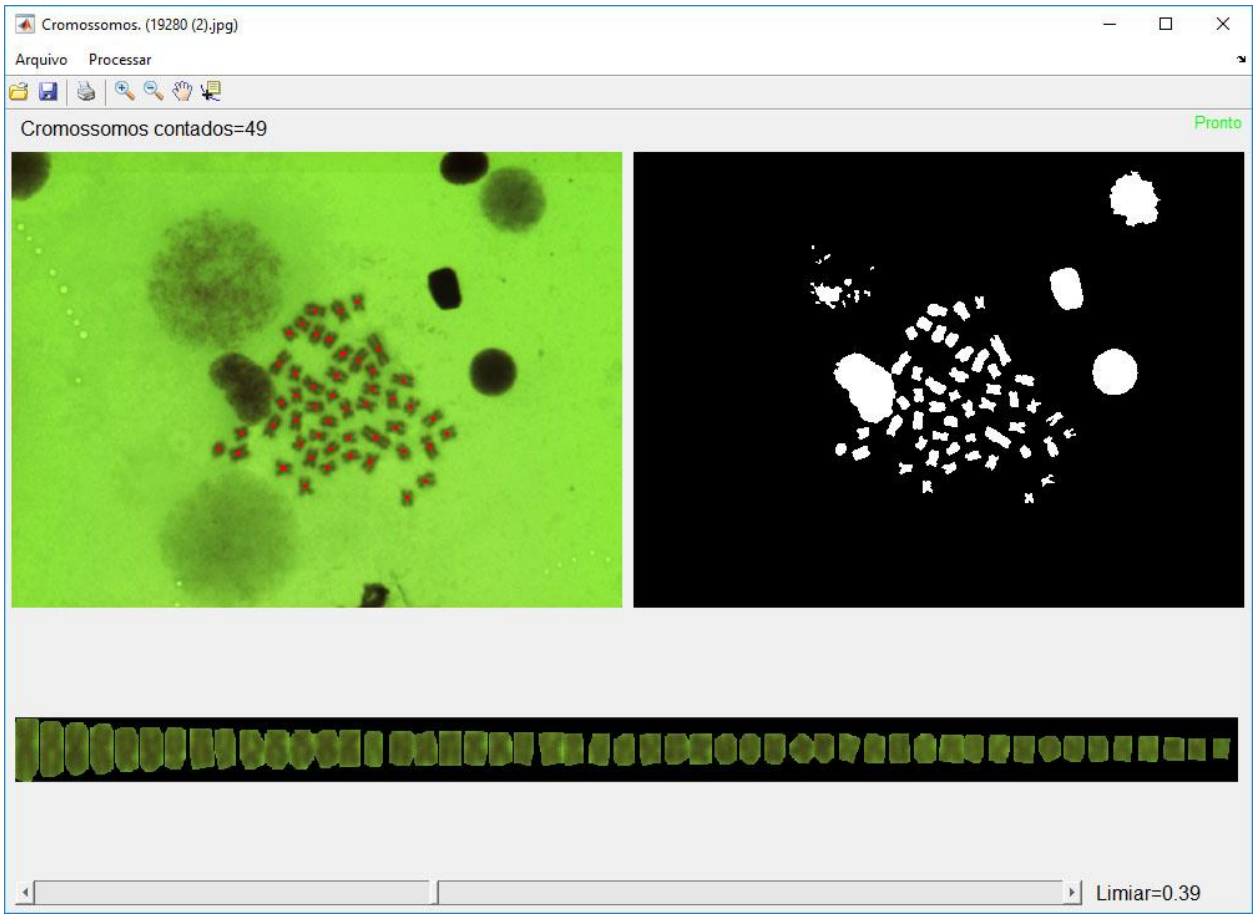
A ferramenta oferece ao usuário uma interface para auxiliar a classificação e pareamento dos cromossomos, mas não realiza estas etapas por métodos automáticos.

3.3.2. Análise Semiautomática

As imagens selecionadas foram analisadas por quatro pessoas diferentes, sendo dois usuários sem experiência na área (usuário 1 e usuário 2) e dois usuários experientes na área (usuário 3 e usuário 4). Através do resultado obtido automaticamente pela ferramenta o usuário pôde dar seguimento na geração do cariótipo de peixe.

A imagem gerada pelo sistema na análise semiautomática pode ser visualizada na Figura 24.

Figura 24 – Análise semiautomática.



A avaliação do sistema foi feita utilizando-se como referência a média das contagens feitas pelos quatro usuários.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Este capítulo apresenta os resultados e discussões das análises realizadas para os métodos apresentados no Capítulo 3.

4.1. ANÁLISE AUTOMÁTICA E SEMIAUTOMÁTICA

Considerando-se as 100 imagens processadas pela ferramenta desenvolvida e a média da contagem dos quatro usuários, foram contados no total 4348 cromossomos, conforme pode ser visto na Tabela 3. O método automático apresentou a contagem de 4190 cromossomos, o que representa uma identificação automática de aproximadamente 96% do total de cromossomos presentes nas imagens. A distribuição das contagens dos dois métodos é apresentada na Figura 25.

Figura 25 – Contagem assistida por computador comparada com os resultados da contagem automática.

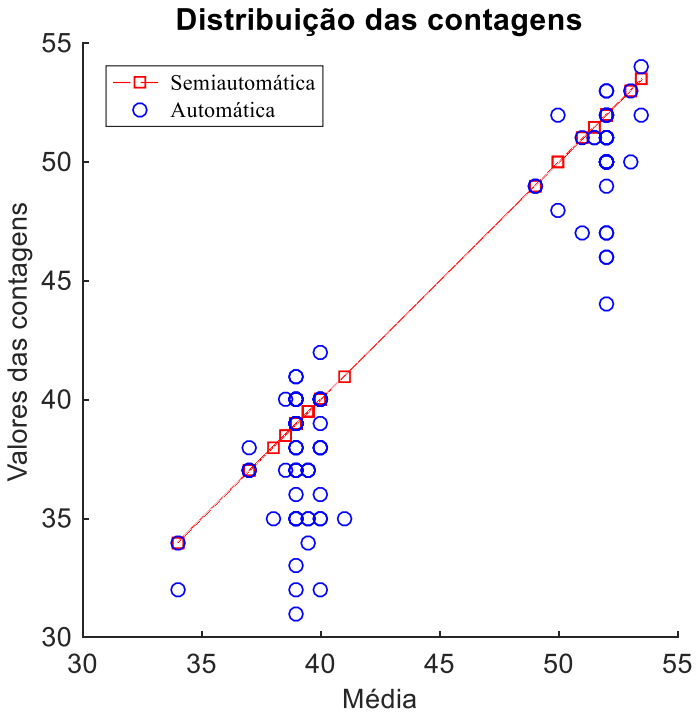


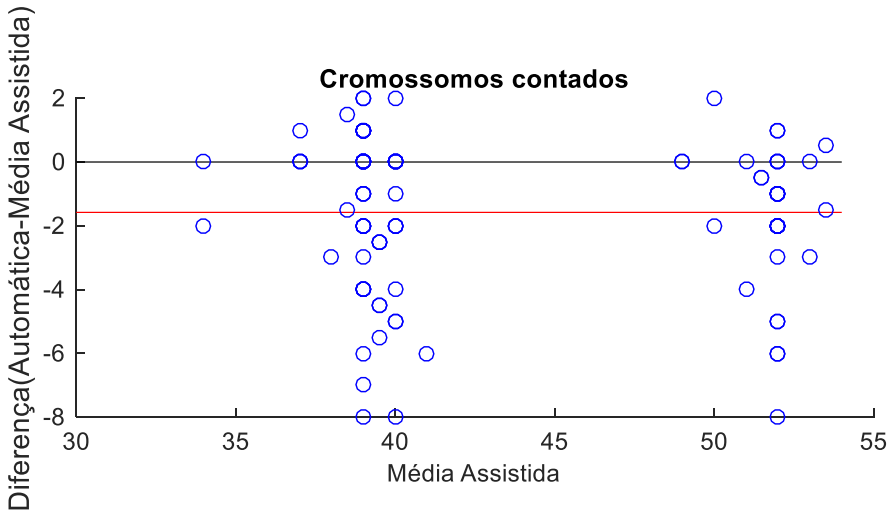
Tabela 3. Total de cromossomos contados nos dois métodos.

	Automática	Semiautomática
Cromossomos	4190	4348
%	96,4%	100%

No gráfico das diferenças, apresentado na Figura 26, é possível observar a variação entre as contagens produzidas pelas duas análises. Observa-se ainda que o número de cromossomos presentes nas amostras está na faixa de 34 a 54, concentrando-se especialmente próximos de 39 e 52 cromossomos.

Os resultados indicam ainda que a análise automática produz, na maioria das amostras, contagens inferiores às contagens produzidas pela análise semiautomática, o que pode ser conferido na Figura 25 e na Figura 26.

Figura 26 – Gráfico de diferenças entre a contagem Automática e a Média da Contagem Assistida.



Para avaliar a análise semiautomática da ferramenta desenvolvida, foram utilizadas 100 imagens que foram analisadas por quatro usuários diferentes. A cada imagem analisada, foram gravadas informações em conformidade com a Tabela 2 referentes ao seu processamento.

A Tabela 4 apresenta estas informações para cada uma das 100 imagens processadas por um dos usuários. Como pode ser visto na tabela, após o processamento automático da imagem, quando necessário, o usuário utiliza a ferramenta para separar os cromossomos justapostos com a utilização da opção linha e elimina artefatos identificados equivocadamente chegando assim ao resultado da contagem semiautomática.

Os valores do “Limiar T” apresentados na Tabela 4 estão normalizados no intervalo 0-1.

Tabela 4. Informações gravadas sobre o processamento das imagens.

Imagem	Limiar T	Contagem Automática	Número de linhas desenhadas para separação	Limpeza de área	Contagem Assistida
2.2 (1).jpg	0,57	37	1	0	39
2.2 (2).jpg	0,55	32	5	0	39
2.2 (3).jpg	0,54	35	2	0	38
3.2 (3).jpg	0,50	38	1	0	39
4.2 (1).jpg	0,51	37	0	0	37
4.2 (2).jpg	0,45	40	0	1	39
4.2 (3).jpg	0,58	37	1	0	39
5.2 (2).jpg	0,54	41	0	2	39
5.2 (3).jpg	0,48	39	0	0	39
19275 (1).jpg	0,60	52	0	0	52
19275 (2).jpg	0,52	51	1	0	52
19275 (3).jpg	0,61	51	0	0	51
19275 (5).jpg	0,57	52	1	3	50
19275 (7).jpg	0,54	51	1	1	51
19275 (9).jpg	0,49	51	1	0	52
19276 (1).jpg	0,45	50	1	0	52
19276 (2).jpg	0,40	47	3	0	52
19276 (3).jpg	0,36	50	1	0	52
19276 (4).jpg	0,43	48	1	0	50
19276 (5).jpg	0,30	50	1	0	52
19276 (6).jpg	0,43	46	4	0	52
19276 (7).jpg	0,43	51	1	0	52
19276 (8).jpg	0,40	49	2	0	52
19276 (9).jpg	0,40	51	1	0	52
19276 (10).jpg	0,37	44	7	0	52
19276 (13).jpg	0,44	49	0	0	49
19280 (2).jpg	0,39	49	0	0	49
19280 (3).jpg	0,35	50	2	0	52
19280 (4).jpg	0,39	53	0	1	52
19280 (5).jpg	0,44	52	0	0	52
19288 (1).jpg	0,43	50	3	2	52
19288 (2).jpg	0,28	47	4	1	52
19288 (3).jpg	0,35	50	1	0	52
19288 (4).jpg	0,19	50	1	0	52
19288 (5).jpg	0,32	53	0	1	52
19292 (1).jpg	0,44	52	1	0	54
19292 (2).jpg	0,52	52	0	0	52
19292 (4).jpg	0,44	53	0	0	53
19292 (5).jpg	0,49	46	4	0	52
19292 (6).jpg	0,51	51	1	0	52

19292 (7).jpg	0,47	51	1	0	52
19698-1 (1) Giemsa.jpg	0,42	50	2	1	53
19698-1 (2) Giemsa.jpg	0,44	54	3	6	53
19698-3 (2) Giemsa.jpg	0,38	47	3	0	51
19717-1.1 (1).jpg	0,14	37	2	0	39
19717-1.1 (4).jpg	0,12	36	3	0	41
19719-2.1 (1).jpg	0,36	40	0	1	39
19719-2.1 (2).jpg	0,56	40	0	2	38
19719-2.1 (4).jpg	0,60	39	0	0	39
19719-2.2 (1).jpg	0,42	35	3	0	39
19719-2.2 (2).jpg	0,50	40	0	1	39
19719-3 (1).jpg	0,21	39	1	2	40
19719-4 (3).jpg	0,44	39	3	3	39
19719-4 (4).jpg	0,56	38	0	1	37
19737-1 (1).jpg	0,52	37	3	1	39
19737-1 (2).jpg	0,52	33	4	0	39
19737-1 (3).jpg	0,40	36	2	0	39
19737-1 (4).jpg	0,39	40	0	1	39
19737-1 (5).jpg	0,46	37	1	0	39
19737-1 (6).jpg	0,52	40	0	1	39
19737-1 (7).jpg	0,53	37	1	0	39
19737-2 (2).jpg	0,58	39	0	0	39
19737-3 (1).jpg	0,45	38	1	1	39
19737-3 (2).jpg	0,51	40	0	1	39
19737-3 (3).jpg	0,50	39	0	0	39
19737-3.1 (1).jpg	0,50	35	4	0	39
19737-3.1 (2).jpg	0,58	34	4	0	40
19737-3.1 (3).jpg	0,61	40	0	1	39
19737-3.1 (4).jpg	0,49	38	1	0	39
19737-3.1 (5).jpg	0,51	39	1	1	39
19737-3.1 (6).jpg	0,54	35	3	1	39
19737-3.2 (1).jpg	0,55	39	0	0	39
19737-3.2 (2).jpg	0,54	35	3	0	39
19737-3.2 (4).jpg	0,59	37	0	0	37
19737-3.2 (5).jpg	0,62	37	2	0	39
19737-4 (1).jpg	0,56	39	0	0	39
19737-4 (2).jpg	0,43	37	3	1	39
19737-4 (3).jpg	0,50	31	6	0	39
19737-4 (4).jpg	0,50	39	0	0	39
19737-4 (5).jpg	0,57	41	0	2	39
19874 (3).jpg	0,34	40	0	0	40
19874 (4.1).jpg	0,33	37	0	0	37
19874 (5).jpg	0,32	35	3	0	39
19874 (7).jpg	0,19	40	0	0	40
19874 (8).jpg	0,24	38	1	0	40
19874 (9).jpg	0,21	40	1	3	40

19874-1 (1).jpg	0,37	32	8	3	40
19874-1 (4).jpg	0,38	35	3	0	40
19874-1 (6).jpg	0,31	35	3	4	39
19874-1 (7).jpg	0,22	35	5	0	42
19874-1 (8.1).jpg	0,20	32	1	0	34
19874-1 (11).jpg	0,44	35	5	3	40
19874-1 (21).jpg	0,35	38	1	0	40
19874-3 (8).jpg	0,39	40	0	0	40
19874-4 (3).jpg	0,34	40	0	0	40
19874-6 (13).jpg	0,32	42	0	2	40
19874-6 (19).jpg	0,33	40	0	0	40
19874-6 (24).jpg	0,40	40	0	0	40
19874-6 (26.2).jpg	0,41	34	0	0	34
19874-6 (29).jpg	0,36	38	1	0	40

A soma de todos os cromossomos contados nas 100 imagens pelos usuários pode ser vista na Tabela 5.

Tabela 5. Total de cromossomos contados pelos quatro usuários.

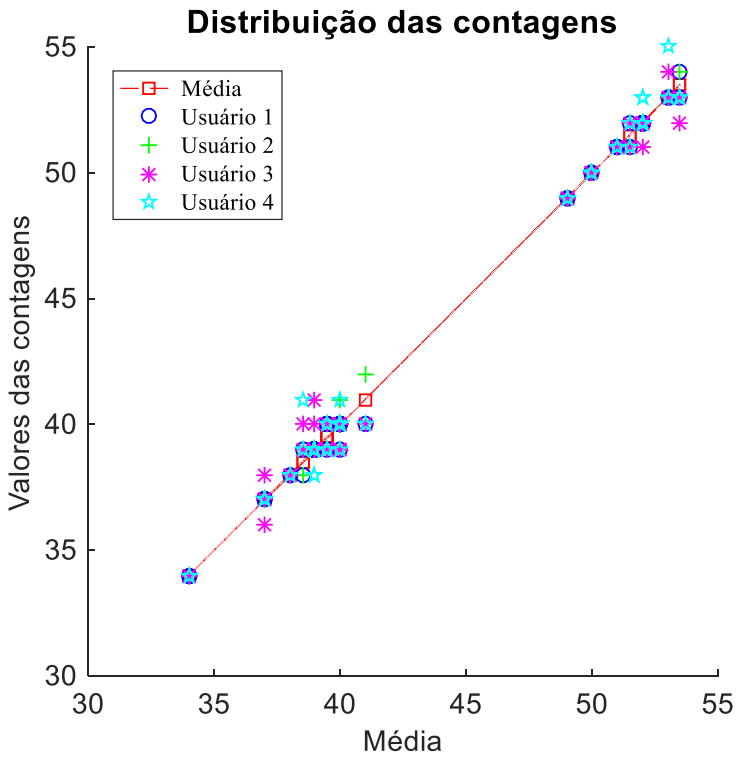
	Usuário 1	Usuário 2	Usuário 3	Usuário 4
Cromossomos Contados	4348	4348	4345	4350

A Tabela 6 apresenta a correlação entre os quatro usuários que utilizaram a ferramenta para a contagem dos cromossomos. Estes resultados se referem à utilização do método semiautomático. Observando-se os valores sempre maiores do que 0,99, pode-se concluir que com o auxílio da ferramenta aos usuários produziram contagens com forte correlação. Em função da forte correlação entre as contagens, o valor adotado como referência para a comparação com o método automático foi a média destas quatro contagens. A distribuição destas contagens e a respectiva média podem ser observadas na Figura 27.

Tabela 6. Correlação das contagens realizadas pelos quatro usuários.

	Usuário 1	Usuário 2	Usuário 3	Usuário 4
Usuário 1	1,0000	0,9974	0,9967	0,9972
Usuário 2	0,9974	1,0000	0,9967	0,9964
Usuário 3	0,9967	0,9967	1,0000	0,9974
Usuário 4	0,9972	0,9964	0,9974	1,0000

Figura 27 – Distribuição das Contagens realizadas pelos quatro usuários.



Resultados detalhados das contagens realizadas pelos quatro usuários nas 100 imagens analisadas podem ser vistos na Tabela 10, disponível no APÊNDICE A – CONTAGENS DOS CROMOSSOMOS REALIZADAS PELOS QUATRO USUÁRIOS.

Apesar de 96,4% ser um bom resultado de identificação automática dos cromossomos, é importante lembrar que em alguns casos essa contagem inclui falsos positivos. Em média 26 imagens para cada usuário, conforme pode ser visto na Tabela 7. Isto ocorre quando um artefato possui características semelhantes aos cromossomos, o que leva o algoritmo a contá-los equivocadamente como cromossomos. Exemplos de falsos positivos podem ser vistos na Figura 28, à direita da imagem é possível notar seis estruturas identificadas erroneamente como cromossomos.

Com o auxílio da ferramenta, usando a opção limpar área, estes falsos positivos foram eliminados das contagens assistidas pelos usuários, mas estão presentes nos valores das contagens automáticas da Tabela 3.

Figura 28 – Exemplos de falso positivo.

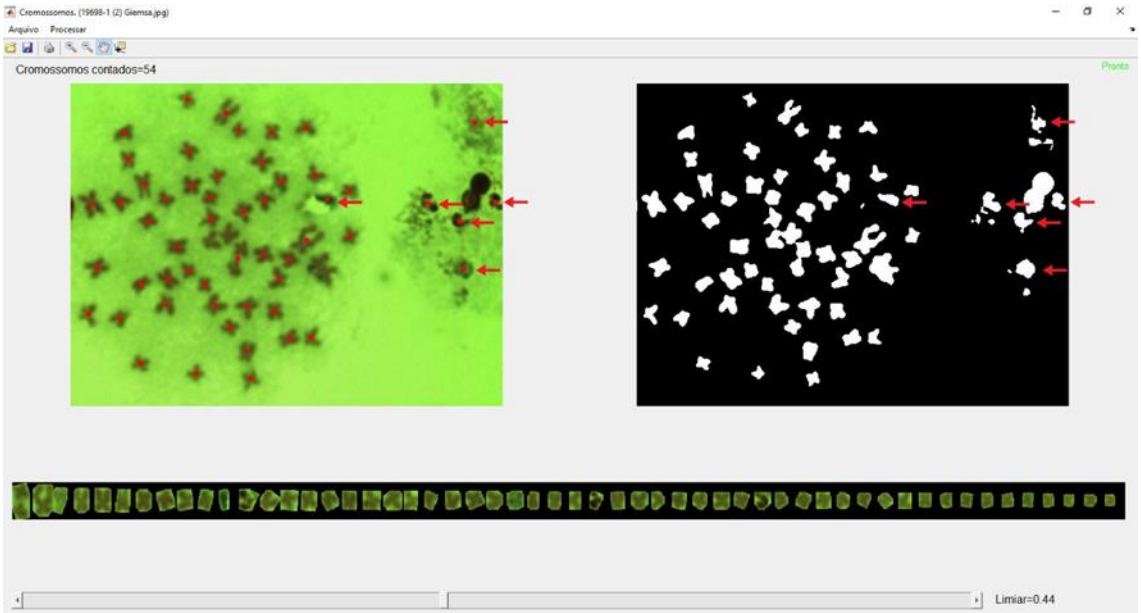


Tabela 7. Número de imagens com uso da opção Linha e da opção Limpar área.

	Opção Linha	Opção Limpar área
Usuário 1	68	20
Usuário 2	62	31
Usuário 3	77	28
Usuário 4	78	27
Média	**71,25**	**26,50**

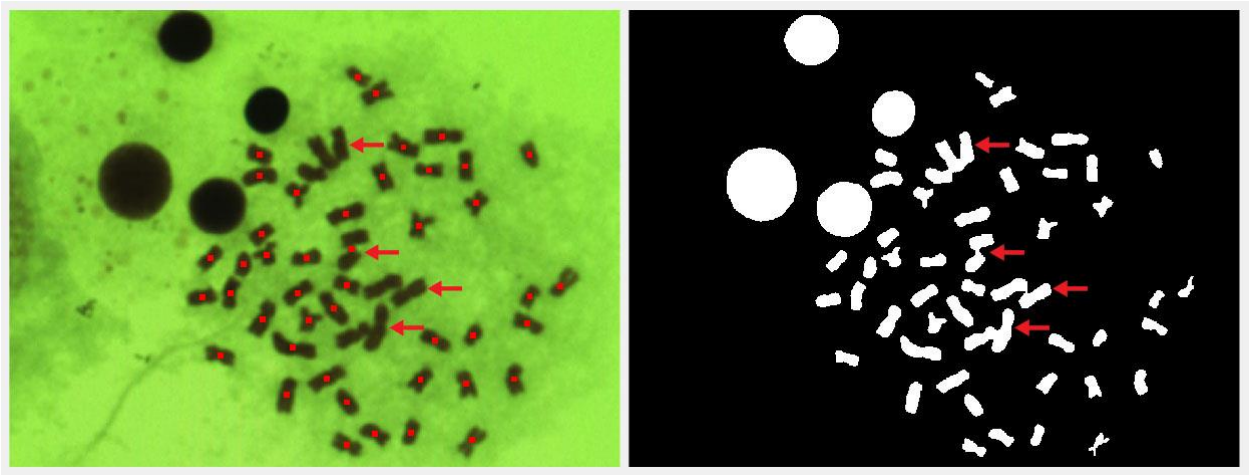
É possível identificar os falsos positivos incluídos na contagem automática a partir do número de vezes que a opção Limpar área foi utilizada. A Tabela 8 apresenta o resultado da contagem automática excluindo 55 falsos positivos, o que representa 1,3% do total de cromossomos presentes nas amostras. Neste caso, o valor da identificação automática é de 95,1% dos cromossomos, o que ainda é um resultado de grande utilidade pois significa que 95,1% dos cromossomos são identificados corretamente e de forma automática, confirmado pela correlação muito forte, r=0.93, entre os dois métodos.

Tabela 8. Total de cromossomos contados, excluindo falsos positivos.

	Automática	Semiautomática
Cromossomos	4135	4348
%	95,1%	100%

Após a eliminação dos falsos positivos, a divergência existente entre a contagem automática e semiautomática se deve às ocorrências de falsos negativos. Nos casos de cromossomos justapostos ou próximos a artefatos, resultando em uma região com tamanho aumentado na imagem binária, ocorre falha na identificação dos mesmos. Na Tabela 8 é possível observar que o método automático produziu uma contagem com 213 cromossomos a menos que o método semiautomático devido aos falsos negativos. Isto representa 4,9% do total de 4348 cromossomos. Exemplos de falsos negativos podem ser vistos na Figura 29.

Figura 29 – Exemplos de cromossomos justapostos.



A Tabela 9 apresenta os resultados finais das análises automática e semiautomática realizadas, incluindo o detalhamento dos falsos positivos e falsos negativos.

Tabela 9. Resultado final das análises.

Descrição	Nº de Cromossomos	%
Média Assistida	4348	100%
Automática com falsos positivos	4190	96,4%
Automática sem falsos positivos	4135	95,1%
Falsos negativos	213	4,9%
Falsos positivos	55	1,3%

5. CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

5.1. CONCLUSÕES

Os estudos de citogenética evolutiva e citotaxonomia apresentam importantes contribuições para a compreensão da evolução das espécies animais e das interferências provocadas pelo ambiente na qual estão inseridas, auxiliando na construção de uma visão mais ampla dos ecossistemas onde estas espécies estão inseridas. Entre as atividades destes estudos, a geração do cariótipo é das mais complexas e trabalhosas e por isso a ferramenta proposta contribui efetivamente para otimizar estas atividades melhorando a eficiência para a geração do cariótipo e a confiança nos resultados, possibilitando ao profissional maior produtividade.

Os resultados indicam que a ferramenta provê um auxílio efetivo na realização das atividades para geração do cariótipo de peixes, identificando corretamente em média 95,1% dos cromossomos. Em imagens com bom contraste e foco obtém-se identificação correta de 100% dos cromossomos. Com isso pode-se estimar a vantagem em tempo que tal ferramenta traria aos usuários, corrigindo 1,3% de cromossomos contados equivocadamente e 4,9% dos cromossomos que não tinham sido contados.

A ferramenta também auxilia extraindo os cromossomos das imagens e ordenando-os por tamanho após ajustar sua orientação na vertical.

Além disso, fornece uma interface interativa para que o usuário possa classificar os cromossomos e pareá-los facilitando a manipulação dos mesmos para a montagem do cariótipo.

5.2. TRABALHOS FUTUROS

5.2.1. Desenvolver e avaliar métodos automáticos para classificação e pareamento de cromossomos

O sistema utilizado neste trabalho auxilia a classificação e pareamento dos cromossomos ordenando-os por tamanho e oferecendo uma interface ao usuário para a manipulação dos cromossomos. No entanto não foram aplicados métodos automáticos para estas tarefas. Estudos para automatizar a classificação de cromossomos podem ser realizados visando melhorar o auxílio oferecido. Exemplos de estudos para automatizar a classificação de cromossomos humanos podem ser vistos em (KURTZ, 2011) e em (KURTZ et al., 2015)

5.2.2. Realizar estudos para avaliar a possibilidade de melhorar o foco e o contraste das imagens geradas a partir das lâminas com as metáfases.

Um dos erros que acontecem na contagem automática se deve à ocorrência de cromossomos sobrepostos. Realizar estudos sobre a melhoria do foco e contraste das imagens pode minimizar estes erros. Em imagens mais nítidas e com bom contraste é possível separar mais facilmente estes cromossomos.

5.2.3. Avaliar a disponibilização do sistema usando outras plataformas

O sistema foi desenvolvido utilizando a plataforma Matlab, ferramenta amplamente utilizada na comunidade científica. Estudos para avaliar outras ferramentas para o desenvolvimento do sistema podem ser realizados visando tornar o sistema mais acessível para os usuários pois na versão atual é necessário possuir o Matlab para poder executar o sistema.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, Z.; PRASAD, P. N. A system of chromosome classification and nomenclature. **Cytologia**, v. 48, n. 1, p. 95–101, 1983.

ANDREATA, A. A. et al. Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 63, n. 4, p. 215–220, 1993.

ARTONI, R. F.; VICARI, R. M.; BERTOLLO, L. A. C. Citogenética de Peixes Neotropicais: Métodos, Resultados e Perspectivas. **Biological and Health Sciences**, v. 6, n. 1, p. 43–60, 2000.

BLANCO, D. R. **Caracterização citogenética de populações alopátricas do gênero Hoplias (Characiformes, Erythrinidae), com enfoque nos grupos malabaricus e lacerdae**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2010.

BLANCO, D. R. **Estudos citogenéticos clássicos e moleculares em espécies do gênero Harttia (Siluriformes, Loricariidae), com enfoque no papel dos DNAs repetitivos na evolução cariotípica do grupo.** [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2012.

BRESSANE-NETO, A. F. et al. **Desenvolvimento de um software para cariotipagem de cromossomos de peixes**. Resumos do 51º Congresso Brasileiro de Genética. **Anais**...Aguas de Lindoia - SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2005

CARVALHO, M. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Nuclear DNA content of thirty species of Neotropical fishes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, n. 1, mar. 1998.

DENTON, T. E. **Fish chromosome methodology**. Springfield: Charles C Thomas Publisher, 1973.

FARIA, E. R. DE. **SiMCaPe - Sistema para a montagem de cariótipo de peixe baseado em conjuntos difusos**. [s.l.] Universidade Federal de Uberlândia, 2006.

FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; FORESTI DE ALMEIDA-TOLEDO, L. A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine. **Experientia**, v. 49, n. 9, p. 810–813, set. 1993.

GRIFFITHS, A. J. F., WESSLER, S. R., LEWONTIN, R. C., CARROLL, S. B. **Introdução à genética.** 9. ed. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GUERRA, M. L. **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

KURTZ, G. C. **METODOLOGIAS PARA DETECÇÃO DO CENTRÔMERO NO PROCESSO DE IDENTIFICAÇÃO DE CROMOSSOMOS**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Maria, 2011.

KURTZ, G. C. et al. Software para Auxílio no Processo de Elaboração de Cariótipo. **Revista de Informática Teórica e Aplicada**, v. 22, n. 2, 2015.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for Centromeric Position on Chromosomes. **Hereditas**, v. 52, n. 2, p. 201–220, 1964.

MAURICIO, C. R. M. **Contador de Células Vermelhas Baseado em Imagens para Múltiplas Espécies de Animais Silvestres e Domésticos**. [s.l.] Universidade Tecnólogica Federal do Paraná, 2017.

MAURICIO, C. R. M. et al. Image-based red blood cell counter for multiple species of wild and domestic animals. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 1, p. 75–84, fev. 2017.

O'CONNOR, C. Karyotyping for chromosomal abnormalities. **Nature Education**, v. 1, n. 1, p. 27, 2008.

OLYMPUS; INC, O. L. A.; BRASIL, O. O. DO. **Câmera Digital DP72**. Disponível em: <http://www.olympuslatinoamerica.com/portuguese/seg/seg_product_print_port.asp?g=355&imgtype=jpg>. Acesso em: 7 jul. 2017.

APÊNDICE A – CONTAGENS DOS CROMOSSOMOS REALIZADAS PELOS QUATRO USUÁRIOS

Tabela 10. Informações das contagens de cromossomos em 100 imagens analisadas.

Imagem	Usuário 1	Usuário 2	Usuário 3	Usuário 4	Média Assistida
2.2 (1).jpg	40	39	39	39	39,5
2.2 (2).jpg	39	39	39	39	39
2.2 (3).jpg	38	38	38	38	38
3.2 (3).jpg	39	39	39	39	39
4.2 (1).jpg	37	37	37	37	37
4.2 (2).jpg	39	39	39	39	39
4.2 (3).jpg	39	39	39	39	39
5.2 (2).jpg	39	39	39	39	39
5.2 (3).jpg	39	39	39	39	39
19275 (1).jpg	52	52	52	52	52
19275 (2).jpg	52	52	52	52	52
19275 (3).jpg	51	51	51	51	51
19275 (5).jpg	50	50	50	50	50
19275 (7).jpg	52	51	51	51	51,5
19275 (9).jpg	51	52	52	52	51,5
19276 (1).jpg	52	52	52	52	52
19276 (2).jpg	52	52	52	52	52
19276 (3).jpg	52	52	52	52	52
19276 (4).jpg	50	50	50	50	50
19276 (5).jpg	52	52	52	52	52
19276 (6).jpg	52	52	52	53	52
19276 (7).jpg	52	52	52	52	52
19276 (8).jpg	52	52	52	52	52
19276 (9).jpg	52	52	52	52	52
19276 (10).jpg	52	52	51	52	52
19276 (13).jpg	49	49	49	49	49
19280 (2).jpg	49	49	49	49	49
19280 (3).jpg	52	52	52	52	52
19280 (4).jpg	52	52	52	52	52
19280 (5).jpg	52	52	52	52	52
19288 (1).jpg	52	52	52	52	52
19288 (2).jpg	52	52	52	52	52
19288 (3).jpg	52	52	52	52	52
19288 (4).jpg	52	52	52	52	52
19288 (5).jpg	52	52	52	53	52
19292 (1).jpg	53	54	53	53	53,5
19292 (2).jpg	52	52	52	52	52
19292 (4).jpg	53	53	53	53	53
19292 (5).jpg	52	52	52	52	52

19292 (6).jpg	52	52	52	52	52
19292 (7).jpg	52	52	52	52	52
19698-1 (1) Giemsa.jpg	53	53	54	55	53
19698-1 (2) Giemsa.jpg	54	53	52	53	53,5
19698-3 (2) Giemsa.jpg	51	51	51	51	51
19717-1.1 (1).jpg	38	39	39	39	38,5
19717-1.1 (4).jpg	39	41	40	40	40
19719-2.1 (1).jpg	39	39	39	39	39
19719-2.1 (2).jpg	39	38	40	41	38,5
19719-2.1 (4).jpg	39	39	39	39	39
19719-2.2 (1).jpg	39	39	39	39	39
19719-2.2 (2).jpg	39	39	40	39	39
19719-3 (1).jpg	40	40	39	39	40
19719-4 (3).jpg	39	39	39	39	39
19719-4 (4).jpg	37	37	38	37	37
19737-1 (1).jpg	40	39	39	40	39,5
19737-1 (2).jpg	39	39	39	39	39
19737-1 (3).jpg	39	39	39	39	39
19737-1 (4).jpg	39	39	41	39	39
19737-1 (5).jpg	39	39	39	39	39
19737-1 (6).jpg	39	39	39	39	39
19737-1 (7).jpg	39	39	39	39	39
19737-2 (2).jpg	39	39	39	39	39
19737-3 (1).jpg	39	39	39	39	39
19737-3 (2).jpg	39	39	39	38	39
19737-3 (3).jpg	39	39	39	39	39
19737-3.1 (1).jpg	39	39	39	39	39
19737-3.1 (2).jpg	39	40	39	39	39,5
19737-3.1 (3).jpg	39	39	39	39	39
19737-3.1 (4).jpg	39	39	39	39	39
19737-3.1 (5).jpg	39	39	39	39	39
19737-3.1 (6).jpg	40	39	40	39	39,5
19737-3.2 (1).jpg	39	39	39	39	39
19737-3.2 (2).jpg	39	39	39	39	39
19737-3.2 (4).jpg	37	37	37	37	37
19737-3.2 (5).jpg	39	39	39	39	39
19737-4 (1).jpg	39	39	39	39	39
19737-4 (2).jpg	40	39	39	39	39,5
19737-4 (3).jpg	39	39	39	39	39
19737-4 (4).jpg	39	39	39	39	39
19737-4 (5).jpg	39	39	39	39	39
19874 (3).jpg	40	40	40	40	40
19874 (4.1).jpg	37	37	36	37	37
19874 (5).jpg	39	39	39	38	39
19874 (7).jpg	40	40	40	40	40
19874 (8).jpg	40	40	40	40	40

19874 (9).jpg	40	40	39	40	40
19874-1 (1).jpg	40	40	40	40	40
19874-1 (4).jpg	40	40	40	40	40
19874-1 (6).jpg	40	39	39	40	39,5
19874-1 (7).jpg	40	42	40	40	41
19874-1 (8.1).jpg	34	34	34	34	34
19874-1 (11).jpg	40	40	39	40	40
19874-1 (21).jpg	40	40	40	40	40
19874-3 (8).jpg	40	40	40	40	40
19874-4 (3).jpg	40	40	40	40	40
19874-6 (13).jpg	40	40	40	41	40
19874-6 (19).jpg	40	40	40	40	40
19874-6 (24).jpg	40	40	40	40	40
19874-6 (26.2).jpg	34	34	34	34	34
19874-6 (29).jpg	40	40	40	40	40
Totais	**4348**	**4348**	**4345**	**4350**	**4348**