

ROTINA EM MATLAB PARA CONTAGEM AUTOMÁTICA DE CÉLULAS MARCADAS POR AGENTE FLUORESCENTE: COMPARAÇÃO ENTRE THRESHOLDINGS E CORREÇÕES

Matheus del Valle¹, Nasser A. Daghasanli¹

¹Universidade Federal do ABC, Santo André, Brasil.

Introdução: Uma das análises utilizadas para avaliar culturas celulares é a contagem de células, sendo empregados cálculos como de rendimento, proliferação e viabilidade celular. Para isso, pode-se realizar a contagem manualmente, observando uma imagem de microscopia. A contagem manual é um procedimento extenuante e sua acurácia é comprometida. A automatização da contagem de células obtida pelo processamento computacional das imagens é uma alternativa para assegurar resultados confiáveis e reproduzíveis. Um método eficaz é o *thresholding*, que permite o isolamento do objeto de interesse do fundo da imagem. A proposta do presente estudo é a de desenvolver e testar um programa computacional para automatização da contagem de células obtidas por imagens de microscopia de fluorescência, comparando diferentes algoritmos computacionais com o método de contagem manual e utilizando conceitos de processamento de imagem em programação MatLab.

Métodos: Foram utilizadas 31 amostras de imagens de fluorescência, cedidas por outros autores, divididas entre os seguintes microrganismos: 4 de *C. albicans*, 9 *E. coli*, 9 *L. plantarum* e 9 *S. aureus*. A contagem manual foi realizada por um grupo de 5 voluntários, utilizando a extensão *Cell Counter* do programa ImageJ para elevar sua acurácia. O intervalo total das contagens foi cronometrado, realizando pausas entre as imagens de diferentes microrganismos para que o processo se tornasse menos extenuante. Foram testados cinco algoritmos de *thresholding* diferentes para as contagens automáticas: intermodos, minimização de fuzificidade, máxima variância, mínima entropia cruzada e máxima correlação. A detecção de fronteiras foi realizada pelo algoritmo de Moore-Neighbor com o critério de parada de Jacob. Foram aplicadas correções pela área de cada célula (A_i) em relação a área média (\bar{A}), alterando o número de células contabilizadas (n) conforme a Equação 1.

$$\begin{aligned} \text{Round}\left(\frac{A_i}{\bar{A}}\right) > 1, n = n + \text{round}\left(\frac{A_i}{\bar{A}}\right) \\ \text{Round}\left(\frac{A_i}{\bar{A}}\right) \leq 1, n = n \end{aligned} \quad (1)$$

Além da área média, foram utilizadas as médias aparadas, onde foram descartados os $n\%$ dos valores extremos das áreas e então calculada a média, onde os valores utilizados de n foram: 5%, 10%, 15%, 20% e 25%. Foi implementada a possibilidade de contagem de todas as imagens contidas em uma pasta e geração de um documento do tipo *.txt* com os resultados finais. As contagens automáticas foram comparadas ao método manual pela análise do coeficiente de variância (CV), gráficos de Bland-Altman e teste *t-Student* ao nível de 5%.

Resultados e Discussões: A contagem pelo método de máxima variância apresentou os menores CV (Tabela 1), com um valor geral das 31 imagens e sem correção de CV=35%. As correções por médias e médias aparadas diminuíram significativamente os valores de CV, sendo os menores valores apresentados pelo método de variância com áreas aparadas de 5% e 10% (CV=5% para ambos). Os gráficos de Bland-Altman e teste *t-Student* corroboraram com os resultados de CV, onde o método de variância por área aparada de 5% obteve o melhor resultado, com diferença média da contagem manual de 0,5 células e $p=0,49$. O tempo de execução da contagem foi reduzido em cerca de 120 vezes da manual para as automáticas. Deste modo, foi concluído que a contagem automática utilizando o método de variância e correção por média aparada de 5% apresentou o melhor resultado, demonstrando ser um potencial substituto da contagem manual de células marcadas por agente fluorescente, tornando o processo mais ágil e eliminando os erros humanos. Para uma maior aplicabilidade, estudos futuros serão realizados para outros métodos de detecção de fronteiras e de *thresholding*, além de variação dos tipos celulares e de microscopias utilizadas.

Tabela 1 – Coeficientes de Variância (CV) entre o método manual e os métodos automáticos. Contagem sem correção (N), com correções por média (Méd) e por médias aparadas de 5% (A5), 10% (A10), 20% (A20) e 25% (A25).

Método	N	Méd	A5	A10	A15	A20	A25
Intermodos	82%	56%	50%	45%	42%	41%	40%
Fuzificidade	101%	72%	63%	56%	51%	47%	42%
Variância	35%	8%	5%	5%	7%	8%	9%
Entropia	106%	79%	68%	61%	56%	53%	48%
Correlação	112%	125%	295%	278%	269%	261%	254%