

Segmentação automática de fibrose em imagens histológicas de tecidos corados com *Picrosirius red* utilizando algoritmos de aprendizado de máquina supervisionado e não supervisionado

Evelyn Rocha Silva

Universidade Federal de São Paulo – SP

Matheus Cardoso Moraes

Universidade Federal de São Paulo – SP

Lívia Bruni Souza

Universidade Federal de São Paulo – SP

Fernanda Silva Tenorio

Universidade Federal de São Paulo – SP

Nilsa Regina Damaceno-Rodrigues

Universidade de São Paulo – SP

Rita de Cássia Marqueti Durigan

Universidade de Brasília – DF

Karina Rabello Casali

Universidade Federal de São Paulo – SP

Tatiana Sousa Cunha

Universidade Federal de São Paulo – SP

RESUMO

A fibrose resulta da deposição excessiva de colágeno em órgãos após inflamação crônica, prejudicando sua função. A detecção e quantificação do colágeno são essenciais para o diagnóstico e tratamento, sendo a coloração Picrosirius Red (PSR) uma técnica padrão-ouro por sua alta eficácia. Este estudo visa desenvolver métodos de aprendizado de máquina para segmentar colágeno em imagens histológicas obtidas com microscopia simples, comparando técnicas supervisionadas e não supervisionadas.

Palavras-chave: Fibrose, Colágeno, Aprendizado de máquina.

1 INTRODUÇÃO

A fibrose é caracterizada pela deposição de colágeno ou tecido conjuntivo em um órgão após um processo de inflamação crônica. Esse fenômeno resulta em um aumento excessivo e anormal da produção da matriz extracelular (MEC), decorrente de processos cicatriciais ou reacionais, provocando efeitos indesejáveis ao organismo e comprometendo a função dos órgãos afetados [1,2]. Desta forma, a detecção de colágeno em amostras histológicas é fundamental no diagnóstico clínico da fibrose, como nos casos de

fibrose hepática [3,4], pulmonar [5] e renal [6,7]. Além disso, a quantificação de colágeno em condições saudáveis e patológicas pode auxiliar no entendimento dos mecanismos de algumas doenças, prognóstico e tratamento [8].

Diversas técnicas de coloração foram desenvolvidas para detectar e quantificar a deposição de colágeno em cortes histológicos, apresentando variados graus de eficácia. Entre os métodos histoquímicos, as colorações tricrômicas tradicionais, como os métodos de Mallory, Masson e van Gieson, têm demonstrado subestimar o conteúdo de colágeno [9, 10]. Como alternativa, a coloração PicroSirius-Red (PSR) foi desenvolvida apresentando um método mais seletivo para detectar fibras de colágeno. Esse método apresenta menos desbotamento ao longo do tempo em comparação com a coloração de van Gieson e permite melhor visualização por meio de microscopia de luz polarizada [11], pois as fibras de colágeno se tornam birrefringentes. Além disso, permite uma análise qualitativa do elemento ao diferenciar fibras de colágeno mais espessas das mais finas por meio das diferentes cores de birrefringência que vão do vermelho (fibras mais grossas) ao verde (fibras mais finas). De fato, atualmente esse método é considerado como padrão-ouro para quantificação de colágeno [12].

A obtenção de imagens histológicas sob luz polarizada (LP) permite segmentar e demarcar exclusivamente o colágeno utilizando softwares específicos, possibilitando a quantificação da fibrose [6,9]. No entanto, a aquisição dessas imagens requer mais tempo e equipamentos mais caros. Portanto, analisar as imagens sem luz polarizada é uma alternativa mais rápida e acessível. No entanto, diferenciar as fibras colágenas do restante da imagem é um grande desafio, pois as intensidades dos pixels são muito próximas e não se distinguem tanto quanto sob luz polarizada. Com o objetivo de mitigar este desafio, nas últimas décadas, têm sido empregadas diferentes técnicas e metodologias de visão computacional voltadas para resolver problemas de classificação e segmentação de objetos como este.

Nesse contexto, várias técnicas têm sido empregadas, incluindo algoritmos de aprendizado de máquina, redes neurais e aprendizado profundo (*deep learning* - DL). Dentre essas, o DL se destaca como uma das mais modernas, utilizando múltiplas camadas de processamento para identificar padrões e estruturas em grandes conjuntos de dados. Esse método não requer processamento prévio dos dados, pois extrai automaticamente os atributos ou características a partir da imagem bruta. No entanto, estudos envolvendo DL exigem um grande volume de dados de treinamento, o que pode não ser viável para algumas análises [13, 14, 15]. Outros algoritmos, como o Multilayer Perceptron (MLP), seguem princípios semelhantes ao DL, mas os atributos não são extraídos automaticamente. Porém, eles não requerem uma quantidade tão elevada de dados de treinamento quanto o aprendizado profundo [16, 17].

Outra alternativa são os algoritmos de aprendizado de máquina não supervisionados, que não requerem classificação prévia dos dados. Esta abordagem é viável principalmente para conjuntos de dados pequenos e sem classificação prévia. Dentre os algoritmos não supervisionados amplamente usados no

campo de classificação está o K-Means. Ele é um algoritmo de clusterização (agrupamento) não supervisionado que classifica os dados de entrada através de suas características ou *features*. Sendo assim, é necessário fornecer como entrada do algoritmo algumas características que caracterizam o objeto de interesse e o método agrupa os padrões de acordo com a sua semelhança [18,19].

Deste modo, o objetivo do presente projeto é o desenvolvimento e padronização de um método robusto, de custo reduzido e de fácil aplicação para análise quantitativa do colágeno em imagens histológicas coradas com Picrosirius Red, e obtidas em microscopia óptica simples (campo claro). Para tanto, serão testados dois métodos, sendo um de aprendizagem supervisionada e outro de aprendizagem não supervisionada, buscando a obtenção de resultados confiáveis e reproduzíveis, otimizando e reduzindo o tempo de análise.

2 OBJETIVO

Desenvolvimento e validação de um método para segmentação do colágeno em imagens histológicas coradas com Picrosirius Red, utilizando algoritmo de aprendizagem de máquina supervisionado (Multilayer Perceptron) e não supervisionado (K-Means), a partir de fotomicrografias obtidas por microscopia simples, sem utilização de luz polarizada, para detecção de fibrose.

3 METODOLOGIA

3.1 OBTENÇÃO DAS IMAGENS HISTOLÓGICAS

As lâminas histológicas utilizadas neste estudo foram provenientes de diferentes centros de pesquisa e produzidas em protocolos experimentais anteriores. No total, foram capturadas 120 fotomicrografias de tecidos de rim, coração e tendão, provenientes tanto de camundongos quanto de ratos. Todo o protocolo de utilização das lâminas histológicas foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA 6210010316; CEUA 056/2010). Os tecidos foram processados seguindo um protocolo padrão: fixação em formalina tamponada a 10%; cortes transversais de aproximadamente 4 μm dos tecidos parafinados; e coloração com *Picrosirius red*. As imagens foram obtidas no Laboratório de Fisiologia do Instituto de Ciência e Tecnologia da UNIFESP, utilizando o software ZEN 3.7, um microscópio AxioLab 5 e uma câmera AxioCam 208 color acoplada (Carl Zeiss Microscopy, GmbH). As fotos foram capturadas com uma objetiva de 20x, sem o uso de luz polarizada e também com o uso da mesma, com o objetivo de obter imagens padrão-ouro.

O banco de imagens consistiu em 60 imagens histológicas de rim de camundongos. Dessas, 40 foram destinadas exclusivamente ao treinamento da rede neural utilizada, enquanto 20 foram reservadas para teste, tanto da rede neural quanto do algoritmo K-Means. Adicionalmente, para o grupo de teste, foram capturadas 20 imagens histológicas de rim, 20 imagens de coração e 20 imagens de tendão de ratos. Cada grupo de

teste incluiu 10 imagens de alta qualidade e 10 imagens contendo algum tipo de artefato, seja da preparação da lâmina (como bolhas ou sujeira) ou da própria captura da imagem (como falta de foco). O objetivo foi avaliar a versatilidade dos algoritmos na segmentação de imagens em diferentes condições.

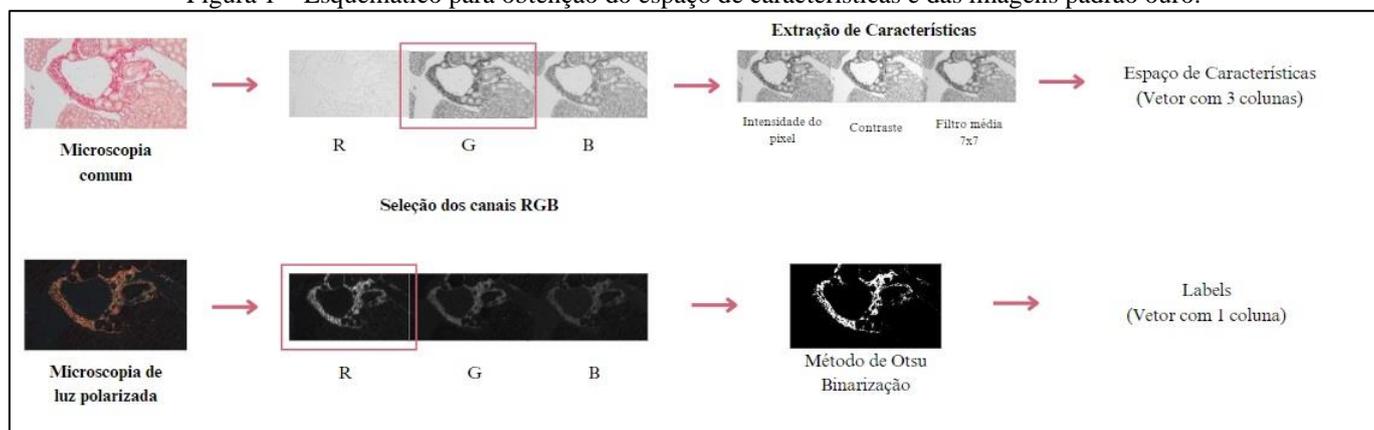
3.2 PROCESSAMENTO DAS IMAGENS

O processamento e a análise das imagens foram realizados em linguagem Python com uso do software Spyder versão 4.1.5, gratuito, em computador com processador Intel Core i7 e 16GB de RAM. Sendo assim, inicialmente foi realizada análise separada dos canais RGB de cada imagem com o objetivo de verificar qual deles favorecia a demarcação do colágeno. Para as imagens obtidas na ausência de luz polarizada, o canal G apresentou o melhor contraste. Já nas imagens obtidas com uso de luz polarizada, o canal R demarcou melhor o colágeno. Sendo assim, as intensidades dos pixels foram normalizadas entre 0 e 1 para padronizar os cálculos posteriores e esses canais (G - campo claro e R - campo escuro) foram utilizados nas etapas subsequentes do processamento.

Tanto para o algoritmo supervisionado quanto para o não supervisionado, foi necessário fornecer algumas características para distinguir os objetos de interesse das demais regiões da imagem. Essas *features* foram encontradas de forma empírica e com base em testes de desempenho dos algoritmos utilizados. Sendo assim, as *features* extraídas ou utilizadas foram: intensidade original de cada pixel no canal G; intensidade de cada pixel no canal G após alongamento de contraste; imagem resultante da correlação entre o canal G e um filtro média 7x7. Cada um desses atributos foi convertido em um vetor e colocado em uma coluna formando o conjunto de entrada dos algoritmos.

Para obtenção das imagens padrão ouro, as imagens obtidas com uso de luz polarizada no canal R foram processadas por meio do Método de Otsu [20], que realiza a binarização de forma automática por análise do histograma da imagem. O passo a passo para obtenção do espaço de características e da formação das imagens padrão-ouro pode ser visto abaixo na Figura 1.

Figura 1 – Esquemático para obtenção do espaço de características e das imagens padrão ouro.





3.3 IMPLEMENTAÇÃO DO MÉTODO K-MEANS

Antes da aplicação do algoritmo K-Means, realizaram-se testes para determinar a quantidade ideal de classes para a segmentação das fibras, obtendo melhores resultados com um número de classes igual a cinco. Utilizou-se a função `KMeans` da biblioteca `sklearn.cluster` com os parâmetros padrão para implementar essa etapa. Após a classificação de cada pixel por meio da separação em classes, o objeto de interesse foi segmentado.

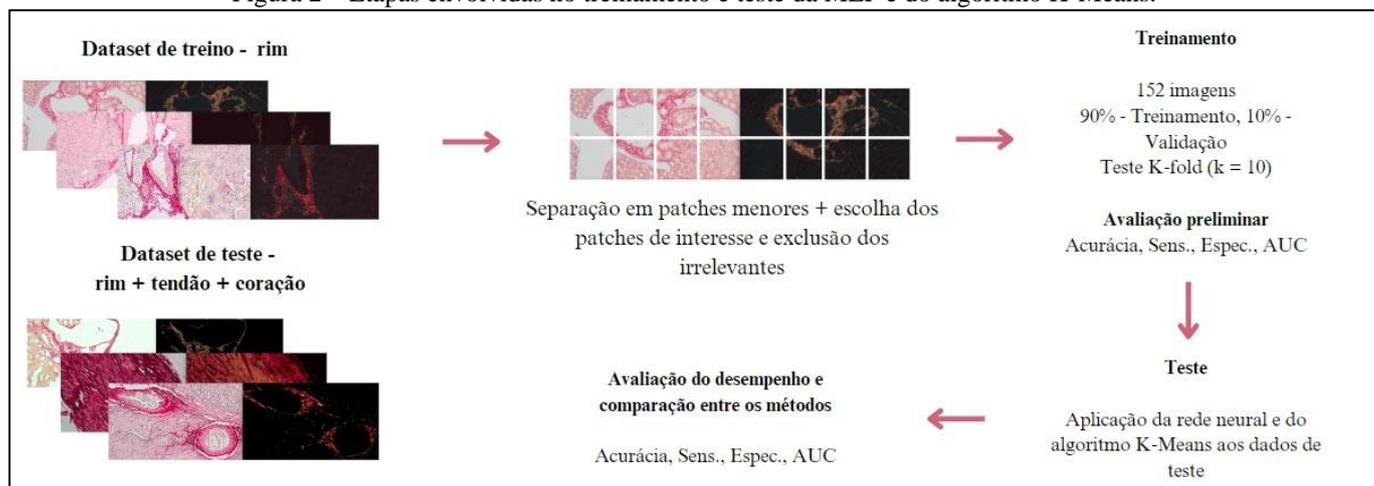
3.4 IMPLEMENTAÇÃO DA REDE NEURAL

A rede neural implementada é do tipo MLP, construída de forma empírica após testes de desempenho. Ela possui três camadas conectadas: a primeira é a camada de entrada com 3 neurônios e função de ativação 'linear'; a segunda camada possui 20 neurônios com função de ativação 'relu'; e a terceira camada possui 1 neurônio com ativação 'sigmoid'. O modelo foi compilado utilizando o otimizador Adam, com uma taxa de aprendizado de 0,001, e a função de perda escolhida foi 'binary_crossentropy'.

Para compor os dados de treinamento, utilizamos 40 imagens de rim de camundongos, todas com suas respectivas imagens padrão-ouro (GS) e dimensão de 1920x1080 pixels. Essas imagens foram divididas em *patches* menores, resultando em 320 imagens (480x540 pixels), como pode ser visto na Figura 2. Após análise visual, selecionamos 152 imagens com proporção de colágeno minimamente satisfatória para compor o banco de dados de treinamento final, descartando aquelas sem marcação. As características de interesse mencionadas anteriormente foram então calculadas para cada uma dessas imagens, e os resultados foram vetorizados e alocados em um *Data Frame* para compor os dados de entrada da rede neural.

Para o treinamento e validação da rede neural, utilizamos validação cruzada k-fold com k=10, dado que o conjunto de dados não era extremamente grande. Em cada iteração de treinamento, 10% dos dados foram reservados para teste do algoritmo, enquanto os restantes 90% foram utilizados para o treinamento. Esse processo garantiu que todos os dados fossem usados tanto para treinamento quanto para teste pelo menos uma vez. Para avaliar o desempenho da rede, calculamos parâmetros como acurácia, sensibilidade, especificidade e a AUC da curva ROC. A média desses valores foi calculada após as 10 iterações e em seguida, os dados e os pesos da rede foram salvos para serem utilizados na classificação de cada um dos conjuntos de teste.

Figura 2 – Etapas envolvidas no treinamento e teste da MLP e do algoritmo K-Means.



3.5 AVALIAÇÃO DO MÉTODO

Para avaliar o desempenho dos algoritmos, estes foram aplicados aos dados de teste e foram calculados parâmetros como acurácia, sensibilidade, especificidade e a AUC da curva ROC. Além disso, antes de capturar todas as imagens de teste e treinamento do estudo, aplicamos um questionário a quatro especialistas da área de histologia para avaliar e validar os dados de treinamento. Apresentamos 10 imagens de rim de camundongos aos especialistas e os mesmos responderam ao questionário padronizado sobre a qualidade das imagens, tanto em campo claro quanto em campo escuro. Por meio deste instrumento (questionário) foram coletados dados sobre a correspondência entre os padrões-ouro produzidos e as fibras colagênicas observadas em campo claro, e sobre a avaliação do resultado da segmentação produzida por uma rede neural preliminar. Com base nas respostas obtidas, prosseguimos com a coleta das demais imagens, utilizando os parâmetros laboratoriais apontados pelos especialistas, realizando os ajustes necessários para atendermos aos mesmos.

4 DESENVOLVIMENTO

Após a separação dos canais RGB em cada uma das imagens, tanto em campo claro quanto com luz polarizada, e a criação do espaço de características e das imagens padrão-ouro, utilizamos o conjunto de dados de treinamento composto por 152 imagens de rim de camundongos para treinar e validar a MLP implementada. Para esse processo, aplicamos validação cruzada K-fold com 10 iterações, em que 10% dos dados eram utilizados para validação e 90% para treinamento em cada iteração. Após as 10 iterações, calculamos as médias dos parâmetros avaliados em cada etapa, como mostrado na Tabela 1.



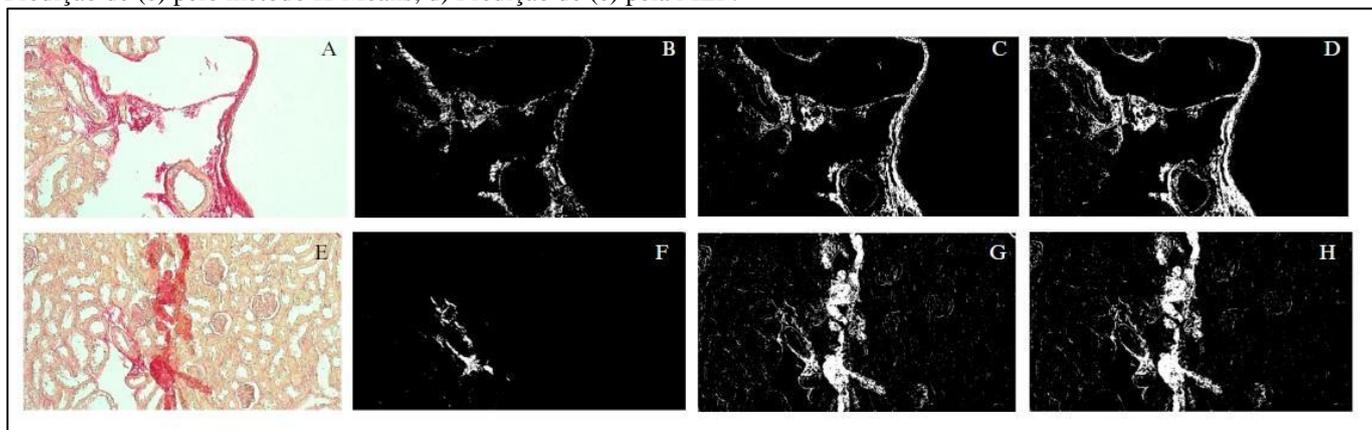
Tabela 1 - Resultados dos parâmetros avaliados com a validação k-fold para a MLP nos dados de treinamento das imagens de rim de camundongos.

Acurácia (%)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	AUC ROC
96,89	83,06	97,04	0,90

Analisando o desempenho da rede neural, testada por meio de validação cruzada, observamos que ela apresentou resultados satisfatórios nas imagens de treinamento. A rede neural demonstrou um alto nível de detecção das fibras colagênicas e uma boa diferenciação dos elementos não colagênicos, evidenciada pela alta especificidade do método. Outro ponto positivo é a AUC (Área Sob a Curva) da curva ROC (Receiver Operating Characteristic). A curva ROC é um gráfico que mostra a relação entre a taxa de verdadeiros positivos (VP) e a taxa de falsos positivos (FP) em diferentes limiares de classificação. A AUC é a área total sob a curva ROC. Ela varia de 0 a 1 e é uma medida agregada da performance do modelo em todos os limiares de classificação possíveis. Quanto mais próximo de 1, melhor é o classificador, ou seja, melhor é a classificação correta dos exemplos positivos e negativos.

Com os parâmetros da rede neural salvos, iniciamos os experimentos com o conjunto de dados de teste, tanto para o algoritmo não supervisionado quanto para a MLP. Inicialmente, realizamos testes para determinar o número ideal de classes de agrupamento ao utilizar o K-Means, obtendo os melhores resultados com cinco classes. Com esse parâmetro definido, aplicamos ambos os algoritmos às imagens de teste de rim, coração e tendão disponíveis. Conforme relatado anteriormente, as imagens foram separadas em dois grupos: imagens com boa qualidade ou sem artefatos e imagens com alguma característica negativa que poderia atrapalhar a classificação dos pixels. Essas características consistiam em sujeiras, bolhas, colorações fracas e até mesmo falta de foco. Sendo assim, na Figura 3 é possível observar o resultado da segmentação do colágeno fornecida pelos dois métodos de aprendizagem de máquina na classificação de imagens de rim de camundongos e os desempenhos referentes a cada um dos métodos na Tabela 2.

Figura 3 – Resultados das segmentações das fibras colagênicas pelo método K-Means e pela MLP em lâminas de rim de camundongos: a) fotomicrografia de lâmina histológica de rim de camundongo em boa condição obtidas em campo claro; b) imagem padrão ouro referente à segmentação do colágeno; c) Predição de (a) pelo método K-Means; d) Predição de (a) pela MLP; e) fotomicrografia de lâmina histológica de rim de camundongo com presença de artefato; f) imagem padrão ouro; g) Predição de (e) pelo método K-Means; h) Predição de (e) pela MLP.



Observa-se que o Método de Otsu segmentou as fibras colágenas de maneira satisfatória, sem eliminar nenhuma informação e nem acrescentar dados indevidos. Do mesmo modo, os resultados da segmentação a partir do método K-Means e do MLP obtiveram êxito em grande parte, porém alguns pixels indevidos foram adicionados à segmentação. Outro fator a destacar, é a dificuldade que os algoritmos tiveram em separar o que era artefato do que realmente era colágeno (Figura 3 - Quadro E).

Em relação ao desempenho dos métodos, notou-se uma diferença perceptível entre os resultados obtidos com imagens de boa qualidade e aquelas de qualidade inferior. Apesar dos valores de acurácia serem muito próximos, os parâmetros de sensibilidade e a AUC revelaram um desempenho inferior de ambos os métodos para as imagens de menor qualidade. Para as imagens de boa qualidade, o método MLP se destacou em relação ao algoritmo K-Means, apresentando uma sensibilidade de 78,81%.

Tabela 2 – Desempenho da MLP e do K-Means na segmentação das fibras colagênicas em imagens histológicas de rim de camundongos.

Grupo de teste Rim de camundongos	Acurácia (%)		Sensibilidade (%)		Especificidade (%)		AUC	
	MLP	K-Means	MLP	K-Means	MLP	K-Means	MLP	K-Means
Imagens Boas	95,92	95,01	78,81	68,47	96,21	95,46	0,88	0,82
Imagens Ruins	95,77	94,70	56,53	58,58	96,63	95,49	0,77	0,77

Para as imagens de rim de ratos, o MLP apresentou melhor desempenho nas métricas de sensibilidade e AUC, enquanto o K-Means se destacou nas métricas de acurácia e especificidade. Um ponto importante a ser destacado foi o melhor desempenho dos métodos em imagens de menor qualidade em comparação com as de maior qualidade. Isso pode ter ocorrido devido à coloração mais fraca em algumas imagens, onde o colágeno não se torna suficientemente birrefringente sob luz polarizada. Como resultado,

os métodos segmentam mais fibras do que as presentes no padrão-ouro, alcançando altos níveis de sensibilidade (Figura 4, Tabela 3).

Nas imagens de coração de ratos em boas condições, tanto o método de aprendizado supervisionado quanto o não supervisionado apresentaram desempenhos semelhantes. No entanto, nas imagens de coração de qualidade inferior, o MLP demonstrou melhor desempenho nos parâmetros de acurácia e especificidade, enquanto o K-Means se destacou nos demais parâmetros.

Do mesmo modo, não houve diferença significativa entre o desempenho dos métodos ao comparar os dois conjuntos de imagens de teste. De fato, as imagens de coração consideradas de qualidade inferior não eram tão diferentes das imagens de boa qualidade e possuíam menos artefatos do que as demais imagens (rim e tendão) de teste deste estudo. Isso demonstra que os métodos são robustos em situações onde a imagem possui alguma alteração leve, diferentemente das imagens com artefatos extensos como mostrado na Figura 3 - Quadro E.

Figura 4 – Resultados das segmentações das fibras colagênicas pelo método K-Means e pela MLP em lâminas de rim de rato: a) fotomicrografia de lâmina histológica de rim de rato em boa condição obtidas em campo claro; b) imagem padrão ouro referente à segmentação do colágeno; c) Predição de (a) pelo método K-Means; d) Predição de (a) pela MLP; e) fotomicrografia de lâmina histológica de rim de rato com coloração fraca e presença de artefato; f) imagem padrão ouro; g) Predição de (e) pelo método K-Means; d) Predição de (e) pela MLP.

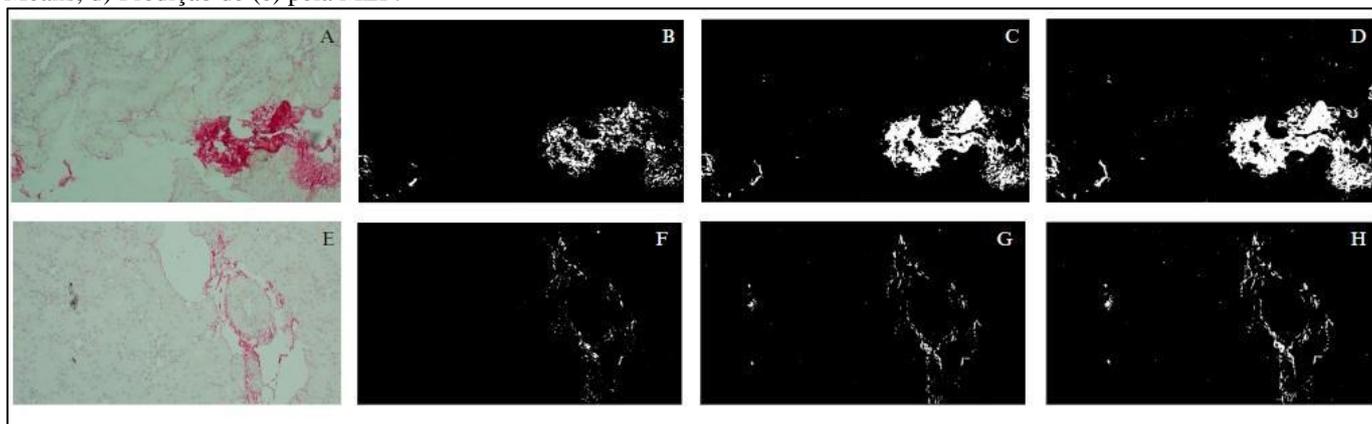


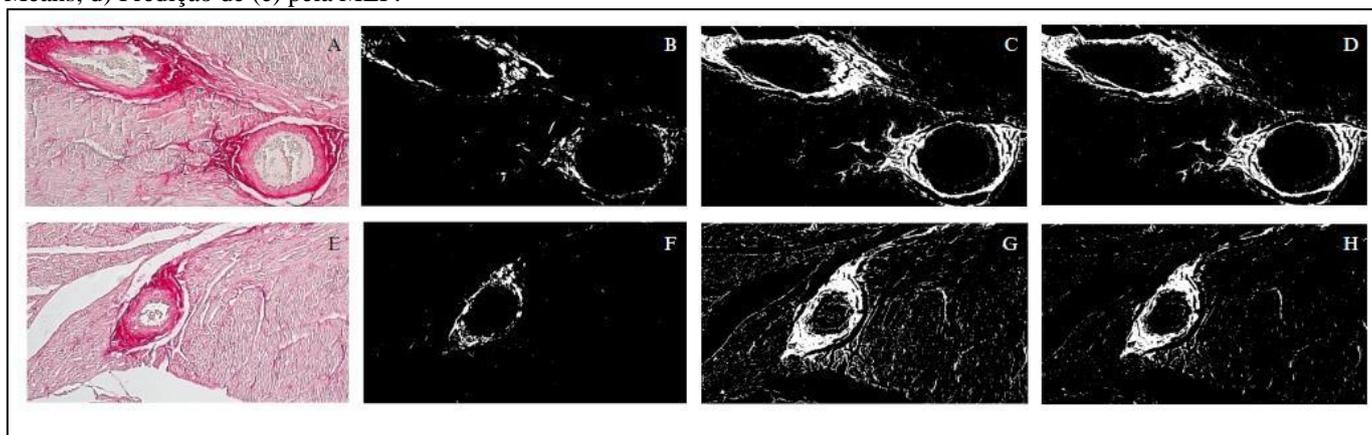
Tabela 3 – Desempenho da MLP e do K-Means na segmentação das fibras colagênicas em imagens histológicas de rim de ratos.

Grupo de teste Rim de ratos	Acurácia (%)		Sensibilidade (%)		Especificidade (%)		AUC	
	MLP	K-Means	MLP	K-Means	MLP	K-Means	MLP	K-Means
Imagens Boas	95,28	96,69	81,12	62,84	95,74	97,80	0,88	0,80
Imagens Ruins	96,89	98,32	85,99	69,88	96,97	98,51	0,91	0,84

Tabela 4 – Desempenho da MLP e do K-Means na segmentação das fibras colagênicas em imagens histológicas de coração de ratos.

Grupo de teste Coração de ratos	Acurácia (%)		Sensibilidade (%)		Especificidade (%)		AUC	
	MLP	K-Means	MLP	K-Means	MLP	K-Means	MLP	K-Means
Imagens Boas	94,94	94,85	73,89	74,11	95,49	95,40	0,85	0,85
Imagens Ruins	97,72	94,84	66,03	78,88	97,90	94,92	0,82	0,87

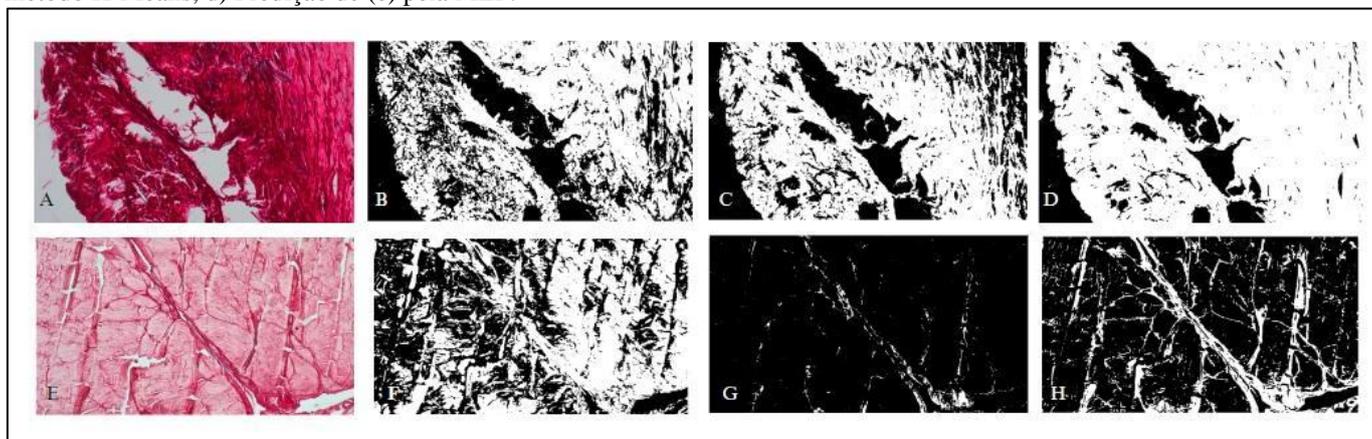
Figura 5 – Resultados das segmentações das fibras colagênicas pelo método K-Means e pela MLP em lâminas de coração de rato: a) fotomicrografia de lâmina histológica de coração de rato em boa condição obtidas em campo claro; b) imagem padrão ouro referente à segmentação do colágeno; c) Predição de (a) pelo método K-Means; d) Predição de (a) pela MLP; e) fotomicrografia de lâmina histológica de coração de rato apresentando falta de foco; f) imagem padrão ouro; g) Predição de (e) pelo método K-Means; d) Predição de (e) pela MLP.



As imagens de tendão (Figura 6) diferem das mostradas anteriormente (Figuras 3,4 e 5), pois quase toda a sua área é ocupada por fibras de colágeno. Do mesmo modo que as fotos de coração, as fotos de tendão não possuíam tantos artefatos. Sendo assim, para compor o grupo de imagens ‘ruins’, foram escolhidas imagens não por serem de baixa qualidade, mas por apresentarem um desafio maior em sua segmentação por apresentarem fibras mais finas que são coradas com um vermelho menos intenso do que fibras mais grossas, como pode ser visto na letra e da figura abaixo.

É possível observar na Figura 6, a dificuldade dos algoritmos em reconhecer as fibras de colágeno que possuem uma coloração mais clara. Em campo claro, o colágeno pode apresentar tonalidades mais escuras, destacando-se das demais estruturas da imagem, como também, pode apresentar tonalidades muito semelhantes às demais estruturas, tornando complexa a sua diferenciação e segmentação. Do mesmo modo, com as imagens padrão-ouro é possível analisar como a segmentação do colágeno não é tão trivial, pois pixels de colorações muito próximas podem pertencer ou não ao grupo das fibras colagênicas.

Figura 6 – Resultados das segmentações das fibras colagênicas pelo método K-Means e pela MLP em lâminas de tendão de rato: a) fotomicrografia de lâmina histológica de tendão de rato em boa condição obtidas em campo claro; b) imagem padrão ouro referente à segmentação do colágeno; c) Predição de (a) pelo método K-Means; d) Predição de (a) pela MLP; e) fotomicrografia de lâmina histológica de tendão de rato com colágeno de difícil identificação; f) imagem padrão ouro; g) Predição de (e) pelo método K-Means; h) Predição de (e) pela MLP.



Em relação à avaliação dos métodos, o MLP mostrou um melhor desempenho do que o método K-Means nas imagens de tendão, principalmente no parâmetro de sensibilidade, como mostrado na Tabela 5. Note que os parâmetros de acurácia foram menores neste grupo experimental, assim como a especificidade do método. A especificidade é a capacidade do método de classificar os pixels negativos como não colágeno. Sendo assim, os métodos apresentaram uma elevada taxa de falso positivo. Mesmo com essas intercorrências, o MLP mostrou-se um método mais robusto do que o K-Means neste grupo de teste.

Tabela 5 – Desempenho da MLP e do K-Means na segmentação das fibras colagênicas em imagens histológicas de tendão de ratos.

Grupo de teste Tendão de ratos	Acurácia (%)		Sensibilidade (%)		Especificidade (%)		AUC	
	MLP	K-Means	MLP	K-Means	MLP	K-Means	MLP	K-Means
Imagens Boas	81,09	72,41	95,99	70,70	61,41	74,69	0,79	0,73
Imagens Ruins	71,98	64,32	80,16	59,99	59,99	81,02	0,70	0,67

Desta forma, por meio dos resultados obtidos, notou-se que os métodos apresentados possuem mais facilidade para segmentar o colágeno perivascular do que o colágeno intersticial ou fibras mais finas. Este já é um tópico conhecido e abordado em pesquisas anteriores. Em [21], foi proposto um método automatizado para quantificar fibrose renal utilizando-se das imagens obtidas sob luz polarizada. Neste estudo, o colágeno perivascular foi eliminado para que somente fosse quantificado o colágeno intersticial. Os autores afirmam que a maioria dos pixels fibróticos intersticiais estavam longe dos vasos e possuíam intensidade intermediária. Para efeitos de comparação, os resultados foram correlacionados com a técnica semiquantitativa de tricrômico de Masson, apresentando diferenças significativas de quantificação de

fibrose entre os métodos, principalmente quando o conteúdo de colágeno perivascular é adicionado aos cálculos.

Outro ponto a se considerar é a construção das imagens padrão-ouro para validação da técnica. O corante PicroSirius Red se liga aos sulcos terciários das fibrilas de colágeno e aumenta a sua birrefringência natural. Sob luz polarizada, aparece brilhante contra um fundo escuro, sendo de fácil visualização. No entanto, existem estudos que atentam sobre a importância da padronização na captura das imagens sob luz polarizada. Em Street e cols. [22] implementaram um método baseado em fluorescência para quantificação de colágeno. No estudo, são coletadas imagens de forma padrão, com luz polarizada, e de uma forma alternativa, por fluorescência. As amostras são rotacionadas em diferentes ângulos, mas são feitas capturas dos mesmos pontos da imagem. Deste modo, os autores encontraram diferenças tanto na tonalidade como na intensidade das fibras de colágeno ao utilizar luz polarizada linear, diferente da luz fluorescente que não refletiu mudanças nas amostras mesmo após rotação, podendo ser uma possível alternativa para criação das imagens padrão ouro. No estudo de Greiner et al. [23], foi realizada a coleta das imagens com luz polarizada linear. No entanto, as lâminas são rotacionadas em 6 ângulos diferentes e foram capturadas 6 imagens, que então são combinadas para formar a imagem final.

No presente estudo, as imagens padrão-ouro foram capturadas com um polarizador circular, que, segundo a literatura, é mais indicado do que o polarizador linear pelo motivo mencionado anteriormente. No entanto, foi perceptível que, em muitas imagens, os métodos de classificação demarcaram mais pixels do que aqueles presentes nas imagens padrão-ouro. Isso indica a necessidade de mais testes de aquisição das imagens padrão-ouro para garantir que este método de validação esteja adequado.

Além dos pontos citados acima, é interessante mencionar que vem crescendo o uso de técnicas mais modernas de segmentação e classificação de imagens como as redes neurais convolucionais (CNN). Fu e cols. [24] propõem um método para identificação de fibrose em imagens coradas com a coloração tricômica de Masson, onde o desempenho da rede neural proposta foi maior do que a rede convencional U-Net. Adicionalmente, Pham e cols. [25] apresentam o uso de CNN profunda para análise de fibrose cicatricial em imagens histopatológicas de tecidos corados com Hematoxilina e Eosina.

Sendo assim, os métodos propostos neste estudo mostraram desempenhos satisfatórios e promissores, apontando a necessidade de melhorias nos parâmetros avaliados e CNNs podem vir a ser uma alternativa, apesar de exigirem um banco de dados de treinamento extenso.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que a metodologia proposta neste trabalho apresenta resultados satisfatórios para a segmentação do colágeno, especialmente o perivascular. Novos métodos baseados em algoritmos de *machine learning* como os apresentados podem facilitar, baratear e aprimorar a identificação e quantificação



do colágeno em tecidos saudáveis e patológicos, auxiliando no diagnóstico e no prognóstico de diversas doenças associadas à fibrose. Neste estudo, o algoritmo do tipo MLP se mostrou mais robusto do que o algoritmo K-Means, especialmente no banco de dados de imagens de teste com qualidade inferior.

Outro ponto a destacar é a necessidade de uma metodologia adequada para a construção das imagens padrão-ouro. Tal protocolo envolve diversas etapas desafiadoras, envolvendo ajustes que devem ser padronizados na coleta das imagens sob luz polarizada para garantir um método mais robusto de validação, como a aquisição das imagens em diversos ângulos diferentes e posterior sobreposição das imagens capturadas.

Além disso, foi possível perceber, principalmente nas imagens de tendão, que existem alguns desafios quanto à segmentação das fibras colágenas mais finas ou menos compactadas, pois os pixels que as compõem apresentam características semelhantes às de outros elementos da imagem. Sendo assim, seria necessário explorar outras características para caracterizar melhor o colágeno ou aplicar técnicas mais modernas que fazem o reconhecimento de padrões de forma automática, sendo necessário um banco de dados de imagens significativo.



REFERÊNCIAS

WYNN, T. A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, v. 214, n. 2, p. 199-210, 2008.

THANNICKAL, Victor J. et al. Fibrosis: ultimate and proximate causes. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 124, n. 11, p. 4673-4677, 2014.

ARJMAND, Alexandros et al. Quantification of liver fibrosis - A comparative study. *Applied Sciences*, v. 10, n. 2, p. 447, 2020.

CANTIGA-SILVA, C. et al. Inflammatory profile of apical periodontitis associated with liver fibrosis in rats: histological and immunohistochemical analysis. *International Endodontic Journal*, v. 54, n. 8, p. 1353-1361, 2021.

TESTA, Lauren C. et al. Automated digital quantification of pulmonary fibrosis in human histopathology specimens. *Frontiers in Medicine*, v. 8, p. 607720, 2021.

MORAIS, G. B. et al. Polarization microscopy as a tool for quantitative evaluation of collagen using picrosirius red in different stages of CKD in cats. *Microscopy Research and Technique*, v. 80, n. 5, p. 543-550, 2017.

BHUIYAN, Sadman et al. Assessment of renal fibrosis and anti-fibrotic agents using a novel diagnostic and stain-free second-harmonic generation platform. *The FASEB Journal*, v. 35, n. 5, p. e21595, 2021.

ROSENBLOOM, Joel et al. Human fibrotic diseases: current challenges in fibrosis research. In: *Fibrosis: Methods and Protocols*, p. 1-23, 2017.

RICH, Lillian; WHITTAKER, Peter. Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Journal of Morphological Sciences*, v. 22, n. 2, p. 0-0, 2017.

SEGNANI, Cristina et al. Histochemical detection of collagen fibers by sirius red/fast green is more sensitive than van gieson or sirius red alone in normal and inflamed rat colon. *PloS One*, v. 10, n. 12, p. e0144630, 2015.

JUNQUEIRA, L. Cx U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, Ricardo R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *The Histochemical Journal*, v. 11, p. 447-455, 1979.

LATTOUF, Raed et al. Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 62, n. 10, p. 751-758, 2014.

JANIESCH, Christian; ZSCHECH, Patrick; HEINRICH, Kai. Machine learning and deep learning. *Electronic Markets*, v. 31, n. 3, p. 685-695, 2021.

WANG, Jue et al. Scaffolding protein functional sites using deep learning. *Science*, v. 377, n. 6604, p. 387-394, 2022.



WOESSNER, Alan E.; QUINN, Kyle P. Improved segmentation of collagen second harmonic generation images with a deep learning convolutional neural network. *Journal of Biophotonics*, v. 15, n. 12, p. e202200191, 2022.

DESAI, Meha; SHAH, Manan. An anatomization on breast cancer detection and diagnosis employing multi-layer perceptron neural network (MLP) and Convolutional neural network (CNN). *Clinical eHealth*, v. 4, p. 1-11, 2021.

YANG, Fen; MOAYEDI, Hossein; MOSAVI, Amir. Predicting the degree of dissolved oxygen using three types of multi-layer perceptron-based artificial neural networks. *Sustainability*, v. 13, n. 17, p. 9898, 2021.

AHMED, Mohiuddin; SERAJ, Raihan; ISLAM, Syed Mohammed Shamsul. The k-means algorithm: A comprehensive survey and performance evaluation. *Electronics*, v. 9, n. 8, p. 1295, 2020.

YUAN, Chunhui; YANG, Haitao. Research on K-value selection method of K-means clustering algorithm. *J*, v. 2, n. 2, p. 226-235, 2019.

OTSU, Nobuyuki et al. A threshold selection method from gray-level histograms. *Automatica*, v. 11, n. 285-296, p. 23-27, 1975.

STREET, Jonathan M. et al. Automated quantification of renal fibrosis with Sirius Red and polarization contrast microscopy. *Physiological Reports*, v. 2, n. 7, p. e12088, 2014.

WEGNER, Kyle A. et al. Fluorescence of picosirius red multiplexed with immunohistochemistry for the quantitative assessment of collagen in tissue sections. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 65, n. 8, p. 479-490, 2017.

GREINER, Cherry et al. Robust quantitative assessment of collagen fibers with picosirius red stain and linearly polarized light as demonstrated on atherosclerotic plaque samples. *PLoS One*, v. 16, n. 3, p. e0248068, 2021.

FU, Xiaohang et al. Segmentation of histological images and fibrosis identification with a convolutional neural network. *Computers in Biology and Medicine*, v. 98, p. 147-158, 2018.

PHAM, Thi Tram Anh et al. Universal convolutional neural network for histology-independent analysis of collagen fiber organization in scar tissue. *IEEE Access*, v. 10, p. 34379-34392, 2022.

APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.