

IDENTIFICAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE FIBRAS DE COLÁGENO TIPO I E II ATRAVÉS DE PROCESSAMENTO DE IMAGENS

Wolley W. Silva¹; Prof. Dr. Jean-Jacques Bonvent²; Prof^a Dr^a Márcia A. S. Bissaco³

Estudante do Curso de Tec. em Análise e Desenvolvimento de Sistemas; e-mail: wolleyws@yahoo.com.br¹

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: bonvent@umc.br²

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: marciab@umc.br³

Área de Conhecimento: Engenharia Biomédica.

Palavras-chaves: processamento de imagens, quantificação, fibras de colágeno, reparação tecidual.

INTRODUÇÃO

O processo de reparo tecidual é um tema importante para toda a equipe multidisciplinar da área da saúde. As cicatrizes podem implicar em complicações, além do aspecto estético, como dores locais, retrações do tecido, diminuição do movimento, alterações de postura e danos psicológicos (IRVIN T.T.,1981).

A resistência mecânica do tecido é estreitamente relacionada com a presença das fibras de colágeno na derme reticular. Estas fibras se apresentam entrelaçadas e são constituídas por 90% do tipo I e 10% do tipo III. Quantificar a densidade destas fibras nas diversas fases da cicatrização permitirá uma análise do efeito do tratamento usado para acelerar a reparação tecidual pós-operatória.

O software Image Pro-Plus, frequentemente utilizado para este tipo de análise, apresenta como principais limitações a complexidade no funcionamento e o custo elevado. Além disso, os critérios escolhidos como parâmetros de processamento dependem exclusivamente da observação feita pelo usuário. Como nenhuma especialidade está imune ao erro, e pode ser influenciada pelos fatores ambientais (barulho, agitação, calor e estímulos visuais), psicológicos (tédio, frustração, ansiedade e estresse) e fisiológicos (fadiga, sono, uso de drogas, álcool, sobrecarga de trabalho e doenças) (Carvalho et. al, 2002), a necessidade de aplicar esses parâmetros individualmente a cada novo processamento intensificam a subjetividade.

Recentemente, pesquisadores da Universidade de Mogi das Cruzes implementaram um software (BioImage v1.0) de baixo custo, com interface amigável e dedicado a análise de amostras biológicas, que é capaz de quantificar as fibras de colágeno num conjunto de imagens e classificá-las em tipo I e III em função de um único limiar selecionado pelo usuário.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é realizar a validação deste software, verificando sua eficiência na identificação e na quantificação das fibras de colágeno dos tipos I e III.

METODOLOGIA

Devido à popularidade da plataforma Windows®, o software foi desenvolvido em Delphi 7, um ambiente de programação compatível com esta plataforma, que permite o desenvolvimento de aplicações com interfaces amigáveis de interação com o usuário.

Para quantificar e classificar as fibras de colágeno dos tipos I e III, o *software* realiza uma varredura na imagem e compara os valores RGB de cada pixel com uma faixa de valores pré-estabelecida, ou seja, um limiar selecionado pelo usuário. Inicialmente, verifica se a tonalidade do pixel deve ser considerada como fundo e pinta este pixel com a cor branca. Em seguida, verifica se a tonalidade pertence ao limiar considerado como fibra de colágeno do tipo III e atribui a cor verde ao pixel. Caso contrário substitui pela coloração vermelha, que é característica da fibra colágena do tipo I. Por último o *software* realiza a quantificação dos pixels com tonalidades verdes e vermelhas.

A definição dos limiares para o fundo da imagem (pixels sem informação útil) e para as fibras de colágeno dos tipos I e III é realizada com o auxílio de um algoritmo que permite ao usuário visualizar dinamicamente no canto inferior esquerdo do programa a proporção de RGB do pixel sob o cursor do *mouse*. Como nas fibras de colágeno do tipo III (verde) o componente R é até 25% maior que nas fibras do tipo I (vermelho), quando o usuário seleciona o pixel com um clique, o algoritmo automaticamente analisa se o componente R encontra-se acima deste percentual, considerando o pixel como pertencente à fibra do tipo I. Caso contrário, o pixel é considerado como fibra do tipo III. Assim, quanto mais próximo do limiar real, mais confiável será o resultado.

Para verificar visualmente a confiabilidade dos resultados do processamento, foi criada uma ferramenta denominada "Alpha", que permite ao usuário definir o nível de transparência da imagem processada e sobrepô-la à imagem original.

A consistência do software foi verificada processando 20 imagens simuladas e 20 imagens reais de reparação tecidual. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos com o software Image Pro-Plus para ambos os conjuntos de imagens. As imagens simuladas são compostas de pigmentos verdes e vermelhos como ocorre em imagens de reparação tecidual. A quantidade exata dos pixels de cada cor é bem conhecida.

As imagens de reparação tecidual foram cedidas por (CRUZ A.N.N, 2007), que realizou um estudo sobre estimulação elétrica na cicatrização cutânea pós-operatória. Porém, neste trabalho foram utilizadas apenas as imagens que fizeram parte do grupo controle, as quais não sofreram estimulação elétrica e que permitem avaliar a maturação das fibras de colágeno em diferentes fases da cicatrização.

Estas imagens com 512x456 pixels foram adquiridas de lâminas histológicas coloridas com Picro-Sirius Red e com o auxílio de um microscópio óptico de luz polarizada. Esta técnica permite visualizar e distinguir as fibras colágenas do tipo I (colágeno maduro) e do tipo III (colágeno imaturo) em decorrência da birrefringência dessas fibras, com cores distintas, ou seja, vermelho e verde para os tipos I e III, respectivamente, enquanto que os demais componentes (material amorfo) do tecido são visualizados como fundo em cor preta. Amostras de reparação tecidual foram colhidas em três diferentes períodos de maturação da lesão: as imagens de 1 a 6 fazem parte do grupo G1 (terceiro dia de maturação), as imagens de 7 a 13 pertencem ao grupo G2 (sétimo dia de maturação) e as imagens de 14 a 20 são do grupo G3 (décimo quarto dia de maturação).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra o desempenho dos *softwares* BioImage v.1.0 e Image Pro-Plus na realização da contagem e classificação das tonalidades vermelha e verde presentes nas imagens simuladas.

Tabela 1. **Quantidade de pixels das imagens simuladas e obtidas com os softwares**

BioImage v.1.0 e Image-Pro Plus

No.	imagens Simuladas		<i>BioImage</i> v.1.0		Image-Pro Plus v.6.0	
	R	G	R	G	R	G
1	135	198	135	198	135	187
2	1000	1000	1000	1000	1000	1000
3	125	125	125	125	125	125
4	675	520	675	520	660	320
5	583	600	583	600	480	583
6	240	243	240	243	240	243
7	2000	1197	2000	1197	2000	1197
8	256	168	256	168	256	168
9	200	200	200	200	200	200
10	180	225	180	225	180	210
11	600	300	600	300	600	285
12	100	76	100	76	100	76
13	273	154	273	154	273	154
14	192	162	192	162	192	162
15	300	465	300	465	260	465
16	169	272	169	272	169	272
17	250	240	250	240	144	100
18	360	299	360	299	360	299
19	209	442	209	442	495	1716
20	884	600	884	600	884	600

Observa-se na Tabela acima que o Software *BioImage* obteve 100% de acerto. Sua eficiência pode ser atribuída ao fato de realizar o processamento pixel a pixel, fazendo uma varredura em toda a extensão da imagem sem considerar os objetos presentes nem sua forma geométrica. A classificação das tonalidades encontradas em verde ou em vermelho nestas imagens foi realizada em função de um limiar informado pelo próprio usuário para um conjunto de imagens (processamento em lote), e este limiar funcionou como uma calibração da sensibilidade do sistema.

O Image-Pro Plus é amplamente utilizado para contagem de núcleos de células e demonstra eficiência significativa nestas aplicações, contudo, foi constatado que pequenas fibras não foram detectadas (FRANCISCO J. S., et. al, 2004). Estas divergências são mostradas nas imagens simuladas 4, 5, 15, 17 e 19 apresentaram discrepâncias de resultado na contagem que realizou. Estas imagens simuladas em particular, são compostas por elementos com formatos não circular, o que dificulta ao Image-Pro Plus identificá-los como um objeto para então mensurar sua área e a densidade de sua cor.

Em relação às imagens de reparo tecidual os resultados são postos em comparação divididos pelos seus respectivos canais R e G. Observa-se um aumento na densidade das fibras de colágeno do tipo I quantificadas pelo *BioImage v.1.0*. Na imagem G101 o *software* quantificou 11360 pixels vermelhos, enquanto que na última imagem G307, que corresponde ao final do processo de cicatrização, o valor foi de 180396 pixels correspondentes a fibra tipo I. Com o *BioImage* image foi possível constatar um aumento de 93% nas fibras colágenos tipo I, se aproximando do valor indicado pela literatura. O *Image Pro-Plus*, quantificou 26924 pixels vermelhos na imagem G101 e 55053 na imagem G307, um aumento de 51%.

CONCLUSÕES

O *software* desenvolvido é capaz de quantificar as fibras de colágeno, bem como classifica-las em tipo I e III em função da faixa de cor escolhida como limiar de classificação. Além disso, possui uma interface amigável de interação com o usuário que permite realizar o processamento sem um equipamento específico ou conhecimentos aprofundados na área de processamento de imagem.

Os resultados obtidos com o processamento das imagens simuladas e de reparação tecidual, em diferentes fases de cicatrização, mostraram que o *BioImage v.1.0* possibilita uma análise simples e precisa da densidade de fibras de colágeno dos tipos I e III representadas pelas tonalidades verde e vermelho, respectivamente. A comparação destes resultados com os obtidos com o *Image-Pro Plus*, demonstrou que o *BioImage* apresenta mais eficiência e precisão na quantificação das tonalidades verde e vermelha, por ser desenvolvido para análises de imagens biológicas. Possibilita a emissão de laudos em lote, reduzindo o tempo e minimizando a subjetividade com a padronização do limiar de classificação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CRUZ A.N.N., BONVENT J.J., Estimulação elétrica neuromuscular por microcorrente, na cicatrização cutânea pós-operatória. análise do colágeno em ratos, Universidade de Mogi das Cruzes, Dissertação de Mestrado, 102p, 2007.

FRANCISCO J. S., MORAES H.P., DIAS E.P., Evaluation of the Image-Pro Plus 4.5 software for automatic counting of labeled nuclei by PCNA immunohistochemistry. *Braz Oral Res* 2004;18(2):100-4.

IRVIN T.T. Wound healing. Principles and practice. Chapman and Hall, London 1981.

CARVALHO, M.; VIEIRA A.A., Erro médico em pacientes hospitalizados. *J. Pediatr. Rio J.*, Porto Alegre, v. 78, n. 4, 2002.