



Quantificação do colágeno dérmico equino por duas técnicas morfométricas: contagem de pontos e segmentação de cor

[Quantification of equine dermal collagen by two morphometric techniques: point counting and color segmentation]

S.A.O. Bedoya¹, M.V. Souza², L.G. Conceição², M.I.V. Vitoria², F.L. Valente²,
F.H. Loures², J.C.L. Moreira³, P.G.B. Coelho²

¹Aluna de pós-graduação - PEC-PG da Capes/CNPq - Universidade Federal de Viçosa - Viçosa, MG

²Universidade Federal de Viçosa - Viçosa, MG

³Autônomo - Viçosa, MG

RESUMO

Os colágenos tipos I e III apresentam diferentes tonalidades de birrefringência em cortes histológicos corados com *Picosirius red* e analisados em microscópio sob luz polarizada. Com base nessa propriedade, os colágenos podem ser quantificados por histomorfometria. Entretanto, são muitas as variáveis que podem afetar a distribuição das cores na imagem histológica, e a escolha adequada dos parâmetros de análise têm grande influência no resultado final. O objetivo deste trabalho foi comparar a quantificação histomorfométrica de colágeno em pele equina pela morfometria por contagem de pontos e pela segmentação de cor com diversas configurações, a fim de se determinar o melhor método de avaliação. Para a morfometria por contagem de pontos, foram utilizadas três graticulas diferentes (391, 588 e 792 pontos de interseções) e, para a segmentação de cor, seis combinações de *hue* e *brightness* no software *ImageJ*. Os valores foram submetidos ao teste de Friedman, seguido pelo teste de Tukey com 5% de significância. Os resultados demonstraram que a quantificação dos colágenos na graticula de 792 pontos foi equivalente aos resultados da segmentação de cor com *brightness* de 1-255 e *hue* de 0-42 e 43-120 para os colágenos tipos I e III, respectivamente. Dessa forma, conclui-se que a análise automática da segmentação de cor, utilizando configuração adequada para *brightness* e *hue*, pode substituir a morfometria por contagem de pontos de forma confiável e segura.

Palavras-chave: análises de imagem, histomorfometria, pele

ABSTRACT

The types I and III collagens present different tonalities of birefringence in histological sections stained with *Picosirius red*, that can be analyzed under a polarized light microscope. Based on this property, collagens can be quantified by histomorphometry. However, many variables can affect the color distribution in the histological image, and the appropriate choice of the analysis parameters have a significant influence on the final result. The objective of this study was to compare the histomorphometric quantification of collagen in the equine skin by counting points planimetry and color segmentation with different configurations to determine the best method of evaluation. For planimetry, three different graticules (391, 588 and 792 intersections) were used and, for color segmentation, six combinations of *hue* and *brightness* in *ImageJ* software. The values were submitted to the Friedman test followed by Tukey with 5% significance. The results showed that the quantification of collagens in the graticule of 792 intersections was equivalent to the results of color segmentation with a *brightness* of 1-255 and *hue* of 0-42 and 43-120 for collagens type I and III, respectively. Automatic analysis of the color segmentation, using suitable configuration for *brightness* and *hue* can replace the counting points planimetry reliably and safely.

Keywords: image analysis, histomorphometry, skin

INTRODUÇÃO

O colágeno pode ser estudado mediante a utilização de diversas técnicas e colorações, entre elas a coloração especial *Picrosirius red*, que é seletiva para colágeno, diferenciando os tipos pela birrefringência de tonalidades vermelha e verde (Sweat *et al.*, 1964; Weatherford, 1972). Essa técnica de coloração histológica é cada vez mais popular em razão de o procedimento ser simples e de seu resultado ser considerado consistente e adequado. Ela permite avaliar o processo de cicatrização, desenvolvimento e reparação em ossos, tecidos dentários (Roush *et al.*, 1988; Artzi *et al.*, 2001) e fibrose em diversos órgãos (Whittaker *et al.*, 1994). Além disso, auxilia no diagnóstico diferencial de neoplasias associadas à fibrose (Koren *et al.*, 2001; Coleman, 2011). Nos últimos anos, o colágeno, detectado por essa técnica, vem sendo considerado um biomarcador potencial em neoplasias de mama (Kakkad *et al.*, 2012) e próstata em humanos (Docheva *et al.*, 2010), assim como em carcinoma de células escamosas em cães (Bedoya *et al.*, 2016).

A análise morfométrica de imagens histológicas permite obter dados precisos por meio da contagem e avaliação de células e componentes teciduais, de forma que esses dados podem fornecer informação diagnóstica e prognóstica, dependendo do caso avaliado (Andrea *et al.*, 2008). Estudos relatam a avaliação do colágeno por planimetria por contagem de pontos e por segmentação de cor utilizando *softwares* como *Image Pro Plus* (Media Cybernetics, Silver Spring, USA) (Fachinelli, 2005) e *ImageJ* (Bedoya *et al.*, 2016), sendo esse último desenvolvido pelo *National Institute of Health* (Maryland, USA), disponível gratuitamente online (<https://imagej.nih.gov/ij>) (Schindelin *et al.*, 2015).

Esses *softwares* permitem avaliar a birrefringência dos colágenos com rapidez e confiabilidade do resultado. Entretanto, não há uma padronização nas configurações de análise que permita a repetibilidade e a comparação entre trabalhos diferentes. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar o melhor método de quantificação histomorfométrica de colágenos tipos I e III em pele equina, realizada por

planimetria por contagem de pontos e pela segmentação de cor com diferentes configurações.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (Ceua/UFV), com o protocolo nº 1/2017. Foram coletadas biópsias de pele sadia com *punch* (6mm de diâmetro) de oito equinos machos, castrados e sem qualquer processo dermatopatológico à inspeção clínica. Esses animais foram provenientes da casuística do Setor de Clínica e Cirurgia de Grandes Animais do Hospital Veterinário, Departamento de Veterinária (DVT)/UFV.

As amostras foram coletadas após prévia sedação com cloridrato de xilazina (0,8mg/kg IV) e bloqueio regional com cloridrato de lidocaína a 2% sem vasoconstritor (Souza *et al.*, 2014). Os fragmentos foram fixados em formol tamponado durante 24 horas e, na sequência, processados segundo protocolo histológico de rotina até o emblocamento em parafina. Foram obtidos cortes de 3µm de espessura, corados com o *kit* comercial *Picrosirius red* (Erviagas Instrumental Cirúrgico Ltda., São Paulo, SP, Brasil) no Laboratório de Histopatologia Prevent, Viçosa (MG).

Os cortes foram examinados em microscópio óptico sob luz polarizada (Olympus BX-53®, Japão), dos quais foram capturadas imagens de 10 campos com câmera Olympus QColor 3 (Olympus, Japão), no aumento de 200 vezes, perfazendo um total de 80 fotos. As imagens foram obtidas no Laboratório de Associações Micorrízicas do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (Bioagro)/UFV.

As fotomicrografias dos campos foram realizadas no *software* QCapture Pro 6 (versão 6.0.0.605 – Qimaging, Canadá – <https://www.qimaging.com/support/downloads/qcappro60.php>), como padronizado por Coelho *et al.* (2018), visando sempre um fundo escuro e birrefringência máxima das cores vermelha e verde. Além disso, os anexos cutâneos foram evitados nos campos capturados (Fig. 1A e B).

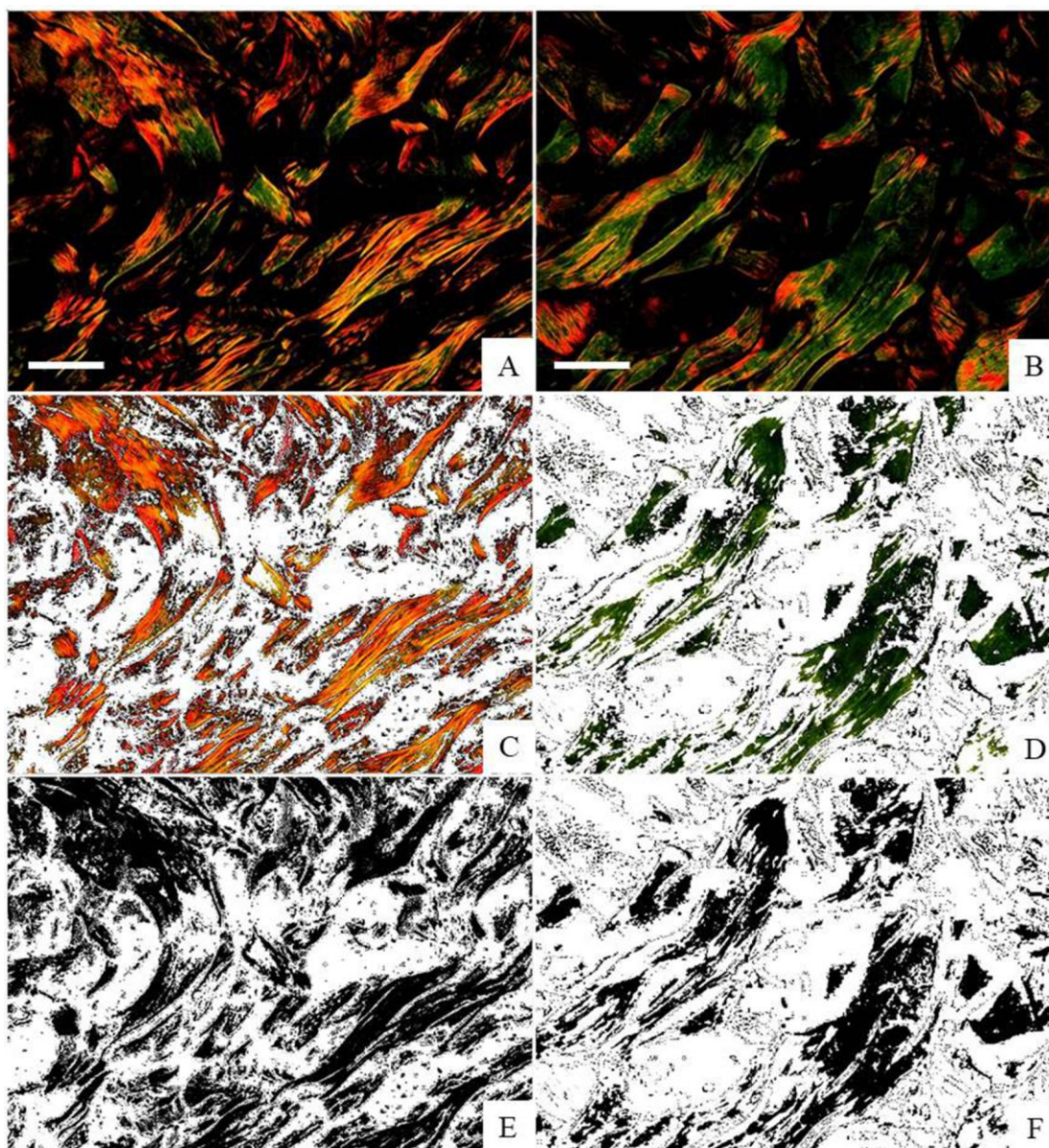


Figura 1. Análise morfométrica de pele equina por segmentação de cor usando os *softwares ImageJ, Plugins Threshold Colour*. A e B, micrografia obtida sob luz polarizada; C e D, segmentação para as tonalidades vermelha a amarela e amarelo a verde, respectivamente; E e F, aplicação de máscara evidenciando a área contabilizada. Barra 50 μ m.

A análise do colágeno foi realizada por dois métodos diferentes, utilizando-se um único *software* de análise de imagem, *ImageJ*, conforme descrito na Tab. 1. As amostras foram divididas em três grupos, que foram subdivididos em três categorias. O primeiro grupo refere-se à morfometria por contagem de pontos (MP), avaliada por um único observador, utilizando-se três diferentes graticulas, sendo elas com 391,

588 e 792 pontos de interseção, correspondendo aos subgrupos MP1, MP2 e MP3, respectivamente. O segundo (SC1, SC2 e SC3) e o terceiro (SC4, SC5, SC6) grupos foram analisados por segmentação de cor. Em todos os grupos, a tonalidade vermelho-amarelada se referiu ao colágeno do tipo I, enquanto a amarelo-esverdeada, ao tipo III (Junqueira *et al.*, 1978). Além dos valores obtidos mediante

análise da tonalidade, o brilho também foi avaliado utilizando-se o *Plugins Threshold Colour*, com um histograma de 255 cores para imagens de oito *bits* (Fig. 1).

A avaliação do segundo grupo foi baseada na metodologia descrita por Bedoya et al. (2016), sendo utilizado o *Hue* de 0-40 para a tonalidade vermelho-amarelada e de 45-120 para a tonalidade amarelo-esverdeada. Foram usadas as

configurações 5-255, 3-255 e 1-255 para o brilho. No grupo 3, além das modificações do brilho conforme mencionado para o grupo 2, foram modificados os valores para a tonalidade vermelho-amarelada (*Hue* de 0-42) (Tab. 1 e Fig. 1C) e amarelo-esverdeada (*Hue* de 43-120) (Tab. 1 e Fig. 1D). A máscara obtida no final da análise foi comparada à imagem original após seleção da tonalidade a ser avaliada, como demonstrado nas Fig. 1C, D, E e F.

Tabela 1. Métodos de análises morfométricas utilizados para quantificar o colágeno na pele equina sadia

Análise morfométrica por contagem de pontos (MP)					
Grupo 1	MP1	391 (7.700*)			
	MP2	588 (5.500*)			
	MP3	792 (3.950*)			
Análise morfométrica por segmentação de cor (SC)					
		<i>Hue</i> vermelho	<i>Hue</i> verde	<i>Saturation</i>	<i>Brightness</i>
Grupo 2	SC1	0-40	45-120	0-255	5-255
	SC2	0-40	45-120	0-255	3-255
	SC3	0-40	45-120	0-255	1-255
Grupo 3	SC4	0-42	43-120	0-255	5-255
	SC5	0-42	43-120	0-255	3-255
	SC6	0-42	43-120	0-255	1-255

*Valor usado para obter uma gráticula de “n” pontos no *ImageJ (Plugins - Analyze-Grid- Area per point)*.

Todas as imagens foram avaliadas com as nove categorias de configuração, perfazendo um total de 720 análises. O tempo gasto para realizar as análises foi cronometrado e expressado em média e desvios-padrão. Os valores encontrados foram submetidos ao teste de Friedman para medidas repetidas (RM ANOVA *on Ranks*), seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas, com nível de significância de 5%. O programa usado foi o *SigmaPlot 11.0* (2008) (<http://www.sigmaplot.co.uk>).

RESULTADOS

O tempo empregado para realizar a morfometria por contagem de pontos das diferentes tonalidades emitidas pela birrefringência dos colágenos foi em média $9,36 \pm 1,50$ minutos, sendo mais demorado durante avaliação das gráticulas de maior quantidade de pontos de interseções ($8,16 \pm 1,06$, $9,16 \pm 1,02$ e $10,75 \pm 1,12$ minutos para MP1, MP2 e MP3, respectivamente), enquanto o tempo médio para avaliar uma fotomicrografia pelo método de segmentação de cor para ambas as tonalidades foi de $1,16 \pm 0,1$ minuto.

Considerando o tempo de análise das imagens separadamente, foi constatado que, para o grupo 2, as categorias SC1, SC2 e SC3 necessitaram de $1,11 \pm 0,10$, $1,16 \pm 0,08$ e $1,11 \pm 0,05$ minutos, respectivamente. Já para as categorias SC4, SC5 e SC6 do terceiro grupo, foram necessários, respectivamente, $1,22 \pm 0,08$, $1,21 \pm 0,11$ e $1,17 \pm 0,11$ minutos.

Os dados originados da morfometria por contagem de pontos revelaram que o colágeno do tipo I foi detectado em maior quantidade quando analisado com as gráticulas do MP2 e MP3, em comparação com o MP1 ($P < 0,001$), não havendo diferença entre MP2 e MP3. Com MP3, foi possível detectar maior quantidade de colágeno do tipo III quando comparado com o MP1 e MP2 ($P < 0,001$) (Tab. 2). Na avaliação do colágeno tipo I, as gráticulas de maior número de interseções não mostraram diferenças, enquanto para o colágeno tipo III, houve diferença, verificando-se, portanto, que a gráticula que melhor contabilizou os colágenos foi a MP3.

Quantificação do colágeno...

Tabela 2. Mediana das porcentagens referentes aos colágenos dos tipos I e III obtidas por morfometria de ponto (MP, grupo 1) e segmentação de cor (SC, grupos 2 e 3)

Grupo	Tipo de morfometria	Mediana	
		Colágeno do tipo I	Colágeno do tipo III
1	MP1	29,795 ^a	10,742 ^a
	MP2	32,228 ^b	5,481 ^b
	MP3	34,785 ^{abAB}	13,510 ^{Ca}
2	SC1	27,776 ^C	6,771 ^B
	SC2	30,844 ^{DE}	7,937 ^{CD}
	SC3	34,991 ^A	12,929 ^A
	SC4	28,336 ^{CD}	6,892 ^{BC}
3	SC5	31,542 ^E	8,278 ^D
	SC6	36,138 ^B	13,187 ^A

Medianas acompanhadas por letras minúsculas, distintas na mesma coluna, diferem dentro do grupo 1 ($P<0,001$), enquanto por letras maiúsculas, diferem ao se comparar a categoria 3 com os grupos 2 e 3 ($P<0,001$). Teste de Friedman seguido de Tukey, $\alpha=5\%$.

Ao se comparar MP3 do grupo 1 com os grupos 2 e 3, foi observado que o MP3 apresentou resultados diferentes aos obtidos nos SC1 e SC2, e similar ao SC3 para os colágenos tipos I e III. Da mesma forma, o MP3 quando comparado ao grupo 3, mostrou que detectou mais colágeno dos tipos I e III quando comparado aos grupos SC4 e SC5, mas obteve resultados semelhantes ao SC6 para ambos os tipos de colágeno. Nesse contexto, pode-se dizer que a morfometria com 792 pontos de interseção (MP3) é equivalente à SC9 (Tab. 2 e Fig. 2).

DISCUSSÃO

A avaliação de imagens por segmentação de cores com *softwares* específicos permite que análises repetitivas sejam realizadas de forma rápida e automática, obtendo-se, assim, resultados que podem ser processados estatisticamente, o que diminui a subjetividade e possibilita a reprodutibilidade. Esses *softwares* são acessíveis e, muitas vezes, gratuitos. Eles permitem que sua configuração seja modificada e padronizada segundo o tipo de análises (mensurações de estruturas, gráticula para morfometria por contagem de pontos,

segmentação de cores) e os tecidos a serem avaliados.

Dentro do processamento de imagem, as categorias de *plugins* mais comuns são a visualização, o pré-processamento, a segmentação, o registro e o rastreamento (Servais *et al.*, 2009; Miot e Brianezi, 2010; Schindelin *et al.*, 2015). No presente estudo, foi utilizado o *software ImageJ* para ambas as técnicas de morfometria, e a segmentação de cor possibilitou uma avaliação quantitativa da birrefringência dos colágenos em um curto intervalo de tempo quando comparada com a morfometria por contagem de pontos. Esse último método exige tempo e concentração do observador e, à medida que se usa uma quadrícula com maior número de interseções, a análise se torna cada vez mais extenuante (Mandarim-De-Lacerda, 1995; Servais *et al.*, 2009). Servais *et al.* (2007) relataram que a obtenção das fotomicrografias pode demorar aproximadamente cinco minutos, porém a verificação da segmentação de cor, menos de um minuto. Situação semelhante foi encontrada no presente estudo, em que a segmentação de cor exigiu um tempo muito inferior com relação à morfometria de pontos.

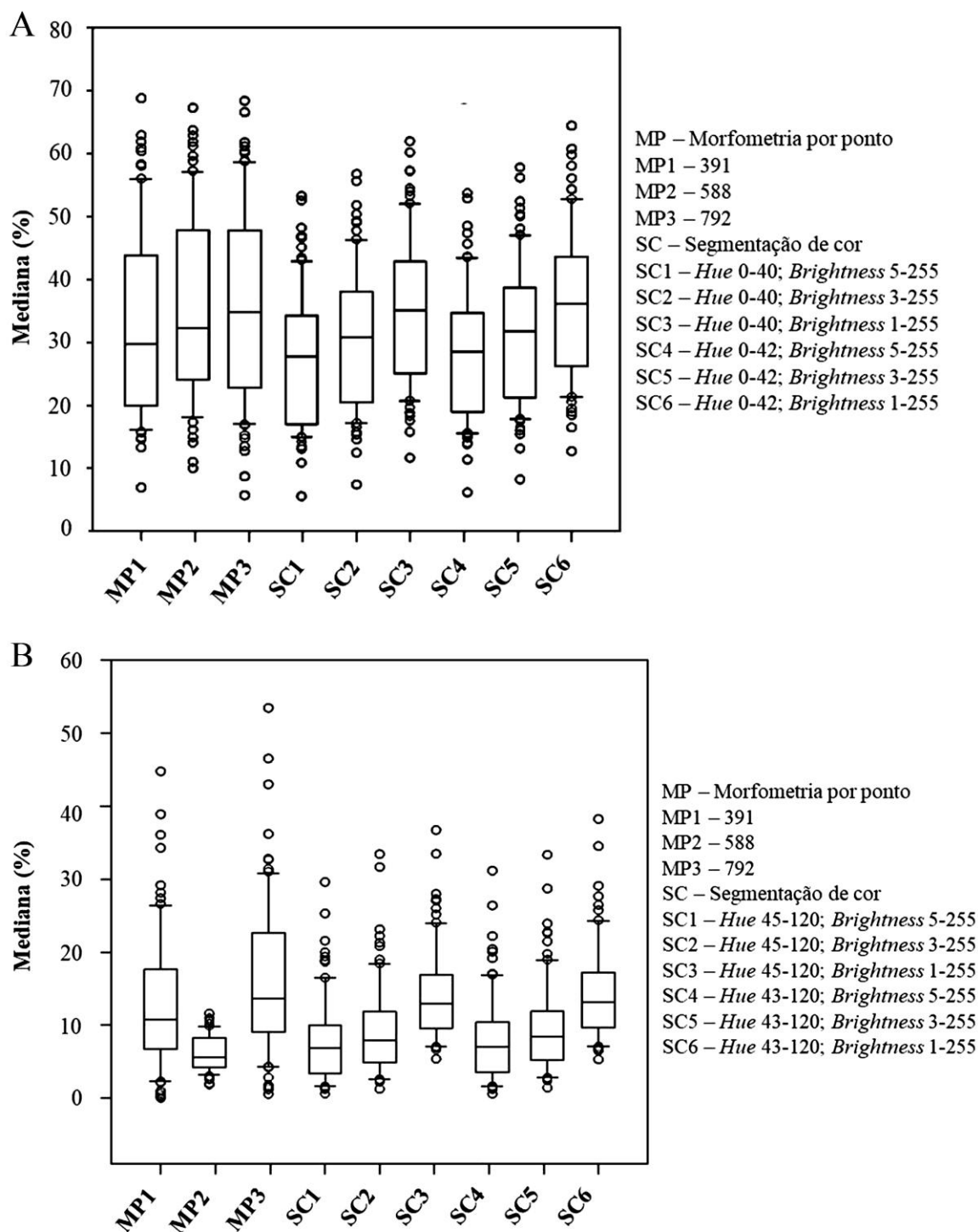


Figura 2. Box plot expressando a distribuição das porcentagens das medianas obtidas com base na análise do colágeno dérmico, por meio da morfometria por contagem de ponto (MP) e da segmentação de cor (SC) para as tonalidades vermelho-amarelada (A) e amarelo-esverdeada (B).

Nesse contexto, quanto mais tempo o observador gastar por imagem, maior a chance de ocorrerem erros, como, por exemplo, desconsiderar alguns pontos; interpretar inadequadamente a birrefringência do colágeno, especialmente nos casos mistos. As vantagens da segmentação de cor também foram percebidas por outros pesquisadores (Andrea *et al.*, 2008; Bedoya *et al.*, 2016), pois essa técnica permitiu a segmentação das cores selecionadas independentemente da organização, desde que o *software* usado fosse padronizado corretamente.

A morfometria de pontos tem como desvantagem a parcialidade da leitura devido ao fato de o olho humano ter a capacidade de visualizar aproximadamente 64 valores de 256 na escala de cinza (Oberholzer *et al.*, 1996). Outra dificuldade encontrada é realizar a estimativa da área e/ou intensidade das cores a serem analisadas, cujos resultados podem sofrer variações, dependendo da experiência do avaliador (Servais *et al.*, 2009). Por outro lado, a segmentação de cor permite que seja feita uma máscara da área mensurada, o que possibilita aos observadores conferir se a área contabilizada foi a mesma selecionada conforme a imagem segmentada para a tonalidade em estudo. Dessa forma, a parcialidade da visão humana e a experiência do observador podem ser extraídas.

No presente estudo, a reprodutibilidade das análises foi garantida, uma vez que não ocorreu variação entre os valores obtidos pelos observadores, ao se utilizar o *ImageJ*, *Plugin Threshold Colour* para detecção da segmentação de cor com as configurações citadas anteriormente. Vale ressaltar que o mesmo programa pode apresentar resultados diferentes se a configuração for alterada, sendo de extrema importância padronizar a metodologia a ser usada. Também pode ocorrer variação nos resultados ao se utilizarem outros programas ou *plugins*, sendo imprescindível adaptá-los às análises desejadas.

A obtenção das fotomicrografias é um aspecto fundamental quando se deseja realizar morfometria, tendo em vista que algumas alterações no momento da captura da imagem podem alterar o resultado (Armas, 2011; Lattouf *et al.*, 2014; Coelho *et al.*, 2018). É interessante recordar que as fotomicrografias foram obtidas de forma a evitar o surgimento de vieses, pois

alguns artefatos, como dobras e birrefringência dos pelos, podem prejudicar a análise quantitativa dos colágenos na morfometria por segmentação de cor.

A configuração descrita por Bedoya *et al.* (2016) foi usada como base para o delineamento da metodologia, uma vez que se buscava comparar dois métodos morfométricos para quantificação do colágeno dérmico, de forma a determinar aquele que fosse mais confiável e passível de ser reproduzido e, baseando-se neles, constatou-se que resultados semelhantes são possíveis desde que as duas técnicas sejam adaptadas, uma aumentando o número de pontos e a outra os valores de brilho e matiz.

MacKenna *et al.* (1994), assim como Rich e Whittaker (2005), avaliaram o colágeno por segmentação de cor utilizando valores individuais para as cores vermelha, laranja, amarela e verde no *software SigmaScan Pro Image Analysis* (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Entretanto, os autores não levaram em consideração o tipo de colágeno. As tonalidades encontradas no presente trabalho, agrupadas seguindo o padrão de vermelho-amarelado para o colágeno do tipo I e amarelo-esverdeado para o tipo III, foram determinadas levando-se em consideração que, na matriz extracelular da pele, o colágeno do tipo I representa aproximadamente de 80 a 85%, enquanto o tipo III de 8 a 11%, conforme mencionado por Schultz *et al.* (2005).

A morfometria de pontos é um método padrão para quantificação de estruturas, porém a segmentação de cor representa uma ferramenta de análise de imagem simples de ser realizada, rápida e confiável para avaliação de colágeno em cortes histológicos de pele sadia em equinos, podendo ser estendida a diversas afecções dermatológicas, desde que o *software* utilizado seja padronizado para as cores que serão avaliadas no tecido a ser estudado.

CONCLUSÃO

A segmentação de cor mostrou-se superior na quantificação histomorfométrica de colágenos tipos I e III em pele equina quando comparada com a morfometria de pontos. Assim mesmo, esse método de quantificação é confiável, mais rápido, automático, reprodutível e menos extenuante. Assim, a segmentação de cor,

utilizando configuração adequada para *brightness* e *hue*, pode substituir a morfometria por contagem de pontos, podendo ser aplicada para análises morfométricas de outros tecidos desde que padronizada a técnica. Entretanto, alguns cuidados precisam ser tomados na obtenção das imagens, pois algumas estruturas da pele podem apresentar birrefringência e fornecer um resultado falso positivo.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos às agências de fomento Capes, CNPq e Fapemig, pela concessão da bolsa de pesquisador e de estudo a membros da equipe do trabalho e pelo suporte financeiro (CVZ – APQ-00661-11 e CVZ – PPM-00222-13).

REFERÊNCIAS

- ANDREA, C.E.; BLEGGI-TORRES, L.F.; ALVES, M.T.S. Análise da morfometria nuclear: descrição da metodologia e o papel dos softwares de edição de imagem. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, v.44, p.51-57, 2008.
- ARMAS, D.J.N. La microscopía: herramienta para estudiar células y tejidos. *Medicina*. Los Andes: Universidad de los Andes, 2011. Disponible en: <<http://www.medic.ula.ve/histologia/anexos/microscopweb/MONOWEB/inicio.htm>>. Acceso en: 2 ago. 2017.
- ARTZI, Z.; TAL, H.; DAYAN, D. Porous bovine bone mineral healing of human extraction sockets: 2. Histochemical observations at 9 months. *J. Periodontol.*, v.72, p.152-159, 2001.
- BEDOYA, S.A.O.; CONCEIÇÃO, L.G.; VILORIA, M.I.V et al. Caracterização de colágenos tipos I e III no estroma do carcinoma de células escamosas cutâneo em cães. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.68, p.147-154, 2016.
- COELHO, P.G.B.; SOUZA, M.V.; GONÇALVES, L.C. et al. Evaluation of dermal collagen stained with *Picrosirius red* and examined under polarized light microscopy. *An. Bras. Dermatol.*, v.93, p.415-418, 2018
- COLEMAN, R. Picrosirius red staining revisited. *Acta Histochem.*, v.113, p.231-233, 2011.
- DOCHEVA, D.; PADULA, D.; SCHIEKER, M.; CLAUSEN-SCHAUMANN, H. Effect of collagen I and fibronectin on the adhesion, elasticity and cytoskeletal organization of prostate cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.402, p.361-366, 2010.
- FACHINELLI, A. *Avaliação qualitativa e quantitativa do colágeno total, tipo I e tipo III da linha alba em pacientes portadores de hernia da parede abdominal anterior*. 2005. 94f. Dissertação (Mestrado em Medicina) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- JUNQUEIRA, L.C.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch. Histol. Jpn.*, v.41, p.267-274, 1978.
- KAKKAD, S.M.; SOLAIYAPPAN, M.; ARGANI, P. et al. Collagen I fiber density increases in lymph node positive breast cancers: pilot study. *J. Biomed. Opt.*, v.17, p.1-7, 2012.
- KOREN, R.; YANIV, E.; KRISTT D. et al. Capsular collagen staining of follicular thyroid neoplasms by *picrosirius red*: role in differential diagnosis. *Acta Histochem.*, v.103, p.151-157, 2001.
- LATTOUF, R.; YOUNES, R.; LUTOMSKI, D. et al. *Picrosirius red* staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, v.62, p.751-758, 2014.
- MACKENNA, D.A.; OMENS, J.H.; MCCULLOCH, D.; COVELL, J.W. Contribution of collagen matrix to passive left ventricular mechanics in isolated rat hearts. *Am. J. Physiol.*, v.266, p.1007-1018, 1994.
- MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. *Métodos quantitativos em morfologia*. Rio de Janeiro: EDUERJ, 1995. 131p.
- MIOT, H.A.; GABRIELLI BRIANEZI, G. Morphometric analysis of dermal collagen by color clusters segmentation. *An. Bras. Dermatol.*, v.85, p.361-364, 2010.
- OBERHOLZER, M.; OSTREICHER, M.; CHRISTEN, H.; BRIIHLMANN, M. Methods in quantitative image analysis. *Histochem. Cell Biol.*, v.105, p.333-355, 1996.

Quantificação do colágeno...

- RICH, L.; WHITTAKER, P. Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Braz. J. Morphol. Sci.*, v.22, p.97-104, 2005.
- ROUSH, J.K.; BREUR, G.J.; WILSON, J.W. Picrosirius red staining of dental structures. *Stain Technol.*, v.63, p.363-367, 1988.
- SCHINDELIN, J.; RUEDEN, C.T.; HINER, M.C.; ELICEIRI, K.W. The ImageJ ecosystem: an open platform for biomedical image analysis. *Mol. Reprod. Dev.*, v.82, p.518-529, 2015.
- SCHULTZ G.S., LADWIG, G.; WYSOCKI, A. Extracellular matrix: review of its roles in acute and chronic wounds. *World Wide Wounds*, 2005. Available in: <http://www.worldwidewounds.com/2005/august/Schultz/Extrace-Matric-Acute-Chronic-Wounds.html>. Accessed in: 05 Dec. 2017.
- SERVAIS, A.; MEAS-YEDID, V.; BUCHLER, M. *et al.* Quantification of interstitial fibrosis by image analysis on routine renal biopsy in patients receiving cyclosporine. *Transplantation*, v.84, p.945-950, 2007.
- SERVAIS, A.; MEAS-YEDID, V.; MORELON, E. *et al.* Apports récents des techniques de quantification de la fibrose pour l'examen anatomopathologique en transplantation rénale. *Med. Sci.*, v.25, p.945-950, 2009.
- SOUZA, M.V.; PINTO, J.O.; COSTA, M.M.; *et al.* Quantificação de fatores de crescimento na pele de equinos tratada com plasma rico em plaquetas. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.34, p.599-612, 2014.
- SWEAT, F.; PUCHTLER, H.; ROSENTHAL, S.I. *Sirius red* F3BA as a stain for connective tissue. *Arch. Pathol.*, v.78, p.69-72, 1964.
- WEATHERFORD, T.W. Staining of collagenous and non-collagen structures with picrosirius red F3BA. *J. Med. Sci.*, v.9, p.383-388, 1972.
- WHITTAKER, P.; KLONER, R.A.; BOUGHNER, D.R.; PICKERING, J.G. Quantitative assessment of myocardial collagen with picrosirius red staining and circularly polarized light. *Basic Res. Cardiol.*, v.89, p.397-410, 1994.