

Análise morfométrica do colágeno dérmico a partir da segmentação por conglomerados (*clusters*) de cor*

Morphometric analysis of dermal collagen by color clusters segmentation

Hélio Amante Miot¹

Gabrielli Brianezi²

Resumo: Análise morfométrica do colágeno dérmico pode fornecer subsídio quantitativo para a pesquisa em dermatologia. Os autores demonstram uma técnica de análise de imagem digital que permite a identificação de estruturas microscópicas, a partir da segmentação por conglomerados (*clusters*), de cor aplicada à estimativa da intensidade e densidade das fibras colágenas da derme.

Palavras-chave: Análise por conglomerados; Citometria por imagem; Colágeno

Abstract: Morphometric analysis of dermal collagen can provide quantitative support to dermatologic research. The authors of this article disclose a technique of digital image analysis which allows the identification of microscopic structures by color cluster segmentation regarding the estimate intensity and density of dermal collagen fibers.

Keywords: Cluster analysis; Collagen; Image cytometry

A fotografia digital constitui uma matriz de *pixels* cujas intensidades de cor, posições, arranjos e inter-relações são definidas e invariáveis para cada imagem, o que favorece a análise quantitativa e contagem de estruturas. Essa técnica se denomina morfometria.¹

Morfometria computacional de cortes histológicos representa uma importante ferramenta na pesquisa biomédica, integrando a objetividade das medidas, alta reprodutibilidade, baixo custo, independência da subjetividade e parcialidade da leitura humana, além da possibilidade de avaliação quantitativa das variáveis, havendo vultosa literatura disponível.²

A estimativa de espessura epidérmica, hiperqueratose, paraqueratose, pigmento melânico, profundidade de tumores, infiltrado inflamatório, volume de glândulas, marcações imuno-histoquímicas, heterogeneidade da cromatina, elastose dérmica e alterações do colágeno são algumas aplicações diretas da morfometria em cortes microscópicos de pele.^{3,5}

Apesar da disponibilidade de sistemas comerciais específicos de morfometria, a quantificação de estruturas pode ser realizada, a partir de simples microscópios de luz, acoplados a câmeras

digitais e analisados por *softwares* gratuitos, entre eles, o ImageJ, promovendo a possibilidade de difusão da pesquisa quantitativa em dermatologia.^{6,7}

Apresentamos em exemplo, uma estratégia para estimativa da densidade e da intensidade das fibras colágenas na derme, que se revela importante variável em estudos de envelhecimento, síndromes genéticas, fibromatoses e colagenoses, além da comparação de terapêuticas.

Há vários sistemas de cor para se operar em morfometria, destacam-se o HSB, LAB, XYZ e RGB, o mais comumente utilizado. Dessa forma, os *pixels* de uma imagem podem ser interpretados como pontos luminosos, com intensidades de cor que podem ser decompostas em canais como: vermelho (R), verde (G) e azul (B). Se cada *pixel* projetar sua composição de cor em um sistema ortogonal tridimensional RxGxB, nesse espaço virtual, podem-se identificar agrupamentos de pontos que se relacionam a tonalidades de cores da imagem. A análise de *cluster* é uma ferramenta computacional na qual se identifica esses agrupamentos de pontos e os substitui pelos seus valores medianos (centróides), criando uma segmentação da imagem por intensidade de cor.^{7,8}

Aprovado pelo Conselho Editorial e aceito para publicação em 01.07.2009.

* Trabalho realizado nos Departamentos de Dermatologia e Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu - Universidade Estadual Paulista (FMB-Unesp) - Botucatu (SP), Brasil.

Conflito de interesse: Nenhum / *Conflict of interest*: None.

Suporte financeiro: Nenhum / *Financial funding*: None.

¹ Professor Assistente Doutor do Departamento de Dermatologia e Radioterapia da Faculdade de Medicina de Botucatu - Universidade Estadual Paulista (FMB-Unesp) - Botucatu (SP), Brasil.

² Biomédica, mestranda do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu - Universidade Estadual Paulista (FMB-Unesp) - Botucatu (SP), Brasil.

No software ImageJ, pode-se utilizar o *plugin*, chamado *k-means clustering*, o qual permite a segmentação por conglomerados representados espacialmente por diferentes sistemas de cor.⁶⁻⁸

Inicialmente, para uma avaliação fidedigna, é necessária rígida padronização da área corporal a ser estudada, técnica de obtenção do material e de processamento da peça cirúrgica, cortes microscópicos de mesma espessura, coloração das lâminas com mesma solução, escolha das colorações que melhor destaquem a estrutura de interesse (p.ex. Tricrômio de Masson), fotografias capturadas no mesmo sistema microscópico e com mesmo aumento óptico, iluminação, resolução, ISO, abertura e velocidade do obturador da câmera; preferencialmente, capturados pelo mesmo indivíduo (cegado quanto aos grupos da análise), no mesmo momento, amostrados em números suficientes de

imagens por lâmina e por paciente, em regiões padronizadas da pele (p. ex. derme papilar).

Após esses cuidados, fotografias de cortes histológicos de pele, corados pelo tricrômio de Masson, devem ser preparadas para a análise, a partir do aumento padronizado do contraste entre as tonalidades e recorte da área de interesse (Figuras 1A, 1B e 1C). A imagem resultante pode ser dividida em cinco ou seis tonalidades diferentes de *pixels*, a partir da segmentação por *clusters* de cor (Figura 1D).

A análise do histograma da nova imagem permite avaliar a frequência e a intensidade de cada grupo de cor (varia de 0 a 255), fornecendo a densidade de colágeno e a estimativa da sua intensidade de tom relativa à cor do fundo (Figura 2).

Alternativamente, a partir da binarização da imagem, a segmentação direta da derme pode ser empregada na estimativa da densidade e da

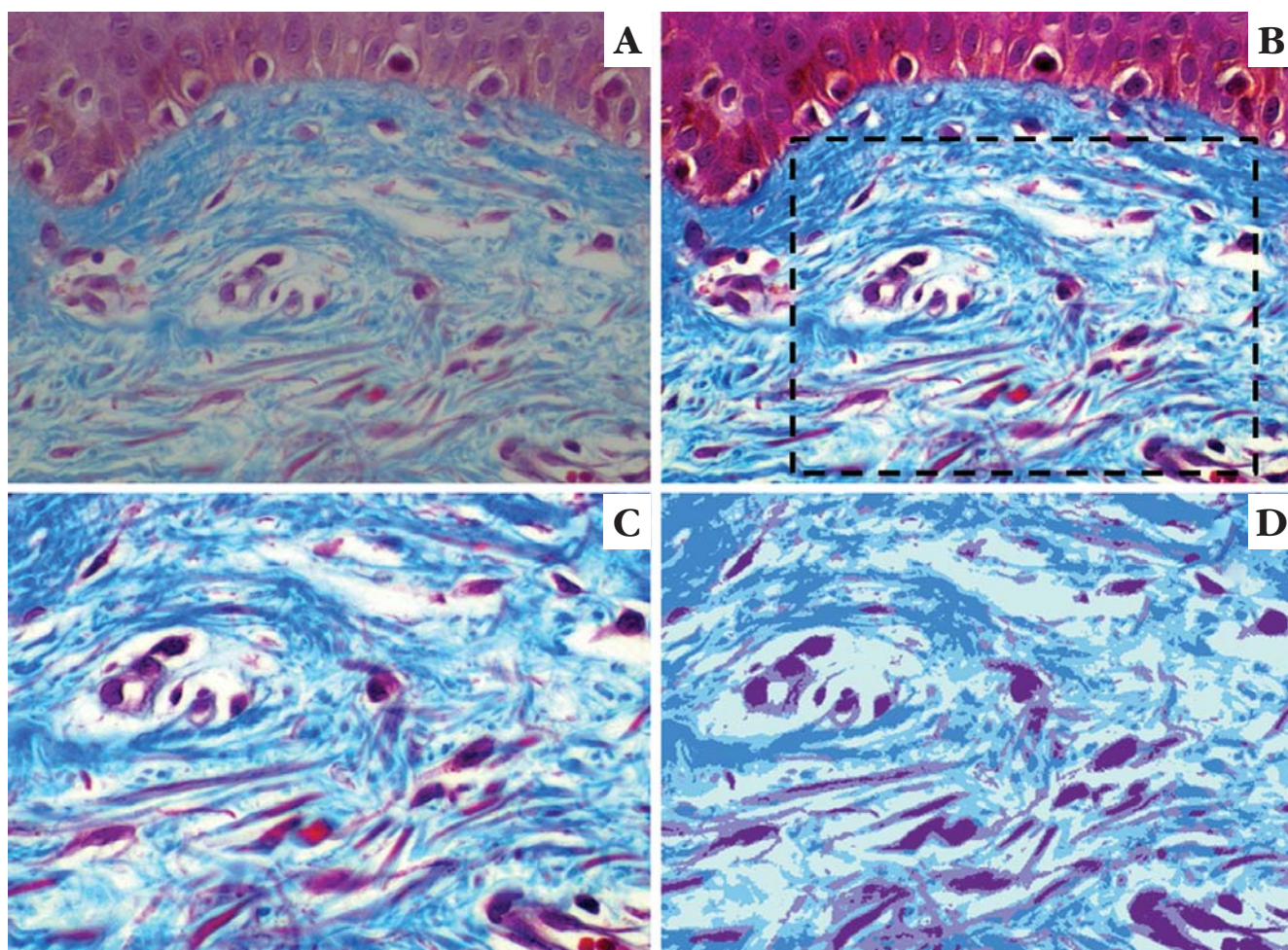


FIGURA 1. A. Fotografia da derme superficial e papilar do tórax anterior de adulto, corada pelo tricrômio de Masson; aumento de 400x; B. Aumento do contraste e determinação da região de interesse para a análise; C. Recorte da imagem para a segmentação (cinco grupos), evidenciando duas tonalidades de colágeno (azul forte e fraco), células inflamatórias, hemácias, endotélio e fibroblastos (roxo e avermelhado), fibras elásticas (vermelho pálido), além do fundo (branco); D. Imagem segmentada representada pelas cinco cores medianas (centroides) de cada grupo

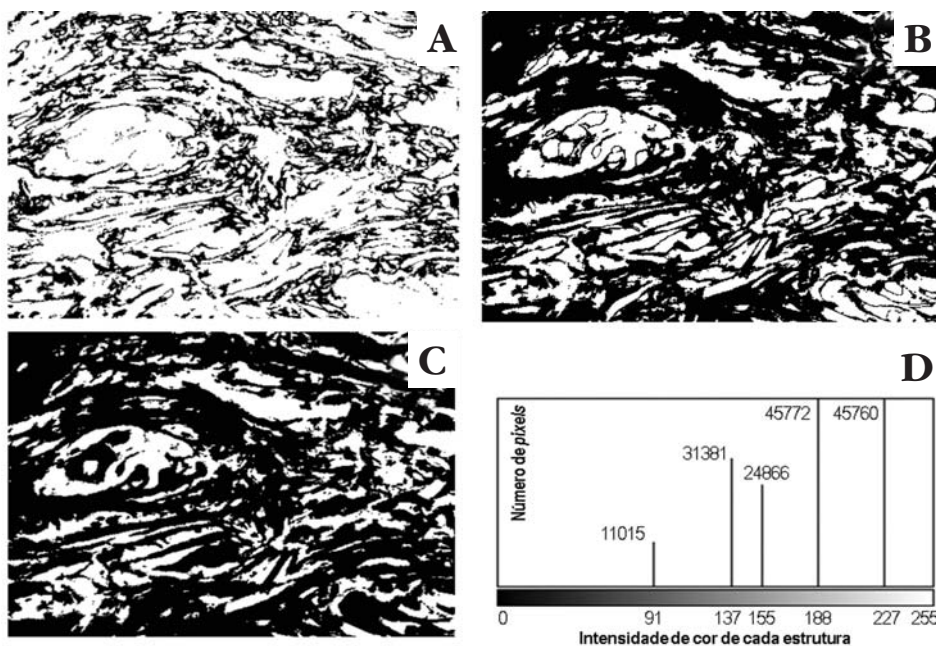


FIGURA 2. A. Segmentação binária individual das fibras colágenas finas (28,8%); B. Fibras finas somadas às densas e elásticas (64,2%); C. Segmentação de todas as estruturas dérmicas, incluindo núcleos (71,2%); D. Histograma representando a intensidade de cor do centroide de cada estrutura. Colágeno denso é mais escuro (137) que o fundo (227), resultando em uma diferença de 90 tons de cor

intensidade do colágeno dérmico, sem a categorização dos diferentes grupos de cor, porém, isso apresenta desvantagens pela não individualização do colágeno das fibras elásticas, endotélio, hemácias, fibroblastos e células inflamatórias; o que pode promover uma superestimativa desses valores (Figura 2). O método de segmentação por *clusters* de cor permite o controle desse viés, e, inclusive, a estimativa conjunta dessas outras estruturas.

A figura 3 demonstra a estimativa quantitativa do colágeno dérmico, em dois diferentes cortes de pele, com densidades e intensidades visivelmente diferentes de fibras, evidenciando o importante subsídio morfométrico que a técnica oferece à pesquisa dermatológica.

O método ainda se revela flexível para o uso de diferentes números de *clusters* selecionados, a fim de se individualizar grupos diferentes de colorações. A mesma técnica descrita pode ser empregada para avaliar cortes de pele coloridos pela Hematoxilina e Eosina, entretanto, a maior discriminação colorimétrica do tricrômio de Masson para o colágeno, também favorece a segmentação de diferentes fibras e demais estruturas dérmicas.

Por identificar os agrupamentos de *pixels* que representam estruturas independentes, a técnica de análise por *clusters* é menos susceptível a diferenças de percepção, inerentes à técnica de coloração da lâmina e iluminação da fotografia, efeitos que geram a falsa impressão de alterações na intensidade de cor.

Sistemas morfométricos computacionais devem ser empregados para análises quantitativas em pesquisas dermatológicas, e preferencialmente

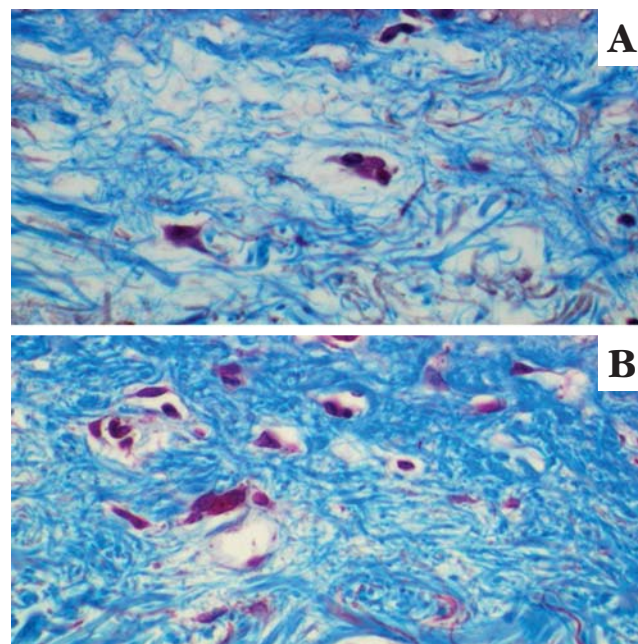


FIGURA 3. Áreas de interesse para análise pela segmentação de conglomerados de cor (derme corada pelo tricrômio de Masson; aumento de 400x), quanto à densidade e intensidade do colágeno; A. Colágeno menos denso (62,8%) e menos intenso (76) em relação ao fundo; B. Colágeno mais denso (74,5%) e mais intenso (80), em relação ao fundo

validados a partir de técnicas qualitativas (avaliação visual estimada em cruzes), biomecânicas (testes de rugosidade, textura, hidratação, elasticidade), bioquímicas (expressão de citocinas, proteínas, degradação enzimática) ou testes funcionais (melhora da doença, redução dos sintomas).

O estudo do colágeno dérmico pode ainda ser suplementado pela análise das frações de colágeno I e III (imuno-histoquímica), além da avaliação da neocolagenogênese, a partir da coloração de

picrossirius (microscopia de luz polarizada), espessura e orientação das fibras. Tais avaliações podem ser quantificadas por técnicas de morfometria.^{9,10} □

REFERÊNCIAS

- 1 Miot HA, Paixão MP, Paschoal FM. Fundamentos da fotografia digital em Dermatologia. *An Bras Dermatol*. 2006;81:174-80.
- 2 Oberholzer M, Östreicher M, Christen H, Brühlmann M. Methods in quantitative image analysis. *Histochem Cell Biol*. 1996;105:333-55.
- 3 Miot LDB, Miot HA, Silva MG, Marques MEA. Estudo comparativo morfofuncional de melanócitos em lesões de melasma. *An Bras Dermatol*. 2007;82:529-64.
- 4 Wolf DE, Samarasekera C, Swedlow JR. Quantitative analysis of digital microscope images. *Methods Cell Biol*. 2007;81:365-96.
- 5 Flotte TJ, Seddon JM, Zhang YQ, Glynn RJ, Egan KM, Gragoudas ES. A computerized image analysis method for measuring elastic tissue. *J Invest Dermatol*. 1989;93:358-62.
- 6 Abramoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics Int*. 2004;11:36-42.
- 7 Collins TJ. ImageJ for microscopy. *Biotechniques*. 2007 Jul;43(1 Suppl): 25-30.
- 8 Smolle J. Computer recognition of skin structures using discriminant and cluster analysis. *Skin Res Technol*. 2000;6:58-63.
- 9 Noorlander ML, Melis P, Jonker A, Van Noorden CJ. A quantitative method to determine the orientation of collagen fibers in the dermis. *J Histochem Cytochem*. 2002;50:1469-74.
- 10 Spinelli FPM, Valente S, Foroni L, Orrico C. Common Tasks in Microscopic and Ultrastructural Image Analysis Using ImageJ. *Ultrastructural Pathology*. 2007;31:401-7.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA / MAILING ADDRESS:
Hélio Amante Miot
Departamento de Dermatologia da Faculdade de
Medicina da Unesp, S/N.
Campus Universitário de Rubião Jr.
18618 000 Botucatu SP - Brasil
Tel./Fax: 14 3882 4922
E-mail: beliomiot@fmb.unesp.br

Como citar este artigo/How to cite this article: Miot HA, Brianezi G. Análise morfométrica do colágeno dérmico a partir da segmentação por conglomerados (*clusters*) de cor. *An Bras Dermatol*. 2010;85(3):361-4.