



# ANÁLISE DA IMAGEM HISTOLÓGICA ASSISTIDA POR SOFTWARE PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DILATAÇÃO SINUSOIDAL E FIBROSE HEPÁTICA CENTROLUBULAR

*Software-assisted image analysis for identification and quantification of hepatic sinusoidal dilatation and centrilobular fibrosis*

Douglas Mesadri **GEWEHR**<sup>1,2,3</sup>, Allan Fernando **GIOVANINI**<sup>1</sup>, Sofia Inez **MUNHOZ**<sup>1,2</sup>, Seigo **NAGASHIMA**<sup>4</sup>, Andressa de Souza **BERTOLDI**<sup>2</sup>, Ana Cristina Lira **SOBRAL**<sup>1</sup>, Fernando Bermudez **KUBRUSLY**<sup>2,3</sup>, Luiz Fernando **KUBRUSLY**<sup>1,2,3</sup>

**Resumo – Racional:** Tecnologias de imagem digital têm sido introduzidas ao diagnóstico patológico, permitindo avaliações quantitativas objetivas. A quantificação de tecido fibroso em biópsias de fígado é extremamente importante para a classificação, diagnóstico e graduação de doenças crônicas hepáticas. **Objetivo:** Criar um protocolo computadorizado semi-automático para quantificação de fibrose centrolobular e dilatação sinusoidal em amostras de fígado coradas por Tricrômico de Masson. **Método:** Uma vez instaurada a fibrose, amostras de fígado foram coletadas, processadas histologicamente, coradas por Tricrômico de Masson e WSI (Whole Slide Images) foram capturadas por scanner digital patológico apropriado. Uma seleção aleatória das regiões de interesse (ROI) foi realizada. Os dados foram submetidos a uma análise de imagem assistida por software (ImageJ®). **Resultados:** A análise de 250 ROIs permitiu obter-se empiricamente as melhores configurações capazes de identificar fibrose centrolobular (FC) e lúmen sinusoidal (LS). Após o estabelecimento das configurações de padrão de cor, uma Macro de autoria própria foi gravada para definir as medidas (área da fração e área total) e calcular as razões de FC e LS por processamento em grupo/lote (batch mode). **Conclusão:** Foi possível criar um método detalhado capaz de identificar e quantificar a área ocupada por tecido fibroso e lúmen sinusoidal em espécimes de fígado coradas por Tricrômico de Masson.

**DESCRITORES:** Processamento de imagem. Processamento de imagem assistido por computador. Fibrose hepática. Sinusoides.

**ABSTRACT – Background:** Heart dysfunction and liver disease often coexist because of systemic disorders. Any cause of right ventricular failure may precipitate hepatic congestion and fibrosis. Digital image technologies have been introduced to pathology diagnosis, allowing an objective quantitative assessment. The quantification of fibrous tissue in liver biopsy sections is extremely important in the classification, diagnosis and grading of chronic liver disease. **Aim:** To create a semi-automatic computerized protocol to quantify any amount of centrilobular fibrosis and sinusoidal dilatation in liver Masson's Trichrome-stained specimen. **Method:** Once fibrosis had been established, liver samples were collected, histologically processed, stained with Masson's trichrome, and whole-slide images were captured with an appropriated digital pathology slide scanner. After, a random selection of the regions of interest (ROI's) was conducted. The data were subjected to software-assisted image analysis (ImageJ®). **Results:** The analysis of 250 ROI's allowed to empirically obtain the best application settings to identify the centrilobular fibrosis (CF) and sinusoidal lumen (SL). After the establishment of the colour threshold application settings, an in-house Macro was recorded to set the measurements (fraction area and total area) and calculate the CF and SL ratios by an automatic batch processing. **Conclusion:** Was possible to create a more detailed method that identifies and quantifies the area occupied by fibrous tissue and sinusoidal lumen in Masson's trichrome-stained livers specimens.

**HEADINGS:** Image processing, computer-assisted. Liver fibrosis. Sinusoids.

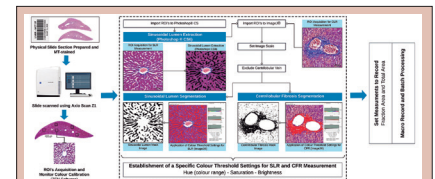


Diagrama de fluxo mostrando a metodologia da análise de imagem para quantificação de percentual de fibrose centrolobular e de lúmen sinusoidal.

## Mensagem central

A busca de abordagens analíticas alternativas que permitissem um protocolo computadorizado semiautomático para quantificar qualquer quantidade de fibrose centrolobular e dilatação sinusoidal no fígado, motivou o objetivo deste trabalho em desenvolver um método mais detalhado que identifique e quantifique a área ocupada por tecido fibroso e lúmen sinusoidal nos espécimes de fígado corados com Tricrômico de Masson.

## Perspectiva

O nosso método representa um complemento essencial aos índices semiquantitativos de fibrose para melhor definir a fase de evolução de diferentes doenças hepáticas e pode ser de grande valor para permitir chegar a conclusões válidas quanto à aplicabilidade de terapias de qualquer etiologia para o tratamento da fibrose hepática em estudos experimentais. Esta técnica poderia também ser adaptada para a quantificação da fibrose de outras zonas e compartimentos hepáticos, bem como de outros tecidos e órgãos.



[www.facebook.com/abcdrevista](http://www.facebook.com/abcdrevista)



[www.instagram.com/abcdrevista](http://www.instagram.com/abcdrevista)



[www.twitter.com/abcdrevista](http://www.twitter.com/abcdrevista)

Trabalho realizado na Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil; <sup>2</sup>Denton Cooley Instituto de Pesquisa, Ciência e Tecnologia, Curitiba, Paraná, Brasil; <sup>3</sup>Instituto do Coração de Curitiba, Curitiba, Paraná, Brasil; <sup>4</sup>Laboratório de Patologia Experimental da Saúde e Ciências Biológicas, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

Como citar esse artigo: análise da imagem histológica assistida por software para identificação e quantificação de dilatação sinusoidal e fibrose hepática centrolobular. ABCD Arq Bras Cir Dig. 2021;34(2):e1608. DOI: /10.1590/0102-672020210001e1608

## Correspondência:

Douglas Mesadri Gewehr  
E-mail: [douglasgewehr@incorcuritiba.com.br](mailto:douglasgewehr@incorcuritiba.com.br);  
[douglasgewehr@gmail.com](mailto:douglasgewehr@gmail.com)

Fonte de financiamento: esta pesquisa foi apoiada pelo Instituto Denton Cooley de Pesquisa, Ciência e Tecnologia e pela Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná, PR, Brasil (CEUA/FEMPAR, código institucional n° 2578/2020) e financiada, em parte, pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PIBIC/CNPq) – Brasil.  
Conflito de interesse: não há  
Recebido para publicação: 22/10/2020  
Aceito para publicação: 08/02/2021

## INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca é condição de alta prevalência e com tendência de aumento de novos casos devido ao envelhecimento populacional e aos avanços da medicina. Disfunções cardíacas e hepáticas frequentemente coexistem em doenças sistêmicas e em doenças que afetam os ambos os órgãos, bem como as complexas interações cardio-hepáticas. A Síndrome Cardiohepática (SCH) do tipo 2 é caracterizada por diminuição da função cardíaca que causa injúria crônica ao fígado e é frequentemente intitulada hepatopatia congestiva<sup>24</sup>. Qualquer causa de insuficiência ventricular direita pode antecipar a congestão hepática, levando à diminuição do fluxo sanguíneo no fígado e aumento de sua pressão venosa. Histologicamente, a congestão passiva do fígado é caracterizada por dilatação dos capilares sinusoides, atrofia de hepatócitos e fibrose tecidual, alterações mais visíveis na zona 3, também chamada de região centrolobular<sup>12</sup>.

Nos últimos anos, tecnologias de imagens digitais foram introduzidas à patologia diagnóstica, permitindo avaliações quantitativas objetivas e mais precisas do que as análises puramente qualitativas ou semiquantitativas realizadas por métodos visuais convencionais<sup>13,19,28</sup>.

Diversos programas de computador são utilizados diariamente em laboratórios para analisar imagens biológicas. Infelizmente, os softwares atuais são de custo elevado e não permitem mensurar parâmetros além daqueles já pré-estabelecidos pelo software<sup>15,17,19,25</sup>. Com a introdução da digitalização, as lâminas histopatológicas podem ser acessadas virtualmente, agregando ao método de lâminas de vidro convencionais. Como resultado, a análise assistida por software aprimora a precisão da análise da imagem histológica, uma vez que contém toda a imagem da lâmina (Whole Slide Image – WSI) em um arquivo digital, permitindo o pré-processamento de regiões de interesse (ROI) e, ainda, possibilitando a utilização de vários softwares analíticos, que, até então, eram limitados a alguns raros<sup>13</sup>.

Há poucos estudos publicados acerca da análise quantitativa de fibrose hepática assistida por software<sup>4,6,9,15,16,18-22,25</sup>. Ainda mais escassos são os estudos que avaliam a fibrose centrolobular e, até onde se sabe, não foi descrito um método padronizado de quantificação de área luminal de espécimes de sinusoides hepáticos corados por Tricrômico de Masson<sup>13</sup>.

Neste artigo, foi aplicada a análise assistida por software para a determinação quantitativa da congestão passiva do fígado induzida por hipertrofia ventricular direita em um modelo de rato. Aqui, propomos um protocolo semiautomático de quantificação de qualquer extensão de fibrose centrolobular e dilatação sinusoidal em amostras de fígado coradas por Tricrômico de Masson.

## MÉTODOS

O protocolo de estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná (CEUA/FEMPAR). Todos os protocolos experimentais foram realizados de acordo com as normas do Nacional Institute of Health (NIH) para cuidado e uso de animais de laboratório (Publicação n.º. 85723, revisada em 1996) e conforme princípios previamente descritos e regulações para experimentação animal contidas em *Experimental Physiology* (Grundy, 2015), e todas as etapas foram conduzidas de modo a minimizar a dor e sofrimento dos animais durante os experimentos. Código de aprovação de ética: 2577/2020.

### Amostras de fígado

Cinquenta fígados de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos foram utilizados para o desenvolvimento desta nova metodologia de análise. Os animais foram submetidos à monocrotalina para a indução de hipertensão arterial pulmonar, hipertrofia de ventricular

direita e, conseqüentemente, hepatopatia congestiva, metodologia previamente reproduzida por nosso grupo de pesquisa, utilizando o mesmo protocolo<sup>10</sup>.

### Preparação histológica

Os fígados foram fixados em formaldeído tamponado a 10% por 48 h. Os maiores lobos hepáticos esquerdo e direito foram seccionados em corte transversal. Após fixados, os tecidos foram incluídos em blocos de parafina e duas secções coronais de 4 µm foram obtidas de cada animal, sendo uma das secções corada por Tricrômico de Masson (TM) e a outra por H&E, respectivamente. Dessa forma, duas lâminas de fígado foram preparadas por animal, totalizando 100 lâminas para a análise anatomopatológica e morfométrica.

### Digitalizador de lâminas e obtenção da imagem

Imagens completas de lâminas (do inglês Whole-Slide Images-WSI) de fígado foram obtidas por um scanner digital de lâminas histológicas (Axio Scan Z1, Zeiss, Jena, Germany, 40X) e as imagens foram analisadas usando o software ZEN 2.3 (edição blue) (Carl Zeiss Microscopy GmbH®, 2011), o qual permite ao usuário navegar pela imagem digital em .CZI (Carl Zeiss Image), através do software ZEN, e realizar aferições geométricas e quantitativas.

Após digitalização das secções de fígado em TM com o Axio Scanner, foram selecionadas aleatoriamente cinco regiões de interesse (ROIs) por lâmina (em máxima resolução com predefinição de ROI a 1364 x 1364 pixels, com a veia centrolobular precisamente no centro de cada ROI, cada pixel medindo 4,55 µm x 4,55 µm). Essas imagens digitais foram utilizadas para quantificar a fibrose centrolobular e a área sinusoidal.

Foram realizadas séries de testes na 250 ROIs obtidas, avaliadas por dois diferentes investigadores. Na sequência, as imagens foram analisadas utilizando macroinstructions (macro) de autoria própria, na funcionalidade de análise em grupo/lote (batch mode) do software ImageJ® (versão 1.53e, ©National Institutes of Health, USA).

### Avaliação do escore de fibrose hepática congestiva

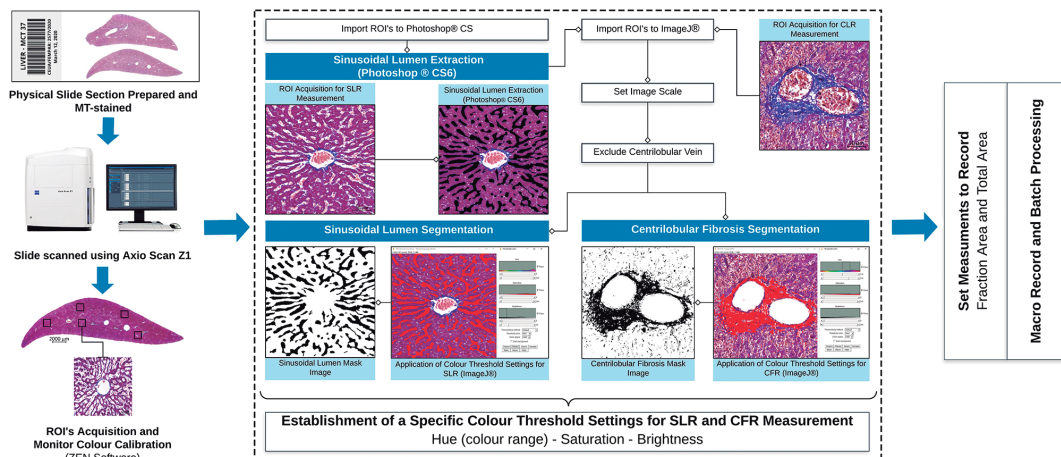
A avaliação histopatológica foi realizada por dois patologistas diferentes utilizando o sistema de Escore de Fibrose Hepática Congestiva (EFHC)<sup>7</sup>. Trata-se de um método de classificação patológica semiquantitativa, que leva em consideração o padrão de fibrose hepática. Os escores 0, 1, 2, 3, e 4 são atribuídos da seguinte forma: escore 0, sem fibrose; escore 1, fibrose na zona central; escore 2, fibrose centrolobular e portal; escore 3, fibrose em ponte; escore 4, cirrose.

### Análise estatística

O EFHC foi expresso em mediana ± intervalo interquartil. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar a se as variáveis apresentavam distribuição normal. O teste ANOVA one-way seguido do teste Tukey foi utilizado para comparação intergrupos, uma vez que os dados apresentavam distribuição normal. Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o software Action Stat® (versão 3.7, Estatcamp Team (2014), Software Action, Estatcamp – Statistics and Quality Consultancy, São Carlos - SP, Brasil) e os gráficos foram confeccionados utilizando o MedCalc® (versão 19.3.1, MedCalc Software Ltd®, 1993–2020).

## RESULTADOS

Todas as imagens foram analisadas seguindo o algoritmo ilustrado na Figura 1, utilizando uma macro de autoria própria, gravado e desenvolvido para quantificar os valores absolutos em micrômetros (µm) da área de fibrose centrolobular e de lúmen sinusoidal em comparação com a área total de cada ROI. Essa metodologia permitiu a mensuração da Razão de Fibrose Centrolobular (RFC) e a Razão de Lúmen Sinusoidal em cada



CFR (Centrilobular Fibrosis Ratio) = Razão de Fibrose Centrolubular; SLR (Sinusoidal Lumen Ratio) = Razão de Lúmen Sinusoidal; ROI (Region of Interest) = Região de Interesse.

**FIGURA 1** – Diagrama de fluxo mostrando a metodologia da análise de imagem assistida por software para quantificação de percentual de fibrose centrolubular e de lúmen sinusoidal. A metodologia inicia-se a partir da lâmina de vidro corada por Tricrômico de Masson, seguida de digitalização pelo equipamento Axio Scan Z1; aquisição de ROI e calibração de monitor (Zen Software); destinação da imagem ao Photoshop CS6; extração e segmentação de imagem de LS; importação das imagens para o programa ImageJ®; determinação da escala de imagem; exclusão da imagem de veia centrolubular; estabelecimento de um padrão de cores específico para RFC e RLS; finalização pela gravação das medidas e processamento pela função batch.

ROI. A média dos cinco campos visuais (das cinco ROI's) foram comparadas.

As ROI's apresentaram algumas variações nas propriedades de cor, que ocorreram devido a diferenças no processamento histológico das amostras teciduais ou durante a aquisição das imagens digitais (configurações da câmera). Devido a isso, as cores do monitor foram previamente calibradas utilizando o software ZEN 2.3 (edição blue).

#### Etapas comum de processamento de imagem

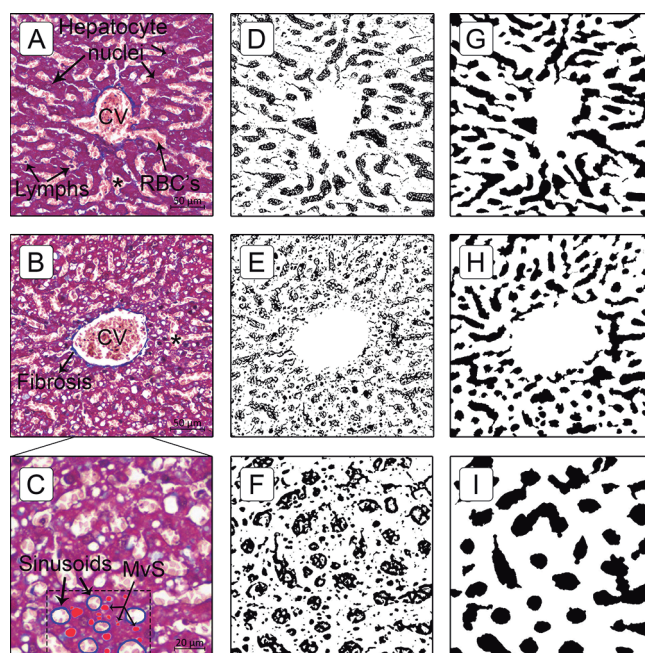
Para todas as imagens analisadas, a macro configura uma escala inicial para a imagem (4,55 µm/pixel). Em seguida, a veia centrolubular é extraída manualmente e preenchida por pixels brancos. Após a obtenção de todos os componentes individuais e correção das áreas a serem excluídas, a macro aplica um algoritmo de padrão de cores (threshold) específico e avalia a área de todos os componentes em µm<sup>2</sup> e em porcentagem. O intervalo do espectro de cores (colour threshold) utilizado pela macro foi estabelecido empiricamente pela análise teste de 250 ROI's e selecionando os limiares que melhor identificaram os componentes, minimizando a interferência de variações de cores entre as lâminas.

#### Segmentação do lúmen sinusoidal

Para quantificar área de lúmen sinusoidal, foi necessário segmentar os sinusoides da estrutura trabecular. No entanto, como a textura do citoplasma depende das condições celulares, (como esteatose, atrofia, metamorfoses lipídicas e displasia) e das condições da técnica histológica (como tempo de armazenagem e fixação do espécime), a extração automática torna-se difícil quando alta precisão é requerida.

Para minimizar as interferências durante a aferição do lúmen sinusoidal, foi desenvolvido um simples e preciso método composto por duas etapas: extração manual do lúmen sinusoidal e aplicação de um recurso para a sua medição baseado em um algoritmo de escala de cores específico. Os lúmens sinusoidais foram manualmente extraídos utilizando a ferramenta Quick Selection Tool (tamanho 10 px; Dureza 50%; espaçamento 50%) do Adobe® Photoshop® CS6 (versão 13.0, © Adobe Systems Incorporated, 1990 – 2012) e preenchidos por pixels pretos. Os pixels pretos, portanto, indicam lúmen sinusoidal, enquanto os pixels brancos indicam estruturas trabeculares e veia centrolubular. Essa etapa é muito importante, visto que elimina estruturas morfológicas que poderiam enviesar a análise, como hemácias, gotículas de gorduras, degeneração hidrópica e outros (Figura 2D-F). A interferência das gotículas de gordura (esteatose microvesicular)

foi eliminada ao realizar a extração de lúmen sinusoidal (Figura 2G-I), previamente à análise pelo ImageJ®. De uma forma geral, foi possível eliminar com sucesso as principais interferências relacionadas ao isolamento e segmentação do lúmen sinusoidal, através extração prévia utilizando Adobe® Photoshop®.



TM = Tricrômico de Masson; CV (Centrilobular Vein) = Veia Centrolubular; lymphs = linfócitos; MvS (Microvesicular Steatosis) = esteatose microvesicular; RBCs (Red Blood Cells) = eritrócitos; \* = sinusoides hepáticos.

**FIGURA 2** – ROI de veia centrolubular e sua respectiva configuração de mascarar para a segmentação de lúmen sinusoidal: A, B e C) amostra de fígado corada por TM; D, E e F) máscara sinusoidal (imagem binária), obtida após obtenção de padrão de cores e suavização utilizando ImageJ®, antes da extração de lúmen sinusoidal; G, H e I) máscara sinusoidal (imagem binária) obtida após aplicação de padrão de cores e suavização, após extração sinusoidal pelo Adobe® Photoshop®; pixels brancos indicando trabécula e veia centrolubular; pixels pretos indicando os sinusoides; G) aparência típica de gotículas de gordura, preenchidas por pixels vermelhos, e sinusoides, destacados por pixels azuis, dentro do retângulo pontilhado, em maior magnitude.

O segundo passo foi a aplicação do algoritmo de padronização do limiar cor (colour threshold) para identificar e medir a área ocupada pelos pixels pretos. As configurações do software ImageJ® aplicadas para mensurar a área de lúmen sinusoidal (pixels pretos) foram: matiz (hue) 0–255, saturação (saturation) 0–255, brilho (brightness) 0–50.

**Segmentação da fibrose centrolobular**

As figuras 2 A, B e C, mostram imagens de espécimes de fígado corado com TM. O tecido conjuntivo/fibrose foi corado em azul, os núcleos de hepatócitos, linfócitos e células de Kupffer corados em vermelho/roxo escuro e o citoplasma dos mesmos em vermelho/rosa/roxo. Os sinusoides e as gotículas de gordura aparecem, em geral, como áreas em branco. Uma trabécula é definida como sendo uma série de células segmentadas pelos sinusoides e estroma. Devido ao o princípio da técnica histológica, a quantificação de fibrose no fígado, neste caso específico, depende da diferenciação de cor entre azul (fibras colágenas) e vermelho/roxo (parênquima).

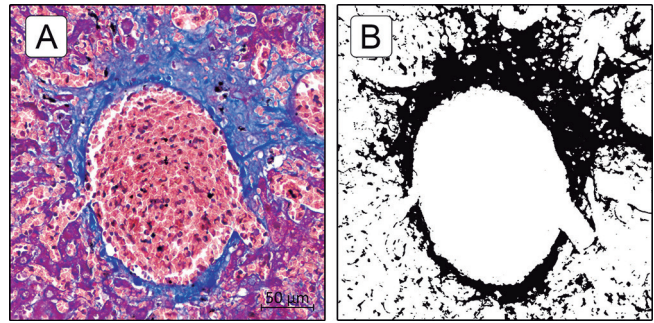
O método desenvolvido para quantificar área de fibrose consiste em uma etapa principal, aplicando um limiar de cor específico (colour threshold) à imagem, após ter estabelecido escala apropriada e ter extraído a veia centrolobular manualmente. O limiar de cores foi conduzido visualmente usando o a configuração predefinida do histograma e ajustando-o manualmente para incorporar a maior quantidade de estruturas coradas em azul (áreas de fibrose), verificando qual delas faria a identificação de forma mais adequada. Foi aplicada uma etapa de suavização de imagem à ROI para reduzir as interferências, melhorando a visualização das estruturas em azul e para definir com mais acurácia a configuração de padrão de cores. Após a análise de 250 ROIs, foi possível empiricamente obter as melhores configurações para a identificação de fibrose centrolobular. As configurações do software ImageJ® aplicadas para esta etapa de mensuração de área de fibrose foram: matiz (hue) 140–190, saturação (saturation) 0–255, brilho (brightness) 0–248.

O presente método foi permitiu identificar e quantificar, através do contraste entre estruturas coradas em azul e vermelho/roxo (fibras colágenas e parênquima, respectivamente), sem interferência entre elas, as áreas difusas de fibrose centrolobular (Figura 3), bem como as áreas delicadas de fibrose perisinusoidal (Figura 4). A aplicação das configurações aplicadas de padrão de cores fora suficientemente capaz de selecionar uma faixa de cor (matiz), saturação e brilho, sem a sobreposição com outros componentes coloridos.

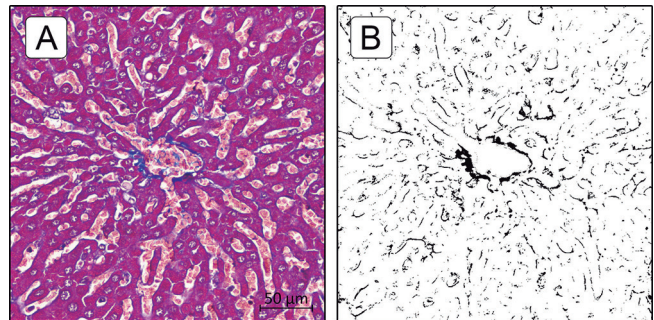
**Gravação em Macro e processamento em grupo/ lote (batch) – quantificação de RLS e RFC**

Após o estabelecimento das definições de aplicação do limiar de cor, uma macro de autoria própria foi gravada para configurar as medições (área da fração e área total) e calcular a Razão de Lúmen Sinusoidal (RLS) e Razão de Fibrose Centrolobular (RFC) através de um processamento automático por lotes. por um processador automático. Uma vez carregada no ImageJ®, a macro é executada para todas as imagens (modo batch de processamento). Primeiramente, a macro configura uma escala para a imagem. Em seguida, a macro determina a veia centrolobular a ser excluída. Depois, o algoritmo determina a área total do campo correspondente ao lúmen sinusoidal e à fibrose centrolobular. Por fim, a macro calcula as relações entre essas medidas pelas fórmulas de RLS e RFC, mostradas abaixo. A média das cinco medidas (das cinco ROI's avaliadas por lâmina) foi calculada, para cada variável, para a obtenção da RLS e da RFC.

A macro é capaz de analisar múltiplas imagens. O modo batch abre as imagens arquivadas em uma pasta de nome específico, processa-as conforme já descrito e compila os resultados para cada imagem em uma linha separada, a qual pode ser exportada para um documento em planilhas.



**FIGURA 3 – Fibrose centrolobular difusa:** A) secção corada em TM; B) a mesma secção mascarada utilizando ImageJ®, pixels pretos indicam zonas fibróticas.



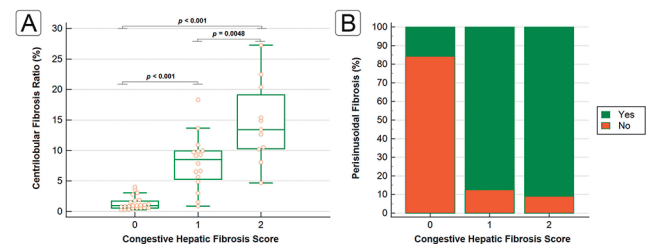
**FIGURA 4 – Fibrose perisinusoidal** A) secção corada em TM; B) secção após processamento de imagem e análise: através da máscara, é possível identificar a fibrose perisinusoidal e o fino tecido fibroso intercelular ramificado.

**Escore de fibrose hepática congestiva e sua correlação com PFC**

A revisão histológica das amostras de fígado foi efetuada para esclarecer a localização de deposição de fibras de colágeno e avaliar o EFHC. A ausência de zonas de fibrose centrais (EFHC 0) foi observada em 23 ratos (46%). Fibrose centrolobular sem envolvimento portal (EFHC 1) esteve presente em 16 ratos (32%), enquanto fibrose centrolobular contendo fibrose portal (EFHC 2) afetou os 11 animais restantes (22%).

A RFC esteve significativamente aumentada nos grupos EFHC 1 e 2, quando comparados ao EFHC 0 (1,32±1,07, 8,00±4,45 e 14,55±6,62; p<0,001) e no grupo EFHC 2, quando comparado ao grupo EFHC 1 (p=0,48). A distribuição do RFC em função do EFHC está ilustrada na Figura 5A.

Após o processamento das ROIs pelo software, as máscaras obtidas (imagens binárias) permitiram a caracterização mais precisa da fibrose perisinusoidal, presente até mesmo no grupo CHFS 0. A frequência de fibrose perisinusoidal em cada grupo EFHC está resumida na Figura 5B.



**FIGURA 5 – Distribuição da porcentagem de fibrose centrolobular em função do Escore de Fibrose Hepática Congestiva (A) e a frequência de fibrose perisinusoidal em cada grupo EFHC (B).**

## DISCUSSÃO

Fibrose centrolobular e dilatação sinusoidal são achados histológicos frequentes em síndromes de obstrução da saída venosa hepática, como na hepatopatia congestiva e na doença venosa oclusiva<sup>2</sup>. Essas lesões não aparecem somente em doenças que resultam em impedimento da saída do sangue do fígado, apesar de serem comuns nessas condições, mas também em algumas doenças hepáticas crônicas. O padrão histológico e a gravidade da fibrose centrolobular e da dilatação sinusoidal variam de acordo com a etiologia e com a evolução natural da doença, sendo a sua dimensão um importante parâmetro diagnóstico e prognóstico<sup>26</sup>.

A fibrose hepática tem um papel crucial no processo evolutivo que leva à cirrose, independentemente da etiologia primária. Mesmo com os avanços de imagens radiológicas e desenvolvimento de diversos marcadores séricos e urinários de fibrose hepática, a avaliação desta em biópsias de fígado continua sendo o padrão ouro para diagnóstico, avaliação do grau da lesão e do prognóstico da doença<sup>1</sup>. A dilatação sinusoidal, achado mais específico e frequente em síndromes de obstrução de saída do fluxo venoso, é, também, extremamente relevante para a avaliação da condição fibrótica<sup>2,12</sup>.

Sistemas de escore semiquantitativos foram usados na maioria dos estudos publicados de biópsias de fígado para avaliar alterações na fibrose<sup>5,8,11</sup>. Características comparativas entre os diferentes sistemas de escore são apresentadas por Brunt e Goodman. A biópsia é frequentemente usada para avaliar a gravidade da doença em termos de grau e estágio. O estágio na maioria das doenças hepáticas crônicas está relacionado ao grau de cicatrização, sendo o estágio final a cirrose com suas complicações clínicas. O grau está relacionado à gravidade do processo da doença de base, com características que variam com os mecanismos patogênicos. A hepatite viral crônica tem sido o objeto dos mais extensos esforços de gradação e estadiamento, estimulados pelo advento de novas formas de terapia. Sistemas também foram desenvolvidos para doença hepática gordurosa, rejeição de aloenxerto e doenças colestáticas crônicas, mas não foram tão amplamente usados. Sistemas simples de classificação e estadiamento para hepatite crônica, incluindo os sistemas IASL, Batts-Ludwig e Metavir, são mais apropriados para o manejo de pacientes individuais, enquanto sistemas mais complexos, como o Índice de Atividade de Histologia (HAL)<sup>11</sup>. Recentemente, Dai et al.<sup>7</sup> estabeleceram um sistema de escore simplificado para a gradação de fibrose hepática congestiva.

Apesar de todos os esforços feitos para a atualização, citação e revisão desses sistemas de escore, com o objetivo de melhorar as suas capacidades de diagnóstico e classificação, defeitos graves ainda existem. Um dos problemas é que o sistema de escore não é preciso para a avaliação de fibrose, visto que eles são dependentes da interpretação visual subjetiva do observador, o qual deve ser um patologista experiente. Na prática clínica, patologistas encontram, com frequência, problemas severos por discrepâncias inter e intra observadores<sup>6,15,22</sup>.

Notadamente, é fundamental existir um método de ampla reprodutibilidade, que seja objetivo, rápido e resulte na quantificação precisa do grau de fibrose hepática e de dilatação sinusoidal nos diferentes compartimentos estruturais do fígado. O grau de fibrose hepática não é dependente de um "estado único" de doença. Os sistemas semiquantitativos de escore, geralmente, não são sensíveis o suficiente para contemplar pequenas mudanças na fibrose, como uma fibrose em Espaço de Disse (fibrose perisinusoidal)<sup>6,9,27</sup>. Além disso, mesmo quando o último estágio da doença é atingido, a progressão da fibrose hepática e a remodelação do parênquima continuam ocorrendo<sup>9</sup>.

Objetivo de desenvolvimento de novas técnicas morfológicas assistidas por software, destinadas a superar falhas dos sistemas de escore histopatológico semiquantitativos convencionais foi atingido, particularmente, para a fibrose hepática<sup>4,6,9,15,16,18-22,25</sup>.

Quanto à dilatação sinusoidal, até onde se sabe, não há estudo publicado que descreva um método morfológico detalhado para avaliação de seu grau (%) em amostras coradas em TM. Ishikawa et al.<sup>13</sup> propôs uma técnica para segmentar, extrair e quantificar os sinusoides em amostras coradas em HE, utilizando um filtro de seleção de orientação através de um complexo algoritmo computadorizado.

O presente estudo teve por objetivo descrever um novo método para a identificação e quantificação de delicada fibrose perisinusoidal, bem como de áreas difusas de fibrose difíceis de quantificar com os métodos semiquantitativos de escore tradicionais. Primeiramente, focamos em acessar a zona 3 de fibrose hepática em um modelo de hepatopatia congestiva, apesar de o mesmo protocolo poder ser extrapolado para acessar outras zonas e compartimentos fibróticos.

O princípio essencial deste método é de corar secções de fígado com corante específico para tecido conjuntivo, neste caso, TM, digitalizar as lâminas e selecionar aleatoriamente as ROI's, submetendo-as, na sequência, à análise de computadorizada da imagem histológica.

Os pontos fortes deste estudo incluem: 1) a descrição de uma nova técnica para medir a área de lúmen sinusoidal; 2) o método não trabalha em escala de cinza ou RGB, as quais poderiam descartar informações colorimétricas potencialmente válidas para a avaliação de fibrose perisinusoidal delicada e de fibrose difusa, deixando de sobrepor a cor entre componentes; 3) a natureza semi-automática da análise computadorizada, partindo de um padrão de cores predefinido e utilizando o modo batch do ImageJ®, capaz de analisar múltiplas imagens ao mesmo tempo.

As três principais limitações do presente estudo são: 1) o pequeno número de amostras de fígado usado, dificultando a obtenção de uma correlação estatística confiável entre a avaliação quantitativa e qualitativa; 2) não é inteiramente automatizado, requerendo um técnico qualificado para extrair manualmente o lúmen sinusoidal, portanto, sendo dependente da subjetividade da interpretação visual do observador; e 3) não ter sido utilizado o corante Sirius Red, que é ideal para a ligação de proteínas colágenas<sup>1</sup>. Assim sendo, este método possui duas desvantagens: 1) informação limitada, visto que a análise da imagem fornece uma abordagem quantitativa para fibrose hepática, não substituindo a determinação qualitativa; 2) o curso de análise de imagem é alto, visto que é necessário digitalizar todas as lâminas<sup>23</sup>.

Como perspectivas para o futuro, o objetivo é automatizar completamente o processo de segmentação sinusoidal, através da implementação de etapas de desconvolução das escalas de cores e de seus valores cortados para a segmentação gráfica das estruturas. Ao final, pretende-se comparar a efetividade deste método com o de extração manual.

Na realidade, a quantificação pura fibrose hepática é valiosa como um complemento para sistemas semiquantitativos desta medida, os quais avaliam o padrão de distribuição da fibrose, o que é importante para otimizar o diagnóstico do estágio da lesão, fornecer um prognóstico mais acurado e avaliar corretamente as possíveis terapias para cada caso. Quando a amostra é adequada, o método morfológico descrito fornece a quantificação precisa através de parâmetros contínuos, permitindo a melhor análise da variação da fibrose no fígado e do prognóstico da evolução do órgão em modelos experimentais in vivo e em pacientes clínicos em exame de rotina.

O presente artigo ilustra, descreve e discute um novo método de quantificação de fibrose centrolobular e dilatação sinusoidal em um modelo experimental de hepatopatia congestiva, baseado em análise assistida por software (ImageJ®). Foi apresentado um método computadorizado de ampla reprodutibilidade, semi-automático, que precisamente identifica e quantifica a área ocupada por tecido fibroso em amostras de fígado coradas em Tricrômico de Masson. Até o momento, não foi apresentado outro método padronizado de quantificação de área de lúmen sinusoidal em espécimes de fígado coradas em Tricrômico de Masson. O nosso método representa um complemento essencial para os

sistemas semiquantitativos de análise de fibrose, de modo a definir melhor o estágio de evolução de diferentes doenças hepáticas, e de grande valor para permitir a chegada a conclusões válidas quanto à aplicabilidade de tratamentos para qualquer etiologia de fibrose hepática em estudos experimentais. Além disso, o trabalho também abre o caminho para novas investigações que tenham por objetivo o uso desta técnica para avaliar outros tipos de tecido.

## CONCLUSÃO

Foi possível criar um método computadorizado semiautomático que identifica e quantifica a área ocupada por tecido fibroso e lúmen sinusoidal nos espécimes de fígados corados com Tricrômico de Masson. O presente método foi capaz de identificar e quantificar, através do contraste entre as estruturas azuis e vermelhas/púrpuras, as áreas fibrose centrolobular e a delicada fibrose perisinusoidal.

## REFERÊNCIAS

- Arjmand A, Tsiouras MG, Tzallas AT, Forlano R, Manousou P, Giannakeas N. Quantification of Liver Fibrosis—A Comparative Study. *Applied Sciences*. 2020;10(2):447.
- Bayraktar UD, Seren S, Bayraktar Y. Hepatic venous outflow obstruction: Three similar syndromes. *World Journal of Gastroenterology*. 2007;13(13):1912–27.
- Brunt E. Grading and staging the histopathological lesions of chronic hepatitis: The Knodell histology activity index and beyond. *Hepatology*. 2000;31(1):241–246.
- Caballero T, Pérez-Milena A, Masseroli M, O'Valle F, Salmerón FJ, Del Moral RMG, et al. Liver fibrosis assessment with semiquantitative indexes and image analysis quantification in sustained-responder and non-responder interferon-treated patients with chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*. 2001;34(5):740–7.
- Chevallier M, Guerret S, Chossegros P, Gerard F, Grimaud J -A. A histological semiquantitative scoring system for evaluation of hepatic fibrosis in needle liver biopsy specimens: Comparison with morphometric studies. *Hepatology*. 1994;20(2):349–55.
- Dahab GM, Kheriza MM, El-Beltagi HM, Fouda AMM, Sharaf El-Din OA. Digital quantification of fibrosis in liver biopsy sections: Description of a new method by Photoshop software. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2004;19(1):78–85.
- Dai DF, Swanson PE, Krieger EV, Liou IW, Carithers RL, Yeh MM. Congestive hepatic fibrosis score: A novel histologic assessment of clinical severity. *Modern Pathology*. 2014;27(12):1552–8.
- Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. Classification of chronic hepatitis: Diagnosis, grading and staging. *Hepatology*. 1994;19(6):1513–20.
- Duchatelle V, Marcellin P, Giostra E, Bregeaud L, Pouteau M, Boyer N, et al. Changes in liver fibrosis at the end of alpha interferon therapy and 6 to 18 months later in patients with chronic hepatitis C: Quantitative assessment by a morphometric method. *Journal of Hepatology*. 1998;29(1):20–8.
- Gewehr D, Salgueiro G, Noronha L, Kubrusly F, Kubrusly L, Coltro G et al. Lesões Plexiformes em Modelo Experimental de Hipertensão Arterial Pulmonar Induzida por Monocrotalina. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2020;115(3):480–490.
- Goodman ZD. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. *Journal of Hepatology*. 2007;47:598–607.
- Hilscher M, Sanchez W. Congestive hepatopathy. *Clinical Liver Disease*. 2016;8(3):68–71.
- Ishikawa M, Murakami Y, Ahi S, Yamaguchi M, Kobayashi N, Kiyuna T et al. Automatic quantification of morphological features for hepatic trabeculae analysis in stained liver specimens. *Journal of Medical Imaging*. 2016;3(2):027502.
- Ishikawa M, Taha Ahi S, Kimura F, Yamaguchi M, Nagahashi H, Hashiguchi A, et al. Segmentation of Sinusoids in Hematoxylin and Eosin Stained Liver Specimens Using an Orientation-Selective Filter. *Open Medical Imaging Journal*. 2013;03(04):144–55.
- Jiang K, Mohammad M, Dar W, Kong J, Farris A. Quantitative assessment of liver fibrosis by digital image analysis reveals correlation with qualitative clinical fibrosis staging in liver transplant patients. *PLOS ONE*. 2020;15(9):e0239624.
- Kage M, Shimamatu K, Nakashima E, Kojiro M, Inoue O, Yano M. Long-term evolution of fibrosis from chronic hepatitis to cirrhosis in patients with hepatitis C. Morphometric analysis of repeated biopsies. *Hepatology*. 1997;25(4):1028–31.
- Lamprecht MR, Sabatini DM, Carpenter AE. CellProfiler™: Free, versatile software for automated biological image analysis. *Biotechniques*. 2007;42(1):71–5.
- Manabe N, Chevallier M, Chossegros P, Causse X, Guerret S, Trépo C, et al. Interferon-α2b therapy reduces liver fibrosis in chronic non-A, non-B hepatitis: A quantitative histological evaluation. *Hepatology*. 1993;18(6):1344–9.
- Masseroli M, Caballero T, O'Valle F, Moral R, Pérez-Milena A, Moral R. Automatic quantification of liver fibrosis: design and validation of a new image analysis method: comparison with semi-quantitative indexes of fibrosis. *Journal of Hepatology*. 2000;32(3):453–464.
- Masugi Y, Abe T, Tsujikawa H, Effendi K, Hashiguchi A, Abe M, et al. Quantitative assessment of liver fibrosis reveals a nonlinear association with fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology Communications*. 2018;2(1):58–68.
- Otton JM, Yu CY, McCrohon J, Sarnell N, Feneley M. Accuracy and clinical outcomes of computed tomography coronary angiography in the presence of a high coronary calcium score. *Heart, Lung and Circulation*. 2013;22(12):980–6.
- Pavlidis M, Birks J, Fryer E, Delaney D, Sarania N, Banerjee R, et al. Interobserver variability in histologic evaluation of liver fibrosis using categorical and quantitative scores. *American Journal of Clinical Pathology*. 2017;147(4):364–9.
- Pilette C, Rousselet MC, Bedossa P, Chappard D, Oberti F, Rifflet H, et al. Histopathological evaluation of liver fibrosis: Quantitative image analysis vs semi-quantitative scores: Comparison with serum markers. *Journal of Hepatology*. 1998;28(3):439–46.
- Poelzl G, Auer J. Cardiohepatic Syndrome. *Current Heart Failure Reports*. 2014;12(1):68–78.
- Sant'Anna LB, Sant'Anna N, Parolini O. Application of computer assisted image analysis for identifying and quantifying liver fibrosis in an experimental model. *Journal of Computational Interdisciplinary Sciences*. 2011;2(2):139–48.
- Shiple LC, Axley PD, Singal AK. Liver Fibrosis: A Clinical Update. *EMJ Hepatology*. 2019;7(1):105–117.
- Tokin IB, Tokin II, Filimonova GF. Quantitative Morphometric Analysis of Liver Biopsy: Problems and Perspectives. In: Takahashi H, ed. *Liver Biopsy*. 1st ed. Intechopen; 2021. p. 137–154.
- Weinstein RS, Graham AR, Richter LC, Barker GP, Krupinski EA, Lopez AM, et al. Overview of telepathology, virtual microscopy, and whole slide imaging: prospects for the future. *Human Pathology*. 2009;40(8):1057–69.