



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



MIRELLA JAMMAL CUSTODIO FREITAS E SILVA

**MÉTODO DE ANÁLISE COMPUTADORIZADO
AUTOMATIZADO PARA QUANTIFICAÇÃO CELULAR EM
MEMBRANAS DE FIBRINA RICA EM PLAQUETAS (PRF)**

UBERLÂNDIA
2023

MIRELLA JAMMAL CUSTÓDIO FREITAS E SILVA

**MÉTODO DE ANÁLISE COMPUTADORIZADO
AUTOMATIZADO PARA QUANTIFICAÇÃO CELULAR EM
MEMBRANAS DE FIBRINA RICA EM PLAQUETAS (PRF)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Faculdade de Odontologia da UFU, como
requisito parcial para obtenção do título de
Graduado em Odontologia

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Paula Dechichi

Co-orientadora: Camila Rodrigues Borges
Linhares

UBERLÂNDIA

2023

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha mãe, Regina, que desde a primeira infância me incentivou à leitura, à curiosidade e à escrita. Obrigada, mãe, por ter me tornado quem sou hoje e por ter me ensinado que o amor, carinho e dedicação são as coisas mais importantes em qualquer ato que realizamos. Também gostaria de agradecer ao meu pai, Marcos, por ter sido o melhor pai do mundo e por sempre ter me feito acreditar que eu sou capaz de qualquer coisa. Obrigada, pai, por sempre ter sido meu fã número um.

Também gostaria de agradecer aos meus avôs, aos meus tios, às minhas tias e aos meus primos, mas, especialmente, a minha madrinha, Virgínia, que esteve ao meu lado durante todos os momentos e por ter me apoiado nas vitórias e nas derrotas. Obrigada, madrinha, por ser a luz que guia a minha vida.

Um agradecimento especial ao Lucca, que trouxe leveza para os meus dias e foi meu porto seguro em todos os momentos. Obrigada por ter sido lar em todos os momentos e por sempre me ajudar em todas as minhas dificuldades com as tecnologias. Gratidão aos meus amigos, Ana Clara, Ana Flávia, Amanda, Carolina, Lanna, Vitória e Yago por terem constituído a melhor parte da faculdade e por terem dividido todos os momentos desses últimos cinco anos e meio comigo. Obrigada por entenderem cada olhar de felicidade e carinho, mas também todos os de frustração, cansaço e decepção.

Obrigada ao PET por ter confirmado a minha paixão pela pesquisa e pela docência e por ter me ensinado o verdadeiro significado de trabalho em grupo e da proatividade.

Por fim, gostaria de agradecer minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Paula Dechichi, por ter me acolhido desde o segundo período e por ter me mostrado como a histologia é gostosa de se viver e, especialmente, a doutoranda Camila Linhares, que me doou tanto do seu tempo, da sua dedicação e da sua inteligência, sem você esse trabalho não seria possível.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo comparar diferentes métodos de análise histomorfométrica e introduzir um novo método automatizado, para quantificação celular em membranas de Fibrina Rica em Plaquetas (PRF). Metodologia: participaram do estudo 5 voluntários, nos quais foram realizadas 3 venopunções, em períodos diferentes. Em cada uma, foram coletados 16mL de sangue, separados em 2 tubos de plástico sem aditivos. Todos os tubos foram centrifugados no protocolo L-PRF (700g/12minutos) e, após a centrifugação, o PRF foi aspirado e dispensado em recipientes de vidro. O coágulo de PRF obtido foi prensado na PRF-BOX e as membranas geradas foram fixadas em solução de formaldeído tamponado com PBS. Em seguida, as membranas foram processadas para inclusão em parafina. Os cortes histológicos obtidos foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e a quantificação celular foi realizada por meio de duas abordagens: 1) análise histomorfométrica convencional e 2) análise automatizada, com a criação de um plug-in para o software ImageJ. O tempo necessário para realizar a análise utilizando cada método também foi medido. Os resultados foram submetidos ao teste estatístico de Bland-Altman e posteriormente ao teste de regressão linear para verificação de viés de proporção (a tendência de os valores estarem acima ou abaixo da média). Resultados: não foi encontrada diferença estatística significativa da quantidade de células obtida pelos dois métodos ($p = 0.1$). O método automatizado reduziu o tempo de trabalho comparado ao método convencional ($p < 0.01$). Conclusão: O método automatizado desenvolvido foi efetivo na análise histomorfométrica, para quantificação celular, em membranas de PRF e mostrou redução significativa no tempo de trabalho.

Palavras-chave: análise computadorizado; membranas de fibrina rica em plaquetas; análise histomorfométrica

ABSTRACT

The aim of this study was to compare different methods of histomorphometric analysis and to introduce a new automated method for cell quantification in Platelet Rich Fibrin (PRF) membranes. Methodology: 5 volunteers took part in the study, in which 3 venipunctures were performed at different times. In each case, 16mL of blood was collected and separated into 2 plastic tubes without additives. All the tubes were centrifuged using the L-PRF protocol (700g/12minutes) and, after centrifugation, the PRF was aspirated and dispensed into glass containers. The PRF clot obtained was pressed in PRF-BOX and the membranes generated were fixed in formaldehyde solution buffered with PBS. The membranes were then processed for paraffin embedding. The histological sections obtained were stained with hematoxylin and eosin (HE) and cell quantification was carried out using two approaches: 1) conventional histomorphometric analysis and 2) automated analysis, with the creation of a plug-in for ImageJ software. The time required to perform the analysis using each method was also measured. The results were submitted to the Bland-Altman statistical test and then to the linear regression test to check for proportion bias (the tendency for values to be above or below the mean). Results: no statistically significant difference was found in the number of cells obtained by the two methods ($p = 0.1$). The automated method reduced working time compared to the conventional method ($p < 0.01$). Conclusion: The automated method developed was effective in histomorphometric analysis for cell quantification in PRF membranes and showed a significant reduction in working time.

Keywords: automated image analysis; computer-assisted; Platelet-Rich Fibrin

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	2
2 METODOLOGIA.....	4
2.1 Obtenção e processamento dos concentrados sanguíneos	4
2.2 Análise histomorfométrica convencional	6
2.3 Análise histomorfométrica automatizada	6
2.4 Análise estatística.....	7
3 RESULTADOS	7
3.1 Comparação entre o método convencional e o método automatizado.....	8
3.2 Análise de Bland-Altman.....	8
4 DISCUSSÃO.....	9
5 CONCLUSÃO.....	10
6 REFERÊNCIAS.....	10

1 INTRODUÇÃO

A análise histomorfométrica é de extrema importância para a avaliação de eventos biológicos como efeito de drogas no organismo e condições sistêmicas, principalmente doenças. Também, frequentemente, é utilizada para analisar grupos em condições experimentais e para avaliar parâmetros histológicos. Essa quantificação pode ser realizada de diferentes maneiras, como: método convencional visual/manual, no qual a análise é totalmente dependente de um operador; método semiautomatizado, no qual a análise é realizada por um operador com o auxílio de um sistema automatizado (MENDES et al., 2020; SOARES et al., 2019; DIAS et al., 2018; ROCHA et al., 2016; BATISTA et al., 2015); e método automatizado, no qual a análise é realizada apenas por um sistema automatizado (LINHARES et al., 2022; WHITNEY et al., 2018; YU et al., 2016).

O método convencional é considerado padrão ouro, sendo muito utilizado em análises microscópicas, quantitativas e qualitativas (MENDES et al., 2020; SOARES et al., 2019; LINHARES et al., 2022). Entretanto, é uma análise demorada e depende da experiência do operador que a realiza, o que pode incluir vieses no processo analítico.

Com os avanços tecnológicos, as análises histológicas assistidas por computador passaram a ser estudadas e, a partir disso, foram criados métodos automatizados para a avaliação quantitativa dessas imagens (MARQUES FILHO e VIEIRA NETO, 1999; GONZALEZ & WOODS, 2018; LINHARES, 2023). Os métodos automatizados permitem a análise de grande número de imagens em um curto período de tempo, reduzindo, significativamente, o tempo de análise. Além disso, podem aumentar a eficiência e a precisão do processo analítico semelhante à análise convencional realizada por um observador experiente (GONZALEZ & WOODS, 2018; HAMMES et al., 2018; STEINER et al., 2018; LINHARES, 2023).

Nesse contexto, o método semiautomatizado é aquele em que um operador combina a análise histomorfométrica convencional com a análise automatizada, o que gera uma redução do tempo de análise quando comparado ao método convencional. Entretanto, esse método ainda requer a presença de um observador experiente e consome considerável tempo. (LINHARES et al., 2022).

O método computadorizado automatizado apresenta como vantagens a possibilidade de reunir um grande volume de informações sobre determinado aspecto a ser analisado em uma única ferramenta digital. Dessa forma, é possível reduzir a subjetividade da avaliação humana, além de acrescentar agilidade à análise do material, objetivando diagnósticos seguros e rápidos.

Apesar de facilitar o trabalho do operador e diminuir o tempo de trabalho, o método automatizado ainda é pouco utilizado em análises histopatológicas. Isso deve-se ao fato de que a imagem histológica é complexa, pois possui grande quantidade de objetos de interesse (células e estruturas celulares) amplamente distribuídos e rodeados por vários tipos de tecido. Além disso, essas imagens podem conter artefatos como: áreas borradas e/ou com falhas; áreas com sobreposição de tecido; presença de fragmentos não pertencentes a lâmina (LINHARES et al., 2022; CARBONARE et al., 2005).

No sentido de avaliar o método computacional proposto, a análise histomorfométrica das membranas de Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos (LPRF) foi utilizada como modelo para quantificação celular. O protocolo de PRF, desenvolvido pelo médico francês Choukroun (2006), consiste em obter o concentrado sanguíneo a partir da centrifugação de sangue periférico a 700g/12min, sem adição de anticoagulantes ou quaisquer outros aditivos (CHOUKROUN et al., 2006).

O PRF é uma membrana de fibrina autógena, enriquecida por plaquetas, leucócitos e fatores de crescimento e apresenta grande importância como terapia adjuvante no processo de reparo tecidual. O PRF é capaz de promover angiogênese, quimiotaxia, mitose e proliferação celular, acelerando os processos fisiológicos de reparo tecidual e reduzindo o desconforto pós-operatório (PEREIRA et al., 2020; ONCU et al., 2016; CHOUKROUN et al., 2006; SOUSA et al., 2017; ALVES et al., 2020). Dentro da odontologia, o PRF é utilizado em diversos campos. Nas cirurgias orais menores e bucomaxilofaciais pode ser empregado como terapia adjuvante em cirurgias de levantamento de seio maxilar (PEREIRA et al., 2020), para o tratamento de comunicações buco-sinusais (ALVES et al., 2020), para promoção de melhor estabilidade secundária do implante dentário (LYRIS et al., 2021; TABASSUM et al., 2022) e para reduzir infecções pós-operatórias (DOHAN et al., 2006; CHOUKROUN et al., 2006; MIJIRITSKY et al., 2021). Já na periodontia, o PRF é indicado, principalmente, para o reparo de tecidos moles, como para tratamento de recessão gengival e de lesões de furca, mas ainda pode ser utilizado para tratamento de defeitos intraósseos (MIJIRITSKY et al., 2021), principalmente quando em conjunto do desbridamento de retalho aberto (MIRON et al., 2021).

Ainda, o PRF pode ser utilizado para promoção de rejuvenescimento facial, por entregar uma alta quantidade de fatores de crescimento ao sítio de aplicação, aumentando o estímulo dérmico (MIJIRITSKY et al., 2021). Por fim, na endodontia, o PRF é indicado, principalmente, para dentes com polpa necrótica e o ápice ainda aberto (rizogênese incompleta). Esse procedimento tem como objetivo promover reparação constante, levando ao aumento progressivo da espessura dentinária, alongamento radicular, regressão de lesões periapicais e,

até mesmo, fechamento do ápice dentário (SIMONPIERI et al., 2009; SHIVASHANKAR et al., 2012; ARSHAD et al., 2021).

A hipótese do presente estudo é que não há diferença significativa entre os métodos convencional e automatizado, na quantificação celular. Assim, o objetivo foi avaliar a eficácia do método de quantificação automatizado comparando-o com o método de quantificação convencional (padrão-ouro), utilizando como modelo imagens histológicas de membranas de PRF.

2 METODOLOGIA

2.1 Obtenção e processamento dos concentrados sanguíneos

Participaram do estudo 5 indivíduos saudáveis (2 do sexo masculino e 3 do sexo feminino), após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), e que preencheram os requisitos dos critérios de inclusão para coleta do sangue, de acordo com protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (número do parecer: 4.115.144). Os critérios de inclusão foram: não ter utilizado anti-inflamatórios, anticoagulantes ou antibióticos nos 03 meses anteriores ao estudo, não estar em período gestacional ou de lactação, não apresentar história de doença periodontal ou qualquer infecção sistêmica ativa e não ser fumante.

Em cada indivíduo foram realizadas 03 venopunções em diferentes momentos. Em cada venopunção foram coletados cerca de 16 ml de sangue distribuídos em 02 tubos de plástico sem aditivos, que foram centrifugados a 700g/12min. Imediatamente após a coleta, os tubos foram colocados em slots de uma centrífuga de mesa (Spinlab®/Spin 5000-8/Ribeirão Preto-Brasil), em um prazo máximo de quatro minutos do início da coleta até o início da centrifugação. Após a centrifugação, a porção acima das hemácias (PRF) foi aspirada com agulha e seringa (figura 1A e B). Em seguida, o PRF foi dispensado em potes de vidro (figura 1C) e após polimerização, os coágulos foram transferidos (figura 2A) e prensados em uma caixa de inox (PRF-Box) (figura 2B).

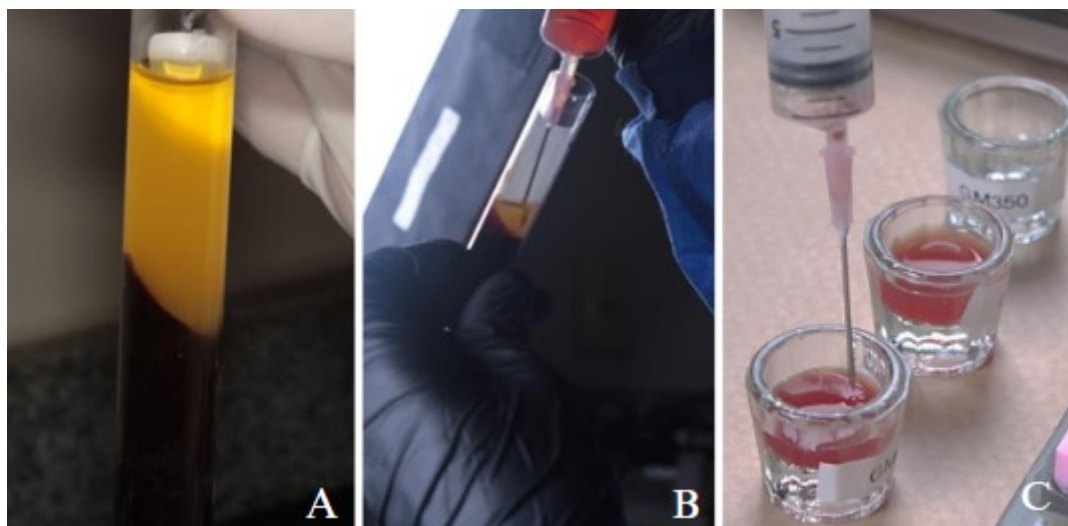


Figura 1: Tubo de plástico após a centrifugação (A), Aspiração do PRF (B) e PRF sendo dispensado em frascos de vidro (C)

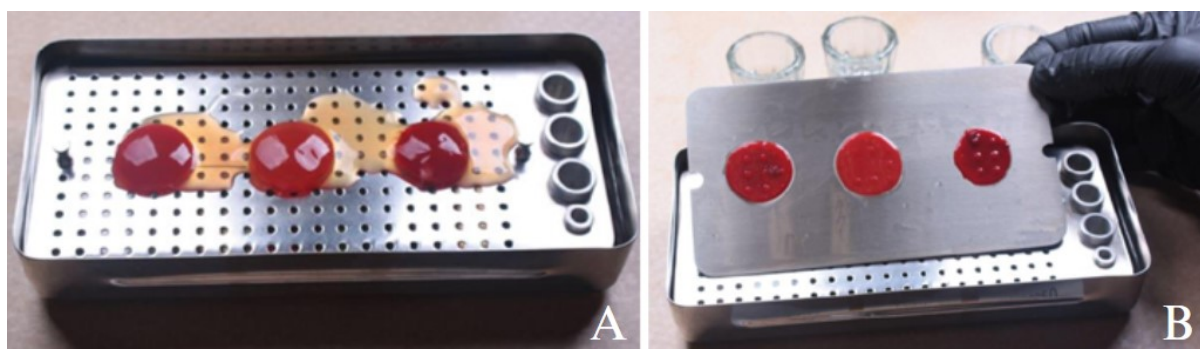


Figura 2: Coágulos-PRF na caixa PRF- box (A) e membranas PRF formadas após a prensagem (B)

As membranas de PRF formadas foram fixadas em solução de formaldeído a 10% em tampão fosfato 0,1M e glutaraldeído a 0,1% durante 24 horas. Após a fixação, as membranas foram processadas para inclusão em parafina, e os blocos obtidos foram cortados no micrótomo (Leica Biosystems RM2245 - Leica®, Nussloch, Alemanha). Os cortes histológicos, de 5 micrômetros de espessura, foram corados em hematoxilina e eosina (HE). Em seguida, as imagens histológicas foram digitalizadas pelo aparelho de Scanner Aperio AT Turbo (Copyright © 2013 Leica Biosystems Imaging, Inc.) e foram visualizadas de leitura de imagens QuPath (© Copyright 2019-2021, QuPath docs authors, Revision 5fef175c).

2.2 Análise histomorfométrica convencional

As imagens digitalizadas foram convertidas para TIFF, de forma a possibilitar a análise no software ImageJ. De cada imagem histológica foram extraídas 10 áreas de 600x600µm utilizando o software QuPath (© Copyright 2019-2021, QuPath docs authors. Revision 5fefl75c). Posteriormente, as células foram quantificadas, manualmente, utilizando a ferramenta de contagem “multi-point” do software ImageJ (versão 1.52a, Copyright © Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA) e listados pela ferramenta “results” do mesmo software (figura 3).

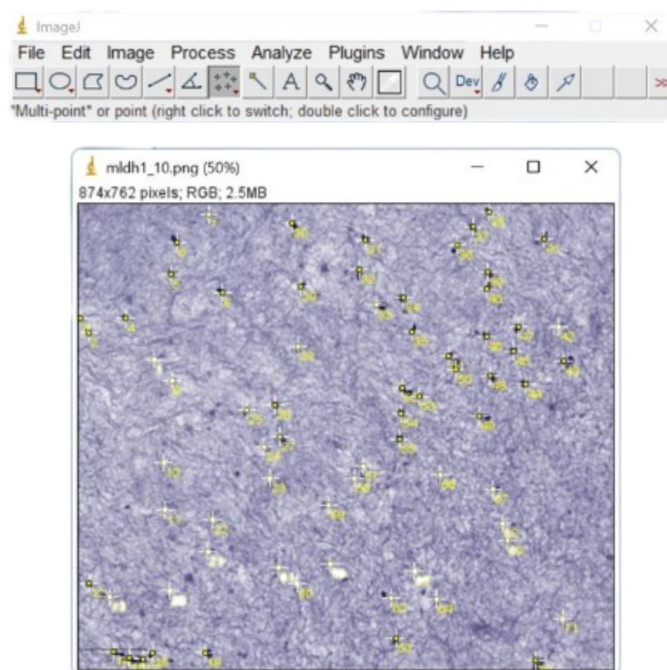


Figura 3: imagem histológica de membrana PRF corada em HE, evidenciando o método manual de quantificação de células por meio do software ImageJ (versão 1.52a, Copyright © Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA) e listadas no mesmo software.

2.3 Análise histomorfométrica automatizada

Foi desenvolvida uma macro, em uma linguagem de script, (figura 4) no formato .txt, o qual foi convertido para uma linguagem em Java e instalado como plugin no software ImageJ. Nessa macro foram definidos parâmetros para que o computador realizasse a quantificação celular de forma automatizada.

```

macro "macro-funçFinal" {
  directory = getDirectory("Selecione uma pasta");
  fileList = getFileList(directory);
  cellDir = directory + "/cells/";
  File.makeDirectory(cellDir);

  for (i = 0; i < fileList.length; i++) {
    if (File.isDirectory(replace(directory + fileList[i], "\\", "/")) != "1") {
      if (File.rename(getNameWithoutSpaces(directory, fileList[i]), getNameWithoutSpaces(directory, fileList[i]) + ".1") {
        openImage(i);
        process();
      }
    } else {
      ij.log("Ocorreu um problema ao renomear o arquivo " + fileList[i]);
    }
  }
}

function openImage(i) {
  open(getNameWithoutSpaces(directory, fileList[i]));
}

function getNameWithSpaces(directory, file) {
  return replace(directory + file, "\\", "/");
}

function getNameWithoutSpaces(directory, file) {
  return replace(directory + replace(file, " ", "_"), "\\", "/");
}

function process() {
  nome = getInfo("image.filename");
  novoNome = "cells-" + nome;
  run("Set Scale...", "distance=308 known=2 pixel=1 unit=mm");
  run("8-bit");
  run("Set Measurements...", "add display area mean min perimeter area_fraction limit red=red none decimal=3");
  run("Threshold...", "title" = novoNome);
  close(nome);

  // matrix
  selectWindow("cells-" + nome);
  run("Subtract Background...", "rolling=30 light");
  run("Gaussian Blur...", "sigma=2.5");
  setAutoThreshold("MaxEntropy");
  setOption("BlackBackground", false);
  run("Convert to mask");
  saveAs("jpg", cellDir + "cells-" + nome);
  run("3D Object Counter...", "threshold=82 slice=1 min.=20 max.=300000 exclude_objects_on_edges objects summary");
  close();
}

```

Figura 4: código do script no formato .txt, que compõe a macro. Nessa macro são detalhadas todas as especificidades e todos os parâmetros para possibilitar a quantificação automatizada. Em seguida, ela foi embutida como plugin no programa ImageJ.

2.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o software PASW Statistics (versão 18.0.0; SPSS Ltd Software Inc., Quarry Bay, Hong Kong) para verificação da concordância entre os métodos. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de Bland-Altman e ao teste de regressão linear para verificação do viés de proporção (tendência de valores acima ou abaixo da média). Os resultados são apresentados como média $\pm 1,96 \times DP$. A concordância estatística foi considerada em $\alpha > 0,05$.

A acurácia foi calculada através da divisão da média dos valores do método convencional pela média dos valores do método automatizado. O resultado foi multiplicado por 100 para conversão do valor em porcentagem.

3 RESULTADOS

3.1 Comparação entre o método convencional e o método automatizado

A análise histomorfométrica não mostrou diferença estatística significativa na quantidade de células das membranas de PRF, obtidas pelos métodos convencional ($37,69 \pm 12,41$) e automatizado ($39,47 \pm 13,82$) (figura 5A). Sendo que a análise pelo método automatizado consumiu tempo significativamente menor ($0,08 \pm 0,0$ segundos) que pelo método convencional ($904,67 \pm 3,77$ segundos) (figura 5B).

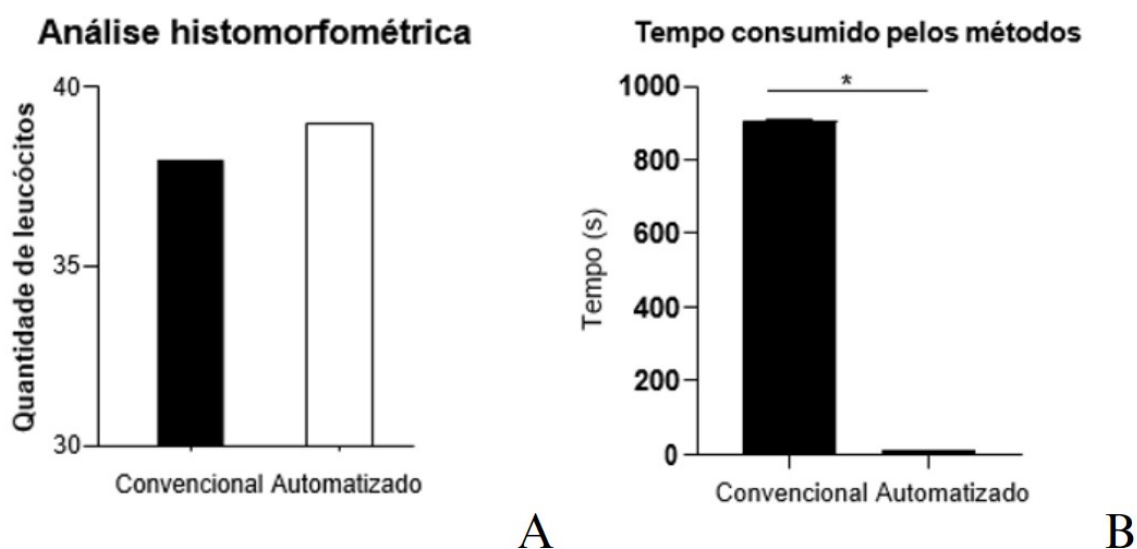


Figura 5: A - Quantificação histológica dos métodos convencional e automatizado. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre esses dois métodos ($p = 0,1$). B - A análise do tempo de trabalho para a análise histomorfométrica em cada método mostrou diferença estatística ($*p < 0,001$) entre os métodos convencional e automatizado.

3.2 Análise de Bland-Altman

A análise de Bland-Altman demonstrou uma forte concordância entre os métodos convencional e automatizado. A diferença entre os métodos para contagem celular foi de $1,78 \pm 5,37$ e os limites de concordância foram: 12,31 (limite superior) e -8,75 (limite inferior), respectivamente. Nenhuma diferença significativa entre eles foi encontrada ($p = 0,1$) e não foi detectada tendência de proporção de viés nos resultados da regressão linear. O valor médio do p foi de 0,89 (figura 6). A acurácia média foi $83,84 \pm 7,20\%$ para o método automatizado quando comparado com o método convencional.

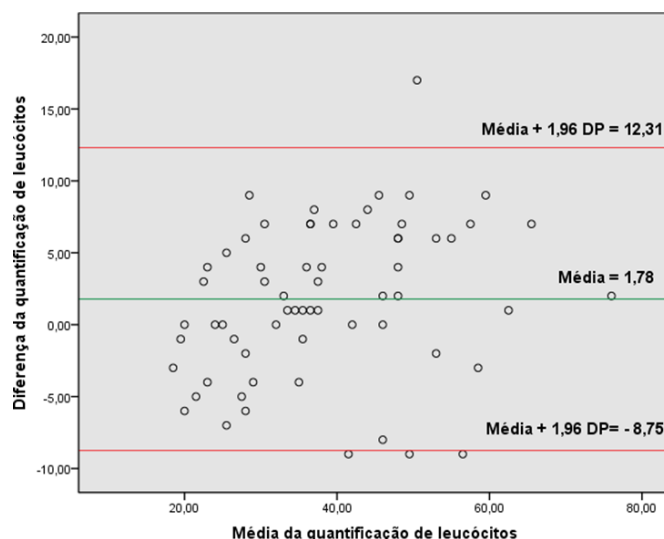


Figura 6: concordância entre os métodos convencional e automatizado.

4 DISCUSSÃO

A hipótese deste estudo foi confirmada, uma vez que não houve diferença significativa entre o método automatizado e o método convencional, na quantificação celular em membranas PRF. Sendo que o método automatizado apresentou redução significativa do tempo de trabalho, alta acurácia (83,84%) e padronização, reduzindo os vieses no processo de análise.

Nesse estudo, criou-se um método automatizado a partir da segmentação por duplo limiar em conjunto com outras etapas de processamento de imagem, sendo criado um plugin para uso no software ImageJ para quantificação celular (SCHINDELIN et al., 2015; REYES-FERNANDEZ et al., 2019). O método de segmentação por duplo limiar já foi aplicado em estudos anteriores, em métodos semiautomatizados e automatizados com resultados positivos (BATISTA et al., 2015; DIAS et al., 2018; ROCHA et al., 2016).

Métodos automatizados são de grande importância nas práticas clínicas e na área da pesquisa, pois permitem a análise de muitas imagens em um curto período, reduzindo, significativamente, o tempo de análise (BATISTA et al., 2015; GONZALEZ & WOODS, 2018; HAMMES et al., 2018; LINHARES et al., 2022). Além disso, pode reduzir substancialmente a variabilidade inter/intra-observador, aumentar a eficiência e a precisão das decisões do especialista (LEI HE et al., 2010). Essa informação corrobora com os resultados observados neste estudo, uma vez que o tempo gasto pelo método automatizado foi cerca de

11 mil vezes menor que pelo método convencional, apresentou alta acurácia e padronização, reduzindo os vieses no processo de análise.

A análise de imagem assistida por computador tem se tornado um recurso cada vez mais importante nas áreas biomédicas. O processamento e análise de imagens médicas em radiologia e citologia vem sendo pesquisado e desenvolvido há décadas (BANKMAN, 2009). No entanto, o uso desses sistemas na análise histológica é complexo, pois as imagens histológicas são significativamente diferentes das imagens radiológicas e citológicas, por apresentarem grande quantidade de objetos de interesse (células e estruturas celulares), amplamente distribuídos e rodeados por diferentes tecidos; tipos diferentes de coloração; variabilidade de cor dentro de uma mesma técnica de coloração; presença de artefatos na imagem (como tecidos sobrepostos; estruturas borradas; perda de material) (LINHARES et al., 2022). Devido à essa complexidade, pesquisas nessa área ainda são muito incipientes e necessitam de amplo desenvolvimento para tornarem-se difundidas como os outros tipos de análise de imagem citados (LEI HE et al., 2010).

Baseando-se nos resultados do presente estudo, é possível que o método automatizado proposto possa aprimorar as análises para diagnóstico e quantificação de células (LAMPRECHT et al., 2007; SILVA et al., 2019). Além disso, é importante destacar que existem outros métodos automatizados em desenvolvimento, utilizando ferramentas mais sofisticadas baseadas em processamento de imagens por inteligência artificial como machine learning, rede neural e deep learning com resultados promissores (LAMPRECHT et al., 2007; JONES et al., 2009; SILVA et al., 2019). Entretanto, são métodos pouco acessíveis, não estão disponíveis em domínio público e não são gratuitos, ao contrário de métodos mais simples (REYES-FERNANDEZ et al., 2019). Um exemplo de software gratuito e acessível é o ImageJ, o qual é disponibilizado pelo Instituto Nacional de Saúde e apresenta diversos plugins para ferramentas de segmentação para uso em todas as imagens, incluindo as histológicas (SCHINDELIN et al., 2015).

A alta acurácia foi mantida (83,84%), quando comparado ao método convencional aplicado por um observador experiente. Também foi demonstrado que não há diferença significativa entre os dois métodos e resultados similares foram demonstrados na literatura em outras condições experimentais (REYES-FERNANDEZ et al., 2019; TAMMINGA et al., 2016), confirmando que o método automatizado proposto é confiável.

Além disso, visando contribuir para a popularização do método automatizado, o presente estudo desenvolveu um método de fácil acesso e aplicabilidade. Uma vez que, o plugin

desenvolvido é para ser utilizado no software ImageJ, o qual é um software gratuito e de domínio público.

Há limitações no método proposto devido a definição de um limiar global para todas as imagens no processo de segmentação, como perda de informações, dificuldade de aplicação do método na mínima variação das imagens e a funcionalidade limitada a um conjunto de condições de padronização da imagem (LINHARES et al., 2022; REYES-FERNANDEZ et al., 2019; TAMMINGA et al., 2016). Portanto, são necessários mais estudos sobre aplicações de automatização em análises histológicas e histopatológicas para que se aprimore as ferramentas de segmentação.

O plugin proposto neste estudo funciona bem em condições específicas: coloração em HE, uso de imagens de boa qualidade e de fundo adequado.

5 CONCLUSÃO

Conclui-se que a quantificação celular nas membranas PRF foi realizada com sucesso pelos dois métodos de análise, sendo que o método automatizado proposto demanda tempo significativamente menor, comparado ao método convencional.

6 REFERÊNCIAS

ALVES, Luiz André da Luz Silva; et al. Fibrina rica em plaquetas (PRF) como tratamento de comunicação buco-sinusal: relato de caso. **Revista Fluminense de Odontologia**, v. 53, p. 84-95, Jan./Jul., 2020.

ARSHAD, Sohaib; et al. Platelet-Rich Fibrin Used in Regenerative Endodontics and Dentistry: Current Uses, Limitations, and Future Recommendations for Application. **Int J Dent.**, p. 4514598, Dez., 2021.

BANKMAN, Isaac N. Handbook of Medical Image Processing and Analysis. **Academic Press**, 2009.

BATISTA, Jonas Dantas; et al. Low-level laser therapy on bone repair: is there any effect outside the irradiated field? **Lasers Med Sci**, v. 30, n. 5, p. 1569-1574, 2015.

CARBONARE, L. Dalle; et al. Bone microarchitecture evaluated by histomorphometry. **Elsevier**, v. 36, p. 609-616, 2005.

CHOUKROUN, Joseph; et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part V: Histologic evaluations of PRF effects on bone all o graft maturation in sinus lift. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral EndodRadiol**, v. 101, p. 299-303, 2006.

DIAS, Pâmella Coelho.; et al. Hyperbaric Oxygen therapy effects on bone regeneration in Type 1 diabetes mellitus in rats. **Connective Tissue Research**, v. 59, n. 6, p. 574-580, 2018.

DOHAN, David M.; et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 101, n. 3, p.51-55, Mar., 2006.

GOODFELLOW, Ian; BENGIO, Yoshua; COURVILLE, Aaron. Deep Learning. **MIT Press**, 2016.

GONZALEZ, Rafael C.; WOODS, Richard E. Digital Image Processing. Ed. 3. **Prentice Hall**, 2018.

HAMMES, Jochen; TAGER, Philipp, DRZEZGA, Alexander. EBONI: A Tool for Automated Quantification of Bone Metastasis Load in PSMA PET/CT. **J Nucl Med.**, v. 59, n. 7, p. 1070-1075, Jul., 2018.

JONES, Thouis R.; et al. Scoring diverse cellular morphologies in image-based screens with iterative feedback and machine learning. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 6, p. 1826-31, 2009.

LAMPRECHT, Michael R.; SABATINI, David M.; CARPENTER, Anne E. CellProfiler: free, versatile software for automated biological image analysis. **Biotechniques**, v. 42, n. 1, p. 71-75, 2007.

LECUN, Y.; BENGIO, Y.; HINTON, G. Deep learning. **Nature**, v. 521, n. 7553, p. 436-444, Mai., 2015.

HE, Lei; et al. Local and global Gaussian mixture models for hematoxylin and eosin stained histology image segmentation. **Proc. IEEE 20th Int'l Conf. Hybid Intell. Syst.**, p. 223-228, 2010.

LINHARES, Camila Rodrigues Borges. **Processamento digital de imagens e suas aplicações na análise histológica e histopatológica**. 2023. 23. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2023.

LINHARES, Camila Rodrigues Borges; et al. Automated bone healing evaluation: New approach to histomorphometric analysis. **Microsc Res Tech**, v. 85, n. 10, p. 3339-3346, Jun., 2022.

LYRIS, V.; et al. Effect of leukocyte and platelet rich fibrin (L-PRF) on stability of dental implants. A systematic review and meta-analysis. **Br J Oral Maxillofac Surg.**, v.59, n.10, p. 1130-1139, Jan.,2021.

MARQUES FILHO, Ogê; VIEIRA NETO, Hugo. **Processamento Digital de Imagens**. Ed. 1. Rio de Janeiro: **Brasport**, 1999.

MENDES, Eduardo Moura; et al. Effects of ionizing radiation on woven bone: influence on the osteocyte lacunar network, collagen maturation, and microarchitecture. **Clin Oral Investig**, v. 24, n. 8, p. 2763-2771, 2020.

MIJIRITSKY, Eitan; et al. Use of PRP, PRF and CGF in Periodontal Regeneration and Facial Rejuvenation-A Narrative Review. **Biology (Basel)**, v. 10, n.4, p. 1-23, Abr., 2021.

MIRON, Richard J.; et al. Use of platelet-rich fibrin for the treatment of periodontal intrabony defects: a systematic review and meta-analysis. **Clin Oral Investig.**, v. 25, n. 5, p. 2461-2478, Fev., 2021.

ÖNCÜ, Elif; et al. Positive effect of platelet rich fibrin on osseointegration. **Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 21, n. 5, p. 601-607, Set., 2016.

PEREIRA, Camila Melo; et al. Cirurgia de levantamento de seio maxilar associada ao uso de membrana de fibrina rica em plaquetas e leucócitos: Revisão de Literatura. **Braz. J. Hea. Rev.**, Curitiba, v. 3, n. 6, p. 19566-19580, 2020.

REYES-FERNANDEZ, Perla C.; et al. Automated image-analysis method for the quantification of fiber morphometry and fiber type population in human skeletal muscle. **Skeletal Muscle**, v. 9, n.1, p. 15, 2019.

ROCHA, Flaviana Soares; et al. The effects of ionizing radiation on the growth plate in rat tibiae. **Microsc Res Tech**, v. 79, n. 12, p. 1147-1151, 2016.

SCHINDELIN, Johannes; et al. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. **Mol Reprod Dev**, v. 82, n. 7-8, p. 518-529, 2015.

SHIVASHANKAR, Vasundara Yayathi; et al. Platelet rich fibrin in the revitalization of tooth with necrotic pulp and open apex. **Journal of Conservative Dentistry: JCD**, v. 15, n. 4, p. 395-398, 2012.

SILVA, Ana Maria Marques da; PATROCÍNIO, Ana Cláudia; SCHIABEL, Homero. Processamento e Análise de Imagens Médicas. **Revista Brasileira de Física Médica**, v. 13, n.1, p. 34-48, 2019.

SIMONPIERI, Alain; et al. The relevance of choukroun's platelet-rich fibrin and metronidazole during complex maxillary rehabilitations using bone allograft. part I: a new grafting protocol. **Implant Dentistry**, v.18, n. 2, p. 102-111, 2009.

SOARES, Priscilla Barbosa Ferreira; et al. Effect of ionizing radiation after-therapy interval on bone: histomorphometric and biomechanical characteristics. **Clin Oral Investig**, v. 23, n. 6, p. 2785-2793, 2019.

SOUSA, Edisa de Oliveira; et al. Tratamento da peri-implantite com emprego de L-PRF: relato de caso clínico. **Brazilian Journal of Periodontology**, v. 27, n. 4, p. 91-98, 2017.

STEINER, David F.; et al. Impact of Deep Learning Assistance on the Histopathologic Review of Lymph Nodes for Metastatic Breast Cancer. **Am J Surg Pathol.**, v. 42, n. 12, p. 1636-1646, Dez., 2018.

TABASSUM, Shahed; et al. Effect of platelet rich fibrin on stability of dental implants: A systematic review and meta-analysis. **Int J Health Sci (Qassim)**, v. 16, n. 5, p.58-68, Set-Out., 2022.

TAMMINGA, Gerrit G.; et al. Different binarization processes validated against manual counts of fluorescent bacterial cells. **J Microbiol Methods**, v. 128, p. 118-124, 2016.

WHITNEY, Jon; et al. Quantitative nuclear histomorphometry predicts oncotype DX risk categories for early stage ER+ breast cancer. **BMC Cancer**, v.18, n.1, p. 610-624, 2018.

YU, Kun H-sing; et al. Predicting non-small cell lung cancer prognosis by fully automated microscopic pathology image features. **Nat Commun**, v. 7, p. 12474-12483, 2016.