



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE COMPUTAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MODELAGEM COMPUTACIONAL DO
CONHECIMENTO**

RAFAEL FERNANDES VANDERLEI VASCO

**APRENDIZADO PROFUNDO APLICADO À QUANTIFICAÇÃO AUTOMÁTICA
DE VARIÁVEIS MORFOMÉTRICAS DE PODÓCITOS EM IMAGENS DE
IMUNO-HISTOQUÍMICA**

**Maceió
2019**

RAFAEL FERNANDES VANDERLEI VASCO

**APRENDIZADO PROFUNDO APLICADO À QUANTIFICAÇÃO AUTOMÁTICA
DE VARIÁVEIS MORFOMÉTRICAS DE PODÓCITOS EM IMAGENS DE IMUNO-
HISTOQUÍMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Modelagem Computacional do Conhecimento, PPGMCC, da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Modelagem Computacional do Conhecimento.

Orientadora: Prof^a. Dra. Michelle Jacintha
Cavalcante Oliveira

Coorientadora: Prof^a. Dra. Fabiane da Silva
Queiroz

Maceió

2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

- V331a Vasco, Rafael Fernandes Vanderlei.
Aprendizado profundo aplicado à quantificação automática de variáveis morfológicas de podócitos em imagens de imuno-histoquímica / Rafael Fernandes Vanderlei Vasco. – 2019.
81 f. : il.
- Orientadora: Michelle Jacintha Cavalcante Oliveira.
Coorientadora: Fabiane da Silva Queiroz.
Dissertação (mestrado em Modelagem Computacional de Conhecimento) –Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Computação. Maceió, 2019.
- Bibliografia: f. 61-64.
Apêndices: f. 65-71.
Anexos: f. 72-81.
1. Podócitos. 2. Aprendizado profundo. 3. Imuno-histoquímica. I. Título.

CDU: 004.85:616.61

Folha de Aprovação

Rafael Fernandes Vanderlei Vasco

Aprendizado Profundo Aplicado à Quantificação Automática de Variáveis
Morfométricas de Podócitos em Imagens de Imuno-Histoquímica

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Modelagem Computacional de Conhecimento da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 05 de junho de 2019.

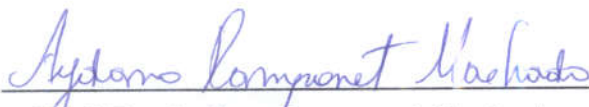


Profa. Dra. Michelle Jacintha Cavalcante Oliveira

FAMED - UFAL

Orientadora

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Aydano Pamponet Machado

Instituto de Computação - UFAL

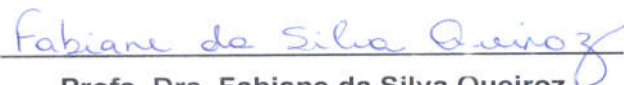
Examinador Interno



Profa. Dra. Maria Eliete Pinheiro

FAMED - UFAL

Examinador Externo



Profa. Dra. Fabiane da Silva Queiroz

CECA - UFAL

Examinador Externo

Aos meus pais José Maria e Marileide, que são os maiores responsáveis pelos resultados obtidos na minha formação profissional. Com muito esforço e dedicação, sempre priorizaram a qualidade dos estudos de seus filhos acima das necessidades pessoais.

À Iraci, por participar da minha criação com muito amor e estar presente até hoje em nossa família.

Aos meus irmãos Rodrigo e Raquel, pela presença em todas as fases da minha vida e pela união para superar as dificuldades na nossa família.

À minha esposa Alba Regina, pelo apoio, incentivo e compreensão nos momentos mais difíceis.

À minha filha Alice, que mesmo antes de nascer me enche de motivação para ser sempre uma pessoa, um profissional e um pai melhor a cada dia.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora e grande colega de profissão, Prof.^a Dra. Michelle Jacintha Cavalcante Oliveira por acreditar na minha capacidade para desenvolver este projeto e sempre me incentivar a enfrentar os obstáculos da pesquisa, com paciência e dedicação.

A minha coorientadora Prof.^a Dra. Fabiane da Silva Queiroz, por participar intensamente do projeto desde o início, com extremo profissionalismo, objetividade e generosamente compartilhando seus conhecimentos com profissionais de outras áreas de forma muito acessível.

Ao Prof. Dr. Gyl Eanes Barros da Silva, por colaborar de forma essencial para o desenvolvimento da pesquisa. Agradeço por ceder a base de dados de biópsias do Laboratório de microscopia do HU-UFMA, processando as lâminas de Imuno-histoquímica e oferecendo total suporte com seu valoroso conhecimento em patologia renal.

RESUMO

Entre os diversos tipos celulares que constituem o tecido renal destacam-se os podócitos, células altamente especializadas do glomérulo que envolvem os capilares e as células vizinhas da cápsula de Bowman. O comprometimento genético ou adquirido dos podócitos pode levar ao desenvolvimento de várias doenças proteinúricas. A hipótese da depleção de podócitos ganhou considerável atenção na última década, principalmente porque representa um conceito unificador na patologia renal o qual associa esta condição ao desenvolvimento de diversas doenças glomerulares, especialmente àquelas caracterizadas por glomerulosclerose, que evoluem para doença renal crônica. Portanto, vem-se desenvolvendo diversas metodologias de avaliação quantitativa dos podócitos por meios mais simples e amplamente disponíveis. Os objetivos do presente estudo foram: 1) verificar o uso da imuno-histoquímica (IH) como marcação alternativa à imunofluorescência (IF) para quantificação de parâmetros morfométricos, principalmente a densidade de podócitos, em biopsias renais pelo método do Fator de Correção (VENKATAREDDY et al., 2014) e 2) apresentar uma avaliação automatizada para quantificação destes atributos a partir de uma Rede Neural Convolutacional. Foram estudados 16 casos de biópsias renais pré-transplante de doadores falecidos no período de 2016 a 2018. As amostras foram marcadas com IH através de anticorpo nuclear anti-WT1 (tumor de wilm's tipo 1). Esta marcação mostrou-se capaz de apresentar resultados de densidade podocitária semelhantes aos referidos pela literatura através da IF, com Coeficiente de Variação entre os estudos de 14%. Verificou-se que a IH com anticorpo anti-WT1 demonstrou uma marcação com amplo espectro de apresentação dos pixels pertencentes às imagens dos núcleos, caracterizada por grandes variabilidades de pigmentação entre indivíduos, entre glomérulos do mesmo indivíduo e dentro de um mesmo glomérulo. Este fator acrescentou dificuldade e mais tempo ao processo de reconhecimento pelo profissional. No desenvolvimento da Rede Neural Convolutacional (U-net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation) foram utilizadas 122 imagens glomerulares com 2.977 imagens de núcleos de podócitos. Onde vetores de características foram extraídos de 80% das imagens selecionadas aleatoriamente para treinamento do modelo de Aprendizado de Máquina e os 20% restantes foram utilizados na Rede Neural para obter as métricas desejadas. A construção da Rede Neural foi baseada nos critérios de melhor desempenho observados em relação à sensibilidade e precisão no reconhecimento de pixels pertencentes às imagens de núcleos podócitos. Todas as 6 variáveis morfológicas testadas de forma pareada não apresentaram diferenças estatísticas entre o processo de podometria manual e o uso da Rede Neural. A similaridade entre as máscaras binárias da marcação manual e da rede neural foi de 89%, medida pelo Coeficiente de Jaccard. Conclui-se que a Rede Neural apresentou um desempenho relevante para identificação e contagem de núcleos de podócitos, assim como para a medida dos diâmetros nucleares. Além disso, houve vantagem significativa na otimização do processo manual pela redução de tempo e esforço gasto nesta atividade. Considerando que o processo de Aprendizado de Máquina pode ser progressivamente melhorado com inserção de mais informações à Rede Neural, observa-se um grande potencial deste modelo à

medida que for alimentado com maior número de imagens e/ou utilização de biomarcadores mais específicos.

Palavras-chave: Podócitos. Imno-Histoquímica. Glomerulonefrite. Aprendizado Profundo.

ABSTRACT

Among the various cell types that make up renal tissue are podocytes, highly specialized glomerulus cells that surround the capillaries and neighboring Bowman capsule cells. Genetic or acquired involvement of podocytes can lead to the development of various proteinuric diseases. The hypothesis of podocyte depletion has gained considerable attention in the last decade, mainly because it represents a unifying concept in renal pathology which associates this condition with the development of several glomerular diseases, especially those characterized by glomerulosclerosis, which evolve to chronic kidney disease. Therefore, several methodologies for quantitative evaluation of podocytes by simpler and widely available means have been developed. The objectives of the present study were: 1) to verify the use of immunohistochemistry (IH) as an alternative marker to immunofluorescence (IF) to quantify morphometric parameters, especially podocyte density, in renal biopsies by the correction factor method (VENKATAREDDY et al., 2014) and 2) present an automated evaluation for quantification of these attributes from a Convolutional Neural Network. Sixteen pre-transplant renal biopsy cases from deceased donors from 2016 to 2018 were studied. Samples were labeled with IH by anti-WT1 nuclear antibody (wilm's tumor type 1). This marking was able to present podocyte density results similar to those reported in the literature through IF, with a coefficient of variation between studies of 14%. IH with anti-WT1 antibody was found to have a broad spectrum labeling of the pixels belonging to the nucleus images, characterized by large pigmentation variability between individuals, between glomeruli of the same individual and within the same glomerulus. This factor added difficulty and more time to the process of recognition by the professional. In the development of the Convolutional Neural Network (U-net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation), 122 glomerular images with 2,977 podocyte nucleus images were used. Where feature vectors were extracted from 80% of the randomly selected images for Machine Learning model training and the remaining 20% were used in the Neural Network to obtain the desired metrics. The construction of the Neural Network was based on the best performance criteria observed regarding the sensitivity and precision in the recognition of pixels belonging to podocyte nucleus images. All 6 morphological variables tested pairwise showed no statistical differences between the manual podometry process and the use of the Neural Network. The similarity between binary markers and neural network masks was 89%, as measured by the Jaccard Coefficient. It was concluded that the Neural Network presented a relevant performance for podocyte nucleus identification and counting, as well as for the measurement of nuclear diameters. In addition, there was a significant advantage in optimizing the manual process by reducing the time and effort spent on this activity. Considering that the Machine Learning process can be progressively improved by inserting more information into the Neural Network, a great potential of this model is observed as it is fed with more images and / or use of more specific biomarkers.

KeyWords: Podocytes. Immunohistochemistry. Glomerulonephritis. Deep Learning.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Micrografia eletrônica de varredura de capilares glomerulares de ratos normais. O espaço urinário da parede capilar é coberto pelos processos podocitários ramificados. P = processo podocitário primário, FP = processo podocitário secundário, pedicelos. Rim de rato, ampliação 6.000x.....	22
Figura 2 - Ilustração das consequências da injúria podocitária.....	23
Figura 3 - Imunofluorescência do anticorpo anti-WT1 nos podócitos de um glomérulo normal. (A) Localização nuclear da proteína WT1 através de um anticorpo C-terminal (WT1-C). (B) Localização citoplasmática da proteína WT1 através de um anticorpo N-terminal (WT1-N).....	24
Figura 4 - Marcação de podócitos em rins normais por imuno-histoquímica (biópsia protocolar pré-transplante) A) Marcação nuclear com anticorpo anti-WT1 e B) Marcação citoplasmática com anticorpo anti-WT1.....	25
Figura 5 - Densidade Glomerular de Podócitos (Dpod): razão entre nº de Podócitos totais corrigidos (Nt) pelo volume glomerular total (VG) de uma amostra.....	31
Figura 6 - O Tamanho de uma partícula quantificado pelo diâmetro médio de Ferret (D), que é a média das distâncias obtidas entre 2 linhas paralelas (calibres) tangentes à projeção da partícula em diversos planos – considerando todas as orientações da mesma.....	32
Figura 7 - Arquitetura da U-net.....	38
Figura 8 - Marcação manual: imagens da lâmina Tx0516, glomérulo “b”. 1 – Imagem inicial, 2 - Identificação e delimitação do perímetro de cada núcleo de podócito (vermelho), 3 - Delimitação da área glomerular (verde).....	40
Figura 9 - Processo de construção das máscaras binárias: 1 - imagem original, 2 - máscara dos núcleos de podócitos e 3 - máscara da área glomerular.....	41
Figura 10 - Visão geral dos métodos de segmentação automática de podócitos para cálculo de densidade podocitária.....	44
Figura 11 - Diâmetro médio real do calibre nuclear dos podócitos (D) de cada caso.....	47

Figura 12 - Diagrama ilustrando a divisão da base de dados em conjunto de treinamento e conjunto de teste.....	50
Figura 13 - Variabilidade de forma e pigmentação dos núcleos de podócitos marcados com imuno-histoquímica pelo anticorpo anti-WT1.....	50
Figura 14 - Ilustração do processo de comparação das máscaras: Imagem (A) foi considerada padrão-ouro (de referência) e Imagem (B) foi a de comparação. No presente estudo, representou a marcação manual e (B) a da Rede Neural. Sendo a (preto) = Verdadeiros Positivos (VP), b (azul) = Falsos Positivos (FP), c (vermelho) = Falsos Negativos (FN). (Sj) = Coeficiente de Jaccard ou Interseção sobre União.....	53
Figura 15 - Avaliação comparativa entre as imagens binárias dos núcleos no Glomérulo Tx100.17b (marcação manual) e Tx100.17b_R18 (marcação pela Rede Neural). Onde a = (VP), b = (FP) e c = (FN). O índice de similaridade foi de 88% entre os núcleos destas 2 imagens e de 93% entre os pixels.....	53
Figura 16 - Médias dos diâmetros aparente (d) e real (D) aferidos de forma Manual e pela Rede Neural apresentaram ao Teste t de student pareado resultados de p-valor >0.05, com I.C. de 95%.....	56
Figura 17 - Médias dos números de podócitos totais (No) e corrigidos (Nt) aferidos de forma Manual e pela Rede Neural apresentaram ao Teste t de student pareado resultados de p-valor >0.05, com I.C. de 95%.....	56
Figura 18 - Médias das densidades podocitárias (Dpod) aferidas de forma Manual e pela Rede Neural (gráfico superior) e médias dos volumes glomerulares por podócito (GV/P) aferidos de forma Manual e pela Rede Neural (gráfico inferior) apresentaram ao Teste de Wilcoxon pareado resultados de p-valor >0.05, com I.C. de 95%.....	57
Figura 19 - Ficha utilizada para coleta de dados dos pacientes submetidos à biópsia renal.....	76
Figura 20 - Formulário que foi utilizado para coleta de dados de cada caso que será analisado no projeto.....	77
Figura 21 - Declaração de cumprimento, publicização e destinação dos dados/materiais coletados.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre artigos que avaliaram a Dpod em rins humanos de doadores de transplante (grupo controle)	34
Tabela 2 - Resultados da análise morfológica manual de podócitos em lâminas de rins normais.....	45
Tabela 3 - Resultados da contagem manual de podócitos em lâminas de rins normais.....	46
Tabela 4 - Resultados da análise morfológica manual de podócitos em lâminas de rins normais	47
Tabela 5 - Comparação dos resultados de densidade podocitária apresentados pela análise baseada em imuno-histoquímica com estudos publicados previamente utilizando imunofluorescência em rins de doadores de transplante.....	48
Tabela 6 - Resultado do desempenho da Rede Neural para identificação de pixels pertencentes aos núcleos de podócitos nas imagens.....	51
Tabela 7 - Avaliação de similaridade entre as imagens binárias dos núcleos de podócitos pela marcação manual e pela Rede Neural.....	54
Tabela 8 - Resultados da avaliação manual e pela Rede Neural das imagens de podócitos.....	55
Tabela 9 - Comparação entre artigos que avaliaram a densidade podocitária (Dpod) - podócitos/106mm ³ - em rins humanos de doadores de transplante (grupo controle).....	66
Tabela 10 - Resultados da avaliação manual de imagens glomerulares e pela Rede Neural.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	Aprendizado de Máquina
CAD	Computer-Aided Diagnosis
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CF	Fator de Correção ou "Correction Factor
CNN	Rede Neural Convolucional
cr	Creatinina sérica
CV	Coeficiente de Variação
d	Diâmetro aparente do calibre médio do podócito
D	Diâmetro real do calibre médio do podócito
DP	Desvio padrão
Dpod	Densidade de podócitos ou podocitária
GESF	Glomeruloesclerose segmentar e focal
GLM	Glomerulopatia de lesão mínima
GN	Glomerulonefrite
GV/P	Volume glomerular por podócito
H&E	Hematoxilina e eosina
HUUFMA	Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão
IA	Inteligência artificial
I.C.	Intervalo de confiança
IF	Microscopia de imunofluorescência
IH	Imuno-histoquímica
IRC	Insuficiência Renal Crônica
MBG	Membrana basal glomerular
ME	Microscopia eletrônica
MO	Microscopia óptica
No	Número de podócitos totais observados
Nt	Número de podócitos totais corrigidos
PAS	Ácido periódico-Schiff
Sj	Coeficiente de similaridade de Jaccard

SN	Síndrome Nefrótica
SUS	Sistema Único de Saúde
TFG	Taxa de filtração glomerular
TLE4	Transducin-like enhancer of split 4
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
Ur	Uréia sérica
VG	Volume glomerular
VP, FP e FN	Verdadeiro positivo, Falso positivo e Falso negativo
WT1	Proteína do Tumor de Wilms - 1
WT1-C	Anticorpos policlonais C-terminais WT1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Objetivos	17
1.1.1	Objetivo geral.....	17
1.1.2	Objetivos específicos.....	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E TRABALHOS RELACIONADOS	19
2.1	Avaliação Anatomopatológica do Tecido Renal	19
2.2	Os Podócitos	20
2.2.1	Lesão de Podócitos.....	21
2.3	Quantificação de Podócitos	25
2.3.1	Depleção de podócitos e as doenças renais.....	25
2.3.2	Métodos estereológicos para quantificação da depleção de podócitos.....	27
2.3.3	Estudos relevantes na avaliação da densidade podocitária com auxílio de técnicas computacionais.....	29
2.4	Avaliação Computacional de Imagens em Microscopia	35
2.4.1	Aplicação de Técnicas de Aprendizado de Máquina.....	36
2.4.2	Redes Neurais Convolucionais e a U-Net.....	37
3	MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1	Fase 1: Marcação por Imuno-Histoquímica e Processo de Captura e Rotulação de Imagens	39
3.2	Fase 2: Desenvolvimento e Aplicação da U-Net para a Automatização da Segmentação de Podócitos em rins normais	42
4	EXPERIMENTOS E DISCUSSÃO	45
4.1	Validação da Segmentação, Contagem Manual de Podócitos e Cálculo de Densidade Podocitária em Rins Normais através da Marcação por Imuno-Histoquímica	45
4.2	Validação do Uso da U-Net no Processo de Automatização da Segmentação, Contagem de Podócitos e Cálculo de Densidade Podocitária em Podocitária em Rins Normais através da Marcação por Imuno-Histoquímica	49

4.2.1	Configuração do Ambiente de Trabalho.....	49
4.2.2	Modelagem da Base de dados.....	49
4.2.3	Métricas de desempenho.....	51
4.3	Aspectos Éticos.....	57
4.4	Análise Estatística.....	58
5	CONCLUSÃO.....	59
	REFERÊNCIAS.....	61
	APÊNDICES.....	65
	ANEXOS.....	72

1 INTRODUÇÃO

As doenças glomerulares, primárias ou secundárias, são responsáveis por cerca de 80% dos casos de Doenças Renais Crônicas (DRC) e o mecanismo de depleção de podócitos descrito na maioria destas patologias está relacionado à progressão da doença renal. Na prática clínica, as ferramentas utilizadas para identificação de risco, predição de desfecho e prevenção da progressão da DRC ainda são muito frágeis. Portanto, metodologias para estimativa de número, tamanho e densidade de podócitos em biópsias de rotina, associados a outros achados laboratoriais que estimam a perda de podócitos vêm se tornando ferramentas importantes para novos conhecimentos capazes de melhorar os desfechos na DRC e reduzir custos em saúde (KIKUCHI et al., 2015). A doença renal crônica (DRC) em estágio final é um dos maiores problemas em saúde pública mundial, custando em países desenvolvidos como os Estados Unidos cerca de 40 bilhões de dólares por ano, equivalente a 7% dos gastos do seguro saúde nacional. De acordo com o Inquérito Brasileiro de Diálise Crônica 2017, o número total estimado de pacientes em diálise foi de 126.583, a prevalência global foi de 610 pacientes por milhão de habitantes, com aumento de 20% nos últimos 5 anos e a presença de 31.226 pacientes (24%) em lista de espera para transplante renal. Verificou-se que 82% dos gastos com o tratamento foi pago pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e que as unidades de diálise funcionaram com 85% da sua capacidade total (THOMÉ et al., 2018).

Entre os diversos tipos celulares que constituem o tecido renal destacam-se os podócitos, células altamente especializadas do glomérulo que envolvem os capilares e as células vizinhas da cápsula de Bowman. Quando se trata de filtração glomerular, os podócitos desempenham um papel ativo na prevenção da saída de proteínas plasmáticas para o ultrafiltrado urinário, fornecendo uma barreira que compreende as fendas de filtração entre os pedicelos. O comprometimento genético ou adquirido dos podócitos pode levar ao apagamento dos pedicelos (fusão de podócitos ou retração), uma característica morfológica comum de várias doenças renais proteinúricas (REISER; ALTINTAS, 2016). O estresse podocitário pode iniciar

um dano glomerular induzindo a lesões de outras células. Estudos têm mostrado que os podócitos possuem propriedades de células imunes e podem estar envolvidos na imunidade adaptativa, além de possuírem caminhos para sinalização de respostas imunes inatas as quais geralmente resultam em lesões nos próprios podócitos (XIA et al., 2017).

As glomerulopatias são doenças renais com diferentes subtipos histopatológicos. Além de crucial para o diagnóstico, a avaliação microscópica pode oferecer dados prognósticos e proporcionar orientação para o tratamento (COSTA et al., 2017). As lesões podocitárias são precisamente observadas através da microscopia eletrônica (ME), na qual é possível identificar alterações qualitativas clássicas na morfologia dos pedicelos. Porém, esta técnica é extremamente complexa, cara e raramente disponível nos laboratórios de patologia. Diversas metodologias de avaliação quantitativa dos podócitos estão sendo desenvolvidas por meios mais simples e amplamente disponíveis como a microscopia óptica (MO) e, geralmente, com identificação pela técnica de imunofluorescência (IF) através de marcação nuclear e/ou citoplasmática por anticorpos direcionados a proteínas específicas destas células (LANE et al., 1992), (LEMLEY et al., 2013), (VENKATAREDDY et al., 2014; WHITE; BILOUS, 2004). A Imuno-histoquímica (IH) é uma técnica de identificação de proteínas em tecidos biológicos de forma semelhante à IF, no entanto, utiliza espécimes de biópsia parafinados e fixados com formalina. Apesar das limitações quando utilizada na avaliação diagnóstica de rotina em patologias glomerulares, a IH demonstra ser um método promissor e satisfatório na avaliação quantitativa de tipos celulares específicos, como os podócitos, com menor exigência técnica e melhor disponibilidade do material para replicação (SEKULIC; PICHLER SEKULIC, 2013).

A hipótese da depleção de podócitos ganhou considerável atenção na última década, principalmente porque representa um conceito unificador na patologia renal o qual associa esta condição ao desenvolvimento de diversas doenças glomerulares, especialmente àquelas caracterizadas por glomerulosclerose. Portanto, é de fundamental importância quantificar os glomérulos e seus podócitos de maneira acurada (sem viés) e precisa (baixa variância). Surpreendentemente,

este processo provou-se ser difícil e controverso (PUELLES; BERTRAM, 2015). Uma variedade de métodos têm sido usados nos últimos 20 a 30 anos para estimar o número de podócitos, com diversas vantagens e desvantagens, e todos eles são considerados métodos estereológicos. Este termo refere-se originalmente a abordagens práticas de imagens para a quantificação tridimensional de estruturas baseadas em medidas bidimensionais, atualmente muito aplicado na quantificação de partículas de interesse médico e biológico. Os métodos estereológicos podem ser divididos em duas categorias amplas: baseadas em Modelos e em Design (PUELLES; BERTRAM; MOELLER, 2017). Os primeiros são assim considerados porque requerem conhecimento da geometria (tamanho, distribuição e forma) dos núcleos podocitários. Geralmente, os valores para essas características geométricas são assumidos e não medidos, e, dado que essas suposições são imprecisas, existe o potencial para um viés sistemático. A vantagem deste método é a menor complexidade de execução e aplicabilidade em amostras teciduais de rotina. Os métodos baseados em Design não requerem conhecimento ou suposições da geometria celular e, quando usada corretamente, fornece estimativas imparciais. Contudo, demandam uma quantidade de tempo maior devido às exaustivas análises em um volume muito maior de material (tecidos) por mão de obra altamente capacitada. Desta forma, torna-se impraticável para a rotina em patologia e destina-se especialmente às pesquisas (PUELLES; BERTRAM, 2015).

Ao longo da última década, aumentos dramáticos no poder computacional e na evolução dos algoritmos de análise automatizada de imagens permitiram o desenvolvimento de abordagens assistidas por computador para o auxílio no estudo de dados e no diagnóstico em histopatologia de vários tecidos (GURCAN et al., 2009), HAMILTON et al., 2014). Diversas metodologias para avaliação das imagens de podócitos utilizando ferramentas computacionais são descritas na literatura, com capacidade de quantificar o total de células e sua densidade por extensão glomerular em cada amostra (LEMLEY et al., 2013; SANDEN et al., 2003; VENKATAREDDY et al., 2014; WHITE; BILOUS, 2004). Estas análises vêm sendo aplicadas a um grande número de patologias renais proteinúricas devido à capacidade de quantificar parâmetros morfométricos teciduais importantes que estão

relacionados a fisiopatologia e avaliação clínico-laboratorial destas doenças (HARA et al., 1998; RATHORE et al., 2012; WAGROWSKA-DANILEWICZ; STASIKOWSKA; DANILEWICZ, 2006).

É muito importante ampliar os estudos acerca das modalidades diagnósticas, principalmente àquelas capazes de estimar o prognóstico da lesão, avaliar extensão dos danos teciduais ou identificar alterações celulares específicas associadas a patogenia da doença. A utilização de métodos computacionais, através de técnicas de Processamento de Imagens, no auxílio ao diagnóstico visa diminuir a subjetividade da avaliação e classificação realizada pelo médico patologista, oferecer maior quantidade de informações, melhor confiabilidade e otimizar o tempo de análise dos dados (BARISONI; HODGIN, 2017). Portanto, a problemática do nosso estudo envolve o seguinte questionamento: 1) É possível estabelecer técnicas automatizadas de Processamento de Imagens Digitais e/ou Visão Computacional para avaliação de parâmetros morfométricos de podócitos marcados com imuno-histoquímica?

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Automatizar etapas manuais do processo de avaliação morfométrica de podócitos marcados por imuno-histoquímica.

1.1.2 Objetivos Específicos

- 1) Verificar o uso da imuno-histoquímica como marcação alternativa à imunofluorescência para quantificação de parâmetros morfométricos de podócitos em tecido renal humano normal.
- 2) Apresentar um método automatizado na avaliação de imagens em patologia renal para quantificação de atributos (número e densidade glomerular) de células podocitárias em tecido renal normal, baseado no uso de uma Rede Neural Convolutacional.

- 3) Verificar se o desempenho do método proposto, avaliado através da aplicação de métricas quantitativas, apresenta capacidade discriminativa semelhante ao processo manual.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E TRABALHOS RELACIONADOS

INTRODUÇÃO

Nesta seção foi realizada uma revisão de conceitos e publicações associados à avaliação em patologia renal, ao conceito de podócitos e alterações fisiopatológicas decorrentes das disfunções destas células e à importância e aplicabilidade de métodos de avaliação quantitativa. Foi descrita a metodologia do artigo base da pesquisa e resultados de outros estudos que envolveram análise morfométrica de podócitos (podometria). Por fim, foram apresentadas algumas evoluções das técnicas de Processamento de Imagens Digitais e/ou Visão Computacional aplicadas em microscopia, especialmente às relacionadas ao uso de Aprendizado de Máquina para estudos de biomarcadores teciduais.

2.1 Avaliação Anatomopatológica do Tecido Renal

A histopatologia é um importante recurso diagnóstico na prática médica e caracteriza-se pelo estudo das alterações estruturais e morfológicas das células e dos tecidos causadas por doenças. Esta análise é realizada por imagens microscópicas obtidas de biópsias que são submetidas à avaliação visual do patologista. A rotina de análise diagnóstica das biópsias renais é realizada contemplando, sequencialmente, os quatro compartimentos representados no rim: os glomérulos, túbulos, interstício e os vasos. Glomerulopatias são enfermidades que acometem primariamente os glomérulos estendendo-se, posteriormente, para os outros segmentos do néfron. Os glomérulos podem ser lesados por diversas condições intrínsecas ou extrínsecas, podendo ter origem em enfermidades auto-imunes, reações de hipersensibilidade, neoplasias, alterações genéticas, enfermidades metabólicas ou infecções por vírus, bactérias, fungos ou parasitos (JENNETTE et al., 2015).

Nos últimos 25 anos, com a evolução das técnicas de obtenção das amostras e das avaliações microscópicas, a compreensão da patologia renal aumentou muito. A imunofluorescência (IF) é essencial para o diagnóstico da maioria das doenças glomerulares e é realizada em seções de biópsia renal congeladas, frescas e não

fixadas. Esse método é considerado padrão-ouro, tecnicamente simples, rápido e econômico, no qual anticorpos marcados com fluorocromo contra imunoglobulinas (IgG, IgA, IgM, kappa e lambda), componentes do sistema complemento (C3, C4, C1q e C4d) e fibrina são aplicados ao tecido renal. Tem como desvantagens a necessidade de uma estrutura mais complexa para análise (incluindo um microscópio de imunofluorescência e uma sala de campo escuro) e o fato de não ser fixada em formol reduz o prazo de viabilidade da amostra devido a degeneração do tecido, não permitindo armazenamento para repetição da análise (AGARWAL; SETHI; DINDA, 2013).

A Imuno-histoquímica (IH) é uma técnica de identificação de proteínas em tecidos biológicos por meio da reação de anticorpos, mono ou policlonais, com os antígenos (proteínas) em biópsias. Também é muito utilizada na pesquisa básica, através do estudo da localização e distribuição dos biomarcadores (AGARWAL; SETHI; DINDA, 2013). A sua utilização na rotina para avaliação qualitativa ou diagnóstico das patologias glomerulares não é comum, visto que a sensibilidade, a especificidade e os valores preditivos em espécimes de biópsia renal parafinados com formalina são mais baixos em relação à IF. Isto ocorre provavelmente pelas dificuldades técnicas desde a coloração de fundo, tempo de bloqueio de anticorpo, desempenho da digestão enzimática e aquecimento para recuperação dos antígenos (RATHORE et al., 2012). Contudo, para fins direcionados à identificação e avaliação tecidual quantitativa de determinadas células utilizando anticorpos específicos, como nos podócitos através do anti-WT1 (anticorpo anti-proteína do Tumor de Wilms - 1), a imuno-histoquímica mostra-se uma técnica satisfatória e confiável que exige menor complexidade na aquisição de imagens e permite maior disponibilidade de tempo para avaliação do material biológico devido à conservação das lâminas (SEKULIC; PICHLER SEKULIC, 2013).

2.2 Os Podócitos

Os podócitos são células altamente diferenciadas e com arquitetura única. São compostos de três partes principais: corpo celular, processos podocitários primários e processos podocitários secundários ou pedicelos. Os pedicelos

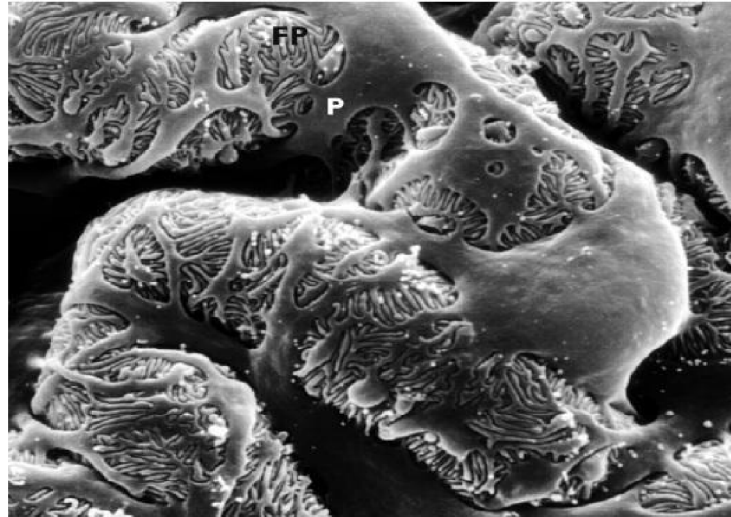
interdigitam-se com os processos de outros podócitos adjacentes e formam uma rede de lacunas estreitas e bastante uniformes, as fendas de filtração (Figura 1). As células endoteliais fenestradas retêm as células sanguíneas, mas permitem a passagem de pequenos solutos e uma membrana basal sobrejacente, menos permeável às macromoléculas, retém em particular a albumina. A dinâmica do citoesqueleto e a plasticidade estrutural dos podócitos, bem como a sinalização entre cada uma dessas camadas distintas, são essenciais para uma filtração glomerular eficiente e, portanto, para uma função renal adequada (REISER; ALTINTAS, 2016).

2.2.1 Lesão de Podócitos

Os podócitos cobrem a camada externa da membrana basal glomerular (GBM), desempenhando um papel crucial na regulação da função glomerular, e a lesão podocitária é uma característica essencial das doenças glomerulares progressivas (CHENG; HARRIS, 2010). A síndrome nefrótica (SN) é uma condição patológica decorrente do aumento da permeabilidade capilar glomerular às proteínas plasmáticas e manifesta-se clinicamente por proteinúria acima de 3,5g/1,73m² de superfície corpórea/dia, com consequente hipoalbuminemia e edema (DANTAS et al., 2012). A patogênese da proteinúria na SN tem sido associada às vias de natureza mecânica no glomérulo renal que envolvem a função das células epiteliais viscerais, os podócitos.

Estudos recentes indicam que o dano podocitário local pode se espalhar para induzir lesão em podócitos saudáveis e afetar células endoteliais e mesangiais glomerulares. Este fato implica que até uma lesão limitada de podócitos pode iniciar um círculo vicioso de dano glomerular progressivo. (GARG, 2018).

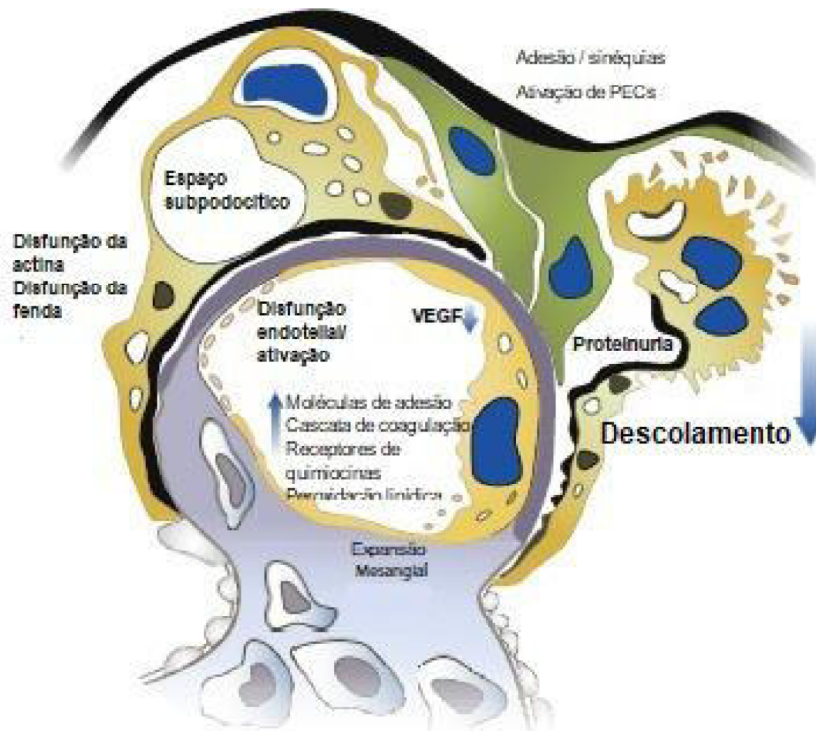
Figura 1 - Micrografia eletrônica de varredura de capilares glomerulares de ratos normais. O espaço urinário da parede capilar é coberto pelos processos podocitários ramificados. P = processo podocitário primário, FP = processo podocitário secundário, pedicelos. Rim de rato, ampliação 6.000x.



Fonte: Elaborado pelo autor - Adaptado de PAVENSTÄDT, 2003.

Portanto, os podócitos são consequentemente células alvo no glomérulo para vários estímulos inflamatórios imunes ou não imunes, e vários graus de lesão podocitária ocorrem em condições patológicas. O podócito lesado é descolado da membrana basal glomerular (MBG), que está associada à resposta das células endoteliais (lesão/ativação), incluindo anormalidades nas moléculas de adesão, cascata de coagulação, expressão do receptor de quimiocinas e peroxidação lipídica (Figura 2) (NAGATA, 2016). Estas alterações às vezes associam-se ao desenvolvimento de lesões extracapilares de glomérulos, como crescentes e aderências, fatores importantes na fibrose glomerular. O acometimento degenerativo dos podócitos geralmente é estimado por ME e as alterações patológicas de podócitos em doenças glomerulares proteinúricas são vistas no nível ultraestrutural como vacuolização, perda de diafragmas de fenda, fusão pedicelar e, ocasionalmente, desprendimento da MBG (HARA et al., 1998).

Figura 2 - Ilustração das consequências da injúria podocitária.

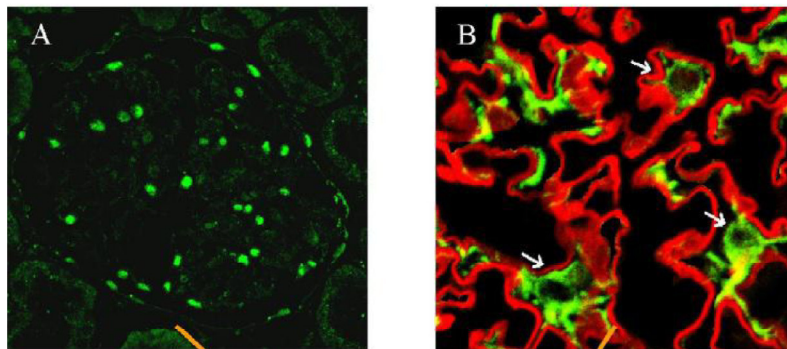


Fonte: Elaborado pelo autor - Adaptado de NAGATA, 2016.

Em estudos utilizando imagens de tecidos renais foi observado a presença de lesão de podócitos contando o número destas células nos glomérulos através das marcações padrões em microscopia óptica (PAS, H&E e tricrômica de Masson). No entanto, reconheceu-se que a medida do número de podócitos por MO é bastante difícil por causa da complexidade da estrutura podocítica e glomerular, o que não é adequado para pesquisas clínicas. Assim, foi necessário descobrir marcadores convenientes para estudar de forma específica o podócito em pacientes com doenças renais. A proteína do tumor de Wilms -1 (WT1) é um fator de transcrição envolvido na nefrogênese e diferenciação de podócitos. No glomérulo maduro, a expressão de WT1 é restrita ao podócito. Alguns trabalhos utilizaram os anticorpos policlonais C-terminais WT1 (WT1-C) para marcar espécimes renais e descobriram que o WT1-C era expresso exclusivamente nos núcleos podocitários, enquanto os núcleos das células mesangiais e as células endoteliais eram negativos. Ao usar este anticorpo anti-WT1, pode-se identificar podócitos de forma precisa através de microscopia de imunofluorescência (Figura 3) (SU et al., 2010). Deve-se notar que o

anti-WT1 é um biomarcador histológico comprovado de podócitos e que a proteína WT1 é também imuno-histoquimicamente expressa no epitélio glomerular de forma a não ser exclusiva e nem específica em estados de doença (SEKULIC; PICHLER SEKULIC, 2013).

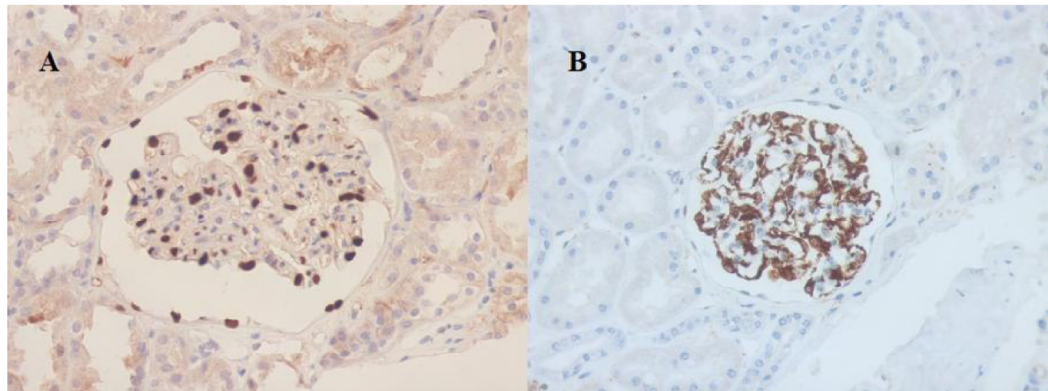
Figura 3 - Imunofluorescência do anticorpo anti-WT1 nos podócitos de um glomérulo normal. (A) Localização nuclear da proteína WT1 através de um anticorpo C-terminal (WT1-C). (B) Localização citoplasmática da proteína WT1 através de um anticorpo N-terminal (WT1-N).



Fonte: Elaborado pelo autor - Adaptado de JIAN SU et al., 2010.

A utilização da imuno-histoquímica (Figura 4) para identificação de podócitos já foi documentada em vários estudos envolvendo diversas patologias renais, como glomerulosclerose segmentar e focal (GESF), nefropatia diabética e Glomerulopatia de lesões mínimas (GLM), entre outras, (HARA et al., 1998), (WAGROWSKA-DANILEWICZ; STASIKOWSKA; DANILEWICZ, 2006). Estas publicações têm em comum o achado da redução do número e/ou do citoplasma de podócitos (relativa a uma área/volume) nas populações portadoras de SN. Este fato demonstra que a podocitopatia não se restringe às lesões ultraestruturais clássicas presentes na microscopia eletrônica, mas também é um fenômeno quantitativo que pode ser mensurado pela distribuição tecidual de biomarcadores (HODGIN et al., 2015).

Figura 4 - Marcação de podócitos em rins normais por imuno-histoquímica (biópsia protocolar pré-transplante). A) Marcação nuclear com anticorpo anti-WT1 e B) Marcação citoplasmática com anticorpo anti-WT1.



Fonte: Imagens cedidas pelo Laboratório de Microscopia do Hospital Universitário da UFMA.

2.3 Quantificação de Podócitos

A depleção de podócitos é um evento central na patogênese de muitas doenças glomerulares. Por tratar-se de células altamente diferenciadas essenciais para função glomerular normal, com grande longevidade e limitada capacidade de reposição, os podócitos podem ser considerados marcadores ideais da progressão das doenças glomerulares (KIKUCHI et al., 2015). Sendo assim, métodos para quantificar a depleção de podócitos têm-se tornado mais evidentes. Os métodos atualmente disponíveis e mais utilizados para quantificar a depleção de podócitos, incluindo a análise das seções transversais glomerulares, são os métodos estereológicos. Todos eles têm vantagens e limitações. Por isso, considerações teóricas e práticas são necessárias à seleção mais apropriada para cada estudo individual (PUELLES; BERTRAM; MOELLER, 2017).

2.3.1 Depleção de podócitos e as doenças renais

Estudos mostraram que a depleção de podócitos é suficiente para o desenvolvimento de cicatrizes glomerulares (glomeruloesclerose). Se um número suficiente de glomérulos tornar-se não funcional devido à esclerose, pode ocorrer doença renal crônica e IRC terminal. Como consequência, a hipótese da depleção do podócito

tem sido proposta como um princípio unificador da patologia glomerular e é atualmente o foco de muitas pesquisas (PUELLES; BERTRAM; MOELLER, 2017).

Durante o envelhecimento normal do ser humano, os podócitos são perdidos numa taxa de 1.7 células por glomérulo por ano. Portanto, um idoso de 80 anos sem patologias renais já deve ter perdido em média 25% destas células. Por outro lado, fisiologicamente temos um aumento progressivo do volume glomerular durante toda vida, porém mais acelerado na infância e adolescência. Esta combinação resulta em redução da densidade de podócitos com o envelhecimento e uma hipertrofia compensatória como resposta (KIKUCHI et al., 2015). A literatura atual descreve duas formas de depleção de podócitos: 1 - Absoluta, quando o número total de células por glomérulo diminui e 2 - Relativa, quando não há redução no número de podócitos, mas há aumento na área de superfície de filtração glomerular (ou volume glomerular) que leva a uma redução efetiva na densidade celular. Contudo, tanto a depleção absoluta quanto a relativa são suficientes para o desenvolvimento da glomerulosclerose (WANNER et al., 2014). Quando se tem uma densidade de podócitos menor que 100 células por 106mm³ de volume glomerular é necessário uma resposta compensatória extrema através de hipertrofia celular que inevitavelmente resultará em estresse podocitário com perda de proteínas através das fendas de filtração, fusão dos processos podocitários e posteriormente colapso do tufo glomerular com esclerose (KIKUCHI et al., 2015).

Outros estudos revelam que um limiar de depleção de podócitos foi encontrado antes do desenvolvimento de alterações patológicas. Por exemplo, no caso de depleção absoluta de podócitos, a perda de menos de 20% dos podócitos levou à expansão mesangial, mas sem alterações na função renal, enquanto a perda de mais de 40% dos podócitos levou à glomerulosclerose segmentar e focal e à função renal reduzida (WANNER et al., 2014). Também já foi documentado que a baixa densidade glomerular de podócitos está associada: (1) ao aumento do volume glomerular entre pacientes com nefropatia por IgA e glomerulopatia relacionada à obesidade, (2) à progressão da nefropatia por IgA e nefropatia membranosa idiopática e (3) à redução da res-posta à corticoterapia em adultos portadores de síndrome nefrótica por lesão mínima (PUELLES; BERTRAM, 2015).

Estas descobertas demonstraram o valor da capacidade de quantificar a depleção de podócitos com precisão na obtenção de informações importantes sobre a fisiopatologia glomerular.

2.3.2 Métodos estereológicos para quantificação da depleção de podócitos

O termo estereológico é derivado do grego e refere-se à “ciência do estudo dos sólidos”. Existem 2 categorias de métodos que são utilizados para quantificação de podócitos: (1) método baseado em Modelo e (2) método baseado em Design (PUELLES; BERTRAM; MOELLER, 2017).

- 1) Os primeiros métodos estereológicos para contagem de partículas foram métodos baseados em Modelos executados em seções únicas. A estrutura do modelo, expressa em termos de probabilidade geométrica, é o conjunto de suposições feitas sobre as características geométricas das partículas em questão, tais como os pressupostos de que os tufo glomerulares são esféricos, os podócitos são uniformemente distribuídos pelos glomérulos, ou os núcleos podocitários têm uma forma específica. No entanto, na medida em que as suposições se desviam sistematicamente do estado atual das coisas, as estimativas obtidas serão enviesadas. Portanto, faz-se necessário nestes métodos a introdução de fatores de correção na equação geral de estimativa de densidade de partículas (LEMLEY et al., 2013). Os métodos baseados em Modelos mais utilizados são os de Weibel e Gomez (WEIBEL; GOMEZ, 1962) e do Fator de Correção (VENKATAREDDY et al., 2014). Estes métodos são particularmente úteis quando estão disponíveis quantidades limitadas de tecido (por exemplo, biópsias renais). Além de várias medições em seções, o método de Weibel e Gomez (1962) requer conhecimento da distribuição do tamanho nuclear do podócito e da forma nuclear. Esses valores são difíceis de obter e, portanto, são tipicamente assumidos, potencialmente introduzindo viés. O método descrito por Venkatareddy et al. (2014) baseia-se na medição direta do diâmetro médio do calibre dos núcleos podocitários, que é usado para determinar um Fator de Correção para a espessura da seção.

Isso representa um desenvolvimento importante porque, anteriormente, este diâmetro era geralmente assumido e não medido, fornecendo uma provável fonte de viés. Este método retrata um avanço significativo no campo da podometria porque não requer hipóteses geométricas para os núcleos podocitários e exige apenas uma única seção, diferenciando-se de outros métodos que demandam análises de várias seções e/ou seções seriadas. Contudo, métodos baseados em Modelos fornecem apenas uma estimativa do número médio de podócitos por glomérulo baseando-se em uma amostra e esta é uma limitação importante, dado que a depleção de podócitos é focal em muitos tipos de doenças glomerulares. Além disso, o uso de um valor médio por rim não fornece nenhuma indicação da variação no número de podócitos entre os glomérulos. Embora os métodos estereológicos baseados em Modelos tenham limitações, eles podem fornecer dados quantitativos confiáveis e reproduzíveis e são especialmente úteis quando se lida com quantidades limitadas de tecido, como é o caso das biopsias renais para fins de diagnóstico de glomerulopatias (PUELLES; BERTRAM; MOELLER, 2017).

- 2) Métodos estereológicos baseados no Design (não-viesados) foram desenvolvidos como uma resposta às limitações inerentes aos métodos baseados em modelos, em particular ao viés na amostragem introduzido pelo uso de seções únicas e a dificuldade de estabelecer valores para as variáveis (geométricas) do modelo em espécimes biológicas (LEMLEY et al., 2013). Em contraste, a estereologia baseada em Design é fundamentada na aplicação de investigações e esquemas de amostragem que são “projetados” ou “definidos a priori”, de modo que os métodos são independentes da orientação espacial, distribuição, tamanho ou forma. Portanto, não requer conhecimento ou suposições da geometria dos objetos de interesse. Se aplicadas corretamente, essas abordagens são consideradas “imparciais”, dado que sua concepção minimiza/remove a introdução de pressupostos e, portanto, de viés sistemático. O método padrão-ouro para estimar o número glomerular é baseado no princípio do disector (PUELLES; BERTRAM; MOELLER, 2017). Dois métodos gerais baseados em disector estão disponíveis para a contagem de glomérulos: o

princípio do dissector/Cavalieri e o princípio do disector/fracionador. Estes métodos foram usados para estimar o número glomerular em uma variedade de espécies, incluindo humanos e roedores. Têm inúmeras vantagens sobre os métodos anteriores, incluindo: (1) estimativas do número total de podócitos em glomérulos de volume conhecido (e, portanto, densidade de podócitos); (2) aquisição de dados que descrevem a heterogeneidade no número total de podócitos e densidade de podócitos entre os glomérulos do mesmo rim; (3) obtenção dos números totais de outros tipos celulares (tais como células epiteliais endoteliais e parietais) e, assim, razões do número destas células por podócito; e (4) informações adicionais, como a localização cortical dos glomérulos. No entanto, costumam ser demorados, complexos e difíceis de implementar. Isto se deve a vários fatores: (1) ambos exigem a análise de uma porção representativa do rim, o que significa que são destrutivos e aplicáveis somente a experimentos terminais, ou seja, podem apenas fornecer dados transversais; (2) a maioria dos estudos utilizou um meio de inclusão de plástico (como o glicolmetacrilato) para a estabilidade dimensional, o que requer experiência no processamento de tecidos que pode não estar disponível regularmente em laboratórios; (3) ambos requerem corte sistemático e corte exaustivo, que não são apenas caros, mas também requerem habilidade significativa; e (4) mesmo que todos esses requisitos sejam atendidos, o tempo de contagem manual varia de aproximadamente 6 horas para um rim de rato a 8 horas para um rim humano. Por todas essas razões, pouquíssimos laboratórios adotaram essas abordagens e é inviável para pequenas amostras como biópsias renais de rotina em patologia (PUELLES; BERTRAM, 2015).

2.3.3 Estudos relevantes na avaliação da densidade podocitária com auxílio de técnicas computacionais

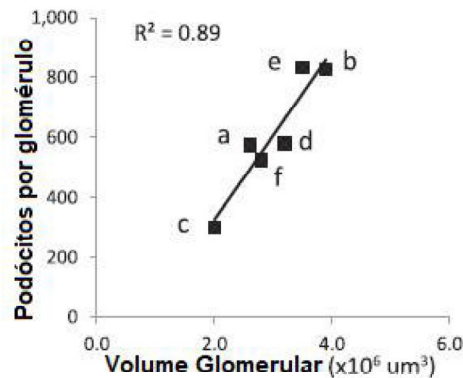
A quantificação de podócitos com auxílio de técnicas computacionais têm sido aplicada a várias glomerulopatias, especialmente na nefropatia diabética (SU et al.,

2010), através de diversas metodologias conforme descrito em várias revisões da literatura (KIKUCHI et al., 2015; PUELLES; BERTRAM; MOELLER, 2017; WHITE; BILOUS, 2004, 2017).

Uma revisão comparou cinco tipos diferentes de metodologias para estimar o número de podócitos. Foram analisados os seguintes métodos validados: método de Enumeração Exaustiva, combinação de Disector/Cavalieri, combinação de Disector/Fractionator e método de seção grosso e fino, todos estes baseados em Design; e método de Weibel e Gomez, baseado em Modelo. A conclusão foi que foi concluído que há pouca uniformidade na literatura biomédica em relação aos métodos utilizados, mas que todos os cinco métodos descritos podem ser usados para estimar o número total de podócitos em glomérulos individuais. Contudo, o método de Weibel e Gomez é provavelmente o único praticável para estudos baseados em espécimes de patologia de rotina (LEMLEY et al., 2013). Não foi avaliado nesta revisão o método do Fator de Correção (CF method) publicado por Venkatarreddy et al. (2014) posteriormente.

O estudo de Venkatarreddy et al. (2014) foi um importante marco na metodologia estereológica de avaliação de podócitos baseada em Modelo. Ficou conhecido também como Método do Fator de Correção (CF Method) e trouxe uma proposta de análise morfométrica mais simplificada utilizando seções histológicas únicas para estimar principalmente a densidade de podócitos (razão entre o número total de podócitos pelo volume glomerular total da lâmina, Figura 5) em amostras de biópsia com precisão adequada e reprodutibilidade. Utilizou imagens de podócitos marcados por imunofluorescência com anticorpos nucleares anti-WT1 e anti-mAb murino TLE4 (“transducin-like enhancer of split 4”), sendo necessário pelo menos 8 imagens glomerulares por lâmina.

Figura 5 - Densidade Glomerular de Podócitos (Dpod): razão entre nº de podócitos totais corrigidos (Nt) pelo volume glomerular total (VG) de uma amostra.



Fonte: Elaborado pelo autor - Adaptado de VENKATAREDDY et al., 2014.

As biópsias humanas analisadas por Venkatareddy et al. (2014) foram de doadores de transplante renal: antes do implante, após 3-6 meses e casos de glomerulopatias pós-transplante. A etapa chave no processo de cálculo da densidade podocitária (DPod) envolveu a necessidade de estimar o diâmetro médio real do calibre nuclear dos podócitos (D) através das variáveis presentes na equação quadrática a seguir:

$$D = d - T + \frac{p}{(d - T)^2 + 4kdT} \quad (2.1)$$

Estas variáveis foram a espessura do corte da lâmina (T), o diâmetro médio aparente do calibre nuclear dos podócitos (d) e o coeficiente da forma nuclear (k). O volume total do tufo glomerular (VG) foi estimado através da área glomerular total de cada caso.

Foram utilizados os resultados de (D) e a aplicação do Fator de Correção (FC) para o número de podócitos totais observados por lâmina (No) para obter o número de podócitos totais corrigidos (Nt). A densidade podocitária (Dpod) resultou da seguinte razão

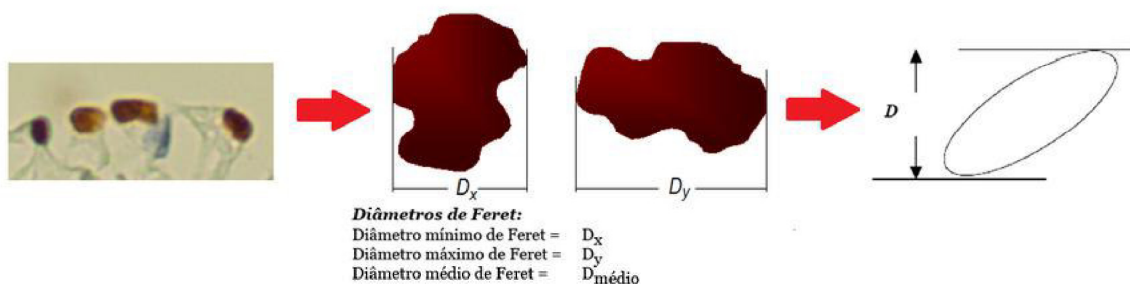
$$Dpod = \frac{Nt}{VG} \quad (2.2)$$

Os resultados encontrados para D tiveram a média de $8,2 \pm 0,3 \text{mm}$ e Dpod de 194 ± 46 podócitos/ 106mm^3 . Também foi verificado o Volume Glomerular por Podócito (GV/P), que era o inverso da densidade podocitária, dado por:

$$GV / P = \frac{V G}{N t} \quad (2.3)$$

O conceito diferencial do CF Method foi a estimativa do diâmetro D (Figura 6), adquirido através da medida direta do diâmetro d nas imagens nucleares de podócitos desta forma retificou-se o viés de pressuposição geométrica assumida por metodologias precedentes. Os núcleos de podócitos foram localizados manualmente clicando-se sobre as estruturas presentes em máscaras geradas através de um “software” baseado em programação JAVA (Image-Pro®), com o qual se obteve o perímetro da imagem do núcleo e o valor de d.

Figura 6 - O tamanho de uma partícula foi quantificado pelo diâmetro médio de Ferret (D) que é a média das distâncias obtidas entre 2 linhas paralelas (calibres) tangentes à projeção da partícula em diversos planos - considerando todas as orientações da mesma.



Fonte: Elaborado pelo autor - Adaptado de LEMLEY et al, 2013.

O método de Venkatarreddy et al. (2014) é robusto, simples de usar, utiliza tecnologias comumente disponíveis, pode ser aplicado a um grande número de glomérulos de uma seção única de biópsia e adaptado para análise automatizada. Desde que as limitações e fontes potenciais de viés sejam reconhecidas e

compreendidas, este método pode ser uma ferramenta útil para estimar o número de podócitos em amostras clínicas (PUELLES; BERTRAM, 2015).

A Tabela 1 reúne alguns trabalhos direcionados à avaliação da densidade podocitária em humanos e observa-se que a maioria dos métodos são baseados em Modelos e apenas mais recentemente tem-se utilizado marcação de podócitos com biomarcadores teciduais, seja por IF ou IH. A marcação padrão da MO foram por PAS, H&E e tricrômica de Masson. Estes estudos observaram o fenômeno de depleção de podócitos em diversas patologias glomerulares, especialmente nos casos de nefropatia diabética (Apêndice A, Tabela 9).

Tabela 1 – Comparação entre artigos que avaliaram a Dpod em rins humanos de doadores de transplante (grupo controle)

Referência	Método	Nº biópsias	Marcação Prodicitária	Dpod
				(podócitos/106mm3)
(PAGTALUMAN et al., 1997)	Weibil e Gomez	8	MO (marcação padrão) e ME.	235
(STEFFES et al., 2001)	Weibel, Gomez e Cavalieri	36	MO (marcação padrão) e ME.	218
(LEMLEY et al., 2002)	Weibil e Gomez	14	MO (marcação padrão e ME.	152
(WHITE et al., 2002)	Weibel, Gomez, e Cavalieri Disector/ Fractionator	10	MO (marcação padrão) e ME.	193
(VESTRA et al., 2003)	Weibel e Gomez	23	MO (marcação padrão e ME.	263
(SU et al., 2009)	Weibel e Gomez	10	IF anti-corpo polyclonal Anti-WT1.	365
(VENKATAREDDY et al., 2014)	Fator de correção (CF method)	10	IF Ac. Anti-WT-1 e anti-TLE4.	194
(ANDEEN et al., 2015)	Fator de correção (CF method)	19	IH: anti-WT-1 e anti-p57	181
(HODGIN et al. 2015)	Fator de correção (CF method)	89	IF Ac: anti TLE4.	Idade: <18 a (318) 19-45a(9211 46-60a(151), >60a(121).
(WICKMAN et al., 2016)	Fator de correção (CF method)	17	IF Ac.anti TLE4.	309

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

2.4 Avaliação Computacional de Imagens em Microscopia

É um equívoco comum considerar que a patologia digital é uma técnica nova, visto que pesquisas sobre o uso de computadores e “softwares” para analisar e medir células ou tecidos em patologia datam de 1960 e 70. Estes sistemas iniciais são de capacidade limitada em comparação com a atualidade, mas foram os primeiros a demonstrar o valor que dados de imagens baseadas em computador para medição e a quantificação celular poderiam desempenhar no diagnóstico e descoberta patológica (HAMILTON et al., 2014).

A quantificação das proporções de regiões especificamente coradas em imagens é de interesse significativo para um número crescente de aplicações biomédicas. Essas aplicações incluem histologia e citologia, onde a quantificação de várias marcações realizadas em seções histológicas de tecido, esfregaços, impressões, etc. é de extrema importância. Através do uso de marcações especiais, os componentes biológicos de interesse podem receber uma cor específica e serem avaliados visualmente de forma quantitativa. As estimativas visuais puras fornecem resultados muito grosseiros e com reprodutibilidade intra e interobservador por diversas vezes insatisfatórias. Para menor interferência deste efeito, as análises de imagens vêm se baseando em métodos desenvolvidos computacionalmente. Uma variedade muito ampla de pesquisas sobre técnicas gerais de segmentação de imagens é encontrada na literatura mundial e o problema da quantificação de imagens de células usando informações de cores tem sido estudado há algum tempo por muitos pesquisadores (RANEFALL; WESTER; BENGTTSSON, 1998).

Por se tratar de uma atividade manual (apoiada ou não por “softwares” de auxílio ao processo), a tarefa de contagem das células detém o profissional durante longo período de tempo. A taxa de erro na contagem tende a ser significativa, pois normalmente utiliza-se o mesmo profissional para contar todas as amostras de determinado paciente. Diversos fatores como o cansaço, o “stress” e a diminuição de atenção podem influenciar nesta probabilidade de erro. A patologia digital está transformando a prática da patologia e cada vez mais se encontra integrada aos procedimentos de ensino/educação/treinamento, diagnóstico e garantia de qualidade na utilização de biomarcadores. A análise quantitativa de imagens pode detectar e

trazer informações que não são facilmente visualizadas pelo observador humano. A contagem e detecção de objetos celulares em imagens digitais é muito menos trabalhosa e de maior rendimento (GURCAN et al., 2010).

2.4.1 Aplicação de Técnicas de Aprendizado de Máquina

Após a década de 90, houve um enorme investimento em pesquisas de triagem de citologia automatizada com base em Inteligência Artificial (IA) com a promessa de que isso poderia ser usado para reduzir a carga de trabalho e melhorar o desempenho de diagnósticos em laboratórios. Infelizmente, isso ainda não aconteceu na escala prevista e até mesmo os sistemas mais avançados da IA não conseguiram mudar significativamente a prática em patologia. Assim, o entusiasmo inicial por esta tecnologia restringiu-se posteriormente ao foco na patologia molecular e na promessa de classificação diagnóstica de amostras de tecido sem a necessidade de avaliação morfológica (HAMILTON et al., 2014).

O Aprendizado de Máquina (AM) é uma área de pesquisa em Ciência da Computação que evoluiu do estudo de reconhecimento de padrões e da teoria do aprendizado computacional em IA. Técnicas de AM exploram o estudo e construção de algoritmos que podem, de maneira indutiva, aprender de seus erros e fazer previsões sobre dados, como também permitem que pesquisadores possam “produzir decisões e resultados confiáveis e repetíveis” e descobrir os “insights escondidos” através do aprendizado das relações e tendências históricas nos dados. Para se obter sucesso no uso de métodos de AM, geralmente começa-se com a extração de características (ou informações úteis) da imagem as quais se acredita serem importantes para fazer a predição ou o diagnóstico de interesse. Dessa forma, os algoritmos de AM operam sobre estas características extraídas (dados amostrais), construindo um modelo a fim de realizar previsões ou decisões guiadas pelos dados. O uso de técnicas de AM aplicadas a análise automática de imagens médicas tem crescido consideravelmente nos últimos anos (DE BRUIJNE, 2016) . Mais recentemente, técnicas de Aprendizado Profundo de Máquina (Deep Learning) começaram a ser usados. Tais técnicas têm o benefício de que não requerem a identificação e extração de características de imagem como na técnica de AM

supracitada. Ao invés disso, as características são identificadas como parte do processo de aprendizagem (LITJENS et al., 2017). O aprendizado de máquina tem sido usado em diversos tipos de imagens na medicina e terá uma maior influência no futuro, portanto, torna-se relevante que os profissionais de qualquer área médica que envolva análise de imagens estejam cientes de como funciona este processo. (ERICKSON et al., 2017).

A análise computadorizada de imagens fornece a capacidade de usar os dados quantitativos inerentes a uma imagem digital para extrair dados numéricos sobre a densidade e distribuição da expressão do biomarcador em imunohistoquímica dentro de uma amostra de tecido. Usada apropriadamente, o Aprendizado de Máquina profundo pode fornecer objetividade e repetibilidade importantes em estudos de biomarcadores, permitindo a identificação de mudanças sutis na expressão que poderiam ter valor diagnóstico, prognóstico ou preditivo. Em mãos experientes, podem ser desenvolvidos algoritmos de análise de imagem que podem segmentar de forma confiável os compartimentos celulares e extrair dados quantitativos de enorme valor (HAMILTON et al., 2014).

2.4.2 Redes Neurais Convolucionais e a U-Net

No contexto de Aprendizado de Máquina profundo, uma Rede Neural Convolucional (CNN, do inglês *Convolutional Neural Network*) é uma variedade de Rede Neural Artificial do tipo feed-forward, que vem sendo amplamente utilizada com sucesso em áreas como Processamento e Análise de Imagens Digitais, (GOODFELLOW; BINGIO; COURVILLE, 2016). Muitas CNNs tem sido desenvolvidas nos últimos anos com o objetivo de realizar reconhecimento de objetos em imagens (AlexNet, GoogleNet, VGG, etc); detecção de objetos em imagens (R-CNN, SPP-Net, etc); segmentação semântica de objetos em imagens (U-Net, Teraus-Net, Seg-Net, etc.) e detecção de objetos com segmentação (Mask R-CNN).

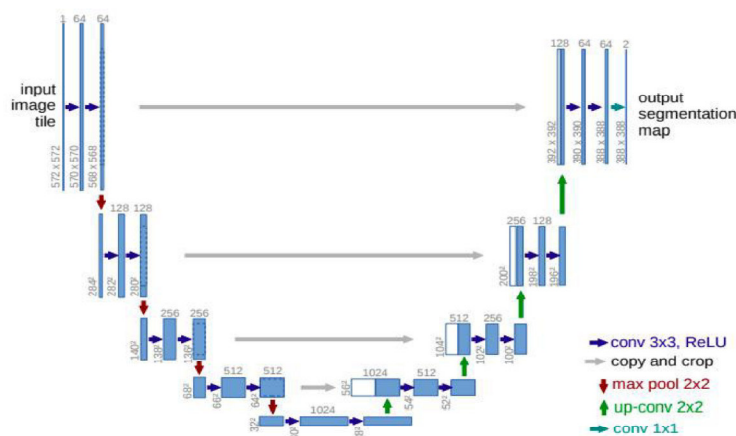
A U-Net é uma CNN que foi desenvolvida para a segmentação de imagens biomédicas (RONNEBERGER; FISCHER; BROX, 2015). O que difere a U-net de outras CNNs é a sua arquitetura modificada e estendida para trabalhar com menos

imagens de treinamento e para gerar segmentações mais precisas. Na U-net, a segmentação de uma imagem de 512 x512, por exemplo, demora menos de um segundo em uma GPU. A U-net possui bons resultados de desempenho em várias aplicações de segmentação biomédica diferentes. Em seu artigo, Ronneberger, Fischer e Brox (2015) usaram a prática de Data Augmentation uma vez que seu conjunto de dados era pequeno.

Data Augmentation (Aumento de Dados) é uma técnica utilizada em problemas de segmentação e classificação quando não se dispõe de uma quantidade suficiente de dados para realizar treinamento e teste de classificadores (HALEVY; NORVIG; PEREIRA, 2009) . Esta técnica é comumente utilizada com imagens médicas, em situações em que não seja possível capturar um banco de imagens suficientemente grande.

A U-Net é uma rede que apresenta apenas camadas de convolução e não tem camadas fully connected, conforme ilustrado na Figura 7 . Ela é composta por camadas de contração chamadas downsampling (lado esquerdo) e camadas expansivas chamadas upsampling (lado direito), apresentando uma simetria entre as camadas dos dois lados, no formato da letra “U”. A modificação mais relevante está na camada up-sampling: que permite a propagação das informações de contexto para camadas com maior resolução. Ademais, a camada expansiva é incrementada com a concatenação das camadas do nível equivalente da camada de downsampling (RONNEBERGER; FISCHER; BROX, 2015).

Figura 7 - Arquitetura da U-net



Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Dentre as diversas metodologias validadas para análise morfológica de podócitos (KIKUCHI et al., 2015; PUELLES; BERTRAM, 2015) foi escolhida a metodologia do Fator de Correção (VENKATAREDDY et al., 2014) como base para reproduzir e comparar resultados. Considerou-se que esta técnica era a mais concisa, de melhor execução prática (pelo auxílio de material suplementar integrado ao artigo) e mais adequada aos objetos de estudo (imagens glomerulares de seção única). A métrica principal escolhida para a avaliação foi a **Densidade de Podócitos** (Figura 5), pois é um parâmetro com resultados constantes e com referências de normalidade definidas pela literatura, o que possibilita comparar resultados. De acordo com os objetivos já previamente apontados, pretendeu-se portanto, verificar a viabilidade do uso de imagens de imuno-histoquímica em detrimento das imagens de imunofluorescência para o cálculo de densidade de podócitos, bem como automatizar o processo de segmentação de podócitos, que no trabalho proposto por Venkatareddy et al. (2014), apresentou-se de forma manual, apesar de utilizar auxílio de softwares de processamento de imagens.

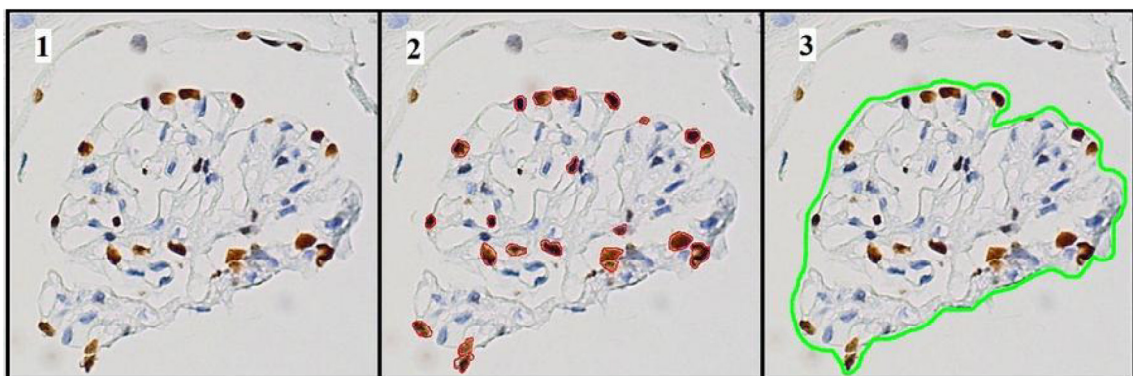
3.1 Fase 1: Marcação por Imuno-Histoquímica e Processo de Captura e Rotulação de Imagens

No presente estudo a imuno-histoquímica foi utilizada em 16 biópsias renais como marcação alternativa para avaliação de podócitos em substituição à imunofluorescência. Deste total, selecionaram-se 07 casos para captura de imagens de microscopia óptica que atenderam a todos os critérios de inclusão: pacientes entre 15 a 40 anos, sem relatos de patologias sistêmicas prévias, com função renal normal à época da biópsia, doadores falecidos de transplante renal submetidos a biópsia protocolar pré-transplante (no “tempo zero” do transplante renal, ou seja, antes do implante do enxerto no receptor), no período entre 2016 e 2018 e com pelo menos 8 glomérulos viáveis por lâmina de biópsia (sem esclerose global ou segmentar e com tufo glomerular íntegro). Todas as amostras renais encontravam-se arquivadas no Laboratório de Imunofluorescência e Microscopia Eletrônica (LIME) de Patologia

Renal do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA). Estas amostras foram submetidas a uma técnica de identificação de núcleos de podócitos utilizando imuno-histoquímica com anticorpos anti-WT1. Ou seja, as seções fixadas em formalina, embebidas em parafina, foram cortadas na espessura de 3mm (micra) com um micrótomo específico e montadas em lâminas revestidas de polilisina. Após a remoção da parafina das seções, elas foram hidratadas e tratadas durante 4 h a 90 ° C. As seções foram então incubadas com um anticorpo policlonal contra a proteína do tumor-1 de Wilms (Human Wilms tumor: immunohistochemical staining for WT1 using NCL-L-WT1-562, CLONE: WT49, Leica Biosystems). Após confeccionadas, as lâminas foram enviadas do LIME para UFAL, onde foram realizadas as visualizações e capturas digitais no microscópio óptico cedido pelo Instituto de Química e Biotecnologia. As imagens dos glomérulos de cada lâmina foram capturadas individualmente no aumento de 40x através de uma câmera digital DP5 acoplada ao microscópio Olympus BX51, com o Software DP2-BSW 2.2 cuja calibração da escala foi de 7.5833 pixels/mm aproximadamente.

Cada imagem representava um glomérulo, sendo identificada pelo número da lâmina seguido por uma letra do alfabeto (ex: Tx05/16b - Glomérulo “b” do caso de transplante Nº 0516) conforme a Figura 8.

Figura 8 - Marcação manual: imagens da lâmina Tx0516, glomérulo “b”. 1 - Imagem inicial, 2 - Identificação e delimitação do perímetro de cada núcleo de podócito (vermelho), 3 - Delimitação da área glomerular (verde).



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Para validar o uso de imagens marcadas com imuno-histoquímica em detrimento de imagens marcadas por imunofluorescência, foi necessário extrair das imagens capturadas os seguintes dados: número total de podócitos por lâmina (No); diâmetro aparente do calibre médio do podócito (d) em mm e área total dos tufo glomerulares por lâmina em mm². Para tanto, nestas imagens, foram realizadas a segmentação manual de cada núcleo de podócito com delimitação dos perímetros nucleares (em vermelho) e das áreas glomerulares (em verde) por um profissional médico treinado (Figura 8). Foi introduzida uma escala de calibração conforme as configurações da câmera de captura, possibilitando converter os dados das imagens de pixels em micrômetros (mm). Após esta segmentação manual, foi verificou-se a viabilidade do uso de imagens marcadas por imuno-histoquímica uma vez que os valores de densidade podocitária encontrados nestas imagens aproximou-se dos valores encontrados nos trabalhos do estado da arte (Tabela 5). A Seção 4.1 avalia o uso de imagens marcadas por imuno-histoquímica para o cálculo de densidade podocitária em detrimento ao uso de imagens marcadas por processo de imunofluorescência.

Para a criação de rótulos necessários ao processo de aprendizado supervisionado da U-net, todas as imagens foram transformadas em máscaras binárias (preto e branco), tanto para os núcleos de podócitos como para área glomerular (Figura 9)

Figura 9 - Processo de construção das máscaras binárias: 1 - imagem original, 2 - máscara dos núcleos de podócitos e 3 - máscara da área glomerular.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Os resultados de d , N_0 , espessura do corte das lâminas e área glomerular total por lâmina foram introduzidos na equação do Método de Fator de Correção para obtenção dos seguintes resultados: diâmetro médio real do calibre nuclear dos podócitos (D), número de podócitos corrigido (N_t) e volume glomerular (VG). Com estas 2 últimas métricas foram calculados a densidade podocitária (D_{pod}) e o volume glomerular por podócito (GV/P).

3.2 Fase 2: Desenvolvimento e Aplicação da U-Net para a Automatização da Segmentação de Podócitos em rins normais

De posse da base de imagens previamente capturada e dos rótulos associados a estas imagens que indicam a segmentação manual de podócitos e área glomerular, foi utilizada a CNN U-net em um processo de aprendizado supervisionado com o intuito de realizar a segmentação automatizada de podócitos.

Quanto a arquitetura da rede U-Net utilizada, no lado esquerdo da U-net, cada etapa do caminho de contração consistiu em duas camadas sequenciais de: filtros de convolução 3×3 , uma camada ReLU e uma max-pooling de 2×2 para downsampling. Do lado direito da U-net, cada etapa do caminho expansivo é composto por uma camada de upsampling, uma expansão das linhas e colunas da camada de origem, seguida por uma convolução 2×2 , uma concatenação com as camadas de contração correspondente e duas camadas de convolução 3×3 . Por fim, a camada final, é uma convolução 1×1 . Na aplicação de Ronneberger, Fischer e Brox (2015) as imagens não eram coloridas. Contudo, implementação da U-Net para este trabalho a imagem de entrada possui três camadas (RGB), enquanto a saída, trata-se de uma imagem de uma única camada (monocromática).

O fluxograma da Figura 10 ilustra o método de cálculo de densidade de podócitos completamente automatizado através do uso de um modelo obtido a partir do treinamento de uma U-Net sobre o conjunto de dados rotulado.

Inicialmente, a base de imagens (cujas dimensões originais são de 2560×1920) foi dividida em um grupo de treinamento contendo 83% do total de imagens e teste, contendo 17% do total de imagens. Em seguida, fragmentos de tamanho 512×512 foram extraídos dessa imagem. Para evitar a presença de dados ruidosos

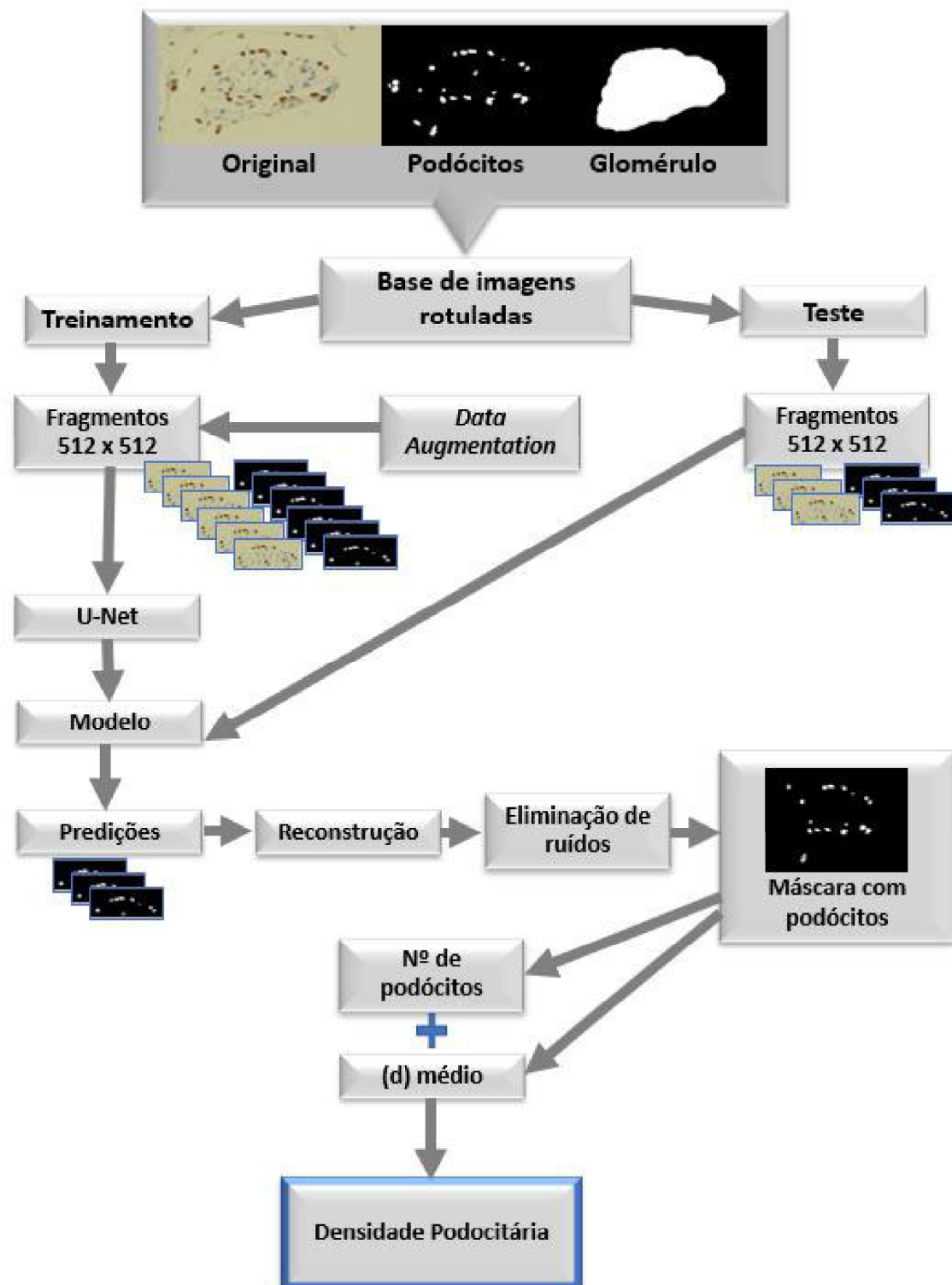
em ambos os conjuntos, tais fragmentos foram extraídos apenas de uma área de interesse da imagem: a região do glomérulo. Para tanto, foi utilizado o rótulo que indica a região do glomérulo, manualmente demarcada (Figura 9, imagem 3). Para o conjunto de dados disponível, a divisão proporcional de 83% e 17%, para imagens de treinamento e teste, respectivamente, foi escolhida de forma que a proporção no conjunto de treinamento e teste de fragmentos fosse de 80% e 20%, respectivamente. Sendo essa proporção comumente utilizada por algoritmos de aprendizado de Máquina supervisionado.

Uma vez que a quantidade de fragmentos extraídos das regiões de interesse (áreas glomerulares) são pequenas em relação a quantidade de dados necessária para a geração de um modelo com boa capacidade de generalização, o conjunto de treinamento contendo tais fragmentos é aumentado através de técnicas de data augmentation. Para a geração desses novos dados, foram realizadas operações de translação, rotação e espelhamento sobre os dados originais.

Após a etapa de data augmentation, os dados de treinamento são utilizados a fim de se gerar um modelo de U-Net com boa capacidade de generalização. O desempenho deste modelo é avaliado sobre o conjunto de fragmentos de teste. Após o modelo gerar as previsões sobre os podócitos presentes nos fragmentos de teste, tais valores preditos são limiarizados em fragmentos binários, e estes fragmentos são unidos de forma a reconstruir uma máscara binária que represente a segmentação de podócitos na imagem de teste original.

Após a reconstrução das imagens, ruídos tais como regiões muito pequenas segmentadas e regiões segmentadas fora da área glomerular são descartados. Em seguida, sobre essa máscara binária são calculadas, de maneira automática, a partir da análise de componentes conexas, informações como o número de podócitos segmentados e o diâmetro calibre médio (d), a partir dos quais se pode calcular valores tais como a densidade podocitária utilizando as Equações 2.1 e 2.2. Dessa forma, uma vez que se tem o modelo previamente treinado, o cálculo dessa densidade torna-se quase completamente automatizado, cabendo ao usuário definir apenas a região glomerular.

Figura 10 - Visão geral do método de segmentação automática de podócitos para cálculo de densidade podocitária.



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

4 EXPERIMENTOS E DISCUSSÃO

Nesta seção são apresentados alguns experimentos e discussões que validam o método proposto neste trabalho, comparando seus resultados aos já previamente publicados no estado da arte.

4.1 Validação da Segmentação, Contagem Manual de Podócitos e Cálculo de Densidade Podocitária em Rins Normais através da Marcação por Imuno-Histoquímica

Para replicar o estudo de Venkatareddy et al. (2014) foi mandatório atender um dos critérios principais para seleção de casos que era a exigência de pelo menos 8 tufo glomerulares por lâmina de biópsia. Em vista disso, 9 casos foram descartados nesta fase. Dos 07 casos selecionados e analisados manualmente, 4 eram do sexo masculino (57%), idade média à época da biópsia de $32 \pm 9,2$ anos, creatinina média na retirada do órgão de $1,03 \pm 0,21$ mg/dl, a causa do falecimento dos doadores foram trauma cranioencefálico em 5 casos e acidente vascular encefálico hemorrágico em 2 casos. Os resultados da podometria foram descritos nas tabelas 2 , 3 e 4.

Tabela 2 - Resultados da análise morfométrica manual de podócitos em lâminas de rins normais (continua)

Caso	Nº corrigido de podócitos por tufo (Nt)	(d) aparente em mm	(D) real em mm
Tx13/16	103,9	7,16	9,07
Tx14/16	56,5	7,35	9,33
Tx100/17	63,8	5,88	7,34
Tx53/18	50,5	7,68	9,77
Tx68/18	87,5	7,64	9,72
Tx71/18	70,9	6,15	7,7
Tx90/18	116,7	7,42	9,42

Tabela 2 - Resultados da análise morfométrica manual de podócitos em lâminas de rins normais (continuação)

Média±DP	78,5±24,9	7,04±0,7	8,09±0,9
-----------------	------------------	-----------------	-----------------

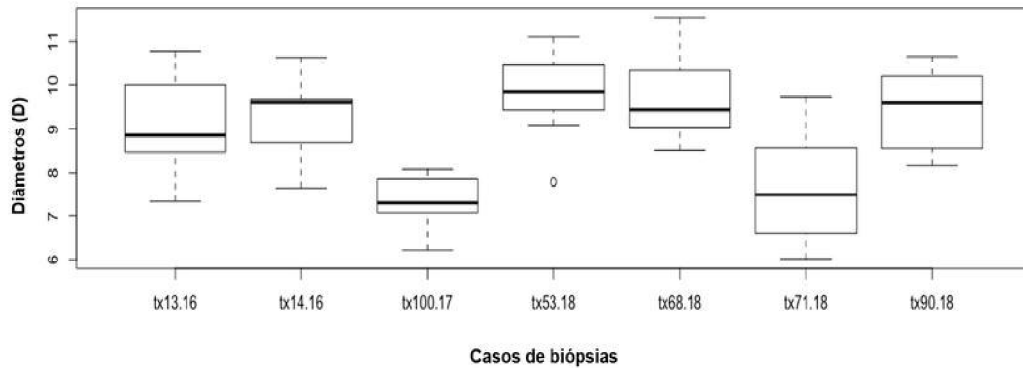
Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Tabela 3 – Resultados da contagem manual de podócitos em lâminas de rins normais

Caso	Nº de Glomérulos (ou tufos)	Nº podócitos Totais por lâminas	Média±DP de podócitos glomérulo	de por Valor Máximo de podócitos por glomérulo	Valor Mínimo por glomérulo
Tx13/16	14	418	29,8±5,9	41	20
Tx14/16	09	232	25,7±12	45	08
Tx100/17	09	220	24,4±13,5	56	10
Tx53/18	10	215	21,5±10,5	39	08
Tx68/18	12	371	30,9±12,2	58	20
Tx71/18	13	253	19,46±7,1	31	06
Tx90/18	15	483	32,2±11,7	56	16
Geral	82	2192	26,3±4,8	58	06
Média±DP/lâmina	11,7±2,4	313,1±109,3			
Valor Máx. por lâmina	15	483			
Valor Min. por lâmina	9	215			

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Figura 11 - Diâmetro médio real do calibre nuclear dos podócitos (D) de cada caso.



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Tabela 4 - Resultados da análise morfométrica manual de podócitos em lâminas de rins normais

Caso	Área total dos turfos glomerulares/lâmina em mm ²	Volume total dos turfos glomerulares/lâmina em mm ³ (VG)	Densidade podocitária em Podócitos 10 ⁶ mm ³ (Dpod)	Volume glomerular Por Podocito VG/P) em mm ³
Tx13/16	142.887	428.661	242	4.125
Tx14/16	90.641	271.923	208	4.816
Tx100/17	97.160	291.479	219	4.566
Tx53/18	90.348	271.046	186	5.368
Tx68/18	183.375	550.125	159	6.287
Tx71/18	150.781	452.342	157	6.378
Tx90/18	193.146	579.437	201	4.967
Média±DP	135.477±43.635	406.430±130.940	196±31	5.215±851

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

A Tabela 2 expressa a grande variabilidade de glomérulos e núcleos de podócitos entre as lâminas. Isto ocorre porque o volume de tecido glomerular capturado em cada biópsia é imprevisível, aspecto observado nos resultados da Tabela 4. Portanto, a contagem absoluta de células por biópsia não é adequada

para comparação de casos. Por outro lado, a razão de número de células por volume glomerular apresenta uma forte correlação linear ($R^2=0,89$), sendo adequada para comparar amostras com massas teciduais distintas (PAGTALUNAN et al., 1997). O artigo base Venkatareddy et al. (2014) apresentou os seguintes resultados na análise de rins de doadores de transplante ($n = 10$): densidade podocitária de 194 ± 46 podócitos/ 106mm^3 e média de (D) foi de $8,2\pm 0,3\text{mm}$. O resultado da densidade podocitária média do presente estudo foi de 196 ± 31 podócitos/ 106mm^3 (Tabela 4) e média de (D) foi de $8,09\pm 0,9\text{mm}$ (Tabela 3 e Figura 11).

Tabela 5 - Comparação dos resultados de densidade podocitária apresentados pela análise baseada em imuno-histoquímica com estudos publicados previamente utilizando imunofluorescência em rins de doadores de transplante

Referência	Dpod \pm desv. padrão
(VENKATAREDDY et al., 2014)	194 \pm 46
(ANDEEN et al., 2015)	181 \pm 71,4
(HODGIN et al., 2015)	211 \pm 60
(VESTRA et al., 2003)	263 \pm 110
(PAGTALUNAN et al., 1997)	235 \pm 25
Estudo atual	196\pm31
Média	213
1 desv. padrão	30,5
Coefficiente de variação - CV (%)	14

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Foi executada a mesma metodologia para comparação de resultados empregada pelo artigo base, que utilizou o Coeficiente de variação (CV) como métrica para avaliação de reprodutibilidade. O CV demonstrou a extensão da variabilidade em relação à média de densidade de podócitos nos estudos, comparando diferentes distribuições e possibilitando avaliar os resultados destes trabalhos, visto que, envolveram a mesma variável-resposta. Isto posto, observou-se que entre o presente estudo com marcação podocitária por IH e as demais referências da literatura, que aplicaram a IF, o CV obtido foi considerado baixo, menor que 15%. Permitindo assim, caracterizar a adequada precisão deste estudo em replicar os resultados obtidos previamente e favorecendo à hipótese de que a imunohistoquímica pode ser utilizada para identificação de núcleos de podócitos e aplicada à quantificação de densidade podocitária de forma semelhante à imunofluorescência

4.2 Validação do Uso da U-Net no Processo de Automatização da Segmentação, Contagem de Podócitos e Cálculo de Densidade Podocitária em Rins Normais através da Marcação por Imuno-Histoquímica

4.2.1 Configuração do Ambiente de Trabalho

Para este trabalho, foi utilizado um computador com o sistema operacional Ubuntu 18.04.2 LTS, com processador Intel® Core™ i7-7700HQ 3.8Gz, com placa Gráfica Nvidia Gforce GTX de 6Gb e 16Gb de memória RAM. O método proposto foi implementado na linguagem de programação Python 3.6. A API Keras foi utilizada no treinamento Rede Neural U-Net.

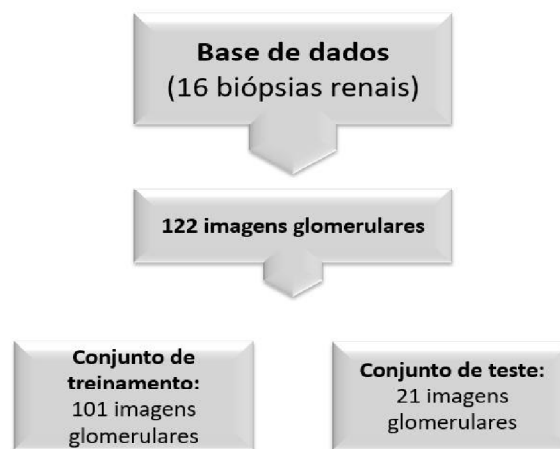
4.2.2 Modelagem da Base de dados

A base de dados para esta fase também foram imagens de microscopia óptica de glomérulos marcados por IH com anticorpo nuclear policlonal anti-WT1 adquiridas no Laboratório de Patologia Renal do HUUFMA, exemplificada pela Figura 8.

Para esta fase não foi exigido uma quantidade mínima de glomérulos por lâmina, pois o objetivo principal não foi calcular a densidade de podócitos e sim

dispor da maior quantidade de imagens nucleares possíveis para o desenvolvimento do método de segmentação automática de podócitos. Essa escolha se deu pelo fato de que algoritmos de AM tendem a requerer grandes amostras de dados devidamente balanceadas para que obtenham sucesso em sua predição. Partindo-se desta premissa, foram analisados todos os 16 casos marcados com IH, no total de 122 imagens glomerulares com 2977 imagens de núcleos de podócitos (Figura 12).

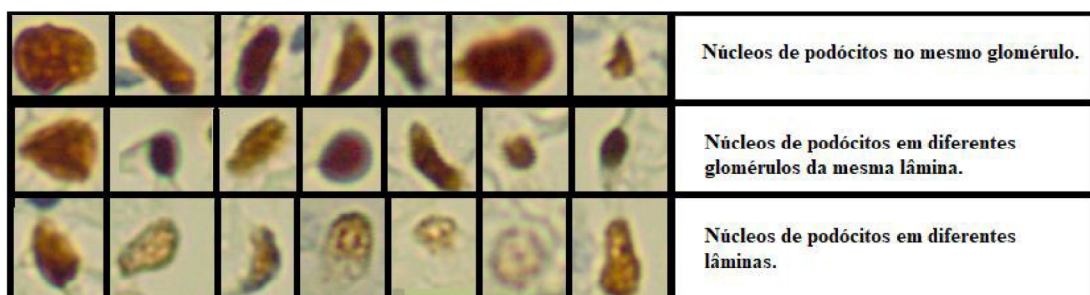
Figura 12 - Diagrama ilustrando a divisão da base de dados em conjunto de treinamento e conjunto de teste.



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Em relação ao desenvolvimento da Rede Neural, o desafio maior desta etapa foi o de estabelecer limiares de segmentação que incluíssem a maioria das diversas pigmentações e formas apresentadas pelos núcleos marcados por imuno-histoquímica (Figura 13), preservando um adequado padrão discriminativo.

Figura 13 - Variabilidade de forma e pigmentação dos núcleos de podócitos marcados com imuno-histoquímica pelo anticorpo anti-WT1.



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

4.2.3 Métricas de desempenho

Para avaliar os resultados de segmentação de podócitos produzidos pelo mo-delo treinado, foram utilizadas 5 métricas de desempenho: precisão (ou valor preditivo positivo), sensibilidade (ou taxa de acerto), especificidade, valor preditivo negativo e coeficiente de similaridade de Jaccard (Sj), também conhecido como Interseção Sobre União - IOU (Tabela 6). O grupo de imagens com identificação manual foi considerado como o padrão-ouro para comparação com o grupo de imagens geradas pela Rede Neural. Sendo assim, os pixels classificados como pertencentes a podócitos pela rede e confirmados na marcação manual foram reconhecidos como verdadeiros positivos (VP), os pixels de podócitos classificados erroneamente como background pela rede foram os falsos negativos (FN) e os pixels classificados como podócito, mas que na realidade eram background foram tidos como falsos positivos (FP).

Tabela 6 - Resultado do desempenho da Rede Neural para identificação de pixels pertencentes aos núcleos de podócitos nas imagens.

Sensibilidade	Especificidade	Precisão ou Valor Preditivo Positivo VP/(VP+FP)	Valor Preditivo Negativo VN/(VN+FN)	Taxa de FN ou Taxa de Erro (FN/FN+VP)	Coefficiente de Jaccard (Sj)
$VP/(VP+FN)$	$VN/(VN+FP)$				
0,80	0,99	0,91	0,99	0,19	0,89

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

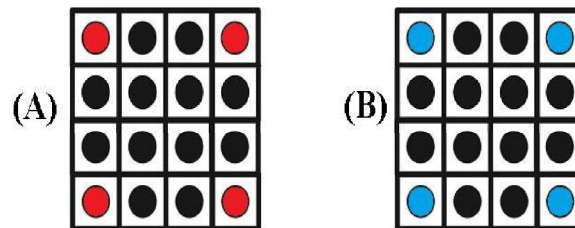
Para o desenvolvimento da Rede Neural priorizaram-se as configurações que proporcionaram uma arquitetura com melhor desempenho para a Precisão e Sensibilidade. Esta decisão foi baseada nos objetivos de análise que eram o reconhecimento de padrões e recuperação de informações com classificação binária, visto que, estas 2 métricas possibilitaram o estudo e compreensão da medida de relevância do processo. A Precisão de 91% informa que o algoritmo da Rede retornou substancialmente mais resultados relevantes (pixels VP) que

irrelevantes (pixels FP) entre todos os pixels classificados como pertencentes a podócitos pelo processo computacional, representando uma medida de alta exatidão e com poucos erros do tipo 1 (FP). A Sensibilidade de 80% representa que a maioria dos resultados relevantes da imagem binária (pixels VP) foram retornados, implicando em uma baixa ocorrência de erros do tipo 2 (FN) e excelente medida de completude desta análise. Na estimativa da Especificidade, 99% dos pixels classificados como não pertencentes a podócitos pela Rede Neural foram realmente confirmados como background (VN) e apenas 1% dos pixels classificados como pertencentes a podócitos pela Rede, na verdade eram background (FP). Na avaliação do Valor Preditivo Negativo, obteve-se que 99% dos pixels classificados pela rede como background foram confirmados como não pertencentes a podócitos e apenas 1% foram classificados erroneamente como background quando na verdade correspondiam a podócitos (FN). A taxa de Erro foi de 0,19, ou seja, 19% dos pixels pertencentes a podócitos (VP) foram classificados como negativos (FN) pela rede. O (Sj) quantificou em 89% a similaridade entre os pixels presentes nas máscaras manuais e os pixels das máscaras reconstruídas pela Rede Neural.

Na avaliação comparativa entre as imagens inteiras dos núcleos de podócitos geradas entre os grupos (manual x rede), foram identificados os núcleos VP que marcaram em ambas as máscaras, os FP que marcaram apenas nas máscaras da Rede e os FN que marcaram nas máscaras manuais e não marcaram nas da Rede (Figura 14). Através destes dados foi possível também calcular o (Sj) entre as imagens dos núcleos nos 2 grupos de máscaras binárias (Figura14).

Figura 14 - Ilustração do processo de comparação das máscaras: Imagem (A) foi considerada padrão-ouro (de referência) e Imagem (B) foi a de comparação. No presente estudo, representou a marcação manual e (B) a da Rede Neural. Sendo a (preto) = Verdadeiros Positivos (VP), b (azul) = Falsos Positivos (FP), c (vermelho) = Falsos Negativos (FN). (Sj) = Coeficiente de Jaccard ou Interseção sobre União.

Coeficiente de similaridade de JACCARD

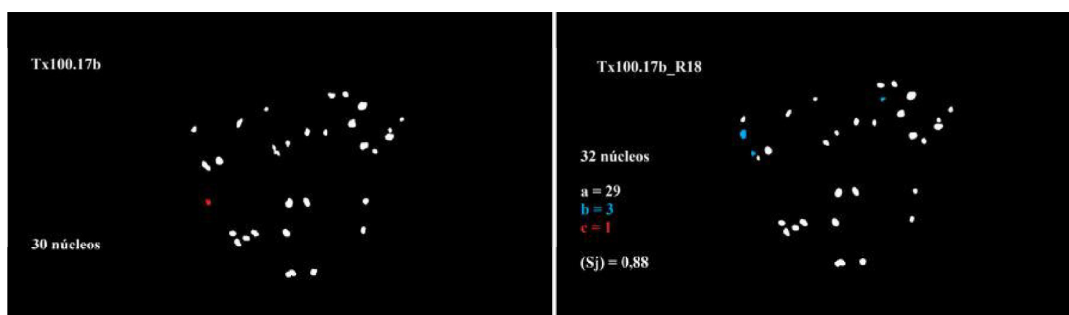


$$(S_j) = \frac{a}{a + b + c}$$

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Utilizando o Coeficiente de Jaccard observou-se uma similaridade geral dos núcleos de 85% entre as máscaras Manual e a da Rede (Tabela 7). Este resultado foi um pouco inferior ao (Sj) calculado entre os pixels das imagens (89,7%). Isto se deve ao fato de que em uma comparação foi verificado a existência ou não das estruturas nucleares completas em ambas as imagens (de referência e a da Rede) e na outra verificou-se similaridade entre todos os pixels, inclusive os do background, entre os 2 grupos de máscaras, contribuindo para uma maior proporção de similaridade (Figura 15).

Figura 15 - Avaliação comparativa entre as imagens binárias dos núcleos no Glomérulo Tx100.17b (marcação manual) e Tx100.17b_R18 (marcação pela Rede Neural). Onde a = (VP), b = (FP) e c = (FN). O índice de similaridade foi de 88% entre os núcleos destas 2 imagens e de 93% entre os pixels.



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Seguindo este mesmo raciocínio, obtiveram-se os seguintes resultados: VP de 92,6%, FP de 8,1% e FN de 7%. Os valores das métricas de cada imagem encontram-se descritos na Tabela 7.

Os atributos morfológicos de cada imagem (d, D, No, Nt, Dpod e GV/P) extraídos manualmente foram comparados com aqueles obtidos através da Rede Neural (Tabela 10). Desta forma foi possível para avaliar a relevância da capacidade discriminativa do processo computacional sobre a análise quantitativa das imagens. Considerando o fato que o grupo teste dispôs apenas de 21 imagens aleatórias de glomérulos e que não formavam um caso inteiro (imagens da mesma lâmina), utilizou-se o cálculo da densidade podocitária baseado em uma única imagem apenas para fins de comparação do método manual com a Rede Neural. Tendo ciência de que estes resultados não poderiam ser tomados para o cálculo real da densidade de podócitos de um indivíduo, pois, para este cenário seria necessário pelo menos 8 imagens glomerulares por caso.

Tabela 7 - Avaliação de similaridade entre as imagens binárias dos núcleos de podócitos pela marcação manual e pela Rede Neural

(continua)

Imagem	Nº núcleos					(Sj) entre as imagens dos núcleos
	Nº núcleos manual	Rede Neural	(VP)	(FP)	(FN)	
Tx71/18f	19	13	13	0	6	0,68
Tx68/18b	38	42	37	5	1	0,86
Tx100/17b	30	32	29	3	1	0,88
Tx68/18i	25	30	25	5	0	0,83
Tx05/16a	65	71	63	7	2	0,87
Tx53/18e	39	44	39	5	0	0,88
Tx68/18l	22	19	18	1	4	0,78
Tx13/16e	29	29	27	2	2	0,87

Tabela 7 - Avaliação de similaridade entre as imagens binárias dos núcleos de podócitos pela marcação manual e pela Rede Neural

						(conclusão)
Tx100/17f	26	28	26	2	0	0,92
Tx100/17e	13	13	12	1	1	0,86
Tx05/16b	24	22	20	2	4	0,76
Tx49/18b	20	17	16	1	4	0,76
Tx21/17d	13	16	12	3	1	0,75
Tx42/16c	13	14	12	1	0	0,92
Tx49/18a	42	43	41	2	1	0,93
Tx21/17f	28	29	27	2	1	0,90
Tx13/16i	26	25	24	0	2	0,92
Tx53/18f	15	14	14	0	1	0,93
Tx44/18b	09	08	08	0	1	0,89
Tx13/16o	23	18	18	0	5	0,78
Tx14/16c	08	09	07	1	0	0,87
Tot	527	536	488	43	37	0,85

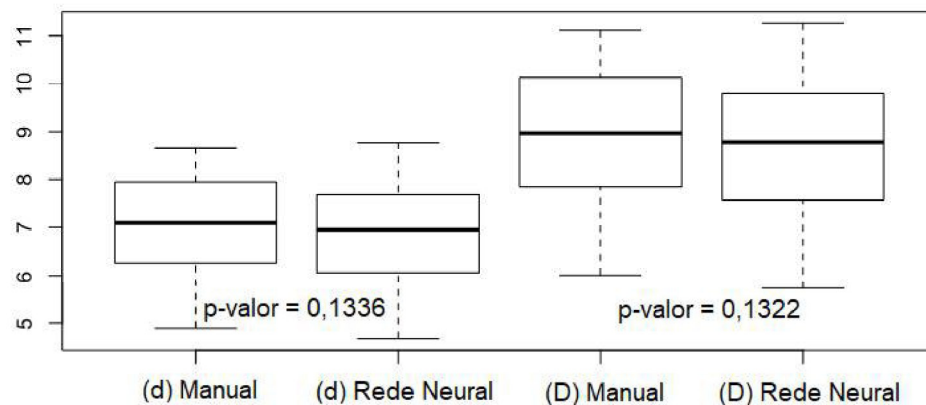
Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Tabela 8 - Resultados da avaliação manual e pela Rede Neural das imagens de Prodócitos

Avaliação	Média	Média	Média	Média	Média	Média	Média	
das	(d) em	(D) em	(No)	de (No)	(Nt)	de (Nt)	Média	
imagens	mm	mm		por		por	Dpod	
				imagem		imagem		
Manual	7,03±1,1	8,89±1,5	527	25,1±13	133	6,47±3,6	178,71±66	6,7±3,6
Rede	6,85±1	8,66±1,4	536	25,5±15	138	6,7±4,2	178,14±63	6,5±2,8
Diferenças (%)	-2,5	-2,5	+1,7	+1,6	+3,7	+3,55	-0,33	-3,6

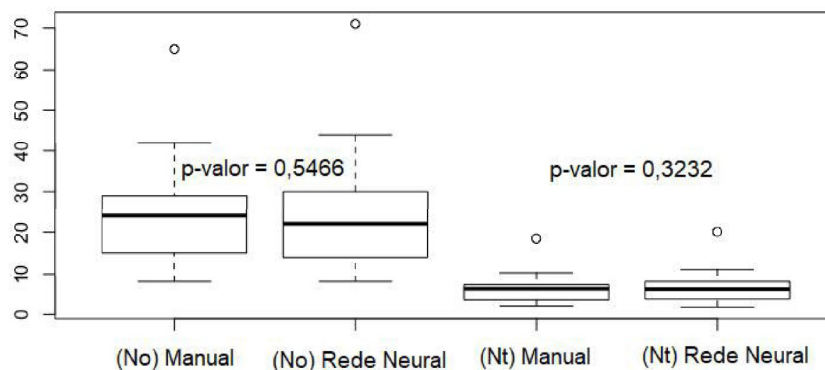
As médias dos resultados dos 6 atributos morfológicos extraídos pelo método Manual e pela Rede Neural (Tabela 10) foram testados de forma pareada, considerando a hipótese nula (H_0) de que os valores não teriam diferença entre as amostras. Para todos os valores testados não houve diferença estatisticamente significativa (nenhum p-valor $<0,05$), portanto, não foi possível rejeitar a H_0 e confirmou-se que os resultados dos valores encontrados pela Rede Neural são semelhantes aos obtidos através da identificação manual (Figuras 16, 17 e 18 dos gráficos em Boxplot).

Figura 16 - Médias dos diâmetros aparente (d) e real (D) aferidos de forma Manual e pela Rede Neural apresentaram ao Teste t de Student pareado resultados de p-valor $>0,05$, com I.C. de 95%.



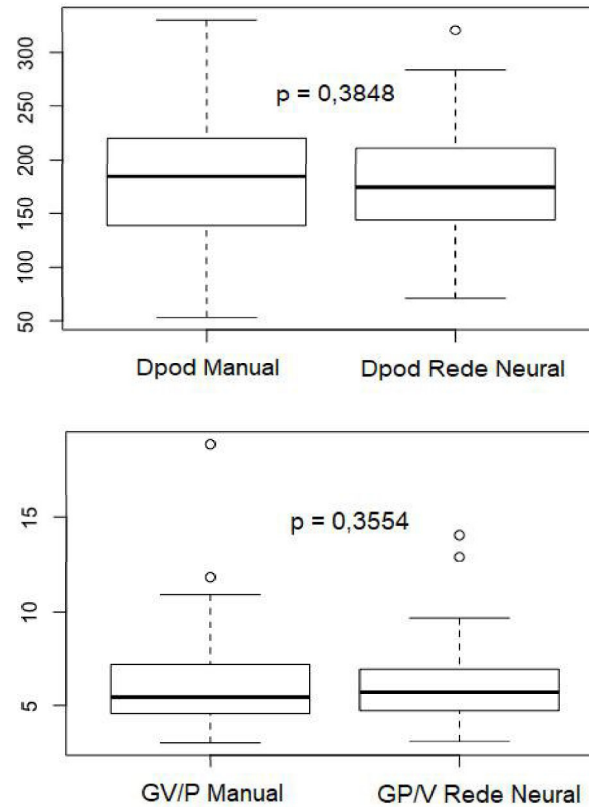
Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Figura 17 - Médias dos números de podócitos totais (No) e corrigidos (Nt) aferidos forma Manual e pela Rede Neural apresentaram ao Teste t de student pareado resultados de p-valor $>0,05$, com I.C. de 95%.



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Figura 18 - Médias das densidades podocitárias (Dpod) aferidas de forma Manual e pela Rede Neural (gráfico superior) e médias dos volumes glomerulares por podócito (GV/P) aferidos de forma Manual e pela Rede Neural (gráfico inferior) apresentaram ao Teste de Wilcoxon pareado resultados de p-valor >0.05 , com I.C. de 95%.



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

4.3 Aspectos Éticos

O projeto foi submetido em 23/05/2018 a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Alagoas através do cadastro online da pesquisa na Plataforma Brasil do Ministério da Saúde e aprovado em 28/06/2018 (CAAE: 91131418.3.0000.5013). Somente após esta aprovação, foi dado início a parte prática da pesquisa que envolve confecção de lâminas de microscopia óptica extraídas de blocos de parafina previamente coletadas para outros fins diagnósticos e que foram arquivadas no Laboratório de Patologia Renal no HU da Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA). Também foi necessário acesso às informações

contidas apenas nas fichas de biópsia (ver em anexo B) as quais constam dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, incluindo os laudos descritivos de cada biópsia. Não foi necessário ter acesso ao prontuário completo de cada participante. Por diversos motivos que estão descritos no anexo A, justificamos o declínio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

A proposta deste estudo estabeleceu que não haveria riscos diretos a saúde dos indivíduos participantes. Trata-se de um estudo retrospectivo no qual nenhum sujeito foi submetido a novas abordagens médicas (diagnósticas ou terapêuticas) para a realização desta pesquisa. Foi garantida a não violação da confidencialidade das informações dos participantes (Anexo A). As imagens selecionadas foram classificadas por sequências de números e/ou letras para não permitir acesso à identificação dos casos estudados por agentes externos ao estudo, sendo estes dados posteriormente analisados e apresentados de forma anônima.

4.4 Análise Estatística

Os dados foram expressos como média +/- desvio padrão (DP) para variáveis contínuas e em porcentagem para variáveis categóricas. O resultado da densidade po-docitária do presente estudo foi comparado com o do artigo base de (VENKATAREDDY et al., 2014) e de outros artigos do estado da arte através do Coeficiente de variação (CV).

Foi verificado se os resultados de cada uma das 6 variáveis analisadas (d, D, No, Nt, Dpod e VG/P) seguiram uma distribuição normal através da aplicação de 3 testes: Teste de Anderson-Darling, Teste de Shapiro-Wilk e Teste de Kolmogorov-Smirnov. O grau de confiança estabelecido para estes testes foi de $1 - \alpha = 0,95$. Se $p\text{-valor} < \alpha$ em pelo menos 2 testes, rejeitou-se a hipótese nula de que as distribuições das amostras poderiam ser aproximadas da distribuição normal.

Para as variáveis que seguiram uma distribuição normal, foi utilizado o Teste t pareado e para as outras variáveis o teste não-paramétrico de Wilcoxon pareado. Valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

5 CONCLUSÃO

Esta dissertação conseguiu verificar o uso da marcação podocitária por imuno-histoquímica com anticorpo anti-WT1, nesta série de casos, como uma técnica viável para se aplicar o cálculo da densidade podocitária com resultados semelhantes aos de Venkatareddy et al. (2014) e outros estudos do estado da arte que utilizaram a marcação padrão por imunofluorescência (Tabela 5). Esta conclusão pode permitir a aplicação da IH em futuros experimentos de quantificação podocitária, com as seguintes vantagens: menor exigência técnica para visualização das imagens (através da MO) e melhor disponibilidade do material para replicação (utiliza amostras de biópsias parafinadas conservadas em formalina e apresenta longa permanência de fixação da marcação nas lâminas).

A utilização da U-Net possibilitou a automatização do processo manual de quantificação da densidade podocitária pelo método do Fator de Correção através da criação de uma CNN com desempenho satisfatório tanto na identificação de pixels pertencentes aos podócitos, como para identificação dos núcleos podocitários. Apesar das dificuldades apresentadas pelas imagens, como a grande densidade de outras células que não são podócitos no compartimento glomerular e a alta heterogeneidade de pigmentação e variação morfológica dos núcleos marcados com IH, as métricas de desempenho apresentaram resultados que possibilitaram observar a importante capacidade discriminativa da rede. Tal fato foi verificado com avaliação comparativa entre as métricas aferidas através de identificação Manual e pela Rede Neural, confirmando que não houve diferença estatística entre os 2 grupos de resultados.

O uso da Rede Neural oferece a vantagem de não exigir um pré-processamento das imagens visto que a extração de características é automática e intrínseca ao processo. Além disso, pode ser generalizada para outros tipos de células ou biomarcadores celulares. Contudo, a principal utilidade prática atribuída a esta automatização foi a capacidade de otimizar o tempo utilizado no processo de quantificação de densidade celular, que em média na identificação manual pelo profissional foi necessário de 3 a 15 minutos por imagem neste estudo, e o mesmo resultado foi obtido pela Rede Neural em alguns segundos para todas as imagens.

Tal fato poderá viabilizar a inserção desta avaliação quantitativa na rotina diagnóstica do patologista, pois uma importante barreira técnica estaria sendo superada. Outros benefícios futuros poderão advir da disseminação deste recurso computacional, tais como: redução da subjetividade dos resultados e da classificação, quantidade maior de informações que poderão apoiar um diagnóstico e/ou decisão terapêutica e criação de ferramenta para predição de desfechos na doença renal crônica em diversos pacientes portadores de glomerulopatias.

Algumas limitações do processo foram observadas, como a avaliação manual por apenas um profissional, a dificuldade de diferenciar a sobreposição de núcleos em algumas imagens que poderiam interferir no diâmetro nuclear calculado, a quantidade limitada de imagens e a intensa variabilidade da marcação da IH pelo anticorpo anti-WT1. Todos estes obstáculos são passíveis de correção, fato que acrescenta um potencial significativo para futuras otimizações na rede.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, S. K., SETHI, S.; DINDA, A. K. Basics of kidney biopsy: A nephrologist's perspective. **Indian Journal of Nephrology**, Ahmedabad, v. 23, n. 4, p. 243–252, 2013. DOI: 10.4103/0971-4065.114462.
- ANDEEN, N. K. *et al.* The phenotypes of podocytes and parietal epithelial cells may overlap in diabetic nephropathy. **Kidney International**, New York, v. 88, n. 5, p. 1099–1107, 2015. DOI: 10.1038/ki.2015.273.
- BARISONI, L.; HODGIN, J. B. Digital pathology in nephrology clinical trials, research, and pathology practice. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, London, v. 26, n. 6, p. 450–459, 2017. DOI: 10.1097/MNH.0000000000000360.
- CHENG, H.; HARRIS, R. C. The glomerulus—a view from the outside—the podocyte. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Exeter, v. 42, n. 9, p. 1380–1387, 2010. DOI: 10.1016/j.biocel.2010.05.014.
- COSTA, D. M. do N. *et al.* Análise comparativa das glomerulopatias primárias e secundárias no nordeste do Brasil: dados do Registro Pernambucano de Glomerulopatias - REPEG. **Brazilian Journal of Nephrology**, São Paulo., v. 39, n. 1, p. 29–35, janeiro 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/0101-2800.20170005>.
- DANTAS, M. *et al.* **Glomerulopatias: patogenia, clínica e tratamento**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2012. ISBN: 978-8573782301.
- DE BRUIJNE, M. Machine learning approaches in medical image analysis: from detection to diagnosis. **Medical Image Analysis**, London, n. 33, p. 94–97, 2016. DOI: 10.1016/j.media.2016.06.032.
- ERICKSON, B. J. *et al.* Machine Learning for Medical Imaging. **Radiographics**, [Easton], v. 37, n. 2, p. 505–515, 2017. DOI: 10.1148/rg.2017160130.
- GARG, P. A Review of Podocyte biology. **American Journal of Nephrology**, Basel, v. 47 Suppl 1, p. 3–13, 2018. DOI: 10.1159/000481633.
- GOODFELLOW, I.; BINGIO, Y.; COURVILLE, A. **Deep learning**. Cambridge: MIT Press, 2016. (**Series:** Adaptive Computation and Machine Learning series). Disponível em: <https://www.deeplearningbook.org/>. Acesso em: ISBN-10: 0262035618 e ISBN-13: 978-0262035613
- GURCAN, M. *et al.* Histopathological Image analysis: a review. **IEEE Reviews in Biomedical Engineering**, Piscataway, v. 2, p. 147–171, 2009. DOI: 10.1109/RBME.2009.2034865.

HALEVY, A. Y.; NORVIG, P.; PEREIRA, F. The unreasonable effectiveness of data. **IEEE Intelligent Systems**, Washington, v. 24, n. 2, p. 8–12, 2009.

HAMILTON, P. W. *et al.* Digital pathology and image analysis in tissue biomarker research. **Methods (San Diego, Calif.)**, San Diego, v. 70, n. 1, p. 59–73, 2014. DOI: 10.1016/j.ymeth.2014.06.015.

HARA, M. *et al.* Immunohistochemical and urinary markers of podocyte injury. **Pediatric Nephrology: Journal of the International Pediatric Nephrology Association**, Berlin, v. 12, n. 1, p. 43–48, 1998.

HODGIN, J. B. *et al.* Glomerular Aging and Focal Global Glomerulosclerosis: a podometric perspective. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, Baltimore, v. 26, n. 12, p. 3162–3178, 2015. DOI: 10.1681/ASN.2014080752.

JENNETTE, J. C. *et al.* **Heptinstall's pathology of the kidney**. 7. ed. Philadelphia LWW, 2015. v. 1. ISBN: 9781451144116.

KIKUCHI, M. *et al.* Podometrics as a Potential Clinical Tool for Glomerular Disease Management. **Seminars in Nephrology**, [New York], v. 35, n. 3, p. 245–255, 2015. DOI: 10.1016/j.semnephrol.2015.04.004.

LANE, P. H. *et al.* Estimation of glomerular volume: a comparison of four methods. **Kidney International**, New York, v. 41, n. 4, p. 1085–1089, 1992. ISSN: 1523-1755 (Electronic).

LEMLEY, K. V. *et al.* Estimation of glomerular podocyte number: a selection of valid methods. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, Baltimore, v. 24, n. 8, p. 1193–1202, 2013. DOI: 10.1681/ASN.2012111078.

LEMLEY, K. V. *et al.* Podocytopenia and disease severity in IgA nephropathy. **Kidney international**, New York, v. 61, n. 4, p. 1475–1485, 2002. ISSN: 1523-1755 (Electronic).

LITJENS, G. *et al.* A survey on deep learning in medical image analysis. **Medical Image Analysis**, London, v. 42, p. 60–88, 8 2017. DOI: 10.1016/j.media.2017.07.005.

NAGATA, M. Podocyte injury and its consequences. **Kidney International**, New York, v. 89, n. 6, p. 1221–1230, 5 2016. DOI: 10.1016/j.kint.2016.01.012.

PAGTALUNAN, M. E. *et al.* Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 99, n. 2, p. 342–348, 1997. DOI: 10.1172/JCI119163.

PUELLES, V. G.; BERTRAM, J. F. Counting glomeruli and podocytes: rationale and methodologies. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, London, v. 24, n. 3, p. 224–230, 2015. DOI: 10.1097/MNH.0000000000000121.

PUELLES, V. G.; BERTRAM, J. F.; MOELLER, M. J. Quantifying podocyte depletion: theoretical and practical considerations. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 369, n. 1, p. 229–236, 2017. DOI: 10.1007/s00441-017-2630-z.

RANEFALL, P.; WESTER, K.; BENGTSSON, E. Automatic quantification of immunohistochemically stained cell nuclei using unsupervised image analysis. **Analytical Cellular Pathology**, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 29–43, 1998. DOI: 10.1155/1998/608293.

RATHORE, M. U. *et al.* Paraffin-based immunohistochemistry in the evaluation of glomerular diseases in renal biopsies. **Journal of the College of Physicians and Surgeons–Pakistan: JCPSP**, Karachi, v. 22, n. 6, p. 353–357, 2012. DOI: 06.2012/JCPSP.353357.

REISER, J.; ALTINTAS, M. M. Podocytes. **F1000Research**, London, v. 5, n. 114, p. 1–19, 2016. DOI: 10.12688/f1000research.7255.1.

RONNEBERGER, O.; FISCHER, P.; BROX, T. U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation. **Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention (MICCAI)**, Amsterdam, v. 9351, p. 234–241, 2015. DOI: 10.1007/978-3-319-24574-4_28.

SANDEN, S. K. *et al.* Evaluation of a thick and thin section method for estimation of podocyte number, glomerular volume, and glomerular volume per podocyte in rat kidney with Wilms' tumor-1 protein used as a podocyte nuclear marker. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, Baltimore, v. 14, n. 10, p. 2484–2493, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000089829.45296.7C>.

SEKULIC, M.; PICHLER SEKULIC, S. A compendium of urinary biomarkers indicative of glomerular podocytopathy. **Pathology Research International**, London, v. 2013, p. 782395, 2013. DOI: 10.1155/2013/782395.

STEFFES, M. W. *et al.* Glomerular cell number in normal subjects and in type 1 diabetic patients. **Kidney International**, New York, v. 59, n. 6, p. 2104–2113, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.00725.x>

SU, J. *et al.* Evaluation of podocyte lesion in patients with diabetic nephropathy: Wilms' tumor-1 protein used as a podocyte marker. **Diabetes Research and Clinical Practice**, Amsterdam, v. 87, n. 2, p. 167–175, 2010. DOI: 10.1016/j.diabres.2009.10.022.

THOMÉ, F. S. *et al.* Inquérito Brasileiro de Diálise Crônica 2017. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v. 41, n. 2, p. 208–214, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/2175-8239-jbn-2018-0178>.

VENKATAREDDY, M. *et al.* Estimating podocyte number and density using a single histologic section. **Journal of the American Society of Nephrology**: JASN, Baltimore, v. 25, n. 5, p. 1118–1129, 2014. DOI: 10.1681/ASN.2013080859.

VESTRA, M. D. *et al.* Is podocyte injury relevant in diabetic nephropathy? Studies in patients with type 2 diabetes. **Diabetes**, [New York], v. 52, n. 4, p. 1031–1035, 2003. DOI: <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.4.1031>.

WAGROWSKA-DANILEWICZ, M.; STASIKOWSKA, O.; DANILEWICZ, M. Immunoexpression of podocyte-associated proteins in acquired human glomerulopathies with nephrotic syndrome. **Polish Journal of Pathology**: Official Journal of the Polish Society of Pathologists, Kraków, v. 57, n. 1, p. 17–21, 2006.

WANNER, N. *et al.* Unraveling the role of podocyte turnover in glomerular aging and injury. **Journal of the American Society of Nephrology**: JASN, Baltimore, v. 25, n. 4, p. 707–716, 2014. DOI: 10.1681/ASN.2013050452.

WEIBEL, E. R.; GOMEZ, D. M. A principle for counting tissue structures on random sections. **Journal of Applied Physiology**, Washington, v. 17, p. 343–348, 1962. DOI: 10.1152/jappl.1962.17.2.343. ISSN: 1233-9687.

WHITE, K. E.; BILOUS, R. W. Estimation of podocyte number: A comparison of methods. **Kidney International**, New York, v. 66, n. 2, p. 663–667, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00787.x>.

WHITE, K. E. *et al.* Podocyte number in normotensive type 1 diabetic patients with albuminuria. **Diabetes**, [New York], v. 51, n. 10, p. 3083–3089, 2002. DOI: 10.2337/diabetes.51.10.3083.

WICKMAN, L. *et al.* Podocyte Depletion in Thin GBM and Alport Syndrome. **PLoS One**, San Francisco, v. 11, n. 5, p. e0155255, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0155255.

XIA, H.; BAO, W.; SHI, S. Innate Immune Activity in Glomerular Podocytes. **Frontiers in Immunology**, [Lausanne], v. 8, p. 122, 2017. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00122. eCollection 2017.

APÊNDICES

**APÊNDICE A – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DA PODOMETRIA APLICADA À
PATOLOGIAS GLOMERULARES EM HUMANOS**

Tabela 9 - Comparação entre artigos que avaliaram Dpod em rins humanos de doadores de transplante (grupo controle) e resultados da avaliação dos grupos de estudo.

Referência	Método	Nº de biópsias	Marcação Podocitária	Dpod dos pacientes do grupo controle (podócitos/10 ⁶ mm ³)	Resultados relevantes nos grupos de estudo
(PAGTALUNAN et al., 1997)	Weibel e Gomez	8	MO (marcação padrão) e ME.	235	
(STEFFES et al., 2001)	Weibel e Gomez Cavalieri	36	MO (marcação padrão) e ME.	218	Redução do N ^o de podócitos em DM para todas as idades.
(LEMLEY et al., 2002)	Weibel e Gomez	14	MO (marcação padrão) e ME.	152	Não houve diferença significativa de redução entre controle x IgA.
(WHITE et al., 2002)	Weibel e Gomez Cavalieri Disector/ fractionator	10	MO (marcação padrão) e ME.	193	Taxa de excreção de albumina correlacionou-se negativamente com o n ^o de podócitos.

APÊNDICE A. Revisão bibliográfica da podometria aplicada à patologias glomerulares em humanos

Referência	Método	Nº de biópsias	Marcação Podocitária	Dpod dos pacientes do grupo controle (podócitos/10 ⁵ mm ²)	Resultados relevantes nos grupos de estudo
(VESTRA et al., 2003)	Weibel and Gomez	23	MO (marcação padrão) e ME.	263	Mudanças na densidade dos podócitos ocorrem desde os estágios iniciais da nefropatia diabética e podem contribuir para o aumento da albuminúria.
(SU et al., 2009)	Weibel and Gomez	10	IF, anti-corpo policlonal anti-WT1.	365	Nº de podócitos diminuiu 30-51% em pacientes com DM. Correlação negativa da densidade e proteinúria.
(VENKATAREDDY et al., 2014)	Fator de correção (CF method)	10	IF, Ac. Anti-WT1 e anti-TLE4.	194	Validação de método para cálculo de densidade baseado em seção única.
(ANDEEN et al., 2015)	Fator de correção (CF method)	19	IH: anti-WT-1 e anti-p57.	181	O diâmetro nuclear médio do podócito foi aumentado em DM avançada.

APÊNDICE A. Revisão bibliográfica da podometria aplicada à patologias glomerulares em humanos

Referência	Método	Nº de biópsias	Marcação Podocitária	Dpod dos pacientes do grupo controle (podócitos/10 ⁵ mm ²)	Resultados relevantes nos grupos de estudo
(VESTRA et al., 2003)	Weibel and Gomez	23	MO (marcação padrão) e ME.	263	Mudanças na densidade dos podócitos ocorrem desde os estágios iniciais da nefropatia diabética e podem contribuir para o aumento da albuminúria.
(SU et al., 2009)	Weibel and Gomez	10	IF, anti-corpo policlonal anti-WT1.	365	Nº de podócitos diminuiu 30-51% em pacientes com DM. Correlação negativa da densidade e proteinúria.
(VENKATAREDDY et al., 2014)	Fator de correção (CF method)	10	IF, Ac. Anti-WT1 e anti-TLE4.	194	Validação de método para cálculo de densidade baseado em seção única.
(ANDEEN et al., 2015)	Fator de correção (CF method)	19	IH: anti-WT-1 e anti-p57.	181	O diâmetro nuclear médio do podócito foi aumentado em DM avançada.

APÊNDICE A. Revisão bibliográfica da podometria aplicada à patologias glomerulares em humanos

Referência	Método	Nº de biópsias	Marcação Podocitária	Dpod dos pacientes do grupo controle (podócitos/10 ⁶ mm ³)	Resultados relevantes nos grupos de estudo
(HODGIN et al., 2015)	Fator de correção (CF method)	89	IF Ac. anti-TLE4.	Idade: <18 a(318), 19-45a(211), 46-60a(151), >60a(121).	Redução de 0,9% na densidade de podócitos por ano.
(WICKMAN et al., 2016)	Fator de correção (CF method)	17	IF Ac. anti-TLE4.	309	Idade entre 4-17 anos. Pacientes portadores de S. de Alport com redução da densidade (203).

APÊNDICE B - DADOS DA ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os dados abaixo foram analisados no programa de estatística RStudio:

Foi verificado se os resultados de cada uma das 6 variáveis analisadas (d, D, No, Nt, Dpod e VG/P) seguiram uma distribuição normal através da aplicação de 3 testes: Teste de Anderson-Darling, Teste de Shapiro-Wilk e Teste de Kolmogorov-Smirnov. O grau de confiança estabelecido para estes testes foi de $1 - \alpha = 0,95$. Se $p\text{-valor} < \alpha$ em pelo menos 2 testes, rejeitou-se a hipótese nula de que as distribuições das amostras poderiam ser aproximadas da distribuição normal.

Para as variáveis que seguiram uma distribuição normal, foi utilizado o Teste t pareado e para as outras variáveis o teste não-paramétrico de Wilcoxon pareado. Valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

- Verificação da distribuição das amostras para as variáveis:

- 1) d) aparente Manual e (d) aparente Rede: Statistic p-value Shapiro-Wilk normality test 0.97300 0.7982 One-sample Kolmogorov-Smirnov test 0.09805 0.9756 Anderson-Darling normality test 0.19825 0.8699 [1] "NORMAL" Paired t-test data: manual_values and network_values t = 1.5637, df = 20, p-value = 0.1336 alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0 95 percent confidence interval: -0.05620741 0.39280058 sample estimates: mean of the differences 0.1682966.
- 2) (D) real Manual e (D) real Rede: Statistic p-value Shapiro-Wilk normality test 0.9378 0.1974 One-sample Kolmogorov-Smirnov test 0.1073 0.9480 Anderson-Darling normality test 0.3784 0.3747 [1] "NORMAL" Paired t-test data: manual_values and network_values t = -4.048, df = 20, p-value = 0.0006288 alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0 95 percent confidence interval: -8.316865 -2.660278 sample estimates: mean of the differences -5.488571.
- 3) N° de podócitos Manual e N° de podócitos Rede: Statistic p-value Shapiro-Wilk normality test 0.9767 0.8706 One-sample Kolmogorov-Smirnov test 0.1223 0.9840 Anderson-Darling normality test 0.1985 0.8692 [1] "NORMAL" Paired t-test data: manual_values and network_values t = -

0.61322, df = 20, p-value = 0.5466 alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0 95 percent confidence interval: -1.886413 1.029270 sample estimates: mean of the differences -0.4285714

- 4) N° de podócitos corrigido manual e N° de podócitos corrigido Rede: Statistic p-value Shapiro-Wilk normality test 0.9309 0.1433 One-sample Kolmogorov-Smirnov test 0.1379 0.8381 Anderson-Darling normality test 0.4455 0.2559 [1]

“NORMAL” Paired t-test data: manual_values and network_values t = -1.013, df =20, p-value = 0.3232 alternative hypothesis: true difference in means is not equalto 0 95 percent confidence interval: -0.6992397 0.2420968 sample estimates:mean of the differences -0.2285714.

- 5) D.Pod manual e D.Pod rede: Statistic p-value Shapiro-Wilk normality test 0.8182 0.001261 One-sample Kolmogorov-Smirnov test 0.1524 0.686013 Anderson-Darling normality test 1.2184 0.002695 [1] “NAO NORMAL” Wilcoxon signed rank test with continuity correction data: manual_values and network_values V = 90, p-value = 0.3848 alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0.
- 6) (GV/P) Manual e (GV/P) Rede: Statistic p-value Shapiro-Wilk normality test 0.7250 5.738e-05 One-sample Kolmogorov-Smirnov test 0.1633 8.864e-01 Anderson-Darling normality test 2.2258 7.266e-06 [1] “NAO NORMAL” Wilcoxon signed rank test with continuity correction data: manual_values and network_values V = 98, p-value = 0.3183 alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0.

ANEXOS

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Ao: **COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP) UFAL :**

Solicito a dispensa da aplicação do Termo de consentimento livre e esclarecido do projeto de pesquisa intitulado **“Processamento computacional de imagens de microscopia óptica para quantificação das variáveis histopatológicas relacionadas às lesões de podócitos na nefrite lúpica.”** para o material utilizado no “grupo controle” da pesquisa, com as seguintes justificativas:

- 1) Trata-se de pesquisa retrospectiva com uso de imagens de microscopia óptica provenientes de lâminas de tecido renal adquiridas de forma protocolar durante o processo de transplante renal com doador falecido, cuja a indicação foi avaliar a viabilidade do órgão antes de transplantá-lo, e após o procedimento permanecem arquivadas em um laboratório de patologia. Nestes casos, as informações pessoais dos doadores e suas características clínicas/laboratoriais estão sobre sigilo com a Central de Doação de Órgãos responsável pelo procedimento e com o laboratório de patologia. Não será necessário à nossa pesquisa ter acesso a estes dados, apenas as imagens microscópicas que serão identificadas de forma alfanumérica, sem risco de violar o anonimato dos participantes.
- 2) Em todos os casos, os pacientes doadores de rim já vieram a óbito.
- 3) Dificil localização de familiares, pois os mesmos não frequentam o hospital e os consultórios dos médicos responsáveis pelo processo de transplante no qual seu parente foi um doador após a morte.
- 4) Os pacientes foram atendidos há muito tempo e o endereço ou telefone já não devem ser os mesmos e estão sobre sigilo da instituição responsável pelo transplante conforme Legislação brasileira sobre doação de órgãos humanos e de sangue. – 2. ed. – Brasília : Câmara dos Deputados, Edições Câmara, 2009, capítulo II, art.14, inciso 4º “Os estabelecimentos de saúde e as equipes especializadas firmarão compromisso, no pedido de

autorização, de que se sujeitam à fiscalização e ao controle do poder público, facilitando o acesso de seus agentes credenciados a instalações, equipamentos e prontuários, observada, quanto a estes, a necessária habilitação, em face do caráter sigiloso destes documentos, conforme for estabelecido pelo Conselho Federal de Medicina.”

- 5) A aplicação do TCLE aos familiares do doador violaria o compromisso da Central de Doação de Órgãos e da equipe de transplante renal com a privacidade e a confidencialidade dos dados utilizados no processo, pondo em risco o anonimato do sujeito e de seus familiares.
- 6) Os dados obtidos na pesquisa somente serão utilizados para o projeto vinculado.

Solicito a dispensa da aplicação do Termo de consentimento livre e esclarecido do projeto de pesquisa intitulado “**Processamento computacional de imagens de microscopia óptica para quantificação das variáveis histopatológicas relacionadas às lesões de podócitos na nefrite lúpica.**” para o material utilizado no “grupo de estudo” da pesquisa, com as seguintes justificativas:

- 1) Tratar-se de um estudo observacional, analítico ou descritivo retrospectivo, que empregará apenas informações provenientes das fichas de protocolo de biópsia renal (vide anexo B) disponíveis na instituição e não será utilizado o prontuário médico integral dos participantes. A utilização de material biológico está restrita a aquisição de imagens de lâminas de microscópio as quais encontram-se arqui-vadas após utilização em procedimentos diagnósticos prévios e independentes da pesquisa.
- 2) Todos os dados serão manejados e analisados sem identificação nominal dos participantes de pesquisa.
- 3) Os resultados decorrentes do estudo serão apresentados de forma agregada, não permitindo a identificação individual dos participantes.
- 4) Trata-se de um estudo não intervencionista (sem outras intervenções clínicas durante o desenvolvimento da pesquisa) e sem alterações/influências na rotina/tratamento do participante de pesquisa, e

consequentemente sem adição de riscos ou prejuízos ao bem-estar dos mesmos.

- 5) O laboratório de patologia do HUUFMA é de referência nacional para a rede de Hospitais das Universidades Federais, portanto, recebe material de biopsia renal de diversos estados da federação. Estes materiais vêm acompanhados apenas de uma ficha de protocolo de biópsia renal (vide anexo B) cujos dados serão utilizados nesta pesquisa. Não é possível ter acesso aos prontuários médicos dos pacientes porque o laboratório de patologia da UFMA não tem a posse da maioria deles que estão arquivados em outras instituições (Hospitais Universitários) e a distância geográfica entre as origens dos pacientes que foram biopsiados é mais um fator importante que inviabiliza o acesso aos prontuários e também à aplicação do TCLE aos participantes.

O investigador principal e demais colaboradores envolvidos no estudo acima se comprometem, individual e coletivamente, a utilizar os dados provenientes deste, apenas para os fins descritos e a cumprir todas as diretrizes e normas regulamentadoras descritas na Res. CNS Nº 466/12, e suas complementares, no que diz respeito ao sigilo e confidencialidade dos dados coletados.

Atenciosamente,

Rafael Fernandes Vanderlei Vasco - Pesquisador responsável pelo estudo.

Michelle Jacintha Cavalcante Oliveira - Orientadora do estudo.

Fabiane da Silva Queiroz - Co orientadora do estudo.

Gyl Eanes Barros Silva - Pesquisador colaborador do estudo.

Maceió, ____ de _____ de 20__.

ANEXO B – FICHA DE BIÓPSIA RENAL DO LABORATÓRIO DE PATOLOGIA DA UFMA

Figura 19 – Ficha utilizada para coleta de dados dos pacientes submetidos à



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO

LABORATÓRIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA E MICROSCOPIA ELETRÔNICA

PROTOCOLO DE BIÓPSIA RENAL



Nome: _____ Sexo: _____ Cor: _____

Prontuário: _____ Naturalidade: _____ DN: ____/____/____ BR _____

História: _____

AMF: _____

AMP: _____

CREATININA: _____

URÉIA: _____

PROTEINURIA: _____

URINA I: _____

SOROLOGIAS: _____

COMPLEMENTO: _____ ALBUMINA: _____

AUTOANTICORPOS: _____

HEMOGRAMA: _____

DISMORFISMO: _____

OUTROS: _____

MEDICAÇÕES: _____

ULTRASSOM: _____

HIPÓTESE DIAGNÓSTICA: _____ DATA: ____/____/____

ANEXO C – FORMULÁRIO PARA COLETA DE INFORMAÇÕES.

Figura 20 – Formulário que foi utilizado para coleta de dados de cada caso que será analisado no projeto.



Universidade Federal de Alagoas

Instituto de Computação da UFAL

Pós-graduação em Modelagem Computacional do Conhecimento

Projeto: "Processamento computacional de imagens de microscopia óptica para quantificação das variáveis histopatológicas relacionadas às lesões de podócitos na nefrite lúpica."

FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS

Caso N° _____

N° da Imagem		Proteinúria de 24h	
Idade		Complemento	
Sexo		Classe de Nefrite Lúpica	
Creatinina		N° de glomérulos	
Ureia		Índice de Atividade	
Albumina		Índice de Cronicidade	
ANÁLISE COMPUTACIONAL DAS IMAGENS			
Glomérulo	N° de podócitos	Volume Glomerular	Densidade podocitária
Total			

ANEXO D - DECLARAÇÃO DE CUMPRIMENTO, PUBLICIZAÇÃO E DESTINAÇÃO DOS DADOS/MATERIAIS COLETADOS.

Figura 21 - Declaração de Cumprimento, Publicização e Destinação dos Dados/ Materiais Coletados.

DECLARAÇÃO DE CUMPRIMENTO DAS NORMAS DA RESOLUÇÃO 466/12, DE PUBLICIZAÇÃO DOS RESULTADOS E SOBRE O USO E DESTINAÇÃO DO MATERIAL/DADOS COLETADOS

Rafael Fernandes Vanderlei Vasco – pesquisador responsável pelo projeto, Fabiane da Silva Queiroz – Coordenadora, Gyl Eanes Barros Silva - Pesquisador colaborador do estudo e Michelle Jacintha Cavalcante Oliveira - Orientadora do estudo, pesquisadores do projeto intitulado : *“Processamento computacional de imagens de microscopia óptica para quantificação das variáveis histopatológicas relacionadas às lesões de podócitos na nefrite lúpica.”*, ao tempo em que nos comprometemos em seguir fielmente os dispositivos da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/MS, asseguramos que os resultados da presente pesquisa serão tornados públicos sejam eles favoráveis ou não, bem como declaramos que os dados coletados para o desenvolvimento do projeto e imagens de lâminas de microscopia óptica serão utilizados para desenvolver uma técnica computacional de avaliação de alterações presentes em imagens de podócitos marcados com anticorpo anti-WT1 em biopsias renais e, após conclusão da pesquisa, serão armazenados por 5 anos em banco de dados no laboratório de patologia renal pertencente ao Hospital Universitário da UFMA de onde foram utilizadas as amostras para o estudo. As lâminas são de guarda permanente do laboratório de patologia da UFMA, sem prazo para descarte.

Maceió, de de .

Rafael Fernandes Vanderlei Vasco _____

Fabiane da Silva Queiroz _____

Gyl Eanes Barros Silva _____

Michelle Jacintha Cavalcante _____

ANEXO E - TABELAS COMPLETAS

Tabela 10 - Resultados da avaliação manual de imagens glomerulares e pela Rede Neural.

Imagem: Manual x Rede Neural	(d) aparente em mm	(D) real em mm	Nº de po- dócitos	Nº de po- dócitos corrigido	D.P.*	(GV/P)**	Coefficiente de Jaccard (Sj) para similaridade entre pixels dos núcleos
Tx71/18f	4,89	6,01	19	6,3	238	4.207	
Tx71/18fR	4,46	5,44	12	4,3	160	6.240	0,88
Tx68/18b	7,09	8,97	38	9,5	171	5.838	
Tx68/18bR	6,54	8,23	38	10,2	183	5.475	0,81
Tx100/17b	5,04	6,21	30	9,8	253	3.958	
Tx100/17bR	4,53	5,54	30	10,5	273	3.667	0,91
Tx68/18i	7,88	10,05	25	5,7	85	11.815	
Tx68/18iR	7,14	9,04	31	7,7	114	8.794	0,86
Tx05/16a	6,05	7,57	65	18,5	220	4.540	
Tx05/16aR	5,74	7,15	66	19,5	233	4.295	0,83
Tx53/18e	7,95	10,14	39	8,9	184	5.424	
Tx53/18eR	7,72	9,83	41	9,6	199	5.037	0,83
Tx68/18l	7,17	9,08	22	5,5	170	5.883	
Tx68/18lR	6,72	8,47	16	4,2	130	7.681	0,85

ANEXO E. Tabelas completas

Tx13/16e	8,41	10,77	29	6,3	202	4.939	
Tx13/16eR	7,47	9,49	29	7	223	4.480	0,91
Tx100/17f	6,26	7,85	26	7,2	185	5.411	
Tx100/17fR	5,59	6,95	33	10	256	3.909	0,86
Tx100/17e	6,42	8,07	13	3,5	249	4.014	
Tx100/17eR	6,29	7,89	15	4,1	292	3.423	0,93
Tx05/16b	6,16	7,72	24	6,7	331	3.024	
Tx05/16bR	6,39	8,03	27	7,3	362	2.766	0,89
Tx49/18b	6,37	8	20	5,5	214	4.667	
Tx49/18bR	5,87	7,33	17	4,9	194	5.166	0,89
Tx21/17d	8,66	11,11	13	2,8	53	18.853	
Tx21/17dR	7,26	9,2	18	4,4	85	11.777	0,86
Tx42/16c	6,99	8,84	13	3,3	139	7.211	
Tx42/16cR	7,22	9,15	19	4,7	197	5.064	0,84
Tx49/18a	7,28	9,23	42	10,3	162	6.187	
Tx49/18aR	6,48	8,15	45	12,1	190	5.263	0,78
Tx21/17f	7,97	10,17	28	6,4	101	9.912	
Tx21/17fR	7,83	9,98	28	6,5	102	9.769	0,89
Tx13/16i	7,9	10,07	26	6,0	159	6.296	
Tx13/16iR	6,83	8,62	23	5,9	158	6.327	0,85
Tx53/18f	8,29	10,6	15	3,3	211	4.741	
Tx53/18fR	7,57	9,62	15	3,6	227	4.399	0,92
Tx44/18b	8,25	10,55	9	2	92	10.925	
Tx44/18bR	7,97	10,17	9	2,1	94	10.618	0,92

ANEXO E. Tabelas completas

Tx13/16o	6,43	8,08	23	6,2	220	4.551	
Tx13/16oR	6,91	8,73	18	4,6	162	6.155	0,82
Tx14/16c	6,11	7,65	8	2,3	114	8.799	
Tx14/16cR	5,39	6,68	9	2,8	141	7.111	0,96
Geral	7,03	8,89	527	133	164	6.086	
Geral R	6,57	8,27	529	140,8	174	5.745	0,87
Diferenças (%)	- 6,5	- 6,8	+ 0,38	+5,8	+6,1	- 5,6	

*Densidade podocitária em podócitos/106mm³, ** Volume glomerular por podócito (GV/P) em mm³

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).