

# Adaptação de algoritmos na segmentação e classificação de esferoides celulares em imagens de tomografia de coerência óptica (OCT)

A P A Corrêa<sup>1,2</sup>; L C Boldrini<sup>1,2</sup>; G A Miranda<sup>2</sup>; L S Baptista <sup>1,2</sup>; A P D Alvarenga <sup>1,3</sup> I B Couceiro <sup>1,3</sup>; J M Granjeiro<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro), 25250-020 Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil

<sup>2</sup>: Laboratório de Bioengenharia Tecidual, Diretoria de Metrologia Aplicada as Ciências da Vida

<sup>3</sup>: Laboratório de Aplicações Ópticas, Divisão de Metrologia Óptica, Diretoria de Metrologia Científica e Industrial

[lcboldrini@inmetro.gov.br](mailto:lcboldrini@inmetro.gov.br)

**Resumo.** Nos últimos anos, o uso de esferoides celulares em pesquisas biomédicas tem mostrado um potencial promissor para experimentos laboratoriais. No entanto, garantir métodos confiáveis de controle de qualidade para essas culturas de células ainda é essencial. Técnicas tradicionais, como a microscopia óptica, ainda são amplamente utilizadas para avaliações quantitativas, mas há um crescente interesse em explorar alternativas como a Tomografia de Coerência Óptica (OCT, na sigla em inglês). A OCT emergiu como uma modalidade competente para obter imagens 3D de alta resolução, sem a necessidade de rótulos e não destrutiva de esferoides celulares, permitindo cálculos precisos e rastreabilidade metrológica. Embora apresentando resultados promissores, a análise de imagens médicas ainda carece de métodos automatizados e amigáveis ao usuário para segmentação e análise de imagens. Portanto, neste estudo, nos concentramos em adaptar metodologias que utilizam algoritmos capazes de classificar e segmentar objetos de interesse em imagens tomográficas de esferoides celulares. Foram feitos ajustes no algoritmo Mask R-CNN com intuito de implementá-lo na segmentação de objetos de interesse em imagens de OCT. Além disso, os resultados obtidos são promissores em relação à adaptação de algoritmos de aprendizado de máquina para a segmentação de amostras em imagens, permitindo-nos vislumbrar seu uso em atividades mais complexas, como análises morfológicas, como volume e esfericidade.

## 1. Introdução

Durante mais de um século, cientistas em todo o globo trabalham arduamente no aprimoramento e desenvolvimento de novas técnicas de cultivo celular. É dito que até mesmo anteriormente ao surgimento da presumivelmente mais popular linhagem celular humana, a HeLa, diversos relatos a respeito do estudo de formas de manutenção de células in vitro já estavam presentes nos anais da literatura científica de seu tempo [1], [2]. Técnicas de cultura de células atuam até o presente como importantes ferramentas na construção de conhecimento aplicado em uma miríade de áreas englobando

a biologia celular e molecular, o estudo do mecanismo de doenças e ação de fármacos, processos de produção proteica e no desenvolvimento da engenharia tecidual [3], [4].

Apesar de modalidades bidimensionais de cultivo celular sejam utilizadas há décadas, é sabido que a capacidade de mimetizar o estado *in vivo* de seus tecidos de origem é limitada, particularmente quando comparadas as técnicas de cultivo tridimensional [3]–[6]. De fato, o cultivo 3D vem representando uma parcela inovadora das abordagens de estudos celulares, permitindo à cientistas a observação e manipulação de células em ambientes de complexidade mais semelhante ao seu ambiente de origem. Desta forma, o cenário atual implica que a implementação de técnicas de cultivo 3D tem demonstrado relatos positivos a respeito da condução de experimentos mais avançados ante a comparação entre esta e as técnicas em duas dimensões [6]. Esta comparação se apoia justamente na observação de um maior potencial mimético do ambiente celular *in vivo* proporcionado por culturas 3D, visto este virtualmente proporcionar dados mais precisos em experimentos *in vitro* em áreas como *drug discovery*, estudos de interação entre células e biomarcadores, perfílaxim metabólica, caracterização de tumores e estudos de células tronco [4]–[6].

De maneira sintética, esferoides são estruturas celulares tridimensionais formadas através do processo chamado automontagem [7]. O primeiro contato direto entre as células e a carência de um arcabouço de fixação proporcionam a sua agregação através de moléculas de adesão célula-célula, em especial caderinas encontradas nas superfícies celulares. O acúmulo destas moléculas de adesão leva a compactação estrutural resultando na formação de esferoides [7], [8]. Outrossim, a competência de fusão entre si proporciona que estes sejam utilizados na geração de tecidos mais complexos [9], fatores que tornam esferoides ainda mais atraentes nas áreas de engenharia tecidual, triagem de fármacos e medicina regenerativa [7]. Ademais, cabe relatar a presença de alusões promissoras quanto ao progresso no uso de esferoides em áreas de pesquisas básicas e aplicadas como, potencialmente, em estudos de regeneração tecidual [10], [11].

Uma das inúmeras preocupações relativas a este campo é a mensuração de dados obtidos por parte de esferoides onde, especificamente, o presente trabalho se encontra no que se refere à extração de dados a partir de imagens geradas por tomografia de coerência óptica (OCT). Anteriormente [12], discutimos o cenário metodológico atual e algumas de suas principais técnicas, onde a quantificação de parâmetros ainda, por vezes, se alicerça em modalidades centenárias, utilizadas amplamente na pesquisa e produção científica [13]. Através da exploração de um panorama de técnicas de quantificação baseadas, sobretudo, em microscopia óptica [14], [15] e, conseqüentemente, imagens unidirecionais, demonstramos, através dos resultados apresentados [12], algumas de suas principais vulnerabilidades e possíveis conseqüências e vieses gerados a partir da utilização de dados coletados por tais métodos. Paralelamente, utilizamos a tomografia de coerência óptica (OCT) como uma alternativa a tais metodologias. De fato, os resultados provenientes dos experimentos realizados corroboraram o cenário observado nos últimos anos, onde a OCT é referenciada como uma modalidade competente na obtenção de dados quantitativos ao produzir capturas tridimensionais de esferoides em escala microscópica de maneira não destrutiva, gerando imagens em alta resolução de microestruturas, sendo capaz de resolver a morfologia de amostras em um ambiente tridimensional *in silico*, apto a realização de cálculos computacionais precisos [12], [14], [16].

A partir de um prisma técnico, a captura de imagens por meio da OCT tem a interferência de luz como princípio fundamental e, em geral, estes possuem hardwares voltados a tal fenômeno. Embora sujeito a diversas configurações em sua montagem, o funcionamento do aparelho e o papel dos princípios básicos da interferência de luz em sua capacidade de formação de imagens podem ser explicados com base na utilização de um interferômetro de Michelson. Esquemáticamente, o sistema de OCT comumente possui um diodo superluminescente que funciona como uma fonte de luz de baixa coerência, onde será acoplada em fibras ópticas e depois dividida em dois segmentos que serão direcionados a dois diferentes braços de um interferômetro [17], [18]. Um dos braços é chamado de braço de referência e o outro chamado de braço da amostra. Ao emergir da extremidade da fibra em qualquer um desses braços, a luz passa por diversos componentes ópticos, como espelhos e lentes, a fim de controlar parâmetros específicos do feixe, como sua forma, profundidade de foco e a distribuição de

intensidade luminosa [17]. Desta forma, em uma amostra heterogênea, diferentes estruturas dentro dela apresentarão índices de refração distintos, levando ao retroespalhamento da luz quando esta encontra uma interface entre materiais de índices de refração diferentes. A luz retornada de ambos os braços se combina novamente no acoplador e gera um padrão de interferência, o qual é registrado pelo detector e interpretado pelo computador [18].

De maneira concisa, o foco do estudo anterior [12] concentrou-se na elaboração de uma metodologia padronizada do uso da OCT na quantificação de diâmetro, altura e volume de esferoides de células tumorais HepG2 e a consequente demonstração das potencialidades da técnica como ferramenta analítica. A partir dos resultados obtidos, redigimos um protocolo que nos permitiu delimitar os primeiros passos de uma metodologia de medição de volume de esferoides a partir do OCT.

Apesar de resultados promissores, o processamento de imagens e a segmentação dos esferoides contidos nelas mostraram-se trabalhos tediosos e cansativos, visto que os modelos mais simples de segmentação não apresentaram soluções úteis na separação dos objetos de interesse nas imagens e sessões indesejadas como o *background* e a placa de leitura das amostras. De maneira simples, o processo de segmentação de uma imagem digital visa a categorização de seus pixels em um modelo binário ou bitonal, onde estes tipicamente dividem-se, separando-se em duas ou mais classes, regiões ou subconjuntos. A partir desta técnica, a separação de objetos de interesse dos objetos de fundo da imagem é possível, fornecendo, desta forma, uma maneira de os analisarmos visual e computacionalmente. Apesar de seu conceito relativamente simples, suas formas de emprego se ramificaram, disponibilizando diversos métodos de sua aplicação baseados em conceitos e princípios distintos [19]. Hoje, as soluções mais comumente utilizadas dividem-se entre os métodos de binarização de imagem manuais, métodos de binarização automatizados através de *softwares open source* e, finalmente, métodos de binarização automatizados através de *softwares* comerciais. As vantagens do uso de métodos manuais e por meio de *softwares open source* incluem o fato de estes gerarem resultados mais transparentes e reprodutíveis no meio científico, visto o fácil acesso a tais ferramentas e sua gratuidade. Por outro lado, *softwares* comerciais tendem a oferecer ferramentas exclusivas e suporte especializado aos usuários. Ferramentas de segmentação mais robustas e gratuitas também são oferecidas através do uso de programação computacional, embora estas possuam maior dificuldade em seu acesso, visto exigirem conhecimentos de lógica e linguagem de programação por parte de seus usuários.

Diante disso, até o presente momento, realizamos algumas das etapas iniciais de métodos de segmentação das imagens e análises de padrão de disposição e intensidade de *pixels* através da aplicação e treinamento de algoritmos baseados em inteligência artificial, com o objetivo de obtermos métodos de segmentação e, conseqüentemente, análises morfofisiológicas mais precisos. Este é o primeiro passo para a tentativa de implementação de metodologias de automação nos processos de segmentação de imagens através da implementação de artifícios de *machine learning* e *deep learning* [20], [21]. Proposta no ano de 2017 por Kaiming He, Georgia Gkioxari, Piotr Dollar e Ross Girshick, a Mask R-CNN [22] se apresenta como uma extensão do algoritmo R-CNN original, sendo esta capaz de realizar a detecção e identificação de objetos em imagens a partir de técnicas de segmentação e classificação.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo principal

Adaptação do algoritmo Mask R-CNN para a realização de segmentação de esferoides celulares em imagens de OCT de maneira automática, através do uso de *machine learning*.

## 3. Materiais e métodos

O seguinte projeto vem sendo desenvolvido no Laboratório de Biologia de Células Eucariontes da Coordenação de Metrologia em Biologia e na Divisão de Metrologia, ambos da Diretoria de Metrologia Científica e Tecnológica do Inmetro.

### 3.1. Sistema do OCT

As imagens 2D e 3D adquiridas durante os experimentos foram obtidas através de um tomógrafo de coerência ótica de domínio espectral (SD-OCT) (Thorlabs TELESTO-II) padrão. As especificações de performance óptica do modelo estão descritas no Quadro 1, a seguir:

**Quadro 1** – Especificações do desempenho óptica do tomógrafo de coerência ótica ThorLabs Tellesto II (SD-OCT) disponível (em inglês) no manual operacional do equipamento.

Especificações de Performance Óptica – TELESTO II	
Comprimento de Onda Central	1,3 $\mu\text{m}$
Taxa de Varredura Axial	Até 76 kHz
Profundidade Máxima de Imagem	3,5 mm
Resolução Axial Ar/Água	5,5/4,2 $\mu\text{m}$

O *software* ThorImage OCT 4.2 foi utilizado como gerenciador de captura de imagens e dados, operando juntamente com o sistema de tomografia de coerência ótica do tipo SD-OCT modelo TELESTO II.

### 3.2. Aquisição de imagens através do OCT

Os parâmetros de configuração de leitura e pré-processamento de imagens utilizados a priori foram os mesmos utilizados no estudo anterior [12] para esferoides tumorais de células HepG2.

Os parâmetros de leitura referentes aos valores de Tamanho, foram definidos como constam na tabela 1. Os parâmetros X e Y da seção campo de visão variam automaticamente de acordo com a área demarcada pelo usuário.

**Tabela 1** - Parâmetros definidos utilizados na leitura de amostras durante os experimentos

	X	Y	Z	
Tamanho	522	287	512	Pixel
Campo de visão (FOV)	Variável	Variável	1,78	mm
Tamanho do pixel	Variável	Variável	3,47	$\mu\text{m}$
Centro	Variável	Variável		mm
Ângulo			Variável	$^{\circ}$

### 3.3. Conversão e pré-processamento de imagens

Com o intuito de viabilizar a utilização de métodos de quantificação baseados na contagem de *voxels*, realizou-se a conversão do formato proprietário de saída de dados das amostras submetidas às análises. Em seguida, procedeu-se ao processamento individual do conjunto de imagens referente à pilha de imagens de cada amostra. Essas etapas foram executadas com o objetivo específico de preparar as imagens para utilização no *software* ImageJ [23].

### 3.4. Resampling

As análises morfológicas realizadas fora do ambiente do *software* de captura e gerenciamento de imagens nativo do sistema de OCT, ThorImage OCT 4.2, utilizaram *software* ImageJ. Visando a manutenção do aspecto cúbico dos *voxels*, recalculou-se as dimensões X e Y do parâmetro “Pixel Size”

das imagens, tornando seus valores iguais ao valor de Z do mesmo parâmetro. Assim, obteve-se imagens com seus aspectos físicos preservados, resultando em *voxels* cúbicos.

Portanto, para a aplicação do cálculo de *resampling*, primeiramente, calcula-se o *Pixel Size Z* referente às imagens através da seguinte equação:

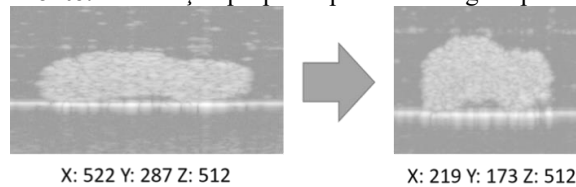
$$\frac{FOVZ}{SizeZ} = \text{Pixel size Z} \quad (1)$$

A partir do valor calculado do Pixel Size de Z, calcula-se novos valores de X e Y para o parâmetro “Size” das amostras. A alteração destes parâmetros resulta no redimensionamento dos *voxels* da imagem para que estes tornem-se cúbicos. Para tal efeito, aplica-se a equação:

$$\frac{FOVX \text{ ou } Y}{\text{Pixel SizeZ}} = \text{Size} \quad (2)$$

Os novos valores de X e Y do parâmetro *Size* são aplicados na redimensionalização das imagens da pilha, gerando resultados como o observado na figura 1, atingindo desta maneira dimensões semelhantes às vistas no *software* nativo no tipo de visualização de *aspect ratio Physical*.

**Fonte:** Elaboração própria a partir de imagens pelo OCT.



**Figura 1** - Resultado de *resampling* em pilha de imagens de esferoide tumoral HEPG2 realizado no software ImageJ com base nos cálculos citados na metodologia. O valor de Z foi preservado durante todos os cálculos por conta da variação dos parâmetros X e Y em decorrência do FOV.

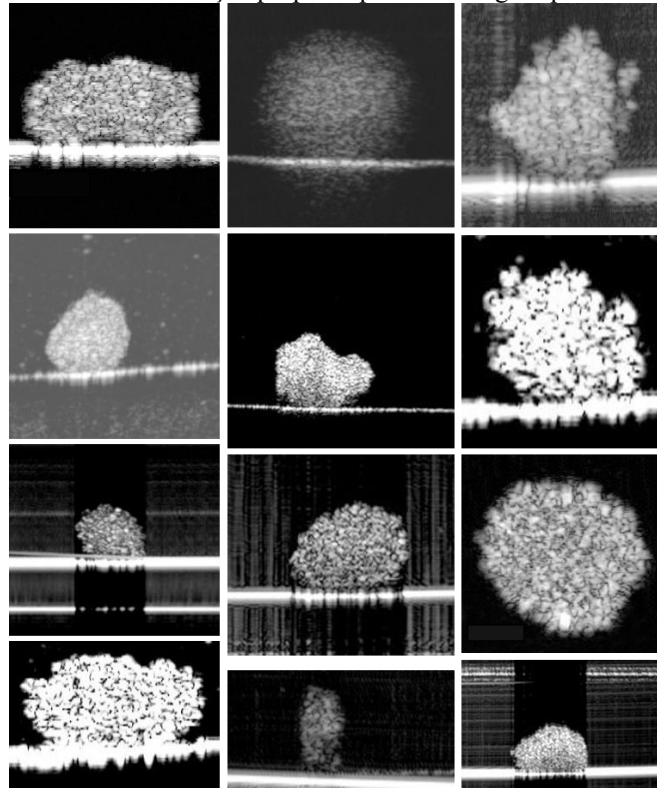
### 3.5. Implementação e uso do modelo de detecção e segmentação de objetos Mask R-CNN por meio da linguagem de programação Python

Dentre uma miríade de possibilidades, o modelo Mask R-CNN (máscara (*Region-based convolutional neural network*) [22] foi escolhido por sua aparente robustez, combinando ferramentas flexíveis e facilidade de acesso a seu código fonte a fim de refinar a segmentação das imagens obtidas por meio do OCT.

O processamento e implementação do algoritmo se deu através do código disponibilizado gratuitamente na plataforma GitHub, onde seu acesso é feito pelo link [github.com/matterport/Mask\\_RCNN](https://github.com/matterport/Mask_RCNN). Modificações necessárias no código foram realizadas para adaptá-lo às necessidades do projeto. Todos os códigos basearam-se na linguagem de programação Python, em sua versão 3.8, e foram implementados nos IDE's (*integrated development environment*) Visual Studio Code e Google Colab. Brevemente, a abordagem computacional R-CNN permitiu, na primeira etapa, extrair regiões de interesse (ROIs – *Regions of interest*) a partir de uma imagem e, na segunda etapa, classificou as ROI, separando-os em diferentes classes como, por exemplo, “esferoide” e “background”.

**3.5.1. Confeção do dataset.** Para o treinamento da rede neural, um conjunto de dados para treinamento e validação foi construído com um conjunto de imagens de 50 esferoides previamente segmentados manualmente (Figura 2).

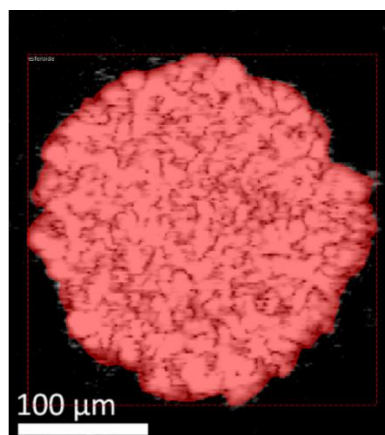
**Fonte:** Elaboração própria a partir de imagens pelo OCT.



**Figura 2** – Parte do conjunto de esferoides utilizados na confecção do *dataset* responsável pelo treinamento da rede neural convolucional. Esferoides com diversas conformações foram escolhidos com o intuito de evitar um conjunto homogêneo de imagens.

Para a realização da segmentação manual (Figura 3), a interface makesense.ai foi utilizada. A traçagem dos polígonos foi realizada com uma mesa digitalizadora de modelo WACOM Intuos.

**Fonte:** Elaboração própria a partir de imagens geradas pelo OCT. Segmentação realizada pelo algoritmo Mask R-CNN.



**Figura 3** – Imagem gerada pelo algoritmo através de um esferoide segmentado manualmente. O quadrado ao redor da ROI é concernente ao classificador presente na estrutura do algoritmo, enquanto a região em vermelho representa, de fato, a segmentação do esferoide, separando-o do resto da imagem

O treinamento a partir do zero contou com 25 etapas, cada uma com 50 épocas, onde cada época representa a passagem completa do treinamento por todo o *dataset*. A conclusão do treinamento levou aproximadamente 8 horas de processamento contínuo. Por outro lado, a segmentação dos esferoides submetidos levou em média 10 segundos por frame.

## 4. Resultados

### 4.1. Dados gerados pelo OCT

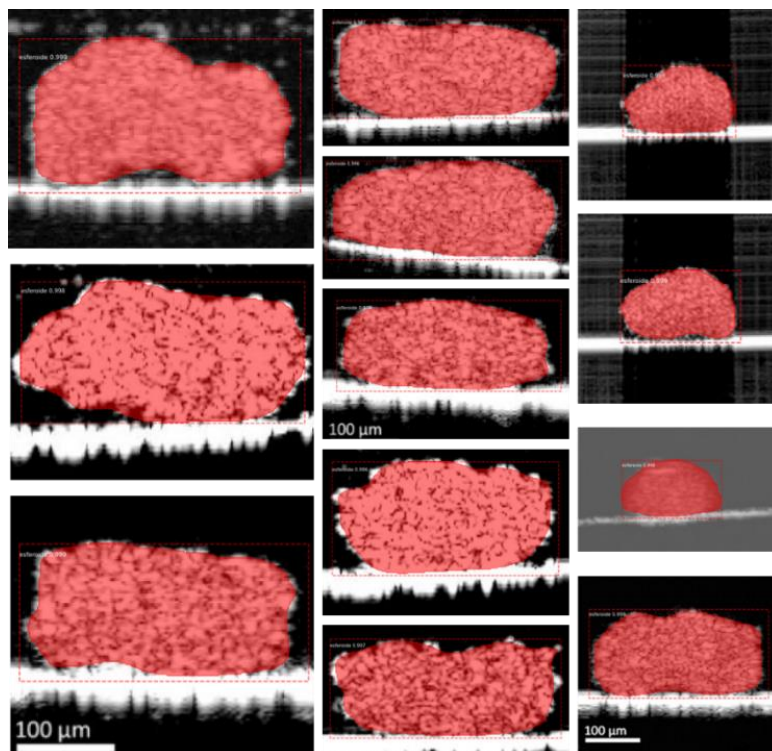
Ao todo, foram realizadas leituras em amostras de esferoides fabricados com número de células distintos (20000, 100000 e 350000 células por esferoide).

### 4.2. Teste do método de segmentação e classificação por meio de Mask R-CNN

A implementação do código fonte de execução do algoritmo devidamente adaptado às necessidades do projeto foi realizada na Plataforma Google Colab, em um ambiente virtual contendo todos os dados referentes ao código juntamente com os dados de leitura das amostras provenientes do OCT armazenados na nuvem.

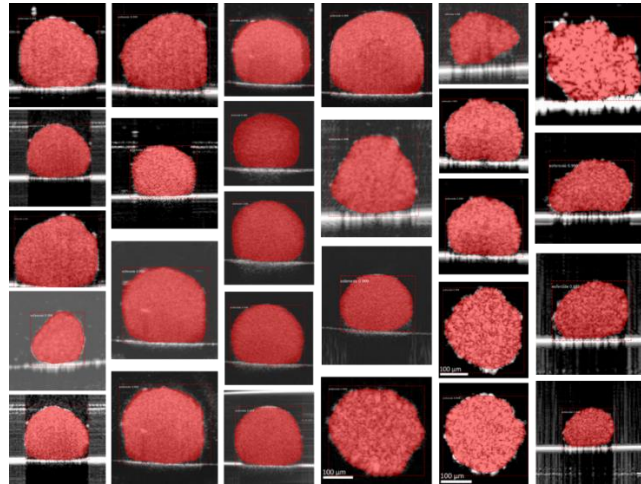
Ao todo, 50 diferentes imagens foram submetidas ao algoritmo com intuito de que cada um dos esferoides presentes nestas fossem devidamente classificados e segmentados. Os resultados de segmentação ficam evidentes através das máscaras vermelhas geradas por cima das regiões de interesse, ou seja, os esferoides, enquanto os resultados de classificação são observados através de polígonos vermelhos cercando os esferoides. Os resultados obtidos podem ser observados nas figuras 4, 5 e 6:

**Fonte:** Elaboração própria a partir de imagens geradas pelo OCT. Resultados obtidos através do IDE Google Colab.



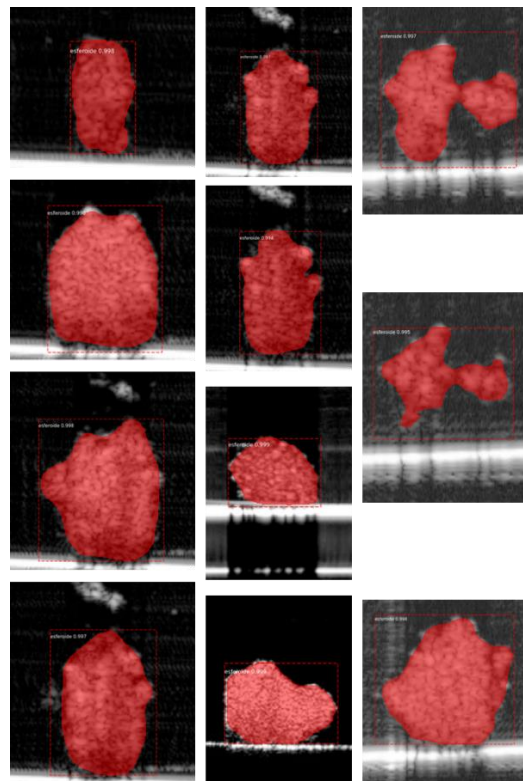
**Figura 4** – Resultados de segmentação obtidos através do uso da modalidade Mask R-CNN. Polígonos vermelhos indicam a classificação e detecção de cada objeto, enquanto a região em vermelho indica a segmentação de cada esferoide.

**Fonte:** Elaboração própria a partir de imagens geradas pelo OCT. Resultados obtidos através do IDE Google Colab.



**Figura 5** – Resultados de segmentação obtidos através do uso da modalidade Mask R-CNN. Polígonos vermelhos indicam a classificação e detecção de cada objeto, enquanto a região em vermelho indica a segmentação de cada esferoide.

**Fonte:** Elaboração própria a partir de imagens geradas pelo OCT. Resultados obtidos através do IDE Google Colab.



**Figura 6** – Resultados de segmentação obtidos através do uso da modalidade Mask R-CNN. Polígonos vermelhos indicam a classificação e detecção de cada objeto, enquanto a região em vermelho indica a segmentação de cada esferoide.



## 5. Discussão

### 5.1. Dados gerados pelo OCT

Durante o breve período inicial do projeto, dois novos tipos de esferoides celulares foram analisados a partir da OCT, adicionando as células DPSC e BEAS-2B ao repertório de amostras bem sucedidas submetidas à técnica. Até o momento, células de tecido hepático, pulmonar e tecido ósseo dentário foram analisadas, contribuindo para corroborar a versatilidade da OCT como técnica na avaliação de esferoides celulares diversos. Até o fim do projeto, intenciona-se a submissão de uma maior diversidade de esferoides celulares às análises a partir da OCT.

### 5.2. Classificação e segmentação de esferoides através da Mask R-CNN

A abordagem a partir da técnica mostrava-se potencialmente positiva no âmbito teórico. Com sua implementação prática, conseguimos, efetivamente, demonstrar que as expectativas quanto ao uso desta modalidade não foram frustradas. De fato, desde o início do projeto, a segmentação dos esferoides mostrou-se como uma das etapas mais problemáticas do processo de análise das amostras, dadas as dificuldades em separarmos digitalmente o esferoide e o fundo da placa de análise, visto estes possuírem intensidades semelhantes nas imagens de saída, impedindo desta forma sua segmentação por meio de técnicas mais simples, como a tradicional segmentação por *threshold*, amplamente utilizada em outras modalidades. A busca por uma metodologia de segmentação robusta e, ao mesmo tempo, com aplicabilidade acessível protagonizou uma considerável parcela de tempo do projeto, onde experimentamos diversas modalidades anteriormente já relatadas. Positivamente, a modalidade Mask R-CNN mostrou grande potencial em assumir o papel de técnica definitiva de segmentação das amostras no presente projeto.

Em uma definição mais ampla, a primeira etapa envolveu o uso de algoritmos de seleção de regiões como, por exemplo, o algoritmo *Selective Search*, capaz de gerar propostas de ROIs que potencialmente contenham de fato o objeto de análise. Em seguida, cada região proposta foi redimensionada para um tamanho fixo, estipulado na arquitetura do algoritmo, e passada como entrada para uma rede neural convolucional. Já na segunda etapa esta rede neural convolucional é treinada para classificar cada região proposta da imagem em uma ou mais classes de objetos ou de background. É importante salientar que redes neurais convolucionais possuem a capacidade de serem retreinadas, conseqüentemente, refinando suas capacidades detectivas ajustando-se melhor ao ROI.

A metodologia Mask R-CNN apresenta-se como uma extensão da abordagem R-CNN, permitindo adicionalmente que os ROIs sejam segmentados. Nesta técnica, treinamos a rede neural convolucional para gerar, além da classificação de objetos, uma máscara binária que representa a localização exata do objeto na imagem. Por conta disto, a Mask R-CNN é uma metodologia de segmentação mais exigente em recursos computacionais devido à complexidade adicional ao segmentar a ROI.

Apesar dos resultados satisfatórios, é notória a necessidade de um melhor refinamento no treinamento da rede neural, visto ser possível observar com clareza que a segmentação realizada por meio da técnica ainda se mostra não otimizada, dada a percepção de bordas não segmentadas nas regiões de interesse. Desta forma, *datasets* mais robustos, com esferoides em diversos ângulos e com diversas conformações serão utilizados em novos treinamentos a seguir. Pelo prisma computacional, a maior barreira quanto a treinamentos mais robustos é o poder computacional necessário para a sua realização, visto a demanda de um período de tempo considerável para *datasets* menos robustos e ainda mais elevado para *datasets* maiores. Em contrapartida, pela primeira vez no projeto conseguimos implementar uma solução à problemática da segmentação, o que eventualmente pode diminuir o erro humano e o tempo necessário para o processamento digital das imagens necessário para a realização da análise.

## 6. Conclusão

Finalmente, embora apresente resultados promissores, a análise imagiológica médica ainda carece de métodos de segmentação de imagens automatizados e de fácil utilização, tornando-os de difícil acesso a pesquisadores de áreas da ciência não voltadas a linguagens computacionais. Desta forma, o foco na adaptação de metodologias voltadas ao uso de algoritmos capazes de classificar e segmentar objetos de interesse em imagens biomédicas se corrobora em seu potencial na redução do tempo gasto em segmentações manuais, assim como na redução de erros cometidos por humanos. As comparações entre diferentes algoritmos também foram capazes de mostrar a eficácia em potencial da modalidade Mask R-CNN com base em seus resultados promissores, classificando e segmentando esferoides de maneira precisa. Ademais, os resultados obtidos mostram-se promissores quanto a adaptação de algoritmos voltados ao aprendizado de máquina no que se refere a segmentação de amostras em imagens, permitindo-nos vislumbrar seu uso também em atividades mais complexas, como em análises morfológicas como volume e esfericidade de amostras.

## Referências

- [1] S. A. Hudu, “Cell Culture, Technology: Enhancing the Culture of Diagnosing Human Diseases,” *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*, 2016, doi: 10.7860/JCDR/2016/15837.7460.
- [2] M. Jedrzejczak-Silicka, “History of Cell Culture,” in *New Insights into Cell Culture Technology*, InTech, 2017. doi: 10.5772/66905.
- [3] D. Anton, H. Burckel, E. Josset, and G. Noel, “Three-dimensional cell culture: A breakthrough in vivo,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 16, no. 3. MDPI AG, pp. 5517–5527, Mar. 11, 2015. doi: 10.3390/ijms16035517.
- [4] M. Kapałczyńska *et al.*, “2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures,” *Archives of Medical Science*, 2016, doi: 10.5114/aoms.2016.63743.
- [5] S. Alhaque, M. Themis, and H. Rashidi, “Three-dimensional cell culture: from evolution to revolution,” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 373, no. 1750, p. 20170216, Jul. 2018, doi: 10.1098/rstb.2017.0216.
- [6] C. Jensen and Y. Teng, “Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture?,” *Frontiers in Molecular Biosciences*, vol. 7. Frontiers Media S.A., Mar. 06, 2020. doi: 10.3389/fmolb.2020.00033.
- [7] L. S. Baptista *et al.*, “Adult stem cells spheroids to optimize cell colonization in scaffolds for cartilage and bone tissue engineering,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, no. 5. MDPI AG, May 01, 2018. doi: 10.3390/ijms19051285.
- [8] P. McMillen and S. A. Holley, “Integration of cell-cell and cell-ECM adhesion in vertebrate morphogenesis,” *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 36. Elsevier Ltd, pp. 48–53, Oct. 01, 2015. doi: 10.1016/j.ccb.2015.07.002.
- [9] M. P. Stuart *et al.*, “Successful low-cost scaffold-free cartilage tissue engineering using human cartilage progenitor cell spheroids formed by micromolded nonadhesive hydrogel,” *Stem Cells Int*, vol. 2017, 2017, doi: 10.1155/2017/7053465.
- [10] M. A. Gionet-Gonzales and J. K. Leach, “Engineering principles for guiding spheroid function in the regeneration of bone, cartilage, and skin,” *Biomedical Materials (Bristol)*, vol. 13, no. 3, Mar. 2018, doi: 10.1088/1748-605X/aab0b3.
- [11] S. J. Chae, J. Hong, H. Hwangbo, and G. H. Kim, “The utility of biomedical scaffolds laden with spheroids in various tissue engineering applications,” *Theranostics*, vol. 11, no. 14, pp. 6818–6832, 2021, doi: 10.7150/thno.58421.
- [12] A. P. A. Corrêa, “Uso de tomografia de coerência óptica (OCT) como ferramenta metrológica na medição de volume de esferoides celulares,”. 2021. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de pós-graduação em Biotecnologia. Inmetro, Duque de Caxias, 2021.

- [13] F. Piccinini, A. Tesei, C. Arienti, and A. Bevilacqua, "Cancer multicellular spheroids: Volume assessment from a single 2D projection," *Comput Methods Programs Biomed*, vol. 118, no. 2, pp. 95–106, 2015, doi: 10.1016/j.cmpb.2014.12.003.
- [14] Y. Huang *et al.*, "Optical coherence tomography detects necrotic regions and volumetrically quantifies multicellular tumor spheroids," *Cancer Res*, vol. 77, no. 21, pp. 6011–6020, Nov. 2017, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0821.
- [15] M. Sharma, Y. Verma, K. D. Rao, R. Nair, and P. K. Gupta, "Imaging growth dynamics of tumour spheroids using optical coherence tomography," *Biotechnol Lett*, vol. 29, no. 2, pp. 273–278, Feb. 2007, doi: 10.1007/s10529-006-9232-2.
- [16] F. Yan *et al.*, "Characterization and quantification of necrotic tissues and morphology in multicellular ovarian cancer tumor spheroids using optical coherence tomography," *Biomed Opt Express*, vol. 12, no. 6, p. 3352, Jun. 2021, doi: 10.1364/boe.425512.
- [17] D. P. Popescu *et al.*, "Optical coherence tomography: Fundamental principles, instrumental designs and biomedical applications," *Biophysical Reviews*, vol. 3, no. 3. Springer Verlag, pp. 155–169, Sep. 01, 2011. doi: 10.1007/s12551-011-0054-7.
- [18] A. Rajabi-Estarabadi *et al.*, "Optical coherence tomography imaging of melanoma skin cancer," *Lasers in Medical Science*, vol. 34, no. 2. Springer London, pp. 411–420, Mar. 06, 2019. doi: 10.1007/s10103-018-2696-1.
- [19] J. Rogowska, "Overview and Fundamentals of Medical Image Segmentation," in *Handbook of Medical Imaging*, Elsevier, 2000, pp. 69–85. doi: 10.1016/B978-012077790-7/50009-6.
- [20] R. Kapoor, B. T. Whigham, and L. A. Al-Aswad, "Artificial intelligence and optical coherence tomography imaging," *Asia-Pacific Journal of Ophthalmology*, vol. 8, no. 2. Asia-Pacific Academy of Ophthalmology, pp. 187–194, Mar. 01, 2019. doi: 10.22608/APO.201904.
- [21] H. Seo *et al.*, "Machine learning techniques for biomedical image segmentation: An overview of technical aspects and introduction to state-of-art applications," in *Medical Physics*, John Wiley and Sons Ltd, Jun. 2020, pp. e148–e167. doi: 10.1002/mp.13649.
- [22] K. He, G. Gkioxari, P. Dollár, and R. Girshick, "Mask R-CNN," Mar. 2017.
- [23] C. A. Schneider, W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri, "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis," *Nat Methods*, vol. 9, no. 7, pp. 671–675, Jul. 2012, doi: 10.1038/nmeth.2089.