
**Desenvolvimento de um método para
segmentação de imagens histológicas da rede
vascular óssea**

Pedro Henrique Campos Cunha Gondim



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE COMPUTAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA COMPUTAÇÃO

Uberlândia
2018

Pedro Henrique Campos Cunha Gondim

**Desenvolvimento de um método para
segmentação de imagens histológicas da rede
vascular óssea**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Computação da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência da Computação.

Área de concentração: Ciência da Computação

Orientador: André Ricardo Backes

Coorientador: Bruno Augusto Nassif Travençolo

Uberlândia

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

G637d Gondim, Pedro, 1994-
2018 Desenvolvimento de um método para segmentação de imagens
 histológicas da rede vascular óssea [recurso eletrônico] / Pedro Gondim.
 - 2018.

Orientador: André Ricardo Backes.

Coorientador: Bruno Augusto Nassif Travençolo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciência da Computação.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.1204>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Computação. 2. Processamento de imagens. 3. Histologia. 4. . I.
Backes, André Ricardo (Orient.). II. Travençolo, Bruno Augusto Nassif
(Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Ciência da Computação. IV. Título.

CDU: 681.3

Maria Salete de Freitas Pinheiro - CRB6/1262

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE COMPUTAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA COMPUTAÇÃO

Os abaixo assinados, por meio deste, certificam que leram e recomendam para a Faculdade de Computação a aceitação da dissertação intitulada "**Desenvolvimento de um método para segmentação de imagens histológicas da rede vascular óssea**" por **Pedro Henrique Campos Cunha Gondim** como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de **Mestre em Ciência da Computação**.

Uberlândia, ____ de _____ de _____

Orientador: _____

Prof. Dr. André Ricardo Backes
Universidade Federal de Uberlândia

Coorientador: _____

Prof. Dr. Bruno Augusto Nassif
Travençolo
Universidade Federal de Uberlândia

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcelo Zanchetta do
Nascimento
Universidade Federal de Uberlândia

Prof. Dr. Jarbas Joaci de Mesquita
Sá Junior
Universidade Federal do Ceará

Agradecimentos

A Universidade Federal de Uberlândia, seu corpo docente, direção e administração, que oportunizaram a janela que hoje vislumbro um horizonte superior, elevado pela acendrada confiança no mérito e ética aqui presentes.

As organizações de fomento da pesquisa no Brasil, como CAPES, FAPEMIG e CNPq. Em especial a CAPES, organização que me forneceu bolsa durante a pesquisa, sem o auxílio financeiro seria impossível o termino deste trabalho.

Ao meu orientador André Ricardo Backes, pelo suporte nas incontáveis reuniões para auxílio e orientação além de suas correções e incentivos.

Ao meu coorientador Bruno Augusto Nassif Travençolo, pelos ensinamentos e constante auxílio em todas as dúvidas que me surgiram durante este percurso.

A minha tia Selma Martins Gomes Caixeta, que na minha infância e juventude me auxiliou nos meus estudos do primário até o final do ensino médio.

Ao meu tio José Martins Coelho e tia Marluce que me auxiliou durante toda minha graduação.

Aos meus pais, Maria da Conceição e Lázaro, pelo amor, incentivo e apoio incondicional. Sei dos sacrifícios e renúncias que tiveram que fazer para me educar.

A minha esposa Jéssica Tamara de Bessa, pelo seu amor, incentivo, apoio e paciência nos momentos que eu não podia estar junto com ela.

Resumo

Histologia é a área da biologia que estuda os tecidos biológicos. Uma das maneiras de se estudar esses tecidos é por meio de imagens. O pesquisador extrai uma amostra de um animal, esta amostra é preparada, seccionada e levada ao microscópio, o qual possui uma câmera acoplada, que transforma a amostra em imagem. A análise dessas imagens é de fundamental importância para os especialistas estudarem e diagnosticarem possíveis doenças, má formação ou outras possíveis anomalias. Um dos tecidos que são analisados em histologia é o tecido ósseo, de fundamental importância para proteção de órgãos e dar estrutura para animais vertebrados. Uma das regiões analisadas no tecido ósseo são as redes vasculares ósseas as quais contêm canais ósseos, osteócitos, matriz óssea entre outros artefatos. A nutrição do tecido ósseo é realizada pelos canais ósseos e osteócitos. Por sua importância os especialistas estudam esses artefatos a fim de descobrirem se houve algum dano a essas regiões e, conseqüentemente, a nutrição do tecido. Ainda hoje a análise desses artefatos é feita de maneira manual pelos pesquisadores da área. Porém, devido a complexidade das imagens histológicas, uma análise manual despende muito tempo e dinheiro das instituições, além de ficarem a mercê de julgamentos subjetivos de cada avaliador. Na literatura já existem muitos trabalhos que segmentam de maneira excelente os núcleos de células em imagens histológicas, porém a segmentação automática de canais ósseos e osteócitos é uma área pouco explorada. Devido a escassez de pesquisa e para auxiliar os especialistas no momento da análise da rede vascular óssea foi desenvolvido um método de segmentação automático dos canais ósseos e osteócitos. O método foi avaliado utilizando métricas como o coeficiente de Dice e abordagem diagnóstica, além de ter sido comparado com outros métodos de segmentação automáticos (*neighborhood valley emphasis* (NVE); *Otsu*; *valley emphasis* (VE)). O resultado do método proposto por este trabalho se mostrou mais eficiente que os outros, sendo uma alternativa viável para pesquisadores que desejam analisar a rede vascular óssea.

Palavras-chave: Segmentação. Rede Vascular Óssea. Imagem Histológica.

Abstract

Histology is the area of biology that studies biological tissues. One of the ways to study these tissues is through images. The researcher extracts a sample of an animal, this sample is prepared, sectioned and taken under a microscope, which has a coupled camera, which turns the sample into an image. The analysis of these images is of fundamental importance for the specialists to study and to diagnose possible diseases, malformation or other possible anomalies. One of the tissues that are analyzed in histology is the bone tissue, which is of fundamental importance to protect organs and structure for vertebrate animals. One of the regions analyzed in the bone tissue are the vascular networks of bone which contain bone canals, osteocytes, bone matrix and other artifacts. Bone canals and osteocytes are responsible for the nutrition of the bone tissue. Because of their importance, the specialists study these artifacts in order to discover any damage to these regions and, consequently, to the nutrition of the tissue. Even today the analysis of these artifacts is performed manually by researchers. However, due to the complexity of the histological images, manual analysis takes a lot of time and money from the institutions, and it is a task that depends of the subjective judgments of each evaluator. Literature provides many papers focused on cell nuclei segmentation in histological images, but the automatic segmentation of bone canals and osteocytes is less explored. Due to the lack of research and to assist the specialists in the analysis of the bone vascular network, a method of automatic / semi-automatic segmentation of bone canals and osteocytes is proposed. The method was applied to three different image sets which were evaluated through the Dice coefficient and diagnostic approach metrics. In addition to being compared with other automatic methods (neighborhood valley emphasis (NVE), valley emphasis (VE) and Otsu). Results showed that our approach proved to be more efficient than the others, being a viable alternative to analyze the bone vascular network.

Keywords: Segmentation. Bone Vascular networks. Histological Images.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Exemplo do processo para obtenção de amostras histológicas. 1) Sacrifica-se o animal; 2) Retira-se a amostra biológica; 3) Fixa-se a amostra; 4) Embebe-se a amostra em corantes; 5) Fatia-se a amostra em laminas extremamente finas com o auxílio de um micrótomo; 6) Fatias histológicas são colocadas em lâminas transparentes para digitalização.	29
Figura 2 – Matriz óssea com destaque para a localização dos canais de Harvers e Volkamn	30
Figura 3 – Cubo de cores RGB com as três superfícies ocultas	31
Figura 4 – Gráfico de comprimento de onda de cada cor primária do espaço de cor RGB.	32
Figura 5 – Gráfico de comprimento de onda de cada canal do espaço de cor XYZ.	32
Figura 6 – Diagrama de cromaticidade CIE 1931	33
Figura 7 – a) Espaço de cor HSV representado em cada um de seus componentes. b) Decomposição de cada canal HSV.	34
Figura 8 – Exemplo de transformação RGB para CIE 1976 $L^*a^*b^*$ com a decomposição dos canais de L^* ; a^* ; b^*	35
Figura 9 – Exemplo do processo de normalização de imagens histológicas. (a) Imagem original; (b) Imagem normalizada. Os pontos destacados na Figura (b) são as características do tecido que foram realçadas pela normalização para guiar o futuro alinhamento.	37
Figura 10 – Exemplo do processo de deconvolução de cor em imagens histológicas. (a) Imagem original; (b) Imagem em tons de cinza que destaca áreas marcadas com hematoxilina; (c) Imagem em tons de cinza que destaca áreas tingidas pela eosina e (d) Imagem em tons de cinza que destaca áreas com corante DAB. A matriz de densidade óptica utilizada foi a descrita na Tabela 5.	40

Figura 11 – Exemplo do processo morfológico de dilatação. (a) Estrutura a ser dilatada (A na Equação 12); (b) Estrutura dilatadora, conhecida como elemento estruturante (B na Equação 12), (c) Resultado da dilatação de A por B.	43
Figura 12 – Exemplo do processo morfológico de erosão. (a) Estrutura a ser erodida (A na Equação 13); (b) Estrutura que ditará a erosão, conhecida como elemento estruturante (B na Equação 12), (c) Resultado da erosão de A por B.	44
Figura 13 – Exemplo do processo morfológico de abertura. (a) Estrutura a sofrer abertura morfológica, X marca o ponto de referência; (b) Elemento estruturante; (c) Objeto após erosão, (d) Objeto após sofrer dilatação e consequentemente o resultado final da abertura.	44
Figura 14 – Exemplo do processo morfológico de abertura. (a) Estrutura a sofrer fechamento morfológico, X marca o ponto de referência; (b) Elemento estruturante utilizado; (c) Objeto após dilatação, (d) Objeto após sofrer erosão e consequentemente o resultado final da abertura.	45
Figura 15 – Exemplo de limiarização em um histograma de uma imagem em tons de cinza.	46
Figura 16 – A matriz da esquerda simula uma imagem na qual será aplicado o crescimento de regiões. A semente da primeira região, (a), é o elemento da linha 3 e coluna 2 (3, 2), este elemento possui valor 1. Enquanto a semente da segunda região, (b), foi o elemento da linha 3 e coluna 4 (3, 4), de valor 8. Ao considerar o limiar $T = 3$ tem-se todos os valores entre 0 e 4 pertencentes a primeira região e os valores entre 5 e 8 a região (b). A matriz à direita simula a imagem após a aplicação do crescimento de regiões.	48
Figura 17 – Visualização dos eixos principais de um objeto (a) Objeto original. (b) Eixos em vermelho após o PCA, e_1 maior eixo e e_2 segundo maior eixo.	53
Figura 18 – Fluxograma de Veta et al. (2013): Aquisição da imagem; deconvolução de cor, seleção do canal da hematoxilina; aplicação de abertura e fechamento por reconstrução; aplicação com múltiplos raios da transformada rápida da simetria radial; marcação do fundo e objetos pela aplicação de <i>watershed</i> ; seleção da região de interesse, e aproximação elítica; fusão de contornos e por fim a segmentação do núcleo.	56
Figura 19 – Diagrama do método proposto para segmentação automática do canal vascular ósseo e osteócito em imagens histológicas	60

Figura 20 – (a) Quatro exemplos de canais ósseos nos quais suas partes basófilas são tingidas pelo corante hematoxilina, destacando estas regiões com cores púrpuras; (b) Quatro exemplos de canais ósseos nos quais suas partes basófilas foram tingidas pelo corante hematoxilina porém com alguma interferência do corante eosina, tornando parte do artefato basófilo avermelhado.	61
Figura 21 – Imagens relacionadas a cada um dos 10 grupos divididos pelos especialistas.	69
Figura 22 – Sétima fatia do grupo P3A digitalizada pelos especialistas que sofreu preenchimento e alinhamento manual. (a) imagem original fornecida pelos especialistas, (b) imagem após sofre preenchimento de 150 pixels de cada lado; (c) imagem alinhada manualmente após sofrer rotação, translação e redimensionamento.	70
Figura 23 – Irregularidades encontradas. (a) Borramento; (b) Luminosidade não uniforme; (c) Baixo contraste; (d) Rasgos no tecido; (e) Rasgos no tecido, iluminação disforme e uma tonalidade completamente diferente das outras imagens.	70
Figura 24 – (a) Imagem original; (b) Imagem após correção de contraste.	71
Figura 25 – Imagens resultantes do pré-processamento. As imagens (a) e (b) são usadas posteriormente na fase de segmentação. (a) Canal L^* do espaço de cor CIE 1976 $L^*a^*b^*$; (b) Realce de elementos basófilos pelo corante hematoxilina; (c) Realce de elementos acidófilos pelo corante eosina; (d) Realce de elementos basófilos com interferência de eosina.	71
Figura 26 – Imagens resultantes da segmentação realizada pelo algoritmo k-means. As tonalidades estão divididas em 7 “cores quentes” começando no preto, passando pelo vermelho escuro, vermelho, laranja escuro, laranja, amarelo e por fim o branco. (a) Imagem resultante da segmentação realizada na imagem em tons de cinza L^* ; (b) Resultado da imagem em tons de cinza que realça às estruturas coradas com hematoxilina e (c) Resultado da imagem em tons de cinza que realça as estruturas coradas com hematoxilina com interferência de eosina	72
Figura 27 – Imagens resultantes da binarização realizada no resultado do algoritmo k-means. (a) Imagem resultante da binarização realizada no resultado do k-means no canal L^* ; (b) Imagem binarizada do resultado do k-means na imagem que realça as estruturas coradas com hematoxilina e (c) Imagem binarizada do resultado do k-menass na imagem que realça as estruturas coradas com hematoxilina e com interferência de eosina. .	73

Figura 28 – (a) Junção da imagem L^* e da hematoxilina após a segmentação pelo k-means. (b) Crescimento de regiões aplicado ao resultado da junção entre as imagens segmentadas pelo k-means.	74
Figura 29 – Conjunto de imagens referentes a fase de pós-processamento. (a) Imagem resultante da fase de segmentação; (b) Imagem após passar pelo preenchimento de buracos; (c) Imagem resultante da eliminação de objetos não circulares; (d) Resultado da remoção de grandes e pequenos objetos, nesse caso nenhum grande objeto foi removido, então a fim de demonstrar a diferença entre as imagens, as regiões dos pequenos objetos removidos estão circuladas em vermelho; (e) Imagem após eliminação de objetos que não continham pixels segmentados na imagem com realce do corante hematoxilina; (f) Remoção de objetos que não possuíam pixels segmentados da imagem L^* , como todos os objetos tinham participação da segmentação do canal L^* o resultado dessa fase foi o mesmo da fase anterior.	75
Figura 30 – Exemplos de imagens que não foram segmentadas devido a sua baixa qualidade. (a) Fatia 12 do grupo P3A, na qual a iluminação danificou o lado esquerdo da imagem e também o lado inferior direito, impossibilitando a detecção correta do canal ósseo e osteócitos presentes nestes locais. (b) Fatia 3 pertencente ao grupo S19F, onde devido a vários rasgos no tecido não se consegue separar com clareza o canal ósseo; (c) Fatia 13 do grupo S27, onde houve uma deformação no momento da coleta da imagem, distorcendo os canais ósseos e osteócitos e consequentemente alterando suas propriedades; (d) Fatia 14 pertencente ao grupo S39A, onde devido a um corte e falha de iluminação no canto superior esquerdo, além de outros rasgos do tecido na imagem, ela não foi segmentada.	77
Figura 31 – Imagem histológica original do fêmur esquerdo do rato.	79
Figura 32 – Primeira fatia de série de imagens histológicas do fêmur esquerdo do rato com a matriz óssea destacada.	80
Figura 33 – (a) Imagem binária após sofrer a filtragem por área. b) Imagem RGB após a filtragem por área. A elipse em vermelho destaca a parte mais difícil de remover nas imagens.	81
Figura 34 – Cada figura representa uma abertura morfológica com um elemento estruturante específico. Cada abertura foi feita no resultado da sua anterior. (a) Resultado da abertura com ES sendo uma linha de 100 pixels com angulação de 135° ; (b) Resultado da abertura com ES sendo um retângulo de 10 linhas por 20 colunas; (c) Resultado abertura com ES sendo um disco com 12 pixels de raio.	81

Figura 35 – (a) Imagem original da fatia 379. (b) Resultado da série de aberturas morfológicas; (c) Resultado do fechamento morfológico; (d) Resultado do <i>convex hull</i> ; (e) Resultado da filtragem com a máscara do <i>convex hull</i> .	82
Figura 36 – (a) Recorde da imagem após aplicação do <i>convex hull</i> , o círculo em vermelho marca a parte do fundo da imagem original que foi anexada a matriz óssea; (b) Recorte da imagem após aplicação do método Otsu para retirada do fundo da imagem; (c) Resultado da etapa de eliminação de objetos externos a matriz óssea.	83
Figura 37 – Resultados de cada etapa proveniente do segundo algoritmo para isolar a matriz óssea na imagem. (a) Imagem binarizada através do k-means; (b) Abertura morfológica com disco de raio 15 pixels; (c) Remoção de todos os objetos com exceção do maior e (d) Fechamento morfológico utilizando um disco de raio 100 pixels.	84
Figura 38 – (a) Imagem original; (b) Resultado do isolamento da matriz óssea.	85
Figura 39 – (a) Imagem original; (b) Imagem normalizada.	85
Figura 40 – Resultados da mudança de espaço de cor e deconvolução.	86
Figura 41 – Imagens resultantes da aplicação do algoritmo k-means com $k = 7$. (a) L^* , (b) H , (c) HE .	86
Figura 42 – Imagens binarizadas obtidas de diferentes canais. (a) L^* ; (b) H ; (c) HE .	87
Figura 43 – (a) Junção das imagens binarizadas L^* , H e HE . (b) Imagem resultante do crescimento de regiões.	87
Figura 44 – Resultados do pós-processamento: (a) Resultado final da fase de processamento; (b) Preenchimento de buracos; (c) Remoção de objetos não circulares; (d) Remoção de pequenos e grandes objetos; (e) Remoção de objetos que não possuem participação de pixels segmentados da imagem L^* ; (f) Remoção de objetos que não possuem participação de pixels segmentados da imagem H ou HE .	88
Figura 45 – Exemplo de 4 canais ósseos na imagem RGB. O círculo em verde representa a marcação do especialista	89
Figura 46 – Gráfico de dispersão <i>boxplot</i> representando a avaliação diagnóstica do método proposto por esse trabalho.	90
Figura 47 – Gráfico de dispersão <i>boxplot</i> representando o coeficiente de Dice para <i>Neighborhood Valley Emphasis (NVE)</i> , <i>Otsu</i> , <i>Valley Emphasis (VE)</i> e o Método Proposto (MP).	90
Figura 48 – Imagem original cedida pelos especialistas. A marcação em vermelho é referente a distorção ocasionada no momento da coleta das imagens.	91

Figura 49 – Processamento para remoção de objetos pouco conectados a matriz óssea: (a) Imagem original; (b) Resultado segmentação k-means com $k = 5$; (c) Abertura com ES sendo uma linha de 30 pixels e ângulo de 75° ; (d) Remoção de objetos menores que o maior objeto; (e) Resultado da dilatação e preenchimento de buracos; (f) Resultado final desse etapa – o círculo em vermelho marca a saliência que ainda persiste no objeto e será removida pela segunda parte do algoritmo.	93
Figura 50 – Processamento para remoção de objetos conectados à matriz óssea: (a) Resultado da segmentação do k-means com $k = 5$; (b) Resultado da remoção de objetos conexos menores que o maior; (c) Resultado da abertura morfológica com ES sendo uma linha de 30 pixels inclinada a 120° e também o fechamento morfológico com ES sendo um raio de 7 pixels; (d) Remoção de todos os objetos exceto o maior; (e) Fechamento morfológico com ES sendo um disco de 100 pixels e preenchimento dos buracos, exceto o maior buraco; (f) Resultado final dessa etapa.	94
Figura 51 – Processamento para remoção de objetos dentro da matriz óssea e eliminação de deformação na parte inferior da imagem; (a) Máscara de remoção dos artefatos dentro da matriz óssea; (b) Imagem após retirada dos objetos; (c) Imagem após remoção do um quarto do seu interior.	95
Figura 52 – Imagem 6 sobreposta a imagem 5, com 50% de transparência. Os círculos em vermelho são exemplos de canais ósseos que não se alinharam e os círculos em verde são os que alinharam adequadamente.	95
Figura 53 – Resultados do pós-processamento: (a) Resultado final da fase de processamento; (b) Preenchimento de buracos; (c) Remoção de objetos não circulares; (d) Remoção de pequenos e grandes objetos; (e) Remoção de objetos que não possuem participação de pixels segmentados da imagem L^* ; (f) Remoção de objetos que não possuem participação de pixels segmentados da imagem H ou HE.	96
Figura 54 – Gráfico de dispersão <i>boxplot</i> representando a avaliação diagnóstica do método proposto por esse trabalho.	97
Figura 55 – Gráfico de dispersão <i>boxplot</i> representando o coeficiente de Dice para <i>Neighborhood Valley Emphasis (NVE)</i> , <i>Otsu</i> , <i>Valley Emphasis (VE)</i> e o Método Proposto (MP).	97

Lista de tabelas

Tabela 1 – Matriz OD.	38
Tabela 2 – Matriz OD para hematoxilina, eosina e DAB.	38
Tabela 3 – Matriz OD normalizada.	39
Tabela 4 – Matriz OD normalizada para hematoxilina, eosina e DAB, valores normalizados a partir da Tabela 2	39
Tabela 5 – Matriz de deconvolução para os corantes hematoxilina, eosina e DAB .	39
Tabela 6 – Resultados (VETA et al., 2013)	56
Tabela 7 – Resultados (HAGE; HAMADE, 2013)	58
Tabela 8 – Relação de valores de corante para cada canal.	62
Tabela 9 – Descrição dos conjuntos utilizados. Na primeira coluna o nome dado a cada conjunto pelos especialistas, a segunda coluna contém as regiões onde as amostras foram colhidas e na terceira e última coluna estão as quantidades de imagens geradas por cada conjunto. Na última linha encontra-se o total de imagens geradas para esse experimento.	68
Tabela 10 – Relaciona cada grupo bucal com sua quantidade total de imagens e quantidade segmentada. Primeira coluna contém cada um dos grupos, segunda coluna contém a quantidade total de imagens por grupo, a terceira coluna contém a quantidade de imagens segmentadas e a última linha contém o total.	76
Tabela 11 – Média do resultado do método proposto para a sensibilidade, especificidade e acurácia de cada grupo	78
Tabela 12 – Média do coeficiente de Dice para <i>Neighborhood Valley Emphasis (MVE)</i> ; <i>Otsu</i> ; <i>Valley Emphasis (VE)</i> e o Método Proposto (MP)	78

Lista de siglas

CIE Comissão Internacional de Iluminação

DAB Diaminobenzidina tetrahidrocloreto

FN Falso Negativo

FP Falso Positivo

NVE *Neighborhood valley-emphasis* - Ênfase nos vizinhos do vale

OD Densidade Óptica

PCA *Principal Component Analysis* - Análise dos componentes principais

PCNN Pulse Coupled Neural Network - Rede Neural de Pulso Acoplado

PDI Processamento Digital de Imagens

pH Potencial Hidrogeniônico

PSO *Particle-swarm Optimization* - Otimização por enxame de partículas

SE Elemento Estruturante

VE *Valley-emphasis* - Ênfase no Vale

VN Verdadeiro Negativo

VP Verdadeiro Positivo

Sumário

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	Motivação	25
1.2	Objetivos e Desafios da Pesquisa	25
1.2.1	Objetivos específicos	25
1.3	Contribuições	26
1.4	Organização da Dissertação	26
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	27
2.1	Histologia e Tecido Ósseo	27
2.2	Espaços de cores e suas transformações	30
2.3	Normalização de imagens histológicas	35
2.4	Deconvolução de cor	36
2.5	Algoritmo de agrupamento K-means	40
2.6	Operações morfológicas	42
2.6.1	Dilatação	42
2.6.2	Erosão	43
2.6.3	Abertura	44
2.6.4	Fechamento	45
2.7	Segmentação	45
2.7.1	Limiarização (<i>Threshold</i>)	46
2.7.2	Detecção de bordas	47
2.7.3	Crescimento de regiões	48
2.7.4	Otsu	49
2.7.5	<i>Valley-emphasis</i>	50
2.7.6	<i>Neighborhood valley-emphasis</i>	50
2.8	Registro de imagem	51
2.9	<i>Principal Component Analysis (PCA)</i>	52
2.10	Técnicas de avaliação para segmentação de imagens	52

2.10.1	Abordagem diagnóstica	53
2.10.2	Coeficiente de Dice	54
2.11	Trabalhos Relacionados	55
3	MÉTODO PROPOSTO	59
3.1	Descrição geral	59
3.2	Pré-processamento	61
3.3	Processamento	63
3.4	Pós-processamento	64
4	ESTUDO DE CASOS	67
4.1	Estudo de caso da rede vascular óssea de maxila e mandíbula humana.	67
4.2	Estudo de caso da rede vascular óssea do fêmur esquerdo de um rato de laboratório	78
4.3	Estudo de caso da rede vascular óssea do fêmur direito de um rato de laboratório	91
5	CONCLUSÃO	99
5.1	Trabalhos Futuros	100
	REFERÊNCIAS	101

Introdução

No campo de pesquisa da biologia existem diferentes técnicas para obtenção de imagens, cada uma focada em capturar um determinado aspecto biológico. Por exemplo, as imagens obtidas por meio de raio-x são fundamentais para captura de esqueletos e a partir da análise dessas imagens os especialistas são capazes de detectar fraturas, má formação óssea dentre outras patologias. Outro tipo de imagem é obtida por ressonância magnética, por meio de pulsos de radiofrequência a máquina de ressonância cria imagens 2D horizontais e verticais da região analisada e posteriormente une todas as imagens geradas para formar a reconstrução 3D da região. Existem também as imagens histológicas as quais contêm parte do bloco biológico a nível tecidual. A grosso modo, imagens histológicas são o resultado da seção do bloco biológico, corados com algum tipo de corante específico (diamino benzidina Diaminobenzidina tetrahydrocloro (DAB) ou hematoxilina e eosina (H&E) por exemplo) para marcar as regiões de interesse que posteriormente são levadas ao microscópio o qual possui uma câmera acoplada que registra a imagem. Esta pesquisa está focada no processamento das imagens histológicas do tecido ósseo.

A análise histológica do tecido ósseo pode detectar tanto características inerentes ao indivíduo portador do bloco biológico quanto anomalias localizadas no tecido ocasionadas por terapia, injeção de medicamentos ou incisões. Estas anomalias podem causar a diminuição da vascularização, deficiência no metabolismo ósseo e perda/morte de células. Por esse motivo o estudo da rede vascular óssea se torna extremamente importante para a prevenção e tratamento de possíveis distúrbios no tecido ósseo.

Para avaliar um tecido ósseo é necessário que haja uma análise da composição do tecido ósseo. Mais especificamente, é necessário mensurar as características e quantificar os canais ósseos e osteócitos presentes no tecido. Os canais ósseos se subdividem em canais de *Havers* e canais de *Volkman*. Eles são responsáveis pela comunicação entre a cavidade medular e a superfície externa do osso. Eles também armazenam a medula óssea, que pode ser amarelada e formada pelo tecido adiposo ou vermelha e formada por células sanguíneas. Nas imagens histológicas, os canais ósseos são representados por grandes aberturas brancas. Já os osteócitos são responsáveis por entregar as substâncias

nutritivas e gás oxigênio proveniente do sangue para as células ósseas sendo representados nas imagens histológicas por pequenos buracos geralmente com algum núcleo.

Vários trabalhos têm como objeto de estudo imagens histológicas de ossos. Em Oliveira et al. (2006) foram avaliadas características morfológicas de frangos de corte, com o objetivo de avaliar as mudanças ocorridas na estrutura óssea. Para chegar aos resultados os autores tiveram que segmentar os canais ósseos presentes nas imagens. Para esta tarefa foi utilizada uma limiarização manual, na qual pixels de intensidade menores que um valor estipulado pelos autores eram considerados fundo e pixels iguais ou maiores a esse valor eram considerados o objeto de interesse. No trabalho de Liu et al. (1999) a análise das micro características do tecido ósseo foi capaz de mensurar a idade da amostra. Os autores também tiveram que realizar a segmentação das imagens. Para isto foi usado uma suavização adaptativa por vizinhança, com o intuito de diminuir a quantidade de ruído. Ao resultado da suavização foi aplicado o algoritmo k-means e posteriormente cada grupo gerado foi rotulado como um objeto da imagem. A pesquisa de Rabelo, Beletti e Dechichi (2010) teve como objetivo analisar as alterações causadas por radioterapia nos ossos de ratos, a partir da análise de imagens histológicas. Primeiramente os autores tiveram que segmentar as imagens utilizando o método de limiarização manual e posteriormente foram extraídas as características de área e seu desvio padrão, perímetro e lacunaridade.

Infelizmente ainda hoje a maioria das análises de imagens histológicas da rede vascular óssea são feitas manualmente por um especialista. Ele deve adquirir as imagens, isolar as regiões de interesse, mensurar essas regiões e analisar seus resultados. Além de ser um processo dispendioso temporal e financeiramente, ele resulta em uma fadiga do especialista ocasionando resultados subjetivos e suscetíveis a erros. Pode acontecer de um mesmo especialista com a mesma imagem gerar resultados diferentes dependendo do seu cansaço.

A cada ano a computação auxilia mais a biologia, sendo em processamento de sinais, processamento de dados numéricos ou processamento de imagens. Com o desenvolvimento da capacidade de processamento dos computadores a análise de imagens biológicas vem se tornando cada vez mais objeto de estudo. Os computadores podem auxiliar na aquisição, realce, segmentação e análise dessas imagens.

O processamento digital de imagens pode ajudar os especialistas em algumas etapas da análise. Uma dessas etapas é o isolamento dos objetos de interesse, o qual é chamado de segmentação. A segmentação é importante pois a partir do seu resultado serão extraídas características morfológicas dos objetos segmentados. Em imagens não triviais, como ocorre as imagens médicas, a segmentação é fundamental para o sucesso ou fracasso de toda a análise. Para auxiliar os especialistas biólogos foram desenvolvidos vários métodos de segmentação nuclear em imagens histológicas tingidas com os corantes hematoxilina e eosina (H&E). Mas a segmentação automática/semi-automática de canais ósseos e osteócitos ainda é um campo de pesquisa pouco explorado.

1.1 Motivação

Na literatura foram encontrados poucos trabalhos que tivessem como objetivo a segmentação automática de canais ósseos e osteócitos em imagens histológicas coradas com H&E, e as pesquisas encontradas não fazem uso de processamento digital de imagens para segmentar automaticamente. De modo geral, essas pesquisas utilizam uma rede neural artificial, a qual precisa ser calibrada com resultados prévios. Pela escassez de pesquisa e com o objetivo de auxiliar os especialistas na análise da rede vascular óssea, foi desenvolvido um método capaz de segmentar automaticamente canais ósseos e osteócitos em imagens histológicas da rede vascular óssea corada com hematoxilina e eosina.

Uma das dificuldades encontradas durante a pesquisa foi a alta dimensionalidade dos dados (imagens com mais de 70.000.000 de pixels). Além disso, mesmo em um ambiente controlado e cuidado por especialistas podem ocorrer algumas imperfeições na coleta das imagens, que acabam por acarretar dificuldades no momento da segmentação. Entre essas imperfeições podemos citar: borramento, luminosidade não uniforme, deformação da imagem, baixo contraste, mesmo objeto com o processo de coloração do tecido diferente, rasgos no tecido histológico.

1.2 Objetivos e Desafios da Pesquisa

O objetivo desse trabalho foi propor um método de segmentação automática/semi automática para imagens histológicas da rede vascular óssea corada com H&E, a fim de aumentar a precisão de detecção de componentes histológicos (canais e osteócitos), bem como artefatos e anomalias nas imagens.

1.2.1 Objetivos específicos

- ❑ Estudar de diversas técnicas utilizadas no pré-processamento, processamento e pós-processamento de uma segmentação de imagem, como por exemplo, normalização dos canais de cor, isolamento de cores específicas, limiarização, processos morfológicos e de reconstrução;
- ❑ Extrair as técnicas mais eficientes para as imagens histológicas e propor um método capaz de segmentar com alto índice de acerto os objetos de interesse, nesse caso, canais ósseos e osteócitos;
- ❑ Aplicar o método proposto em imagens histológicas da rede vascular óssea, tingidas com os corantes H&E;
- ❑ Analisar e avaliar os resultados provenientes das melhorias através de métricas comumente utilizadas.

1.3 Contribuições

Ao final da pesquisa foi desenvolvido um método robusto que pode ser usado de maneira automática, para a segmentação de canais ósseos e osteócitos em imagens histológicas coradas com H&E. O método é dividido em quatro etapas e está detalhado no Capítulo 3. Para verificar a eficiência do método, ele foi aplicado, a três estudos de caso diferentes e avaliado por meio do coeficiente de Dice e pelo método da abordagem diagnóstica, além de ser comparado com outros três algoritmos de segmentação (*Otsu*, *Valley Emphasis* e *Neighborhood Valley Emphasis*).

Como contribuição bibliográfica a partir desse trabalho teve-se o artigo *Automatic segmentation of the human bone vascular network* aceito e apresentado no XIII Workshop de Visão Computacional.

1.4 Organização da Dissertação

O presente trabalho está organizado da seguinte maneira: no Capítulo 2 são apresentados e detalhados todos os conceitos, métodos e técnicas utilizadas durante o desenvolvimento da pesquisa. O Capítulo 2 conta com 12 sub-seções detalhando tanto a parte computacional quanto a parte biológica pesquisada. O Capítulo 3 contém toda a descrição do método de segmentação automática. No Capítulo 4 encontram-se três estudos de caso nos quais o método proposto foi aplicado, com a finalidade de testar e mensurar a qualidade do método. Por fim, no Capítulo 5 são descritas as perspectivas finais da pesquisa, as conclusões a que os autores chegaram e os trabalhos futuros a serem feitos para complementar a pesquisa.

Fundamentação Teórica

Nesse capítulo serão expostos, conceitos, técnicas e procedimentos que compõem o método proposto pelo autor desse texto. Dentre as técnicas estão: definição de imagem histológica e procedimentos para sua aquisição, espaços de cor e suas transformações, normalização de imagens histológicas, deconvolução de cor, algoritmo de agrupamento k-means, operações morfológicas, segmentação de imagens digitais, registro de imagem, *principal component analysis*, técnicas para avaliação do resultado da segmentação, e por fim, trabalhos relacionados a este.

2.1 Histologia e Tecido Ósseo

Histologia pode ser descrita como o estudo de tecidos biológicos. Os tecidos são divididos em quatro classes fundamentais, o tecido epitelial, conjuntivo, muscular e nervoso. Os tecidos são constituídos por suas células e matriz extra celular. Uma das principais funções da matriz extra celular é ser um meio de transporte de nutrientes. Pelo tamanho das células e os componentes da matriz extra celular a histologia depende do uso de microscópios. Para ser usado no microscópio o tecido antes deve ser preparado (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Quando utilizado um microscópio óptico a imagem é gerada por meio de um feixe de luz transmitido por meio do corte. Considerando a espessura dos tecidos a luz não consegue atravessá-lo por completo, sendo assim é necessário seccionar o tecido para se obter as fatias mais delgadas possíveis. Estes cortes são chamados de cortes histológicos e são obtidos com a ajuda do micrótomo (instrumento de precisão para fatiar tecidos com precisão nanométrica) (KIERZENBAUM, 2008).

Após a secção inicia-se a autólise (digestão dos tecidos por enzimas presentes nas células ou por bactérias) (KIERZENBAUM, 2008). Para evitar a degradação do tecido uma série de tratamentos são feitos. A primeira parte é a fixação que pode ser feita tanto de maneira química quanto física. Na fixação química o tecido é imerso em uma solução de agentes desnaturantes, ou em outras palavras, agentes que estabilizam as

células e param a autólise após a secção. Na biomedicina essas soluções são chamadas de fixadores (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Após a fixação os tecidos ainda não se encontram nas condições necessárias para sofrerem uma secção extremamente fina. Eles devem ser infiltrados com substâncias que lhes proporcionem mais rigidez (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Essas substâncias podem ser tanto a parafina quanto resinas de plástico. Esse procedimento é conhecido como embebição ou também inclusão (KIERZENBAUM, 2008).

Terminada a fase de embebição os tecidos podem finalmente serem seccionados com um instrumento de alta precisão chamado micrótomo que é capaz de fatiar o tecido na espessura de 1-10 μm (1 μm equivale a 0.001 mm) (ABREU, 2016). Ao fim da última secção o tecido é colocado para flutuar em uma superfície de água aquecida para aderir à lâmina de vidro e posteriormente ser corado (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A maioria dos cortes histológicos são incolores e ao serem analisados por microscópios de luz muitos dos componentes seriam perdidos e a análise seria pouco proveitosa. A fim de otimizar a análise histológica foram desenvolvidos métodos de coloração que além de tornar os componentes celulares visíveis facilitam a distinção entre cada um. A maioria dos corantes agem como compostos ácidos ou básicos na escala de Potencial Hidrogeniônico (pH) sendo considerado $7 > \text{pH} \geq 0$ componentes ácidos, $14 \geq \text{pH} > 7$ componentes básicos e $\text{pH} = 7$ componente neutro. Os componentes dos tecidos que são tingidos com os corantes básicos são chamados de basófilos, enquanto os componentes que são tingidos com corantes ácidos são denominados acidófilos. A hematoxilina, por exemplo, se comporta como um corante básico, se ligando as estruturas basófilas, enquanto a eosina tinge os componentes acidófilos de um corte histológico. Os corantes hematoxilina e eosina conhecidos como corantes H&E são os mais comumente usados. A hematoxilina tinge as estruturas basófilas (como os núcleos por exemplo) com uma coloração azulada enquanto a eosina tinge estruturas acidófilas (citoplasma) com coloração rosada (KIERZENBAUM, 2008). A Figura 1 representa os passos da preparação de uma amostra histológica.

O esqueleto de qualquer animal é formado principalmente por tecido ósseo. Ele é responsável por dar suporte às partes não duras, proteger órgãos vitais como coração, pulmão e cérebro por exemplo. Além de alojar a medula óssea, a qual tem por principal função formar células do sangue, ele funciona como apoio para os músculos esqueléticos transformando suas contrações em movimentos, além de funcionar como alavancas para aumentar a força gerada pelas contrações musculares (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

O tecido ósseo se enquadra dentro dos tecidos conjuntivos pois é formado por células e material extra celular calcificado denominado matriz óssea. As células formadoras são divididas em três classes: osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. Os osteócitos ficam situados na matriz óssea, mais especificamente em estruturas conhecidas como lacunas, as quais possuem canalículos que ligam um osteócito ao outro. É por meio destes canalículos que ocorre a troca de moléculas e íons entre os osteócitos. Essas células são responsáveis por

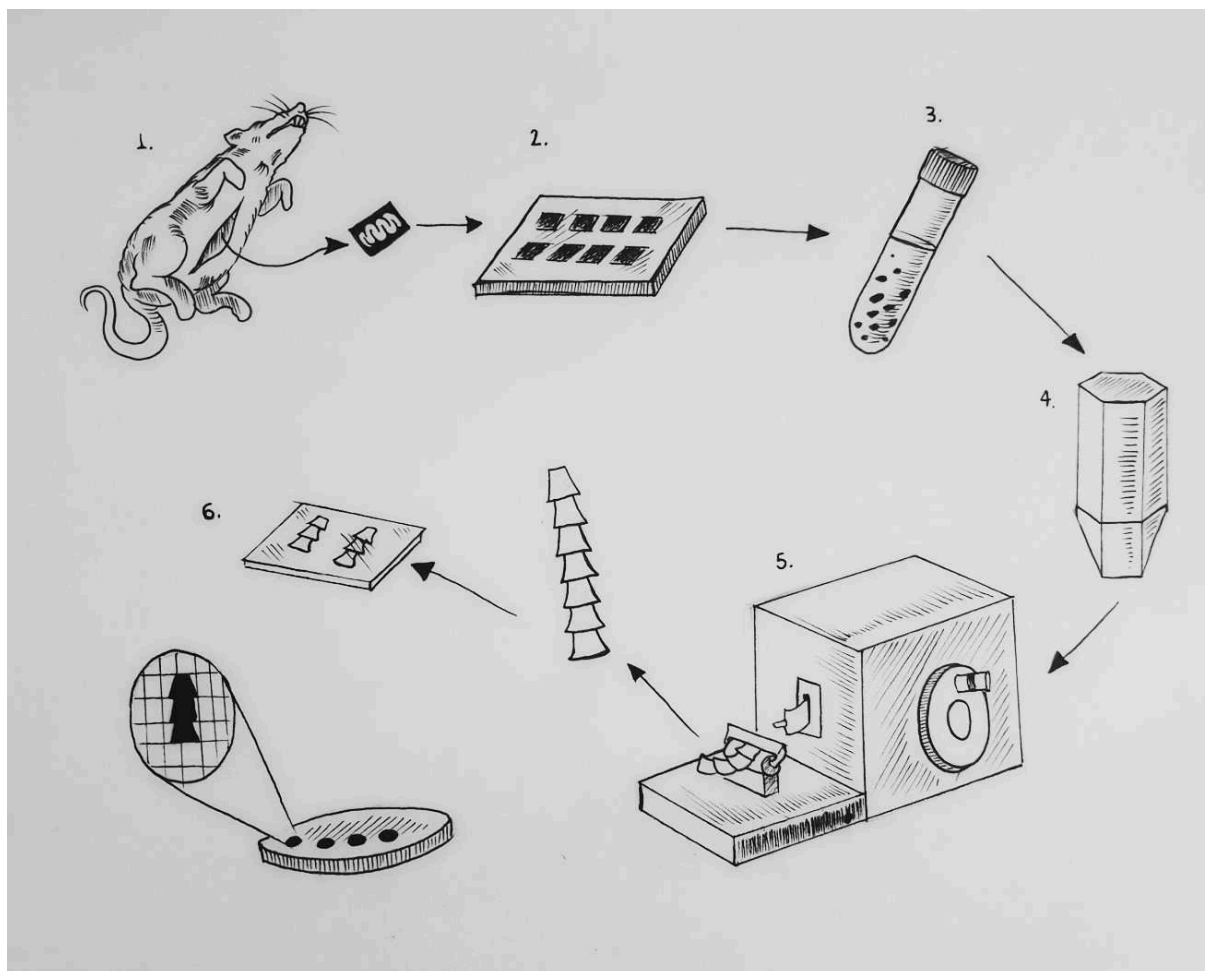


Figura 1 – Exemplo do processo para obtenção de amostras histológicas. 1) Sacrifica-se o animal; 2) Retira-se a amostra biológica; 3) Fixa-se a amostra; 4) Embebe-se a amostra em corantes; 5) Fatia-se a amostra em laminas extremamente finas com o auxílio de um micrótomo; 6) Fatias histológicas são colocadas em lâminas transparentes para digitalização.

Figura adaptada de Junqueira e Carneiro (2013).

manter a matriz óssea e após a sua morte ela é absorvida pela própria matriz. A célula que sintetiza a parte orgânica do tecido ósseo é o osteoblasto. Caso ele seja aprisionado pela matriz óssea ele passa a ser chamado de osteócito (RABELO et al., 2015). Por sua vez os osteoclastos são gigantes, multinucleados ramificado (ramificações irregulares) e são originados da medula óssea.

Os ossos grandes são divididos pelos especialistas em duas regiões: as epífises e a diáfise. A epífise se encontra nas extremidades e são constituídas pelo osso esponjoso enquanto a diáfise é a parte cilíndrica e quase totalmente composta por osso compacto (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A vascularização óssea é feita por meio dos canais de Havers e Volkmann. Os canais de Havers podem ser encontrados na diáfise e são compostos por tubos estreitos os quais passam pequenos vasos sanguíneos. Os canais de Volkmann, menores e transversais aos

canais de Havers, têm por objetivo também a nutrição do tecido ósseo. A Figura 2 mostra a disposição destes dois canais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

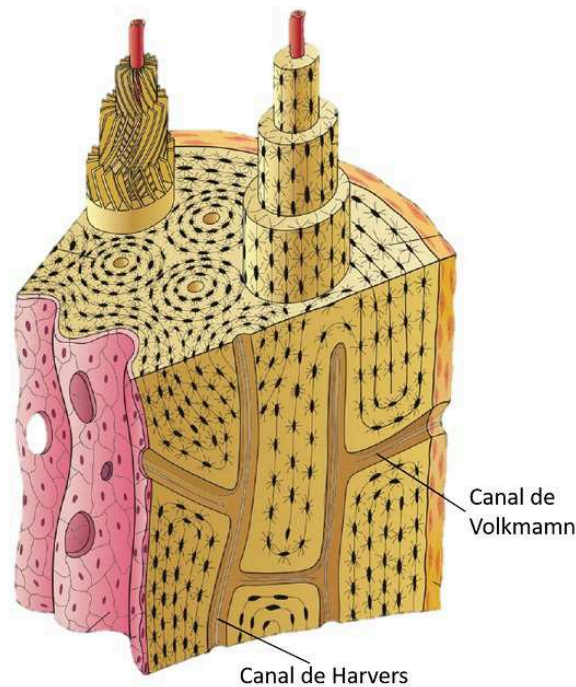


Figura 2 – Matriz óssea com destaque para a localização dos canais de Havers e Volkmann

Figura obtida de: Junqueira e Carneiro (2013).

2.2 Espaços de cores e suas transformações

Em 1666 Isaac Newton descobriu que a luz ao passar por um prisma de vidro se decompunha em cores entre o violeta e o vermelho. Foi a partir deste pontapé inicial de Newton que começaram as teorias para a ciências das cores (GONZALEZ; WOODS, 2010). Cada cor é composta por três componentes básicos: brilho que diz respeito a sua intensidade acromática, matiz que se refere ao comprimento de onda daquela cor (já que a teoria das cores é derivada da luz e o comprimento de onda é fundamental para a classificação de cada cor) e a saturação, a qual corresponde ao nível de pureza da cor ou, em outras palavras, a quantidade de branco que interfere na cor (IBRAHEEM et al., 2012).

Foi então em 1931 que a Comissão Internacional de Iluminação (CIE) determinou o comprimento de onda para cada cor primária (vermelho, verde e azul). Sendo o vermelho = 700 nm, verde = 546,1 nm e o azul = 435,8 (BROADBENT, 2004). O CIE criou então o RGB, fazendo surgir então o primeiro espaço de cor. O objetivo dos espaços de cores é padronizar a especificação de cores (ZHANG; KAMATA, 2016). Um espaço de cor é uma especificação de um sistema cartesiano de coordenadas no qual cada ponto corresponde

a uma cor. Nessa seção serão abordados os espaços de cores RGB, XYZ, $L^*a^*b^*$ e HSV bem como suas transformações.

O espaço de cor RGB se caracteriza por ser um modelo aditivo no qual as cores são expressas como uma combinação das três cores primárias, vermelho (*red* - R), verde (*green* - G) e azul (*blue* - B) (LOESDAU; CHABRIER; GABILLON, 2014). O espaço de cor RGB usualmente é representado por um cubo, ilustrado na Figura 3, no qual cada cor primária está representada em um vértice e as cores secundárias nos outros três vértices (GONZALEZ; WOODS, 2010). O preto se encontra na origem das coordenadas do cubo e o branco na extremidade mais distante da origem. Neste espaço de cor a escala de cinza se encontra no trecho que liga o preto ao branco (HUANG et al., 2016). Todas as cores neste espaço são representadas por pontos dentro do cubo e são definidas por vetores que partem da origem.

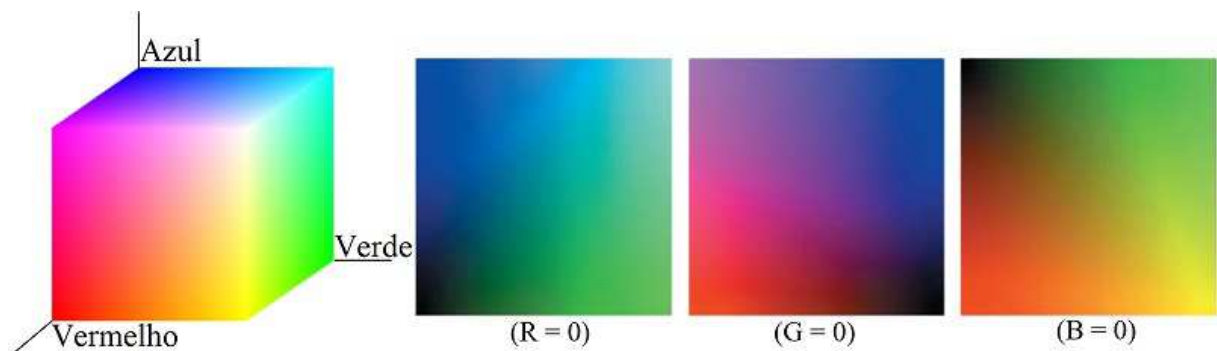


Figura 3 – Cubo de cores RGB com as três superfícies ocultas

Figura obtida de: Huang et al. (2016)

Para se ter uma imagem RGB são necessárias 3 camadas de imagens monocromáticas, cada uma destinada a uma cor primária. Cada pixel de cada camada de uma imagem RGB ocupa 8 bits na memória, gerando assim para cada canal 256 possíveis valores. Como tem-se três camadas pode-se dizer que uma imagem RGB tem a capacidade de expressar $(2^8)^3 = 16.777.216$ cores diferentes (SU; HU, 2013). A maioria dos dispositivos de aquisição de imagem trabalham com o espaço de cor RGB por ele expressar de maneira satisfatória para o ser humano a cena capturada. Porém, para as máquinas, o modelo RGB nem sempre é o suficiente. Isso ocorre porque o modelo possui alguns problemas. Por exemplo, ao analisar o gráfico de cores gerado pela padronização da CIE representado pela Figura 4 pode-se perceber que no intervalo entre o azul e o verde há uma certa quantidade negativa de vermelho. Esta porção de vermelho negativo foi adicionada ao modelo de cor RGB pois as células cone (células responsáveis pela detecção das cores nos humanos) são estimuladas todas ao mesmo tempo, criando assim uma sobreposição de percepção das cores. Para minimizar este efeito alguma das cores primárias deveria possuir valores negativos. No caso do modelo de cor RGB da CIE foi o vermelho a cor escolhida (GONZALEZ; WOODS, 2010).

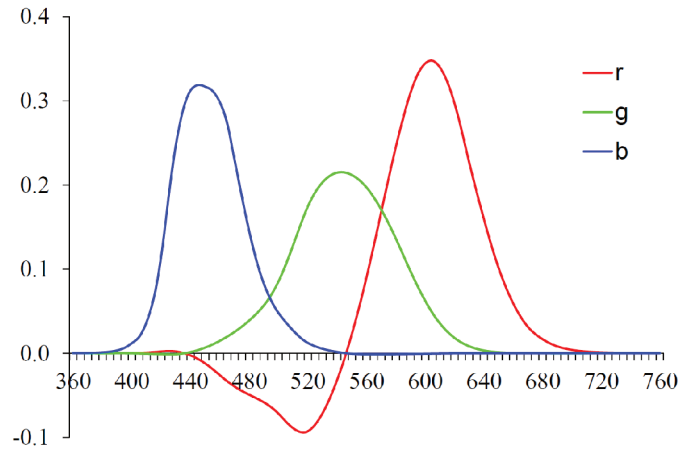


Figura 4 – Gráfico de comprimento de onda de cada cor primária do espaço de cor RGB.

Figura modificada de: Ohm (2016)

Para contornar os problemas ocasionados pela mistura de luz negativa a uma cor a CIE desenvolveu outro espaço de cor conhecido como XYZ, que não possui valores negativos, como mostrado na Figura 5 (ASMARE; ASIRVADAM; IZNITA, 2009). A novidade deste espaço de cor é que ele não divide a imagem em componentes espectrais primários e sim em luminosidade e cromaticidade. Enquanto a luminosidade representa o brilho da imagem a cromaticidade representa a matiz e saturação (ASMARE; ASIRVADAM; IZNITA, 2009).

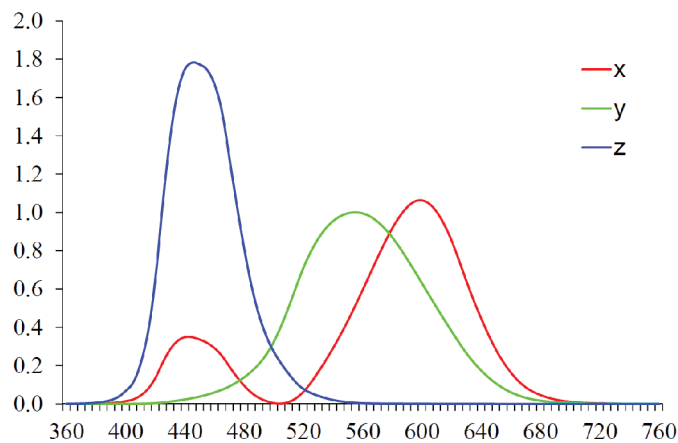


Figura 5 – Gráfico de comprimento de onda de cada canal do espaço de cor XYZ.

Figura obtida de: Asmare, Asirvadham e Iznita (2009)

No espaço de cor XYZ tem-se o Y representando a luminosidade e X e Z a cromaticidade. A transformação do espaço de cor RGB para XYZ é uma transformação pixel a pixel dada pela Equação 1. A partir da criação destes dois espaços de cores a CIE propôs

um diagrama de cromaticidade (OHM, 2016), representado pela Figura 6.

$$\begin{bmatrix} X \\ Y \\ Z \end{bmatrix} = \frac{1}{0.17697} \begin{bmatrix} 0.49 & 0.31 & 0.2 \\ 0.17697 & 0.81240 & 0.01063 \\ 0.00 & 0.001 & 0.99 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} R \\ G \\ B \end{bmatrix} \quad (1)$$

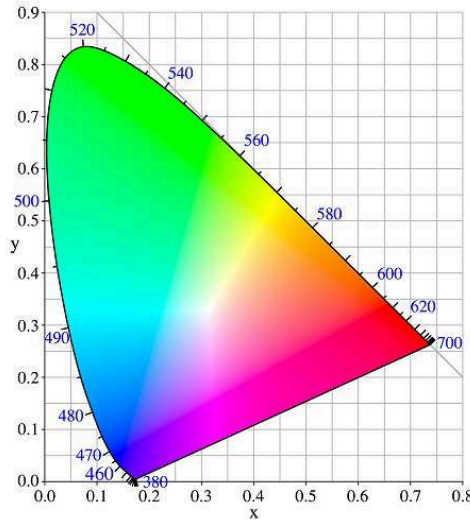


Figura 6 – Diagrama de cromaticidade CIE 1931

Figura modificada de: Ohm (2016)

Outro espaço de cor é o HSV (*hue*, *saturation* e *value*), assim como o RGB, é composto por 3 canais. O primeiro canal denominado matiz (H - *Hue*) é responsável por definir o componente de cor de cada pixel da imagem, a saturação (S - *Saturation*) é a influência de outras cores sobre a cor principal e o valor (V - *Value*) refere-se à quantidade de luz branca interferindo na cor (MANJUNATH et al., 2001). Portanto, o HSV divide os componentes principais da cor da imagem em cada um de seus canais, tornando cada canal específico para uma determinada análise de intensidade. Um exemplo do espaço de cor HSV é mostrado na Figura 7.

Como o espaço de cor RGB é o mais comum, as transformações de espaço de cor serão todas baseadas nele. A transformação do espaço de cor RGB para HSV é dada pela Equação 2 na qual *MAX* e *MIN* são os valores máximos e mínimos de uma imagem

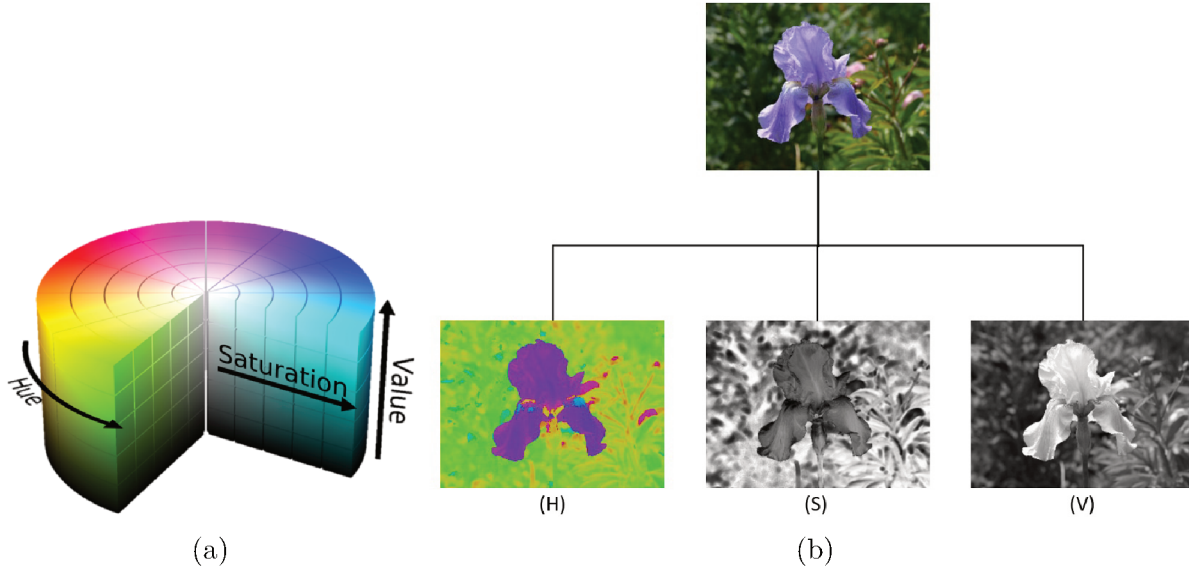


Figura 7 – a) Espaço de cor HSV representado em cada um de seus componentes. b) Decomposição de cada canal HSV.

Figura obtida de (a): Zhu, Mai e Shao (2015); (b): Gonzalez e Woods (2010).

RGB com intensidades variando de 0,0 até 1,0 (GONZALEZ; WOODS, 2010).

$$H = \begin{cases} 60 * \frac{G-B}{MAX-MIN} + 0 & \text{se } MAX = R \text{ e } G \geq B \\ 60 * \frac{G-B}{MAX-MIN} + 360 & \text{se } MAX = R \text{ e } G < B \\ 60 * \frac{G-B}{MAX-MIN} + 120 & \text{se } MAX = G \\ 60 * \frac{G-B}{MAX-MIN} + 240 & \text{se } MAX = B \end{cases} \quad (2)$$

$$S = \frac{MAX - MIN}{MAX}$$

$$V = MAX$$

O espaço de cor XYZ não é conveniente para os seres humanos, pois a maneira que é separada a luminância da cromaticidade não é familiar aos olhos. Com o objetivo de facilitar para o sistema visual humano reconhecer a luminância das imagens, o CIE remapeou de maneira não linear o espaço de cor XYZ, criando assim o espaço de cores CIE L*a*b* 1976 no qual a diferença entre a luminância e a cromaticidade são mais uniformes para os humanos (NARKHEDE; GOKHALE, 2015). Neste espaço o componente L* se refere a luminosidade da imagem e pode ser definido como está descrito na Equação 3, no qual Y_n é o valor do branco e a função $f(t)$ (definida na Equação 4) é uma aproximação de inclinação finita com $\delta = 6/29$. O resultado da escala de 0 a 100 mede aproximadamente quantidades iguais de perceptibilidade. Os componentes a* e b* dizem respeito à cromaticidade e são definidos de maneira semelhante pela Equação 5 (GONZALEZ; WOODS, 2010). Um

exemplo de transformação de uma imagem RGB para $L^*a^*b^*$ é mostrada na Figura 8.

$$L^* = 116f\left(\frac{Y}{Y_n}\right) \quad (3)$$

$$f(t) = \begin{cases} t^{1/3} & \text{se } t > \delta^3 \\ t/(3\delta^2) + 2\delta/3 & \text{se não} \end{cases} \quad (4)$$

$$\begin{aligned} a^* &= 500 \left[f\left(\frac{X}{X_n}\right) - f\left(\frac{Y}{Y_n}\right) \right] \\ b^* &= 200 \left[f\left(\frac{Y}{Y_n}\right) - f\left(\frac{Z}{Z_n}\right) \right] \end{aligned} \quad (5)$$

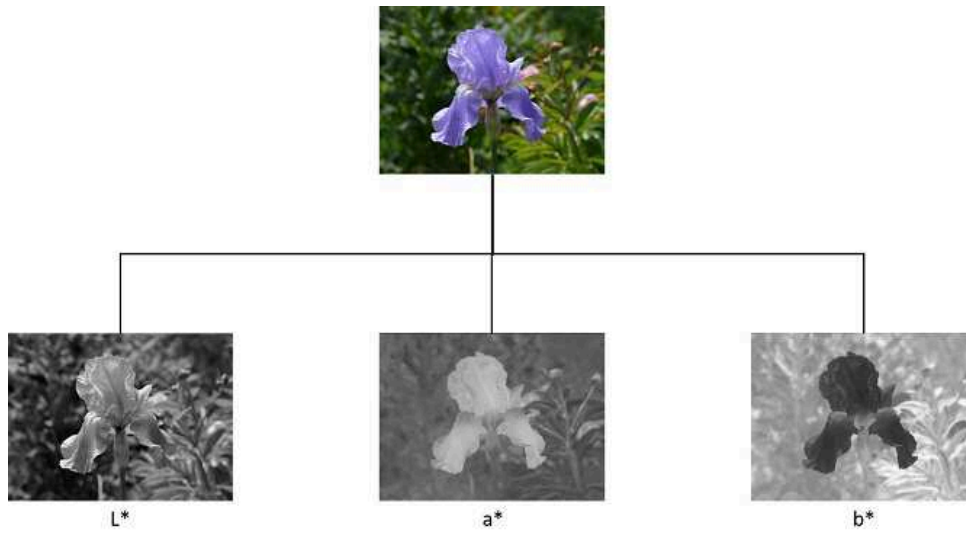


Figura 8 – Exemplo de transformação RGB para CIE 1976 $L^*a^*b^*$ com a decomposição dos canais de L^* ; a^* ; b^* .

Figura obtida de: Gonzalez e Woods (2010)

2.3 Normalização de imagens histológicas

O principal objetivo no método de normalização de imagens histológicas é reduzir as variações nas características da imagem e melhorar os padrões dos tecidos biológicos (LI; PLATANOTIS, 2014). A melhora desses padrões auxilia no processo de correspondência entre duas imagens do mesmo bloco biológico (essa correspondência é essencial para o alinhamento das imagens). A normalização otimiza o brilho e contraste da imagem baseando-se na análise da distribuição de histograma em cada um dos canais RGB (WANG; KA; CHEN, 2014).

Nas imagens histológicas convencionais tingidas com os corantes hematoxilina e eosina, a hematoxilina tinge as estruturas basófilas com coloração azulada enquanto a eosina tinge com uma coloração rosada (LI; PLATANOTIS, 2014). Ao se realizar a equalização de histograma percebe-se que o melhor espaço de cor para aplicar o método de normalização

das imagens é o RGB, pois ele obteve melhor desempenho na separação das estruturas basófilas e acidófilas. Portanto, a normalização é aplicada aos canais vermelho, verde e azul (WANG; KA; CHEN, 2014).

Nas imagens coloridas, o valor de cada pixel é representado pelo vetor \bar{X} , sendo este vetor a composição de cada componente de cor. Supondo-se que $I_{(i,j)} = \bar{X} = [x^{c1}, x^{c2}, x^{c3}]$ é um vetor aleatório em uma imagem colorida, a primeira tarefa a ser executada é computar a intensidade mínima e máxima de cada canal (x_{low} e x_{high} respectivamente) conforme a Equação 6 e Equação 7, nas quais H representa o histograma, $H(x)$ é a quantidade de pixels de intensidade x , $c_j : \{c_1, c_2, c_3\}$ (cada um dos canais RGB), $\alpha = 0,1$ e $\beta = 0,002$. Os valores de α e β foram obtidos de maneira empírica pelos autores do método (WANG; KA; CHEN, 2014).

$$x_{low}^{c_j} = \arg \min_x \left(\sum_k H(k)^{c_j} * \beta < H(x)^{c_j} < \sum_k H(k)^{c_j} * \alpha \right) \quad (6)$$

$$x_{high}^{c_j} = \arg \max_x \left(\sum_k H(k)^{c_j} * \beta < H(x)^{c_j} < \sum_k H(k)^{c_j} * \alpha \right) \quad (7)$$

O próximo passo é remapear o valor original do pixel x^{c_j} pertencente ao intervalo de $x_{low}^{c_j}$ até $x_{high}^{c_j}$ para um novo valor $x_*^{c_j}$ entre $x_{min}^{c_j}$ e $x_{max}^{c_j}$, como descrito matematicamente na Equação 8 (WANG; KA; CHEN, 2014).

$$x_*^{c_j} = \begin{cases} x_{min}^{c_j} & , x^{c_j} \leq x_{low}^{c_j} \\ x_{min}^{c_j} + (x^{c_j} - x_{low}^{c_j}) \frac{x_{max}^{c_j} - x_{min}^{c_j}}{x_{high}^{c_j} - x_{low}^{c_j}} & , x_{low}^{c_j} \leq x^{c_j} \leq x_{high}^{c_j} \\ x_{max}^{c_j} & , x^{c_j} > x_{high}^{c_j} \end{cases} \quad (8)$$

A normalização das imagens reduz a variação de tonalidade entre as imagens além de realçar os padrões existentes no tecido analisado, auxiliando assim na extração de características, segmentação e registro das imagens. Um exemplo da aplicação do método de normalização descrito por essa seção está exposto na Figura 9 (WANG; KA; CHEN, 2014).

2.4 Deconvolução de cor

A deconvolução de cor tem como objetivo principal a separação dos canais de corantes imuno-histoquímicos como a *hematoxilina* e *eosina* (VETA et al., 2013). Segundo (RUIFROK; JOHNSTON, 2001) os métodos de deconvolução de cor anteriores a eles perdiam informações, pois muitas vezes a deconvolução era direcionada para áreas manchadas com apenas um corante. Porém, é muito difícil que uma imagem histológica seja tão bem definida. Portanto, eles desenvolveram um método que pode ser usado para praticamente todas as combinações de duas ou três colorações. O método desenvolvido por (RUIFROK; JOHNSTON, 2001) é baseado na transformação ortonormal da imagem

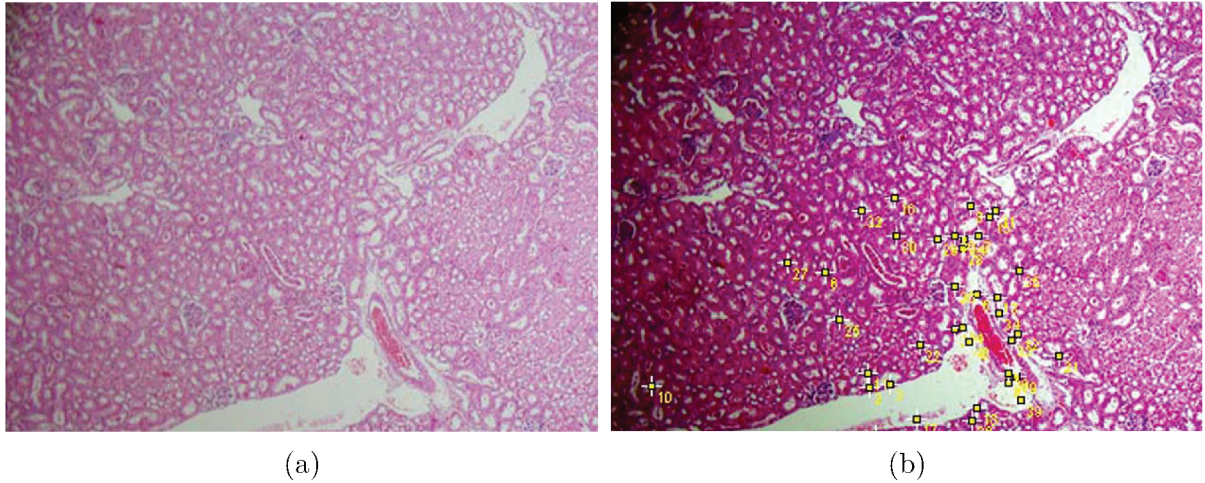


Figura 9 – Exemplo do processo de normalização de imagens histológicas. (a) Imagem original; (b) Imagem normalizada. Os pontos destacados na Figura (b) são as características do tecido que foram realçadas pela normalização para guiar o futuro alinhamento.

Figura obtida de: Wang, Ka e Chen (2014) ©

original RGB (*Red*, *Green*, *Blue*), a fim de separar os corantes em um canal distinto da imagem.

Para dar continuidade a explanação sobre o método de deconvolução de cor é necessário abordar a representação de cor. Mais especificamente sobre a relação entre a transmissão da luz e a espessura da camada do meio absorvente, conhecida como a lei de *Lambert-Beer's* (VETA et al., 2013). Quando um feixe de luz monocromática atravessa um meio transparente homogêneo cada camada desse meio absorve igualmente fração da luz. A lei de *Lambert-Beer's* pode ser expressa pela Equação 9, em que: I é a intensidade de luz transmitida, I_0 é a intensidade de luz incidente, x o coeficiente de absorção e l a espessura do meio absorvente (RUIFROK; JOHNSTON, 2001).

$$I = I_0 * 10^{-x l} \quad (9)$$

No modelo *RGB*, as intensidades I_R, I_G, I_B são obtidas pela câmera para cada pixel. A intensidade relativa a cada canal depende da concentração de corante de uma maneira não linear, por isso os valores de intensidade não podem ser diretamente usados para a separação e mensuração de cada corante (LAAK et al., 2000). No entanto, a Densidade Óptica (OD) de cada canal pode ser definida na Equação 10.

$$OD_x = -\log_{10}(I/I_0) \quad (10)$$

Segundo a Equação 10, a OD para cada canal é linear com a concentração de absorção do material e por isso pode ser usada para a separação de múltiplos corantes na amostra (RUIFROK; JOHNSTON, 2001).

Cada um dos corantes presentes na amostra pode ser caracterizado por uma densidade óptica específica em cada um dos três canais RGB, o qual pode ser representado por um vetor de três posições (VETA et al., 2013). Por exemplo, uma amostra tingida apenas com corante hematoxilina resulta em um OD com valores de 0,18, 0,20 e 0,08 para cada um dos canais RGB, respectivamente (RUIFROK; JOHNSTON, 2001).

Para cada corante que tingiu a amostra existirá então um vetor de três posições. Caso tenha-se uma amostra com três corantes o vetor passa a ser uma matriz 3×3 da densidade óptica de cada corante em relação aos canais RGB (RUIFROK; JOHNSTON, 2001). Essa matriz é representada na Tabela 1.

Tabela 1 – Matriz OD.

Tabela obtida de: Ruifrok e Johnston (2001)

$$\begin{bmatrix} p_{11} & p_{12} & p_{13} \\ p_{21} & p_{22} & p_{23} \\ p_{31} & p_{32} & p_{33} \end{bmatrix}$$

Cada linha dessa matriz representa um corante e cada coluna representa a densidade óptica de cada canal. Para cada corante pode-se determinar uma densidade óptica em cada um dos três canais medindo a absorção relativa ao vermelho, verde e azul (RUIFROK; JOHNSTON, 2001). Um exemplo de uma matriz OD para a combinação de hematoxilina, eosina e DAB é mostrada na Tabela 2.

Tabela 2 – Matriz OD para hematoxilina, eosia e DAB.

Tabela obtida de: Ruifrok e Johnston (2001)

$$\begin{bmatrix} 0.18 & 0.20 & 0.08 \\ 0.01 & 0.13 & 0.01 \\ 0.10 & 0.21 & 0.29 \end{bmatrix}$$

Para conseguir a separação de cada corante os autores Ruifrok e Johnston (2001) fizeram uma transformação ortonormal das informações RGB para conseguir as informações independentes de cada corante. Depois normalizaram essa transformação para obter o balanceamento correto do fator de absorção de cada corante. Para a normalização é preciso dividir cada vetor OD pelo seu tamanho total:

$$\begin{aligned} \hat{p}_{11} &= p_{11} / \sqrt{p_{11}^2 + p_{12}^2 + p_{13}^2} \\ \hat{p}_{21} &= p_{21} / \sqrt{p_{21}^2 + p_{22}^2 + p_{23}^2} \\ \hat{p}_{31} &= p_{31} / \sqrt{p_{31}^2 + p_{32}^2 + p_{33}^2} \end{aligned}$$

Como resultado, tem-se a matriz normalizada \mathbf{M} , representada na Tabela 3. Os valores da matriz normalizada sobre a combinação dos corantes de hematoxilina, eosina e DAB é mostrada na Tabela 4.

Tabela 3 – Matriz OD normalizada.

Tabela obtida de: Ruifrok e Johnston (2001)

$$\begin{bmatrix} \hat{p}_{11} & \hat{p}_{12} & \hat{p}_{13} \\ \hat{p}_{21} & \hat{p}_{22} & \hat{p}_{23} \\ \hat{p}_{31} & \hat{p}_{32} & \hat{p}_{33} \end{bmatrix}$$

Tabela 4 – Matriz OD normalizada para hematoxilina, eosina e DAB, valores normalizados a partir da Tabela 2

Tabela obtida de: Ruifrok e Johnston (2001)

$$\begin{bmatrix} 0.65 & 0.70 & 0.29 \\ 0.07 & 0.99 & 0.11 \\ 0.27 & 0.57 & 0.78 \end{bmatrix}$$

Se \mathbf{C} é o vetor de três posições para as quantidades dos três corantes em um pixel em particular, então o vetor de níveis OD detectado naquele pixel é $y = \mathbf{CM}$. A partir disso pode-se dizer que é $\mathbf{C} = \mathbf{M}^{-1}[y]$. Isso significa que a multiplicação entre o OD da imagem com o inverso da matriz OD, pode definir a matriz de deconvolução \mathbf{D} , resultando em uma representação ortogonal dos corantes formando a imagem: $\mathbf{C} = \mathbf{D}[y]$ (RUIFROK; JOHNSTON, 2001).

A matriz de deconvolução \mathbf{D} correspondente à matriz de cor \mathbf{M} para hematoxilina, eosina e DAB é representada na Tabela 5:

Tabela 5 – Matriz de deconvolução para os corantes hematoxilina, eosina e DAB

Tabela obtida de: Ruifrok e Johnston (2001)

$$\begin{bmatrix} 1.88 & -1.02 & -0.55 \\ -0.07 & 1.13 & -0.13 \\ -0.60 & -0.48 & 1.57 \end{bmatrix}$$

Nessa matriz, a diagonal principal tem elementos maiores do que 1, enquanto os outros elementos são negativos. O processo final de deconvolução de cor implica que:

- ❑ Subtraindo parte do OD do verde e OD do azul para o OD vermelho obtém-se o OD da hematoxilina (RUIFROK; JOHNSTON, 2001);
- ❑ Subtraindo uma porção do OD de vermelho e OD azul para o OD verde obtém-se o OD da eosina (RUIFROK; JOHNSTON, 2001);
- ❑ Subtraindo uma porção de OD vermelho com OD azul para OD verde obtém-se o OD da DAB (RUIFROK; JOHNSTON, 2001);

Após a aplicação do método de deconvolução de cor é possível obter uma nova imagem com 3 canais distintos. Um canal focado em partes da imagem as quais foram tingidas

pelo corante hematoxilina, outro canal destacando as estruturas que foram tingidas pela eosina e por fim, o último enfatiza os elementos corados com DAB. Um exemplo de cada um dos novos canais está representado na Figura 10. A partir dessa técnica é possível testar valores de densidade óptica até encontrar qual o ideal para a imagem histológica trabalhada e obter um resultado satisfatório de separação dos corantes hematoxilina e eosina.

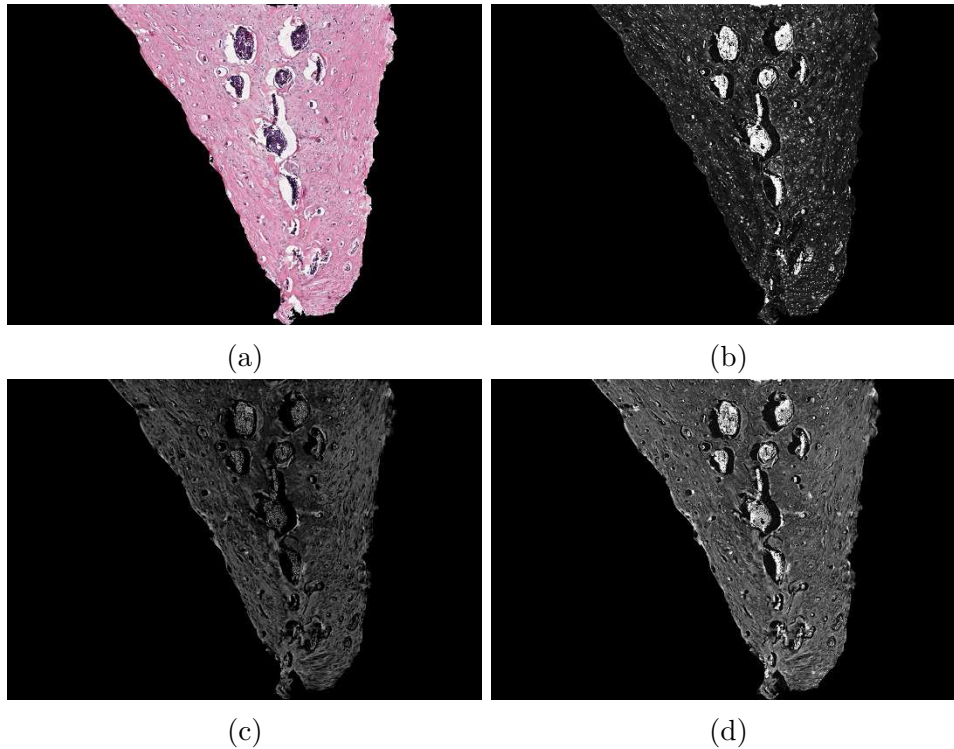


Figura 10 – Exemplo do processo de deconvolução de cor em imagens histológicas. (a) Imagem original; (b) Imagem em tons de cinza que destaca áreas marcadas com hematoxilina; (c) Imagem em tons de cinza que destaca áreas tingidas pela eosina e (d) Imagem em tons de cinza que destaca áreas com corante DAB. A matriz de densidade óptica utilizada foi a descrita na Tabela 5.

2.5 Algoritmo de agrupamento K-means

A técnica de agrupamento k-means é um tipo de aprendizado não supervisionado. Este tipo de aprendizagem é usada quando não se tem dados categorizados, ou seja, todos os dados do problema a ser resolvido são desconhecidos para o algoritmo. O objetivo principal do k-means é separar os dados de entrada em grupos, sendo a quantidade de grupos definida pela variável k . Além de separar os dados, o algoritmo encontra a localização do centroide de cada grupo, isto é, o ponto médio de cada grupo (CHEN; CHEN; CHIEN, 2008).

O algoritmo funciona de maneira iterativa, colocando cada dado em um determinado grupo, baseado nas características de cada elemento do conjunto de dados de entrada.

O agrupamento se dá por similaridades entre as características de cada elemento do problema. O resultado final do algoritmo é a rotulação de cada elemento em um determinado grupo, ou seja, se foram definidos 5 grupos, cada elemento receberá um valor de 1 a 5, demonstrando em qual grupo aquele dado está inserido (KANUNGO et al., 2002).

O método k-means usa refinamentos iterativos para produzir um melhor resultado final a partir de pequenos ajustes no centroide de cada grupo. As entradas para o algoritmo são: a quantidade de grupos a serem criados, k , e os dados a serem agrupados. Os dados são uma coletânea de características de cada elemento a ser analisado, usualmente cada característica é uma coluna e cada elemento (ou indivíduo) é uma linha de uma tabela que contém toda a coletânea (LIKASA; VLASSISB; VERBEEKB, 2003).

A partir do momento em que os dados foram tabulados e organizados e a quantidade k de grupos foi estabelecida, inicia-se o processamento dos mesmos. Inicialmente escolhe-se de maneira aleatória a posição de cada centroide. Logo após é calculada a distância de cada elemento/indivíduo até o centroide. Os elementos que forem mais próximos geram os grupos. Os centroides são recalculados a fim de permanecerem no centro de cada grupo. Então o cálculo da distância entre cada elemento e os centroides é realizado e caso seja necessário os elementos são redistribuídos. Este passo ocorre até que o erro quadrático, descrito pela Equação 11, seja minimizado, ou seja, a distância intra-grupo seja minimizada e a distância entre grupos maximizada (LIKASA; VLASSISB; VERBEEKB, 2003)..

Matematicamente, o método pode ser assim descrito. Seja $C = C_1, \dots, C_k$ uma partição dos dados em k grupos e m_1, m_2, \dots, m_k elementos escolhidos em cada grupo para representar o seu centro. O objetivo do método *k-means* é construir uma partição C que minimize o erro quadrático descrito na Equação 11 (DUDA; HART; STORK, 2012).

$$Erro(C) = \sum_{i=1}^k \sum_{p \in C_i} |p - m_i|^2 \quad (11)$$

Os passos sumarizados para a execução do k-means podem ser divididos em quatro grandes etapas (DHANACHANDRA; MANGLEM; CHANU, 2015):

1. Escolhe-se aleatoriamente um número k de centros (*seeds*) para iniciar os grupos;
2. Cada elemento é atribuído ao grupo cujo centro esteja mais próximo;
3. Move-se cada centro para a média (centróide) dos objetos do grupo correspondente;
4. Repete-se os passos 2 e 3 até que algum critério de convergência seja satisfeito (no caso, o erro quadrático);

O k-means vem sendo usado na área de processamento de imagens com o objetivo de segmentação, pois com ele é possível separar pixels com intensidades semelhantes e o desenvolvedor tem controle de quantos grupos a imagem será dividida. Isso permite mais

controle sobre a *under segmentation* (quando o resultado do método segmentação possui mais objetos do que o objeto de interesse) ou a *over segmentation* (quando alguma parte do objeto é perdida durante a segmentação) (KANUNGO et al., 2002).

2.6 Operações morfológicas

A morfologia matemática em Processamento Digital de Imagens (PDI) é uma ferramenta para representação e descrição de fronteiras, esqueletos e fechos convexos (GONZALEZ; WOODS, 2010). As técnicas morfológicas podem ser utilizadas também para filtragem, afinamento e poda de regiões da imagem.

A base da morfologia matemática é a teoria dos conjuntos. Nas imagens binárias os conjuntos são membros do espaço bi-dimensional de números inteiros (\mathbb{Z}^2) o qual todo elemento é um vetor cujas coordenadas são (x, y) . Em uma imagem em níveis de cinza esse conjunto pode ser representado por sub-conjuntos contidos em \mathbb{Z}^3 , sendo que dois componentes são as coordenadas dos pixels e o terceiro é a intensidade (VINCENT, 1992).

A morfologia matemática é importante pois por meio dela é possível realizar uma filtragem baseada no formato dos objetos. Esta filtragem é utilizada no pós-processamento do método proposto. Com a morfologia matemática o método é capaz de preencher buracos em objetos de interesse, eliminar grandes e pequenos objetos além de auxiliar na retirada de objetos baseados em sua circularidade.

Serão discutidas nessa seção quatro técnicas de morfologia, sendo elas dilatação, erosão, abertura e fechamento.

2.6.1 Dilatação

Dilatação é uma operação morfológica dependente de 2 estruturas, a estrutura a ser modificada (a imagem) e uma estrutura modificadora (elemento estruturante). A dilatação combina estes dois conjuntos de modo a aumentar a área dos objetos contidos na imagem. A forma na qual os objetos serão aumentados depende diretamente do formato do Elemento Estruturante (SE). Por exemplo, se um SE for da forma de um círculo, as extremidades dos objetos na imagem dilatação ficarão arredondadas. O formato assumido pelo SE depende do problema a ser resolvido. A dilatação A por B pode ser descrita como (BOYLE, 2007):

$$A \oplus B = \{x \in \mathbb{Z}^2 | c = a + b, a \in A \text{ e } b \in B\} \quad (12)$$

Na Equação 12 A e B são conjuntos pertencentes a \mathbb{Z}^2 , com A sendo a imagem a ser modificada e B o elemento estruturante. A dilatação é o conjunto de todos os deslocamentos c tais que B sobreponha-se em pelo menos um elemento não nulo (objeto /*foreground* da imagem A). Um exemplo de dilatação morfológica é apresentado na Figura 11. Uma

das aplicações da dilatação é a união de lacunas. Por exemplo, quando uma aplicação almeja classificar caracteres, ela precisa que eles estejam completos, caso algum esteja separado por alguma falha no momento de digitalização da imagem, a dilatação consegue expandir suas extremidades e conectar as partes que estão desconexas.

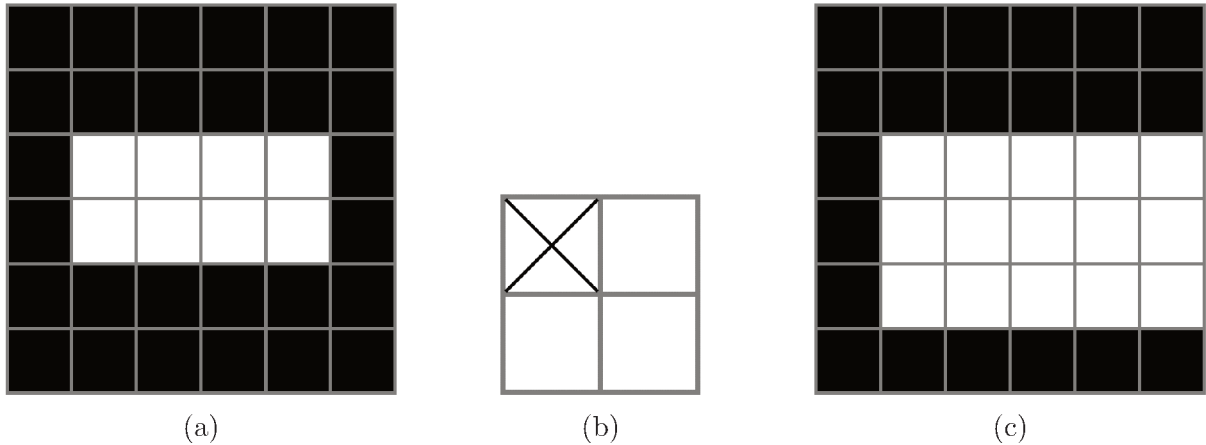


Figura 11 – Exemplo do processo morfológico de dilatação. (a) Estrutura a ser dilatada (A na Equação 12); (b) Estrutura dilatadora, conhecida como elemento estruturante (B na Equação 12), (c) Resultado da dilatação de A por B .

2.6.2 Erosão

Assim como a dilatação, a erosão necessita de 2 estruturas, a imagem e o elemento estruturante. Porém, ao contrário da dilatação, que visa o aumento do tamanho dos objetos da imagem, a erosão tem por objetivo a diminuição da área desses objetos. Após a erosão pode ocorrer a separação de um objeto em outros. O modo que este objeto se separará depende diretamente do formato do elemento estruturante. Por isso o formato a ser usado sempre irá depender do problema abordado. Sendo A e B imagens binárias tem-se que a erosão de A por B é definida como (BOYLE, 2007):

$$A \ominus B = \{c \in Z^2 | c + b \in A, \text{ para todo } b \in C\} \quad (13)$$

Na Equação 13 A e B são conjuntos pertencentes a Z^2 , com A sendo a imagem a ser modificada e B o elemento estruturante. A erosão é o conjunto de todas as translações c tais que B seja completamente alinhado sobre um objeto de A . Um exemplo de erosão morfológica é apresentado na Figura 12. Por exemplo, caso alguma aplicação queira separar células é necessário que elas não estejam conexas. Para isso pode-se utilizar a erosão para separar as pequenas junções entre as células muito próximas.

As operações de dilatação e erosão são ditas duais. A erosão de A por B é o complemento da dilatação de A_c (complemento de A) por \hat{B} (reflexão de B) e a dilatação de A por B é o complemento da erosão de A_c por \hat{B} . Quando o elemento estruturante é

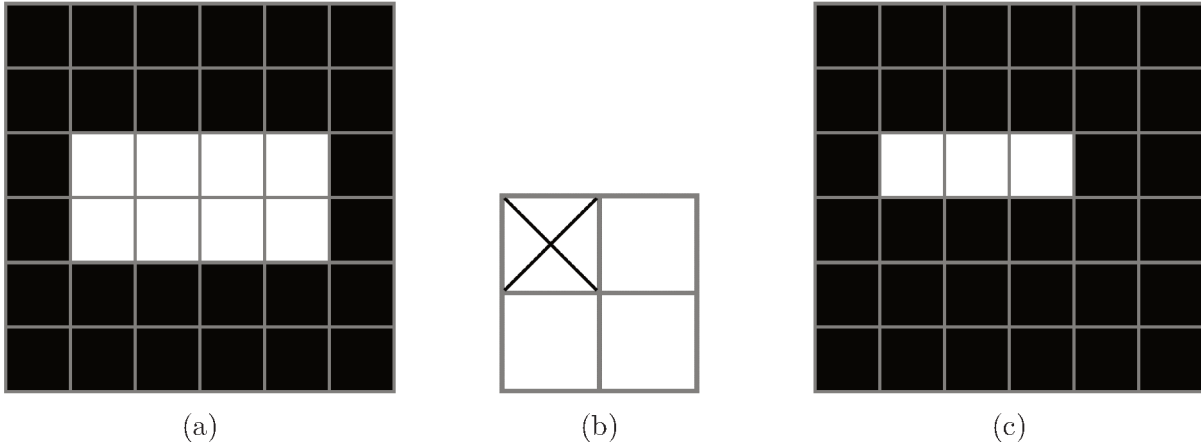


Figura 12 – Exemplo do processo morfológico de erosão. (a) Estrutura a ser erodida (A na Equação 13); (b) Estrutura que ditará a erosão, conhecida como elemento estruturante (B na Equação 12), (c) Resultado da erosão de A por B.

simétrico pode-se obter a dilatação erodindo o fundo da imagem e pode-se obter a erosão dilatando-se o fundo da imagem (GONZALEZ; WOODS, 2010).

2.6.3 Abertura

Como dito nas seções anteriores (Seção 2.6.1 e Seção 2.6.3), a dilatação expande uma imagem enquanto a erosão diminui. Quando se faz uma erosão e depois se aplica a dilatação (com o mesmo elemento estruturante) no resultado tem-se a abertura representada pela Equação 14. Seu objetivo é suavizar os contornos da imagem, quebrar istmos estreitos e eliminar protusões finas (GONZALEZ; WOODS, 2010), como pode ser observado na Figura 13.

$$A \circ B = (A \ominus B) \oplus B \quad (14)$$

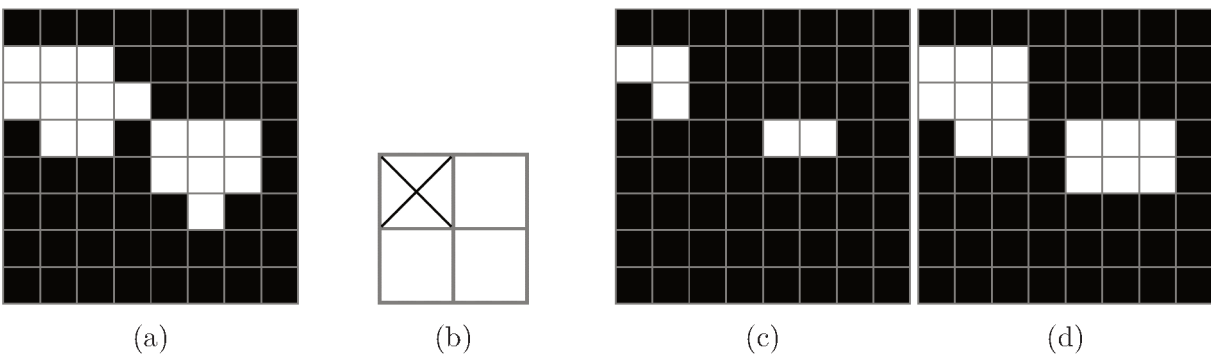


Figura 13 – Exemplo do processo morfológico de abertura. (a) Estrutura a sofrer abertura morfológica, X marca o ponto de referência; (b) Elemento estruturante; (c) Objeto após erosão, (d) Objeto após sofrer dilatação e consequentemente o resultado final da abertura.

2.6.4 Fechamento

É chamado de fechamento morfológico quando após a dilatação ocorre uma erosão (com o mesmo elemento estruturante) como descrito na Equação 15. Esse método é utilizado quando se quer suavizar o contorno da imagem, eliminar pequenos buracos e até preencher fendas em um contorno (GONZALEZ; WOODS, 2010). Um exemplo de fechamento pode ser observado na Figura 14.

$$A \bullet B = (A \oplus B) \ominus B \quad (15)$$

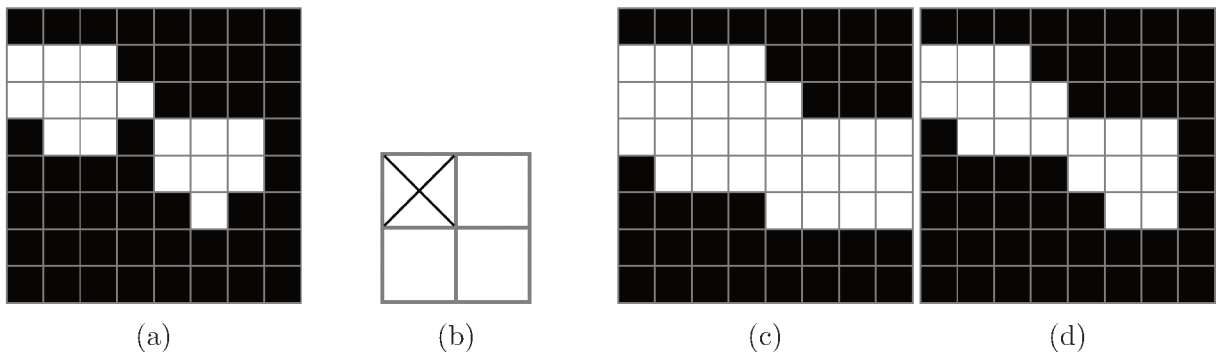


Figura 14 – Exemplo do processo morfológico de abertura. (a) Estrutura a sofrer fechamento morfológico, X marca o ponto de referência; (b) Elemento estruturante utilizado; (c) Objeto após dilatação, (d) Objeto após sofrer erosão e consequentemente o resultado final da abertura.

2.7 Segmentação

A presente seção é responsável por descrever o conceito de segmentação assim como suas técnicas e abordagens. A segmentação é uma etapa posterior ao pré-processamento da imagem. A segmentação tem por objetivo dividir uma imagem em suas partes ou objetos constituintes (GONZALEZ; WOODS, 2010).

Esse nível de divisão depende do problema a ser resolvido. Em outras palavras, a segmentação deve parar quando os objetos de interesse da imagem forem encontrados. A segmentação pode ser considerada a parte mais difícil e importante de toda uma aplicação de processamento digital de imagens (GONZALEZ; WOODS, 2010).

Existem duas abordagens possíveis para se segmentar uma imagem. Quando se particiona uma imagem baseado em mudanças bruscas entre os níveis de cinza da imagem temos uma técnica de segmentação por descontinuidade. As áreas de interesse na descontinuidade são a detecção de pontos isolados, linhas e bordas. Já a outra abordagem é baseada na similaridade das intensidades dos pixels, ou seja, os pixels que possuem os valores mais próximos serão agrupados na mesma região. O critério de similaridade, ou

em outras palavras o quão parecidos os pixels tem que ser para ficarem na mesma região, é pré-estabelecido pelo desenvolvedor (GONZALEZ; WOODS, 2010).

Existem inúmeras técnicas para cada tipo de segmentação. Neste trabalho serão abordadas as técnicas de Limiarização (seção 2.7.1), Detecção de bordas (seção 2.7.2) e Crescimento de regiões (seção 2.7.3).

2.7.1 Limiarização (*Threshold*)

Matematicamente, a limiarização pode ser descrita como uma técnica na qual uma imagem de entrada, considerada como uma função $f(x, y)$ contendo N níveis de cinza é processada e a imagem resultante é uma função $g(x, y)$ cujos níveis são 0 e 1 (FILHO; NETO, 1999). O sistema de equações definido por este processo é expresso pela Equação 16. A técnica mais simples de limiarização consiste na bipartição do histograma no qual o limiar (T) é selecionado baseado no vale deste histograma, como ilustrado na Figura 15. Como dito anteriormente os pixels com intensidade inferior a este limiar T se tornam fundo e todos os pixels de intensidade maior ou igual a este limiar se tornam o objeto da imagem (FILHO; NETO, 1999).

$$g(x, y) = \begin{cases} 0, & \text{se } f(x, y) < T \\ 1, & \text{se } f(x, y) \geq T \end{cases} \quad (16)$$

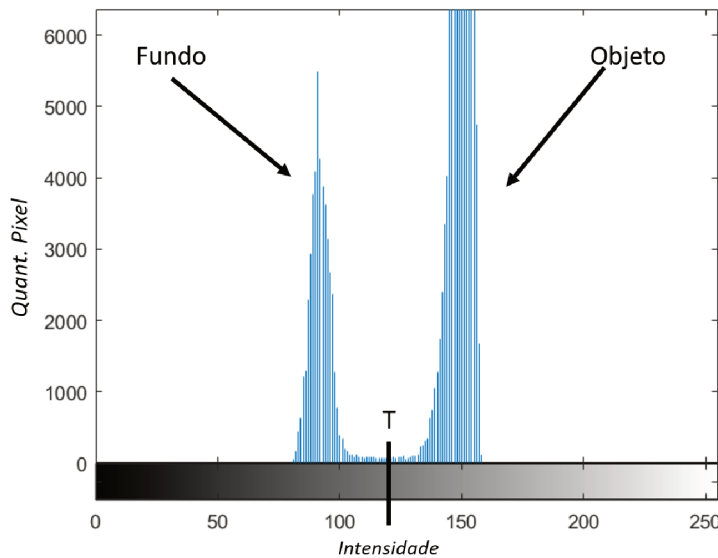


Figura 15 – Exemplo de limiarização em um histograma de uma imagem em tons de cinza.

O primeiro passo da limiarização é a escolha do limiar. Limiar é um valor entre 0 e 255 (caso a imagem seja de 8 bits) e todos os pixels abaixo deste limiar recebem valor 0, enquanto todos os pixels iguais ou maiores recebem 1, separando a imagem em duas classes, os pixels com valor 0 são comumente chamados de fundo (*background*) e os pixels 1 chamados de objeto (*foreground*).

Existem algumas técnicas automáticas para se determinar o limiar T , dentre elas o "Limiar Global Adaptativo". Essa técnica consiste em quatro grandes passos: primeiramente deve-se escolher um limiar (T) para dar início ao algoritmo, esse limiar deve estar entre a menor e a maior intensidade (normalmente utiliza-se a intensidade média); o segundo passo é segmentar a imagem usando este limiar, construindo assim dois grupos ($G1 \leq T$ e $G2 > T$); no terceiro passo deve-se computar as médias de cada região ($\mu_1(G1)$ e $\mu_2(G2)$); no último passo ocorre o cálculo do novo valor de T , sendo ele a média das médias de cada grupo ($T = (\mu_1 + \mu_2)/2$). Os passos 2, 3 e 4 devem ser repetidos até que dois valores sucessivos de T sejam menores que um ΔT pré-estabelecido pelo desenvolvedor (GONZALEZ; WOODS, 2010).

2.7.2 Detecção de bordas

A detecção de bordas é a abordagem mais utilizada quando se diz respeito à segmentação por descontinuidade. Nesse método são analisadas as descontinuidades nos níveis de cinza. As bordas podem ser descritas como limite entre duas regiões com níveis de cinza significativamente diferentes (GONZALEZ; WOODS, 2010).

Para o cálculo da descontinuidade normalmente são utilizados operadores diferenciais locais. Segundo (GONZALEZ; WOODS, 2010), a magnitude da primeira derivada pode ser usada para saber se um pixel pertence à borda do objeto enquanto a segunda derivada pode dar a informação de intensidade do pixel, se ele está do lado claro ou escuro da imagem.

As derivadas parciais são usadas para estimar a direção e intensidade da imagem na posição (x, y) em uma imagem f . Para isso são usados os métodos de gradiente. Como uma imagem depende de suas coordenadas espaciais, as bordas são expressas por meio de derivadas parciais $G_x = \partial f / \partial x$ e $G_y = \partial f / \partial y$. Os componentes G_x e G_y compõem o vetor gradiente, conforme a Equação 17 (GONZALEZ; WOODS, 2010).

$$\nabla \mathbf{f} = \begin{bmatrix} \frac{\partial f}{\partial x} \\ \frac{\partial f}{\partial y} \end{bmatrix} \quad (17)$$

O vetor gradiente aponta na direção de mudança mais rápida/abrupta de f na posição (x, y) . Duas medidas são fundamentais para a detecção de borda, a magnitude do vetor gradiente (denotada por $mag(\nabla \mathbf{f})$) como mostrada na Equação 18 e a direção do vetor gradiente. A direção é dada pelo ângulo $\alpha(x, y)$ como descrito na Equação 19 (GONZALEZ; WOODS, 2010).

$$mag(\nabla \mathbf{f}) = \sqrt{G_x^2 + G_y^2} \quad (18)$$

$$\alpha(x, y) = \tan^{-1} \left(\frac{G_y}{G_x} \right) \quad (19)$$

Em geral os operadores gradientes fazem uso de máscaras de convolução para obterem os componentes G_x e G_y em cada pixel da imagem. Dentre as máscaras mais utilizadas para o cálculo do gradiente estão a máscara de: *Prewitt*, *Roberts* e *Sobel* (GONZALEZ; WOODS, 2010).

2.7.3 Crescimento de regiões

Crescimento de regiões é uma técnica de segmentação que tem como objetivo agrupar pixels ou sub-regiões em regiões maiores. A abordagem mais simples se chama agregação de pixels. Essa abordagem começa com a seleção das “sementes” (pixels iniciais), a quantidade de sementes limitará o máximo de regiões ao final da segmentação (GONZALEZ; WOODS, 2010).

O parâmetro a ser usado para agregar mais pixels a sub-regiões depende de um limiar T . Caso a diferença absoluta entre o pixel semente e o pixel analisado seja igual ou menor a T , então esse pixel entra para a sub-região da semente; caso contrário, não se faz nada (GONZALEZ; WOODS, 2010). A Figura 16 mostra a aplicação dessa técnica com duas sementes de coordenadas $(3, 2)$ e $(3, 4)$ e com $T = 3$.

0	0	5	6	7
0	1	6	7	7
1	1	5	8	7
2	0	7	6	6
0	1	5	6	5

a	a	b	b	b
a	a	b	b	b
a	a	b	b	b
a	a	b	b	b
a	a	b	b	b

Figura 16 – A matriz da esquerda simula uma imagem na qual será aplicado o crescimento de regiões. A semente da primeira região, (a), é o elemento da linha 3 e coluna 2 $(3, 2)$, este elemento possui valor 1. Enquanto a semente da segunda região, (b), foi o elemento da linha 3 e coluna 4 $(3, 4)$, de valor 8. Ao considerar o limiar $T = 3$ tem-se todos os valores entre 0 e 4 pertencentes a primeira região e os valores entre 5 e 8 a região (b). A matriz à direita simula a imagem após a aplicação do crescimento de regiões.

Figura obtida de: (GONZALEZ; WOODS, 2010).

Existem dois problemas bem perceptíveis nessa técnica. O primeiro a ser citado é a seleção das propriedades utilizadas para inclusão do novo pixel na sub-área. Caso o limiar escolhido não seja adequado várias informações relevantes podem ser perdidas ou várias informações irrelevantes podem aparecer no resultado final, dando assim uma falsa impressão de que o procedimento foi efetuado corretamente. O outro problema diz respeito à condição de parada. Basicamente o algoritmo acaba quando nenhum pixel se encaixa em nenhuma área. Sendo assim pode acontecer de algum pixel nunca entrar em alguma

área e no fim o desenvolvedor ter mais áreas segmentadas do que ele queria (GONZALEZ; WOODS, 2010).

2.7.4 Otsu

Histogramas de imagens reais nem sempre apresentam uma separação clara entre as classes, dificultando a escolha dos intervalos de cada classe. Por este motivo alguns erros na classificação dos pixels são comuns e inevitáveis. Otsu é um método de segmentação automática baseado no histograma da imagem em escala de cinza. A proposta do método Otsu é encontrar um limiar ótimo que minimize os erros de classificação (NG, 2006).

Uma imagem 2D em escala de cinza pode ser representada por uma função do tipo $f(x, y)$. O valor dessa função varia de 0 até $L - 1$, sendo L a quantidade de níveis de cinza distintos (no caso de uma imagem 8 bits o valor de L é 256). Suponha que a quantidade de pixels pertencentes a i seja n_i e n o total de pixels na imagem. A probabilidade da ocorrência do pixel de intensidade i é dada pela Equação 20, sendo a média da imagem calculada por meio da Equação 21 (OTSU, 1979).

$$p_i = \frac{n_i}{n} \quad (20)$$

$$\mu_T = \sum_{i=0}^{L-1} ip_i \quad (21)$$

Considerando o caso onde se quer segmentar a imagem em apenas duas classes (fundo e objeto), pode-se dividir cada grupo como sendo $C_1 = \{0, 1, \dots, t\}$ e $C_2 = \{t + 1, t + 2, \dots, L - 1\}$, no qual t é o valor do limiar. A probabilidade de cada uma das classes é matematicamente descrita na Equação 22. Enquanto a média de cada classe pode ser expressa pela Equação 23 (OTSU, 1979).

$$\omega_1(t) = \sum_{i=0}^t p_i \quad \text{e} \quad \omega_2(t) = \sum_{i=t+1}^{L-1} p_i \quad (22)$$

$$\mu_1(t) = \sum_{i=0}^t \frac{ip_i}{\omega_1(t)} \quad \text{e} \quad \mu_2(t) = \sum_{i=t+1}^{L-1} \frac{ip_i}{\omega_2(t)} \quad (23)$$

Por análise discriminatória (OTSU, 1979) provou que seu melhor limiar era calculado a partir da maximização da variância entre as classes C_1 e C_2 . Tal operação é descrita na Equação 24, na qual σ_B^2 representa a variância entre as classes e é calculada por meio da Equação 25 (OTSU, 1979).

$$t^* = \arg \max_{0 \leq t < L} \{\sigma_B^2(t)\} \quad (24)$$

$$\sigma_B^2(t) = \omega_1(t)(\mu_1(t) - \mu_T)^2 + \omega_2(t)(\mu_2(t) - \mu_T)^2 \quad (25)$$

Ao se calcular t^* obtém-se o melhor limiar pelo método de Otsu. Após a obtenção de t^* todos os pixels de intensidade menor ou igual a ele são transformados em 0 e os maiores são transformados em 1. Otsu funciona bem em imagens que possuem vales e picos bem definidos, ou seja, aquelas imagens em que o histograma mostra suas distribuições de maneira clara. Por histogramas em imagens reais não serem bem definidos, aqueles poucos pixels que seriam classificados de maneira errada se tornam muitos. Por isso, mesmo sendo um método muito usado e de resultados satisfatórios, algumas aplicações do método em imagens reais não conseguem obter o resultado ideal (NG, 2006).

2.7.5 *Valley-emphasis*

O método *Valley-emphasis* - Ênfase no Vale (VE) é a tentativa de melhoramento do método Otsu, ou seja, ele também é um método de segmentação automática baseado em histograma. A ideia deste método é que a probabilidade do valor do limiar p_t ocorrer deve ser pequena (p_t , representado pela Equação 26, com t sendo o valor do limiar encontrado pelo método Otsu) e a variância entre os grupos deve ser maximizada, assim como no método Otsu. A formulação do método *Valley-emphasis* é descrita na Equação 27. Levando-se em conta que t^* é o limiar calculado pelo método; ω_1 e ω_2 são a probabilidade das classes 1 e 2 ocorrerem, respectivamente; μ_1 e μ_2 são as médias de cada classe (NG, 2006).

$$p_t = \frac{n_t}{n} \quad (26)$$

$$t^* = \arg \max_{0 \leq t < L} \{(1 - p_t)(\omega_1(t)\mu_1^2(t) + \omega_2(t)\mu_2^2(t))\} \quad (27)$$

O ponto crucial do método é a aplicação de $(1 - p_t)$. Quanto menor for p_t (quanto mais baixa a probabilidade dessa ocorrência), maior será o resultado. Isto garante que o limiar sempre será um valor pertencente ao vale ou a borda inferior do histograma da imagem em escala de cinza. Caso a distribuição do histograma seja unimodal (apenas um pico) este método não se aplica (NG, 2006).

2.7.6 *Neighborhood valley-emphasis*

Segundo os autores do método *Neighborhood valley-emphasis* - Ênfase nos vizinhos do vale (NVE) apenas a informação do ponto de vale do histograma não é suficiente para um bom resultado de segmentação. Visando melhorar o método descrito na Seção 2.7.5, os autores Fan e Lei (2012) propõem considerar a vizinhança do ponto no vale de modo a melhorar o resultado da segmentação.

Considerando um histograma de uma imagem em tons de cinza a vizinhança do ponto no vale é dada pela Equação 28. Essa equação é a soma da probabilidade da vizinhança no

intervalo $2m + 1$ (tamanho da vizinhança, se o ponto no vale for 25 e m for 3 a vizinhança será de 22 a 28). Esse resultado sempre será um valor ímpar, para que o ponto de vale esteja na mediana de sua vizinhança. O objetivo principal do método é maximizar a variância entre as classes, de modo que o limiar ótimo calculado por este método pode ser descrito como a Equação 29.

$$\bar{p}_i = [p(i - m) + \dots + p(i - 1) + p(i) + p(i + 1) + \dots + p(i + m)] \quad (28)$$

$$t^* = \arg \max_{0 \leq t < L} \{ (1 - \bar{p}_t)(\omega_1(t)\mu_1^2(t) + \omega_2(t)\mu_2^2(t)) \} \quad (29)$$

2.8 Registro de imagem

O registro de imagem também pode ser chamado de fusão, correspondência ou deformação de imagem. Cada uma das definições têm suas particularidades (ZITOVÁ; FLUSSER, 2003). A fusão de imagem tem por principal objetivo combinar duas ou mais imagens, com o intuito de se criar uma nova (THEÂPAUT; KPALMA; RONSIN, 2000). Correspondência entre imagens encontra as estruturas mais idênticas entre as imagens analisadas, porém, não alinha nenhuma delas (SHUO ZHANG et al., 2018). Já a deformação se baseia em selecionar duas imagens, uma sendo a imagem de parâmetro e a outra sendo a imagem a ser deformada, são encontradas correspondências entre as imagens e uma delas sofre deformações para que os artefatos encontrados na imagem de parâmetro estejam nas mesmas coordenadas da imagem deformada (WANG; ; CHEN2, 2013; SOTIRAS; DAVATZIKOS; PARAGIOS, 2013).

O registro de imagem é importante pois ele pode detectar anomalias em câmeras de segurança (por meio de um processamento pode-se notar a falta de um objeto em um cofre fazendo a correspondência entre a imagem antes e depois do objeto ser movido), no campo do entretenimento pode-se usar a fusão de imagem para parecer que um ator está contracenando com ele mesmo (em casos de personagens com irmão gêmeo) (ZITOVÁ; FLUSSER, 2003) e na área da saúde o registro de imagem é usado em imagem por ressonância magnética, na qual várias imagens 2D são feitas entorno da cabeça do paciente e ao final são deformadas, alinhadas, sobrepostas e um cérebro 3D é digitalizado para auxiliar no diagnóstico do paciente (AVANTS et al., 2011).

Na área da saúde, além de imagens de ressonância magnética, o registro de imagem é usado em imagens histológicas, com o objetivo de prepará-las para posterior reconstrução 3D (MCCANN, 2015). Como visto na Seção 2.1, as imagens histológicas são comumente 2D e por isso elementos inerentes a estruturas 3D são perdidos quando essas fatias são analisadas (KLEIN et al., 2010). Para contornar este problema os especialistas podem realizar várias secções em sequência no mesmo bloco de tecido biológico, digitalizar as

imagens e por fim realizar deformações em cada imagem a fim de alinhá-las para posteriormente realizar a reconstrução 3D e conseguir analisar o bloco biológico com mais precisão (WANG; KA; CHEN, 2014).

2.9 *Principal Component Analysis (PCA)*

O *Principal Component Analysis* - Análise dos componentes principais (PCA) é um método estatístico multivariado usado para representação, interpretação, análise e redução da dimensionalidade dos dados. O principal objetivo deste método é transformar um grande volume de dados em um conjunto menor de variáveis que sejam mais relevantes, evidenciando o subespaço com maior variância (COSTA; CESAR, 2009).

Em processamento digital de imagens uma das funções do PCA é o cálculo da elongação do objeto analisado. Primeiramente criam-se dois vetores contendo as coordenadas de cada pixel do objeto, como explicitado na Equação 30 (ABREU, 2016).

$$\begin{aligned} X &= [x_1, x_2, \dots, x_n] \\ Y &= [y_1, y_2, \dots, y_n] \end{aligned} \tag{30}$$

Após a criação dos vetores é necessário calcular a covariância entre cada par de atributos, neste caso, X e Y , como representado na Equação 31.

$$M = \begin{pmatrix} \text{cov}(X, X) & \text{cov}(X, Y) \\ \text{cov}(Y, X) & \text{cov}(Y, Y) \end{pmatrix} \tag{31}$$

A partir do cálculo dos autovetores e autovalores da matriz M é possível encontrar os dois maiores eixos do objeto. O autovetor que possuir o maior autovalor é considerado o eixo principal (e_1), enquanto o autovetor com segundo maior autovalor será o segundo maior eixo (e_2) (TRAVENTOLO, 2007), como representado na Figura 17. A partir do quociente entre os dois maiores eixos é possível calcular a elongação do objeto analisado.

2.10 Técnicas de avaliação para segmentação de imagens

Após a realização dos experimentos é necessário avaliar os resultados. Para a avaliação deste trabalho foram usados dois métodos: a Abordagem Diagnóstica e o coeficiente de Dice. A Abordagem Diagnóstica conta com a comparação entre duas imagens: o resultado do método proposto e a imagem de controle fornecida por um especialista. O método divide os pixels segmentados (do método proposto) em quatro grupos, com a intenção de avaliar a sensibilidade (SE) especificidade (ES) e acurácia, medidas que estão detalhadas na Seção 2.10.1. O Coeficiente de Dice, também faz uso de duas imagens para gerar

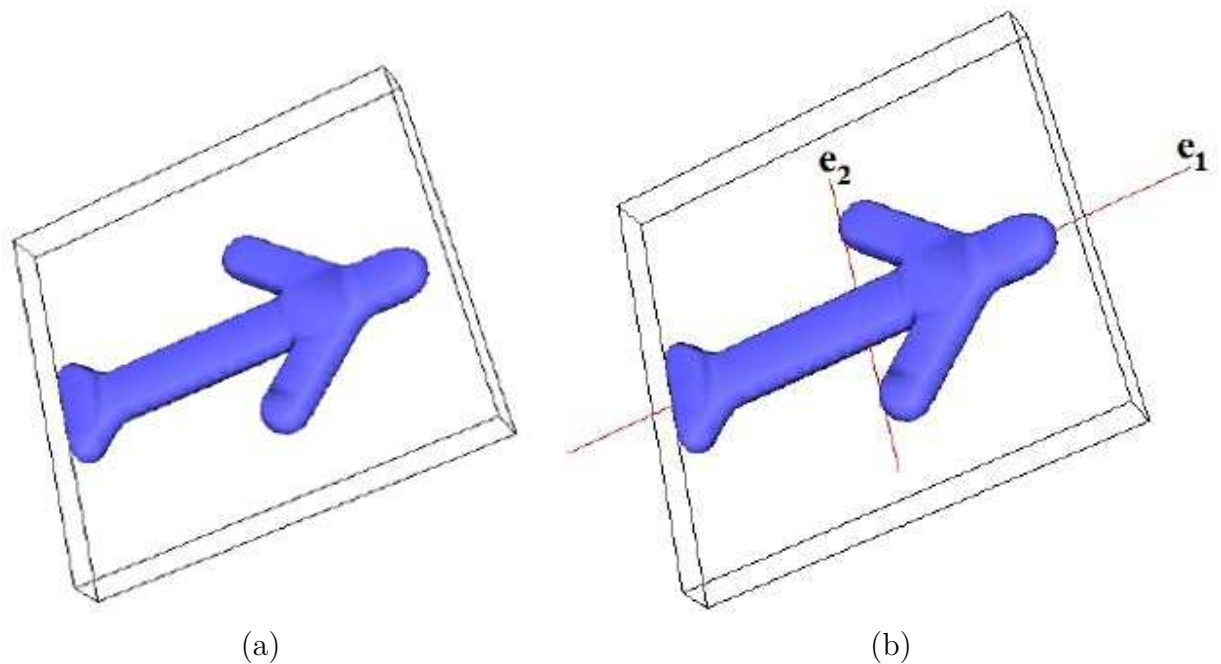


Figura 17 – Visualização dos eixos principais de um objeto (a) Objeto original. (b) Eixos em vermelho após o PCA, e_1 maior eixo e e_2 segundo maior eixo.

Figura adaptada de: Travençolo (2007) ©

um coeficiente de similaridade entre elas. O coeficiente varia de 0 a 1, sendo 0 o pior desempenho e 1 o melhor. Este método está detalhado na Seção 2.10.2.

2.10.1 Abordagem diagnóstica

Abordagem Diagnóstica é um método muito utilizado em análises laboratoriais para avaliar o quão próximo da realidade o exame está. Um frasco de sangue o qual já é conhecido seu resultado é submetido a um teste para gerar os mesmos resultados, a partir daí os resultados do novo teste são comparados com aqueles já conhecidos para confirmar a eficiência do novo método.

Em imagens, este teste de resultados também pode ser aplicado, desde que haja uma imagem já com os resultados e um novo método a ser testado. Para se avaliar os resultados com este método, dentro do processo de segmentação de imagens, os pixels do resultado do método testado são divididos em quatro grupos (LI et al., 2015):

1. Verdadeiro Positivo (VP): pixels que foram segmentados como objeto e também são objeto na imagem do especialista;
2. Verdadeiro Negativo (VN): pixels que foram segmentados como fundo e são parte do fundo na imagem do especialista;
3. Falso Positivo (FP): pixels que foram segmentados como objeto mas não são parte do objeto na imagem do especialista;

4. Falso Negativo (FN): pixels que foram segmentados como fundo e não fazem parte do fundo na imagem do especialista;

Após a rotulação de cada pixel entre estes grupos são realizados três cálculos a fim de se obter a sensibilidade, a qual representa a relação entre os pixels que foram certamente colocados como objeto sobre a quantidade de pixels que realmente são os objetos; especificidade, que calcula a razão entre os objetos colocados como fundo no resultado do método testado sobre a quantidade de pixels que realmente é o fundo da imagem; e por fim a acurácia que calcula a soma dos pixels que foram segmentados como objeto e realmente fazem parte do objeto mais os pixels que foram segmentados como fundo e realmente fazem parte do fundo sobre a quantidade total de pixels. A sensibilidade, especificidade, acurácia estão matematicamente descritas nas Equações 32, 33 e 34 respectivamente (LI et al., 2015).

$$Se = \frac{VP}{VP + FN} \quad (32)$$

$$Es = \frac{VN}{VN + FP} \quad (33)$$

$$Ac = \frac{VP + VN}{VP + VN + FP + FN} \quad (34)$$

2.10.2 Coeficiente de Dice

Medidas de associação são medidas baseadas no relacionamento binário entre os objetos (em processamento digital de imagens cada imagem binária é considerada um objeto para Dice). Este relacionamento pode tanto ser a partir da similaridade quanto dissimilaridade entre os objetos analisados. O coeficiente de Dice é uma medida de associação por similaridade, ou seja, ele gera um valor baseado em quão parecido os objetos analisados são (VETA et al., 2013).

A medida de associação mais simples que existe é a intersecção entre objetos, no caso de imagens, intersecção entre as imagens. Porém, este método não leva em conta o tamanho dos objetos, deixando o método pouco robusto. Para melhorar a qualidade do resultado de mensuração de associação entre as imagens binárias, foi desenvolvido o coeficiente de Dice, que após a intersecção dos objetos faz a razão entre o dobro do resultado da intersecção e o somatório de cada um dos objetos calculados (VETA et al., 2013).

Para se usar o coeficiente de Dice em PDI é necessário ter a imagem de controle e a imagem a qual se quer comparar. Após calcular o coeficiente de Dice o resultado final varia de 0 a 1, sendo que quanto mais próximo de 1 mais parecidas são as imagens. A descrição

matemática do coeficiente de Dice é dada pela Equação 35, na qual A é a imagem cedida pelo especialista e B a imagem resultante do método a ser avaliado (VETA et al., 2013).

$$Dice = 2 \frac{|A \cap B|}{|A| + |B|} \quad (35)$$

2.11 Trabalhos Relacionados

Esta seção apresenta três trabalhos que possuem alguma relação com a pesquisa desenvolvida e relatada por essa dissertação. O objetivo principal do trabalho Veta et al. (2013) é apresentar um algoritmo não supervisionado capaz de segmentar núcleos de imagens histopatológicas de câncer de mama corados com hematoxilina e eosina. Segundo os autores, quando se tem a segmentação dos núcleos os especialistas podem localizar possíveis regiões de tumor. Seguindo uma técnica de *bottom-up*, os especialistas encontram um núcleo anormal e vão aumentando a área de busca até encontrar todo o tecido afetado pelo tumor. As principais dificuldades enfrentadas pelos autores são a diversidade e complexidade dos tecidos analisados. Segundo os autores alguns tecidos podem ser mais simples enquanto outros têm várias camadas e núcleos dificultando assim o processamento. Outro problema citado pelos autores é a preparação imperfeita das amostras. Borrões, falta de foco ou iluminação imperfeita nas amostras acabam prejudicando o algoritmo e deixando as amostras mais difíceis de serem analisadas.

A metodologia utilizada por Veta et al. (2013) é dividida em quatro grandes passos. A Figura 18 mostra o fluxograma dos métodos utilizados. O primeiro passo é a aquisição das imagens em que foram coletadas 39 imagens histopatológicas de câncer de mama. Dessas 39 imagens, 21 foram usadas para o desenvolvimento e teste (conjunto A) do algoritmo, enquanto as outras 18 foram usadas apenas para o teste (conjunto B). Após a aquisição das imagens foi feito um pré-processamento utilizando a deconvolução de cor e processamentos morfológicos de abertura e fechamento.

O terceiro passo foi a marcação e segmentação por *watershed*. Para fazer a marcação dos mínimos locais foi utilizada a FRST (*fast radial symmetry transform*) (LOY; ZELINSKY, 2003), que se baseia na direção do gradiente para conseguir localizar objetos com certo nível de simetria dentro da imagem. Como os núcleos possuem alguma simetria, essa técnica se mostrou bastante útil. Depois de selecionar os mínimos locais é aplicado o *watershed* para encontrar a fronteira de cada núcleo.

O quarto passo é o pós-processamento. Mesmo usando o pré-processamento e a *fast radial symmetry transform* alguns ruídos ainda existiam na imagem ocasionando falsos positivos. Para eliminar esses falsos positivos os autores usam a solidez (raio da área e o *convex hull* do objeto) de cada região, o *boundary saliency* (diferença entre a intensidade fora da borda e dentro da borda) e o deslocamento de massa. Por fim, é feita a avaliação do

algoritmo, em que foi comparada a segmentação automática com a segmentação manual, e aplicado o coeficiente de *Dice* mostrado na Equação 35.

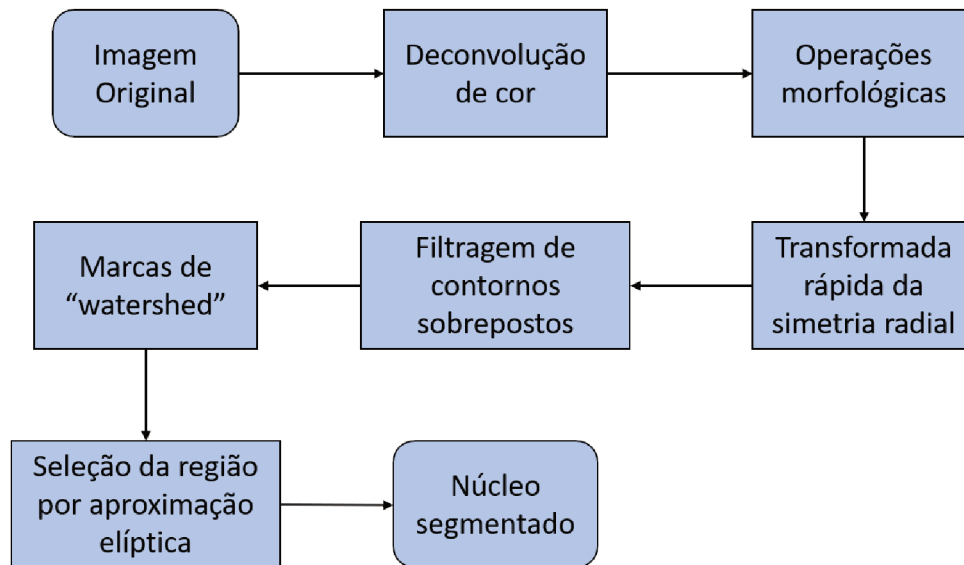


Figura 18 – Fluxograma de Veta et al. (2013): Aquisição da imagem; deconvolução de cor, seleção do canal da hematoxilina; aplicação de abertura e fechamento por reconstrução; aplicação com múltiplos raios da transformada rápida da simetria radial; marcação do fundo e objetos pela aplicação de *watershed*; seleção da região de interesse, e aproximação elítica; fusão de contornos e por fim a segmentação do núcleo.

Figura adaptada de: (VETA et al., 2013).

Os resultados de sensibilidade, e coeficiente de *Dice* para a base de imagens dos autores pode ser vista na Tabela 6.

	Sensibilidade	Dice
Conjunto A	87,5% (+/-0.92)	80%-90%
Conjunto B	85,3% (+/-0.77)	80%-90%

Tabela 6 – Resultados (VETA et al., 2013)

O trabalho desenvolvido por Hage e Hamade (2013) tem como objetivo segmentar (de maneira automática) micro características (lacunaridade, canais ósseos, canaliculite e a matriz óssea) pertencentes a estruturas ósseas em imagens histológicas de bovinos. Para chegar a tal objetivo os autores combinaram técnicas de inteligência artificial e processamento digital de imagens, com o proposito de se obter o melhor resultado.

A segmentação ocorreu por meio da Pulse Coupled Neural Network - Rede Neural de Pulso Acoplado (PCNN) otimizada pelo *Particle-swarm Optimization* - Otimização por enxame de partículas (PSO). A escolha da PCNN se deu pois, as redes neurais padrão são sensíveis a transformações geométricas enquanto a PCNN não sofre deste problema. Outro fator foi a estrutura ideal da rede, enquanto em outras redes neurais é difícil encontrar qual a melhor estrutura a PCNN possui uma estrutura fixa (HAGE; HAMADE, 2013).

A PCNN é um rede bio inspirada no córtex visual de gatos. O neurônio é composto por dois compartimentos de entrada, a alimentação e a ligação. O compartimento de alimentação recebe tanto o estímulo de entrada S (imagem em tons de cinza) quanto o estímulo local Y , enquanto o compartimento de ligação recebe apenas o estímulo local. A alimentação e a ligação são conectadas por meio do coeficiente β , o qual faz parte do processamento do neurônio. O resultado dessa atividade é comparado com o limiar θ , gerando a saída (0 ou 1). A partir deste resultado os valores de θ são aumentados por meio dos coeficientes V_L , V_F e V_θ , ao passo que α_L , α_F e α_θ são diminuídos até que o neurônio seja ativado sucessivamente até que toda a imagem binária seja criada. A descrição matemática da PCNN está descrita nas Equações 36 até 40. Sendo Y o campo de pulso de saída, F os neurônios de alimentação, L os neurônios de ligação, U atividade interna, Θ limiar, S imagem de entrada em tons de cinza, n a iteração atual, W_1, W_2 os pesos da matriz, $\alpha_L, \alpha_F, \alpha_\theta$ os coeficientes de decrescimento, V_L, V_F, V_θ os coeficientes de incremento e β o coeficiente de ligação.

$$F_{ij}(n) = S_{ij} + F_{ij}(n-1)e^{-\alpha_F} + V_F(W_1 * Y(n-1)_{ij}) \quad (36)$$

$$L_{ij}(n) = L_{ij}(n-1)e^{-\alpha_L} + V_L(W_2 * Y(n-1)_{ij}) \quad (37)$$

$$U_{ij}(n) = F_{ij}(n)(1 + \beta \cdot L_{ij}(n)) \quad (38)$$

$$Y_{ij}(n) = \begin{cases} 1 & \text{se } U_{ij}(n) > \Theta_{ij}(n) \\ 0 & \text{se não} \end{cases} \quad (39)$$

$$\Theta_{ij}(n) = \Theta_{ij}(n-1)e^{-\alpha_\theta} + V_\theta \cdot Y_{ij}(n-1) \quad (40)$$

Para um resultado ótimo foi necessário usar o PSO para calcular os coeficientes α_L , α_F , α_θ , V_L , V_F e V_θ . Os parâmetros para se executar o PSO são: a função de aptidão (neste caso a entropia/energia), a dimensão da partícula (como são 7 coeficientes necessários para a PCNN o valor da dimensão também é 7), o tamanho da população (varia de 20 a 50), fator de inércia (controla a otimização global e local e é baseada na quantidade de iterações máxima) e a condição de parada (foi considerada como 5 iterações da PCNN). A cada iteração o PSO calibra os coeficientes de cada micro estrutura.

Após estabelecidos os coeficientes as imagens de teste são processadas pela PCNN e geram as imagens binarizadas. Os resultados do trabalho de Hage e Hamade (2013) estão expostos na Tabela 7.

O último trabalho a ser abordado nessa seção foi desenvolvido por Abreu (2016) e teve por objetivo principal desenvolver um algoritmo de esqueletização capaz de diminuir a quantidade de informação dos objetos de interesse de uma imagem (diminuindo assim a

Tabela 7 – Resultados (HAGE; HAMADE, 2013)

Imagem		Precisão	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia	Dice
1	Lacunas	83,86%	89,04%	99,41%	99,06%	86,37%
	Canais ósseos	99,28%	73,83%	99,98%	99,17%	84,70%
	Canalículo	50,37%	45,74%	94,47%	89,13%	47,94%
	Matriz óssea	98,15%	92,52%	93,86%	92,82%	95,25%
2	Lacunas	83,64%	87,43%	99,48%	99,13%	85,49%
	Canais ósseos	99,43%	83,23%	99,98%	99,41%	90,61%
	Canalículo	42,37%	66,75%	86,01%	83,44%	51,84%
	Matriz óssea	98,54%	93,90%	94,03%	93,93%	96,17%
3	Lacunas	85,55%	91,65%	99,67%	99,51%	88,50%
	Canais ósseos	97,01%	75,32%	99,95%	99,38%	84,80%
	Canalículo	81,12%	66,30%	96,92%	91,83%	72,96%
	Matriz óssea	90,84%	95,03%	87,94%	91,89%	92,89%

quantidade de dados também). Para testar seu método a autora teve de alinhar, segmentar e por fim realizar a reconstrução 3D das imagens, para só então aplicar seu algoritmo.

No trabalho foram coletadas 194 imagens de fêmur direito e esquerdo de um rato. Após a coleta das imagens foi necessário que os biólogos responsáveis fizessem uma segmentação manual de cada canal ósseo e osteócito. Após a realização da segmentação manual, foi utilizado o software Photoshop CS6® a fim de retirar todos os artefatos que não faziam parte da matriz óssea. Com as imagens possuindo menos dados, foi possível alinhá-las com o método proposto por Wang, Ka e Chen (2014).

Depois do alinhamento, cada imagem foi segmentada manualmente usando um limiar de valor $T = 200$ (na imagem de 8 bits). Depois de segmentada, a imagem passou por um pós-processamento com o intuito de retirar pequenos e grandes objetos os quais foram segmentados de maneira errada. Objetos conexos de tamanho inferior a 30 e maiores que 1000 pixels foram eliminados.

Com a segmentação finalizada foi utilizada a técnica *Marching Cubes* para a reconstrução 3D, e outra filtragem por tamanho e formato foi realizada com os objetos. Depois de reconstruída, a imagem passou pelo método de esqueletização proposto, o qual percorre a imagem até encontrar um ponto de interesse (pixel de um objeto conexo) e após encontrar os pontos de interesse são calculados os componentes conexos do conjunto de pontos. Calculam-se os centróides de cada componente conexo e os armazenam em uma lista. Esse processo é feito até que todos os componentes conexos sejam processados. Ao final deste algoritmo o esqueleto da imagem é calculado.

Após a esqueletização foram comparados os resultados entre o fêmur esquerdo (passou por um processo de radioterapia) e o direito (controle) com o objetivo de analisar suas diferenças. O fêmur esquerdo apresentou menos canais vasculares (172 para o esquerdo a 176 para o direito) menos ramificações (510 para o esquerdo a 898 para o direito) e a distribuição dos canais não estava uniforme.

Método proposto

Este capítulo objetiva apresentar o método proposto para a segmentação e identificação de canais ósseos e osteócitos em imagens ósseas histológicas. Toda a metodologia desenvolvida é descrita detalhadamente bem como as técnicas utilizadas.

3.1 Descrição geral

A proposta deste trabalho é conceber um sistema computacional para o processamento e análise de imagens histológicas relativas a ossos. Para se chegar ao objetivo foram necessários quatro grandes passos, sendo eles: (a) obtenção das imagens, (b) pré-processamento, (c) segmentação e, por fim, o (d) pós-processamento. Para o estudo e desenvolvimento dos algoritmos foi utilizado o software de desenvolvimento MATLAB® e para executar tais artefatos foi utilizado um notebook i7-7700 (2.8 GHz) com 16 GB de memória RAM.

A primeira etapa do método proposto foi a obtenção das imagens. Nela reuniu-se todas as imagens utilizadas neste trabalho. Algumas imagens colhidas pelos especialistas estavam com um nível muito alto de degradação, tanto morfológicamente (algumas imagens se encontravam distorcidas devido ao mau posicionamento do tecido na lâmina, ou rasgos no tecido) quanto em relação à intensidade dos pixels. Essas imagens muito degradadas foram eliminadas pois nem mesmo os especialistas foram capazes de avaliar com exatidão tais imagens.

O segundo passo, pré-processamento, foi responsável por modificar os pixels das imagens para facilitar os passos seguintes, melhorando assim os resultados posteriores, como a segmentação e o pós-processamento. Para realizar o pré-processamento foram utilizadas as técnicas da deconvolução de cor (com o intuito de realçar os componentes tingidos pelos corantes hematoxilina e eosina), transformação do espaço de cor (com o objetivo de realçar as partes brancas da imagem) e também o ajuste de contraste (para corrigir possíveis alterações inadequadas das tonalidades no momento da aquisição das imagens).

A terceira parte do método, segmentação, teve como objetivo identificar e isolar as áreas e/ou objetos de interesse, no caso específico deste trabalho os canais ósseos e osteó-

cit. Para se obter um resultado robusto foi realizada a segmentação em três imagens em tons de cinza derivantes da imagem original RGB (duas imagens derivantes da deconvolução de cor, uma realçando elementos tingidos pela hematoxilina e a outra com elementos tingidos pela hematoxilina com influência de eosina. A terceira imagem foi obtida a partir do canal do espaço de cor CIE 1976 $L^*a^*b^*$). Essa etapa é crucial para a análise e reconstrução 3D dos canais ósseos e osteócitos. A qualidade dos resultados desta etapa determina o sucesso ou fracasso da análise das imagens.

Com as imagens binarizadas e os artefatos de interesse isolados, é necessário refinar o resultado. Sendo assim, é necessário um pós-processamento para a retirada de objetos que não fazem parte dos objetos de interesse. Nesta fase é realizado o preenchimento de buracos, é calculada a circularidade de cada objeto e aqueles que não tiverem um mínimo de circularidade são excluídos, também são retirados tanto objetos muito pequenos quanto objetos grandes, e por fim, são eliminados objetos que não possuem partes brancas ou que não possuem regiões tingidas pelo corante hematoxilina. O diagrama do método proposto esta representado na Figura 19.

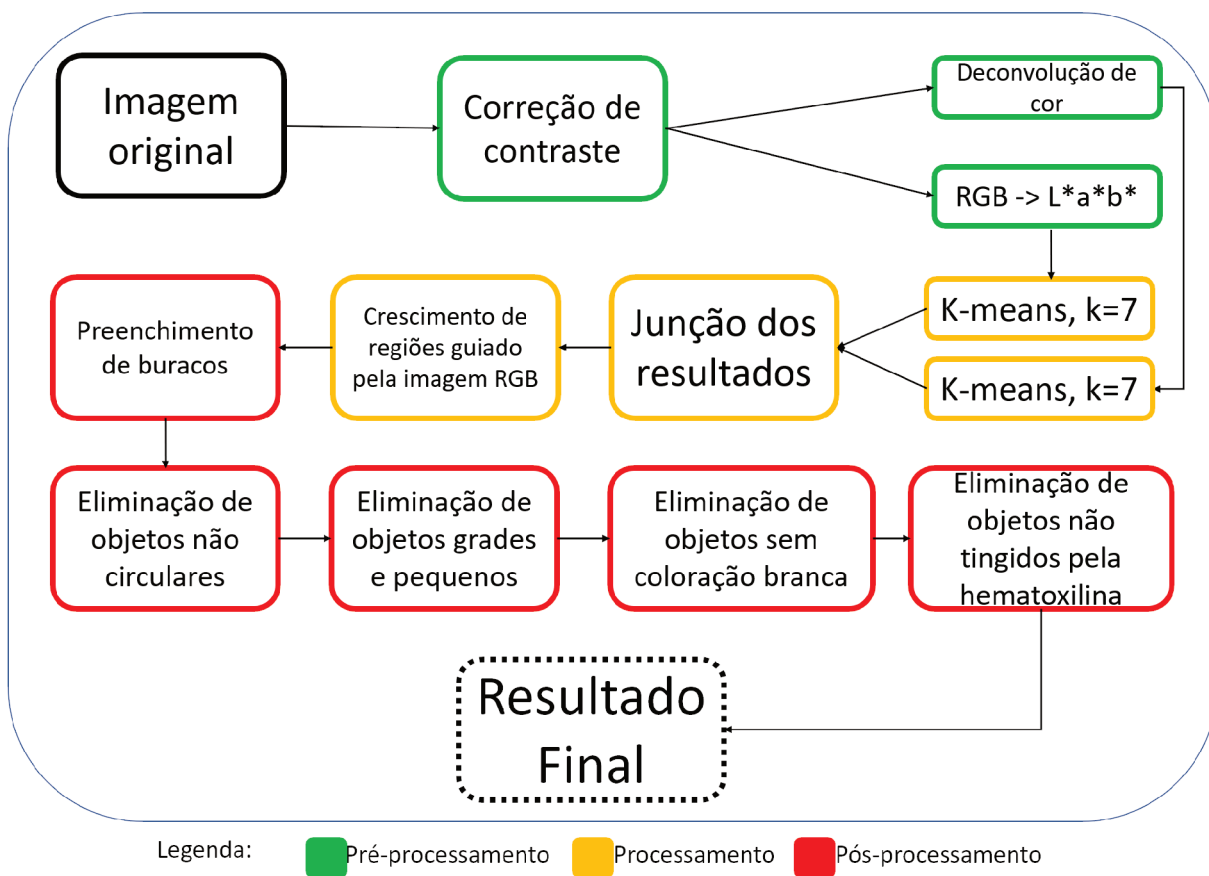


Figura 19 – Diagrama do método proposto para segmentação automática do canal vascular ósseo e osteócito em imagens histológicas

3.2 Pré-processamento

Após a aquisição das imagens iniciou-se a etapa de pré-processamento. O objetivo desse passo é processar as imagens de modo a corrigir distorções e facilitar o passo subsequente, a segmentação. Para isso foram executadas três tarefas: (a) deconvolução de cor, (b) mudança do espaço de cor e (c) ajuste de contraste.

A deconvolução de cor tem por intuito obter imagens em tons de cinza que realçam cada um dos corantes: hematoxilina e eosina. Este método está detalhado na Seção 2.4. O resultado deste processo são três imagens derivantes: uma imagem realçando os componentes tingidos com a hematoxilina, outra imagem evidenciando as partes tingidas pela eosina e a terceira imagem derivante da deconvolução de cor representa uma tonalidade entre a hematoxilina e a eosina.

Essa etapa é importante pois nela consegue-se evidenciar os núcleos presentes nos canais ósseos e osteócitos (partes tingidas pela hematoxilina) enquanto a terceira imagem é importante pois os núcleos dos canais podem apresentar influência tanto de hematoxilina quanto de eosina, caso o tecido não tenha sofrido um processo histológico ideal. A Figura 20 exemplifica a diferença entre um núcleo apenas com hematoxilina e outro com hematoxilina e interferência de eosina.

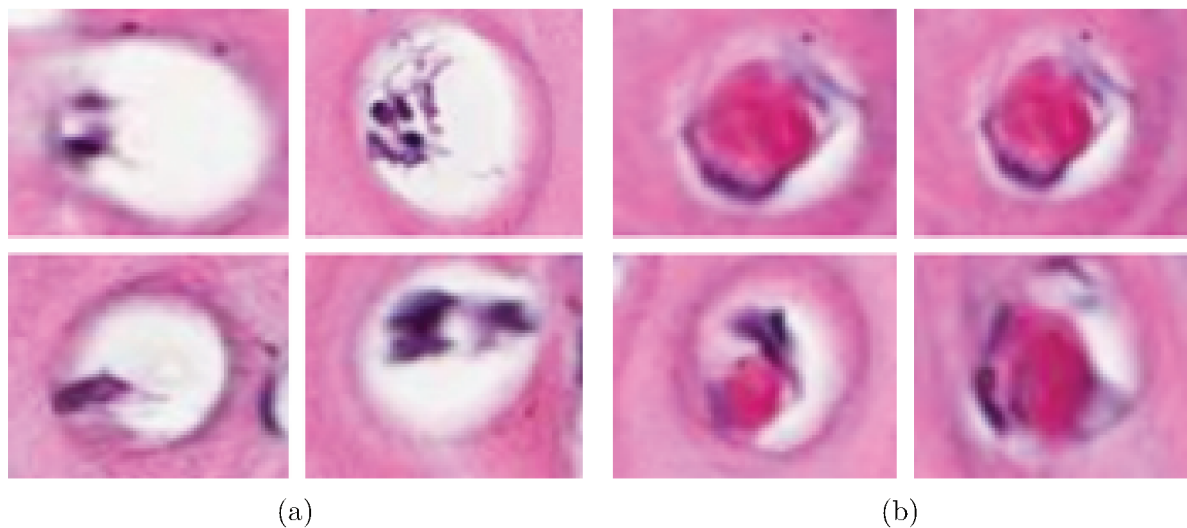


Figura 20 – (a) Quatro exemplos de canais ósseos nos quais suas partes basófilas são tingidas pelo corante hematoxilina, destacando estas regiões com cores púrpuras; (b) Quatro exemplos de canais ósseos nos quais suas partes basófilas foram tingidas pelo corante hematoxilina porém com alguma interferência do corante eosina, tornando parte do artefato basófilo avermelhado.

A diferença entre a tonalidade da terceira imagem e da imagem com realce de eosina pode ser bem baixa, caso as duas imagens derivantes sejam bem parecidas, no momento da segmentação pelo algoritmo k-means a quantidade de pixels considerados objetos é muito maior do que o esperado. Em média a segmentação do terceiro canal considera 5% ou menos dos pixels da imagem como objetos. Então, caso a segmentação tenha resultado

em uma quantidade de pixels maior que 5% do total de pixels da imagem, o resultado da segmentação da terceira imagem derivante é descartado e não faz mais parte do ciclo do método.

Os valores de cada corante para cada canal para todos os estudos de caso foram os mesmos. A Tabela 8 contém a relação dos valores para a hematoxilina e eosina em cada um dos canais RGB, estes valores foram obtidos por meio de estudos empíricos. Depois de realizada a deconvolução de cor, apenas o canal realçando a hematoxilina e o canal que realça a interferência de hematoxilina e eosina no núcleo são usados na próxima etapa. Essas imagens têm a função de detectar os núcleos dos canais ósseos e osteócitos. As regiões de interesse deste trabalho não são tingidas pelo corante eosina, portanto o canal que realça apenas o corante eosina não é utilizado

Tabela 8 – Relação de valores de corante para cada canal.

Corantes/Canais	R	G	B
Hematoxilina	0.65	0.7	0.29
Eosina	0.007	0.99	0.11
Interferência H&E	0.27	0.57	0.78

Os canais ósseos nas imagens RGB são compostos, em sua maioria, por coloração branca. Infelizmente, o modelo de cores RGB não é o que melhor caracteriza esta coloração. Sendo assim foi necessário realizar a mudança do espaço de cor RGB por um mais adequado. Para isso foi utilizado o modelo de cor CIE 1976 $L^*a^*b^*$ o qual separa a luminância da crominância da imagem, no canal L^* fica a luminância enquanto a junção dos canais a^* e b^* são responsáveis pela crominância.

Pode-se considerar a luminância da imagem a quantidade de branco que interfere na cor, sendo assim quando se faz a mudança de cor entre RGB e CIE 1976 $L^*a^*b^*$ obtém-se um canal o qual realça as partes brancas da imagem, informação esta que para este trabalho é de suma importância para detecção precisa dos canais ósseos.

Portanto após realizar a mudança de espaço de cor, o canal L^* é selecionado para ser utilizado como parâmetro de entrada para a próxima etapa. O método de conversão de espaço de cor utilizado por este trabalho está descrito na Seção 2.2, e a Equação 3 se refere ao canal L^* (luminosidade) e a Equação 5 se refere aos canais a^* e b^* (crominância).

O ajuste de contraste da imagem tem por objetivo aumentar a diferença entre as tonalidades de uma imagem. O realce de contraste é uma técnica que se baseia em uma função radiometria. A função mapeia as variações de intensidade do intervalo original para um novo intervalo de cinza, definido pelo desenvolvedor. Essa técnica é aplicada pixel a pixel, ou seja, o cálculo do novo valor do pixel é calculado separadamente, sem a interferência dos demais. Quanto mais espalhado os pixels estão neste novo intervalo, maior será o contraste. Esse ajuste pode ser feito empiricamente ou a partir da análise do histograma. Para este trabalho, foi realizado a normalização de imagens histológicas

definido na Seção 2.3. Essa etapa é importante para aproximara coloração de imagens do mesmo bloco biológico e realçar os componentes histológicos.

3.3 Processamento

Após a fase de pré-processamento foram geradas três imagens em tons de cinza: (a) realce de hematoxilina, (b) realce de hematoxilina com interferência de eosina e (c) canal L^* do modelo de cor CIE 1976 $L^*a^*b^*$. Todas as três imagens têm em comum que a tonalidade de interesse é a mais próxima do branco absoluto (valor 255 em uma imagem de 8 bits).

Mesmo colocando as zonas de interesse em evidência nas três imagens derivadas da original, a diferença de intensidade é pequena e métodos tradicionais de segmentação como Otsu não apresentam bons resultados. Por esse motivo foi utilizado o método de agrupamento k-means para dividir as tonalidades de cada imagem derivante. A formação dos dados de entrada do k-means são cada indivíduo em uma linha com cada uma de suas características em uma coluna. Como cada pixel da imagem é considerado um indivíduo com uma única característica (sua intensidade), uma imagem que a priori é um vetor bidimensional $M \times N$ (M linhas por N colunas) tem que ser reformatada para se tornar um vetor unidimensional com $M * N$ posições, contendo o valor de intensidade de cada pixel. Esse vetor unidimensional foi a entrada do algoritmo k-means.

A técnica de agrupamento k-means consiste em escolher aleatoriamente k centros para dar início aos grupos. Após esta escolha cada elemento do vetor de entrada é atribuído ao grupo cujo centro esteja mais próximo. Então calcula-se a média de cada grupo e move-se o centro para esta média. Repete-se este processo até que os elementos dos grupos estejam similares de acordo com algum parâmetro, no caso deste trabalho, o erro quadrático. Ao longo dos experimentos, vários valores de k , $k = 3, 4, \dots, 10$ foram avaliados. Inicialmente ponderou-se que por a imagem ser formada majoritariamente por cores púrpuras, rosadas e brancas, apenas três grupos seriam suficientes. Porém, pela tonalidade entre os pixels variar de maneira tão suave, empiricamente percebeu-se que o melhor valor para o k-means seria $k = 7$. Assim, para a imagem que realça a hematoxilina, a imagem que realça componentes tingidos com hematoxilina e interferência de eosina e o canal L^* do CIE 1976 $L^*a^*b^*$ foi aplicado o k-means com $k = 7$. A distância utilizada para encontrar a similaridade foi a Euclidiana. Como nem sempre o k-means encontra o mesmo resultado para entradas iguais o algoritmo foi replicado três vezes para testar a consistência do resultado final.

Após a divisão dos pixels entre os 7 grupos ainda era necessário selecionar o grupo que continha a região de interesse. Foi calculada a distância euclidiana entre a média de cada grupo com o valor 255 (considerado branco absoluto em imagens de 8 bits). O grupo que obtivera a menor distância em cada imagem era então selecionado. Após a binarização é

realizada a junção do resultado de todas as imagens em uma só.

Mesmo a quantidade ideal de grupos para o k-means sendo sete, em algumas imagens ocorre a perda de informação perto da borda dos canais ósseos e osteócitos, prejudicando assim as características naturais dos objetos. A fim de evitar a deformação dos objetos foi desenvolvido um método de crescimento de regiões guiado pela imagem RGB. Dada a imagem resultante da união das três imagens binárias calculadas por meio do algoritmo k-means, esta imagem binária é utilizada como máscara para o cálculo da média do RGB de todos os objetos. Após o cálculo dessa média inicial, a imagem binária sofre uma dilatação com o elemento estruturante sendo um disco de raio três pixels, o formato e tamanho do elemento estruturante foram definidos de maneira empírica.

Após a dilatação foi calculada a média dos valores RGB de cada objeto. Para cada objeto é calculada a distância euclidiana da sua média dos valores RGB para a média dos valores RGB calculados anteriormente para a imagem. Caso todas as distâncias sejam menores ou iguais a um limiar T , a dilatação é mantida e o processo de dilatação e cálculo das médias é executado novamente. Esse processo ocorre até que pelo menos uma distância seja maior do que o limiar. A cada processo de dilatação, caso a quantidade de pixels que compõem os objetos da imagem seja superior a 15% do total de pixels da imagem, o valor do limiar é decrescido em 0,01 e o crescimento de regiões é novamente executado. Essa última condição foi incorporada pois poderia acontecer de a média variar pouco de uma iteração para outra e ao longo destas iterações ocorrer uma dilatação da imagem binária em uma região que não era a de interesse. Para o método proposto o limiar começou em $T = 0,3$ (definido empiricamente), note que o pequeno valor do limiar se deve ao fato de os valores RGB estarem normalizados no intervalo $[0, 1]$. É importante salientar que quanto maior a degradação na imagem RGB, menor deverá ser este limiar. Isto ocorre devido a inconsistência de tonalidade entre as regiões de uma imagem degradada.

3.4 Pós-processamento

Mesmo utilizando uma técnica robusta para segmentação das imagens histológicas o resultado ainda contém muitos pixels considerados falso positivos (pixels marcados na imagem resultado como objeto, mas que não fazem parte da região de interesse) ou até mesmo falso negativos (pixels considerados como fundo da imagem, mas que na verdade fazem parte da região de interesse). Dessa forma, para melhorar o resultado final, as imagens resultantes da fase de segmentação são submetidas às tarefas de pós-processamento que estão listadas e detalhadas abaixo:

- **Preenchimento de buracos:** Está técnica visa preencher objetos conexos (no caso deste trabalho, com conectividade 8) que possuem algum “buraco”. Essa técnica é necessária pois mesmo realizando a segmentação da parte branca e do núcleo de cada canal ósseo e osteócito às vezes não é possível segmentar corretamente

todo o objeto. Mesmo o objeto estando totalmente conexo ele pode possuir em seu interior pixels de fundo. Não se utilizou um fechamento morfológico pois este poderia promover a junção de objetos diferentes. Com todos os objetos totalmente preenchidos pode-se iniciar a segunda tarefa.

- ❑ **Eliminação de objetos não circulares :** Os canais ósseos e osteócitos possuem um certo nível de circularidade em sua morfologia. Sendo assim, é possível estabelecer um limiar mínimo de circularidade a fim de eliminar objetos que não são circulares o suficiente. Para isso foi realizada a rotulação de componentes conexos e para cada componente foi calculada sua circularidade, baseada na descrição do método de curvatura exposto na Seção 2.9. Os objetos cuja circularidade está acima do limiar são eliminados (maior e menor objetos são definidos a partir do tamanho da imagem).
- ❑ **Eliminação de objetos muito grandes e muito pequenos:** Aproveitando-se da rotulação dos componentes conexos inicia-se a terceira etapa da fase de pós-processamento, a eliminação de grandes e pequenos objetos. Depois de rotulados, as áreas dos objetos são definidas e caso ultrapassem um limite inferior ou superior estes objetos são eliminados. Por se tratar de uma medida morfológica cada conjunto de imagens possui seu próprio limite. Sendo assim ele será apresentado individualmente para cada estudo de caso.
- ❑ **Eliminação de objetos que não possuem participação de pixels segmentados da imagem L^* :** Essa tarefa se torna necessária pois partes da imagem original que são apenas tingidas por hematoxilina podem ser consideradas objetos na segmentação da imagem de realce da hematoxilina. Portanto, é necessário eliminar objetos que não possuem participação de pixels segmentados da imagem L^* . Para esta etapa a imagem resultante da segmentação L^* é considerada uma imagem de referência, enquanto o resultado obtido da eliminação de objetos não circulares será considerado um resultado parcial. As posições de cada pixel da imagem de referência são armazenadas em um vetor e comparadas com as posições de cada objeto da imagem resultado parcial. Caso a quantidade de pixels de interseção entre os pixels da imagem referência e os pixels do objeto analisado sejam menores que 25% da área deste objeto, então ele é descartado.
- ❑ **Eliminação de objetos que não possuem participação de pixels segmentados da imagem de realce da hematoxilina:** Mesmo que alguns canais ósseos e osteócitos não possuam núcleo, o corante hematoxilina tinge a borda destes componentes, porém, se houver um rasgo no tecido durante a coleta da imagem a hematoxilina não tinge esta região. O fundo das imagens histológicas RGB são brancos devido ao processo de coleta, então caso ocorra um rasgo no tecido, esta falha

será considerada um objeto na segmentação. Para contornar este obstáculo foram realizados os mesmos passos da tarefa de eliminação de objetos que não possuem participação de pixels segmentados da imagem L^* . A diferença está na imagem de referência que no caso deste passo é o resultado da segmentação da imagem com as áreas tingidas pelo corante hematoxilina realçadas e a imagem de resultado parcial fica sendo a imagem resultante do passo anterior.

Estudo de Casos

As seções desse capítulo tratam sobre os estudos de caso nos quais o método proposto foi aplicado. O primeiro estudo de caso trata de imagens histológicas da rede vascular óssea da maxila e mandíbula humana, os estudos dessas imagens é importante pois, por meio deles é possível avaliar a saúde de regiões afetadas por incisões. Os estudos de caso dois e três tratam de imagens histológicas da rede vascular óssea do fêmur esquerdo e direito de um rato, respectivamente. O estudo dessas imagens é importante pois com o resultados obtidos é possível avaliar se houve ou não uma degradação na rede vascular após aplicação de uma radioterapia.

4.1 Estudo de caso da rede vascular óssea de maxila e mandíbula humana.

As incisões bucais realizadas em pacientes podem acarretar degeneração do tecido ósseo das regiões afetadas. Para avaliar o impacto destas nos pacientes, amostras do tecido ósseo bucal foram extraídas, e posteriormente processadas, pelo método de segmentação de imagens do tecido ósseo descritas no Capítulo 3, esta seção detalha cada uma das etapas.

As imagens utilizadas nesse estudo de caso foram preparadas e fornecidas por pesquisadores na Universidade Federal de Goiás sob coordenação da Profa. Dra. Rejane de Faria Ribeiro-Rotta. Os espécimes ósseos estudados aqui foram obtidos através de biópsia durante procedimento de instalação de aparelhos dentários em pacientes. O instrumento utilizado para auxiliar a extração dos espécimes ósseos foi uma broca de terina com 2,7mm de diâmetro interno.

A preparação das amostras se deu baseada nas informações descritas na Seção 2.1. Portanto, primeiramente os tecidos foram desmineralizados em uma solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) de pH 7,0 durante uma semana. Os tecidos foram incluídos em parafina e processados automaticamente dentro de uma estufa (OMA DM-

20, M20090257, São Paulo, Brasil). As secções foram realizadas com o auxílio de um micrótomo em cortes sequenciais de $5\mu\text{m}$, as fatias resultantes das secções foram fixadas em lâmina e banhadas com os corantes hematoxilina e eosina (HE; Merck KGaA). Por fim, as imagens histológicas foram obtidas usando câmera digital conectada ao microscópio óptico com zoom 5x (Axio Scope A1, Carl Zeiss, 3322000179, Göttingen, Germany).

Após esse processo, foram obtidos 10 conjuntos contendo de 12 a 21 imagens cada. Cada conjunto corresponde a uma área óssea na qual foi instalado o aparelho dentário. A Tabela 9 detalha o nome de cada conjunto, a quantidade de imagens contidas nele e sua região bucal, enquanto a Figura 21 exemplifica uma imagem de cada um dos conjuntos. Tendo as amostras sido colhidas de diferentes regiões, nas quais os dentes apresentam funções mastigatórias distintas, cada conjunto apresenta tecido ósseo com características também distintas quanto à microarquitetura trabecular como, por exemplo, número, espessura e volume das trabéculas. Sendo assim, a quantidade e distribuição de canais ósseos e osteócitos também varia.

Tabela 9 – Descrição dos conjuntos utilizados. Na primeira coluna o nome dado a cada conjunto pelos especialistas, a segunda coluna contém as regiões onde as amostras foram colhidas e na terceira e última coluna estão as quantidades de imagens geradas por cada conjunto. Na última linha encontra-se o total de imagens geradas para esse experimento.

Conjunto	Local	Quantidade
P3A	mandíbula posterior esquerda (região pré-molares)	13
P3D	mandíbula posterior direita (região de molares)	20
S17	maxila posterior direita (região de molares)	12
S19F	maxila posterior esquerda (região de molares)	10
S27	mandíbula posterior direita (região de pré-molares)	20
S29A	maxila anterior (região de incisivos centrais)	17
S35	mandíbula posterior direita (região pré-molares)	21
S36A	maxila posterior esquerda (região pré-molares)	13
S37	mandíbula posterior esquerda (região de molares)	13
S39A	mandíbula posterior direita (região de molares)	14
Total	...	154

Após a obtenção foi necessário realizar o alinhamento das imagens RGB. Devido a qualidade das imagens (que será discutida mais adiante nesta seção), não foi possível realizar o alinhamento automático dos grupos de cada região. Sendo assim, optou-se por realizar o alinhamento manual. Os autores desse trabalho utilizaram a ferramenta GIMP 2.8® para realizar o alinhamento. Primeiramente foi realizado o preenchimento de bordas de todas as imagens, com 150 pixels de cada lado. Este preenchimento foi necessário pois quando se transladava e/ou rotacionava havia perda de informação das imagens. Após os preenchimentos a primeira imagem foi inserida na ferramenta GIMP como uma camada sendo a imagem seguinte adicionada no mesmo arquivo como outra camada. A imagem colocada posteriormente sofreu uma operação de transparência para

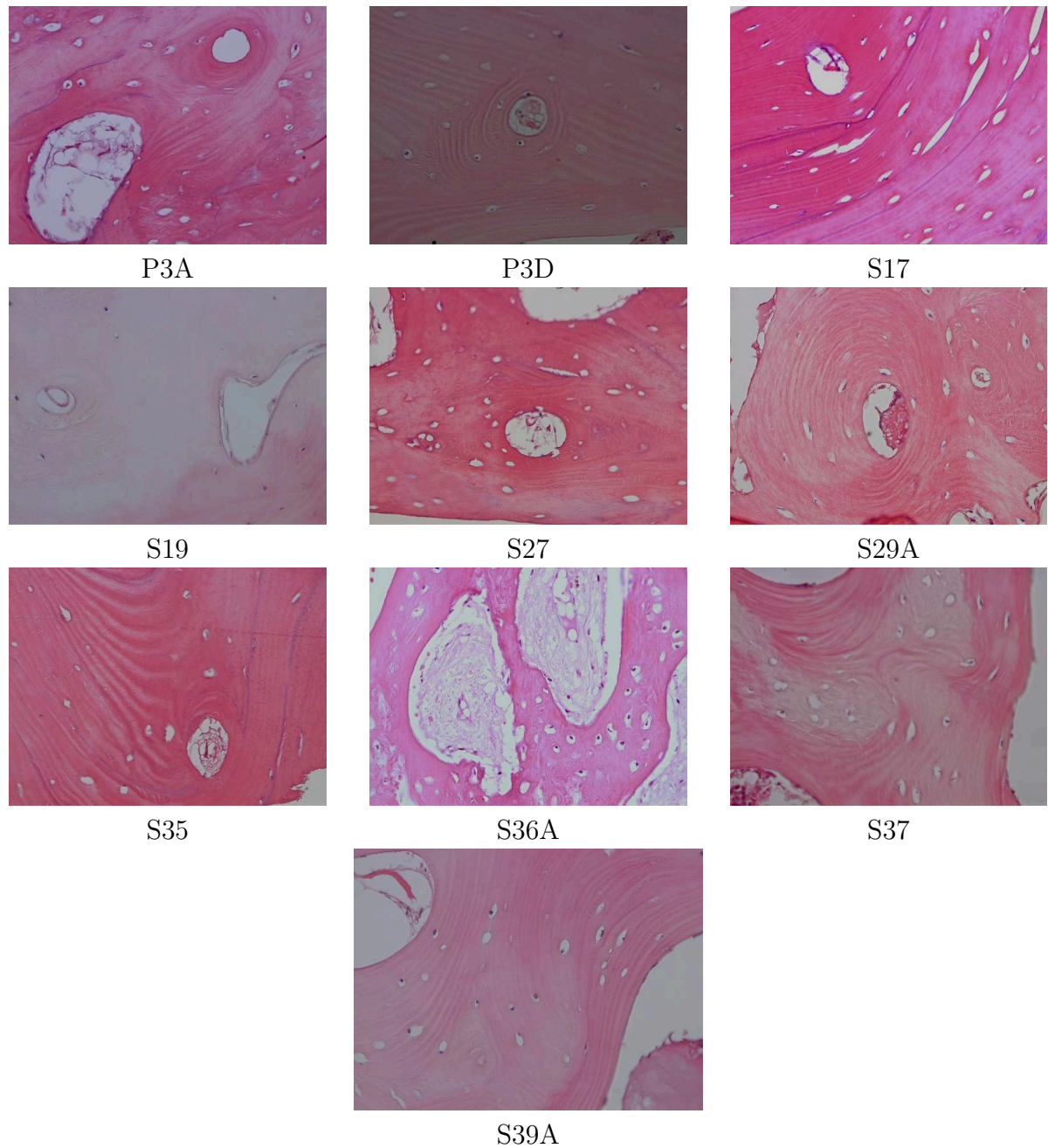


Figura 21 – Imagens relacionadas a cada um dos 10 grupos divididos pelos especialistas.

que fosse possível visualizar as 2 imagens ao mesmo tempo. Depois disso foram realizadas diversas operações de rotação, translação e redimensionamento a fim de alinhar cada um dos canais ósseos e osteócitos. Esse processo foi feito para todas as imagens de cada grupo, tendo primeiramente como referência a primeira fatia histológica de cada grupo, e as demais imagens eram alinhadas de acordo com a sua predecessora. A Figura 22 exemplifica cada passo para o alinhamento de uma imagem.

Com o alinhamento de todas as imagens concluído inicia-se o método de segmentação proposto por esse trabalho. Ao iniciar a segmentação das imagens foi percebido que algumas amostras colhidas sofreram deformações durante a captura da imagem, o que



Figura 22 – Sétima fatia do grupo P3A digitalizada pelos especialistas que sofreu preenchimento e alinhamento manual. (a) imagem original fornecida pelos especialistas, (b) imagem após sofrer preenchimento de 150 pixels de cada lado; (c) imagem alinhada manualmente após sofrer rotação, translação e redimensionamento.

tornou a segmentação muito mais difícil de ser executada de maneira adequada. As irregularidades mais presentes nas imagens obtidas são: o desfoque (o qual ocasionou borramento nas imagens), luminosidade não uniforme (essa irregularidade faz com que pixels que teriam intensidades próximas não tenham mais), um baixo contraste entre os artefatos da imagem (fazendo com que suas intensidades fiquem próximas e dificultando a separação de cada artefato) e rasgos no tecido histológico (como o tecido é muito fino, no momento na fixação pode ocorrer o rasgo em alguma parte do tecido). Cada uma das irregularidades citadas são exemplificadas e ilustradas pela Figura 23.

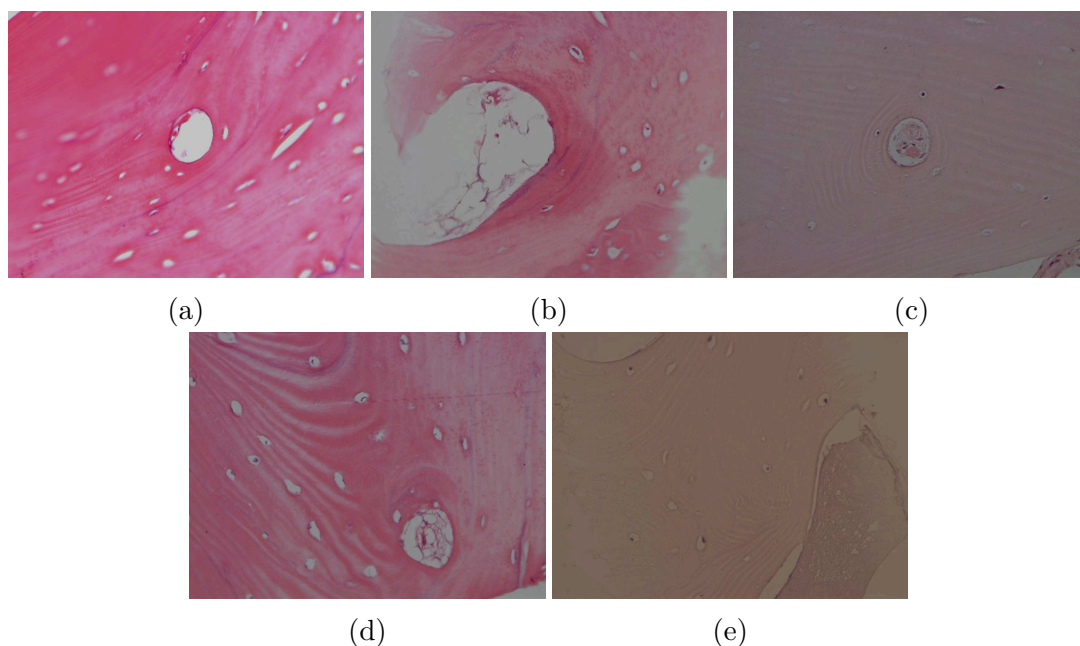


Figura 23 – Irregularidades encontradas. (a) Borramento; (b) Luminosidade não uniforme; (c) Baixo contraste; (d) Rasgos no tecido; (e) Rasgos no tecido, iluminação disforme e uma tonalidade completamente diferente das outras imagens.

A primeira fase do método proposto a ser realizada foi o pré-processamento. A correção de contraste foi o primeiro método a ser aplicado em todas as imagens. Um exemplo desse processo é ilustrado na Figura 24. Após correção de contraste foi aplicada a deconvolução de cor, com o objetivo de se obter as imagens nas quais a hematoxilina e eosina são destacadas. Paralelamente ao processo de deconvolução foi realizada a mudança do espaço de cor de RGB para CIE 1976 $L^*a^*b^*$ (descrita na Seção 2.2), sendo o canal L^* selecionado para prosseguir com as operações. A Figura 25 ilustra cada imagem resultante do pré-processamento para a primeira imagem do grupo P3A.

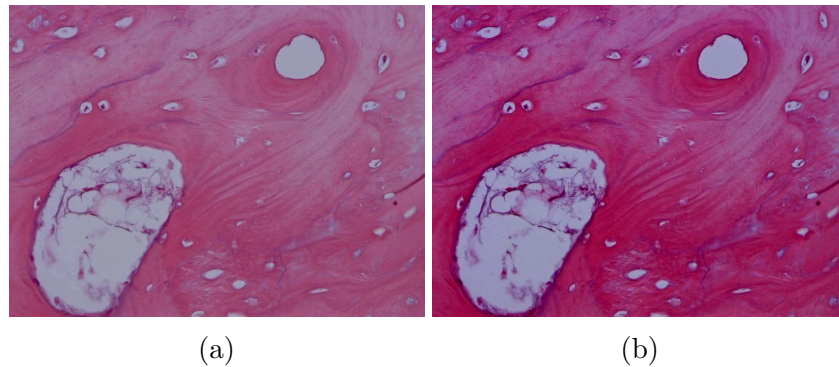


Figura 24 – (a) Imagem original; (b) Imagem após correção de contraste.

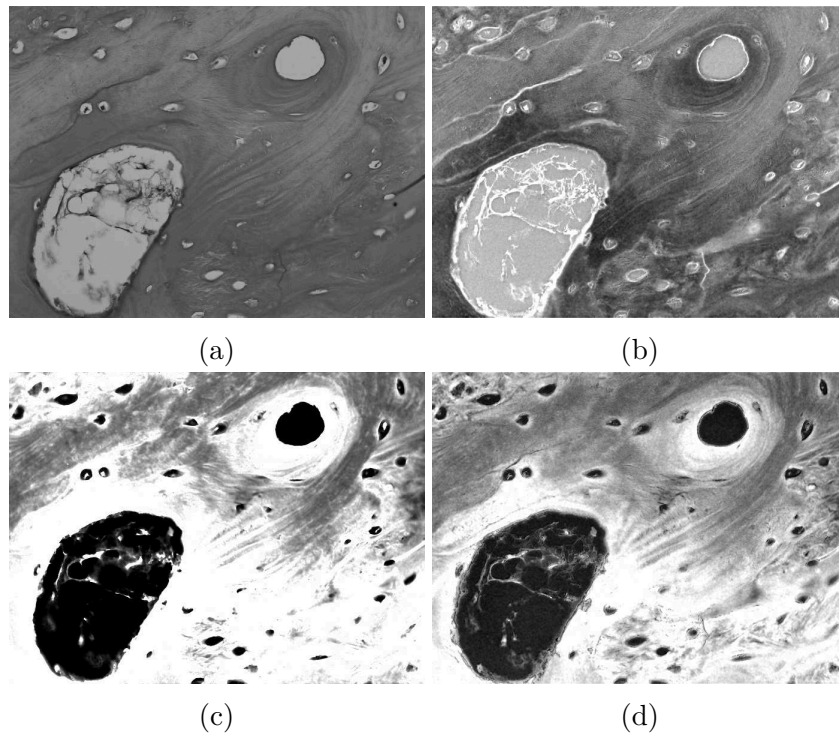


Figura 25 – Imagens resultantes do pré-processamento. As imagens (a) e (b) são usadas posteriormente na fase de segmentação. (a) Canal L^* do espaço de cor CIE 1976 $L^*a^*b^*$; (b) Realce de elementos basófilos pelo corante hematoxilina; (c) Realce de elementos acidófilos pelo corante eosina; (d) Realce de elementos basófilos com interferência de eosina.

Após o pré-processamento iniciou-se a fase de segmentação com a imagem L^* e a imagem em tons de cinza que realça a hematoxilina. Pela semelhança entre a imagem de realce da eosina e da imagem que possui a interferência de eosina em componentes basófilos já se sabe que ela será descartada durante a segmentação. Porém mesmo assim ela ainda faz parte do processo, pois, só após a binarização do resultado do k-means ela será descartada. O valor das intensidades de cada imagem se torna a característica a ser dividida em 7 grupos pelo algoritmo k-means. A Figura 26 ilustra cada um dos resultados gerados pelo algoritmo k-means.

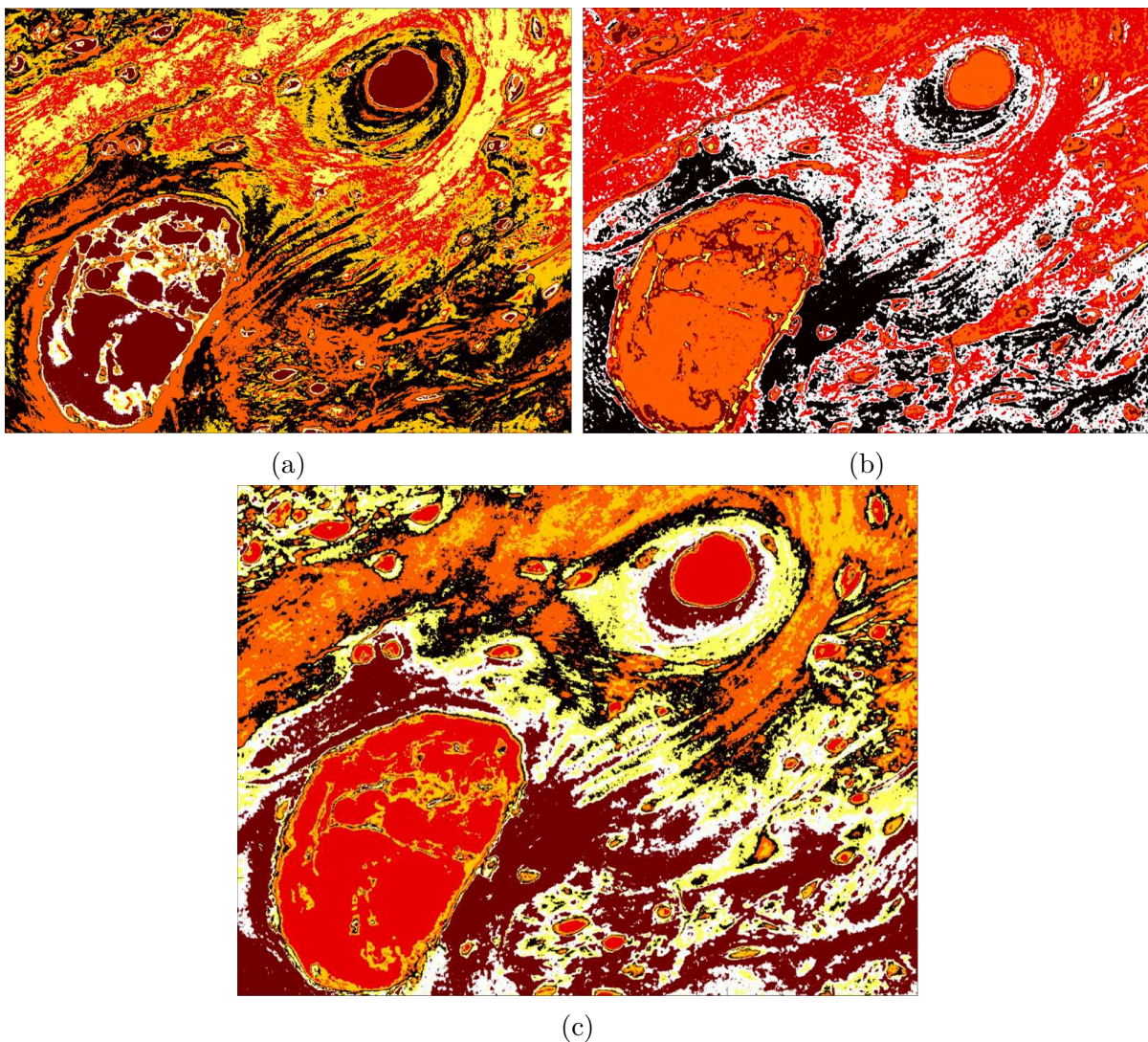


Figura 26 – Imagens resultantes da segmentação realizada pelo algoritmo k-means. As tonalidades estão divididas em 7 “cores quentes” começando no preto, passando pelo vermelho escuro, vermelho, laranja escuro, laranja, amarelo e por fim o branco. (a) Imagem resultante da segmentação realizada na imagem em tons de cinza L^* ; (b) Resultado da imagem em tons de cinza que realça às estruturas coradas com hematoxilina e (c) Resultado da imagem em tons de cinza que realça as estruturas coradas com hematoxilina com interferência de eosina

Para cada agrupamento realizado pelo k-means em cada imagem foi calculado a distância euclidiana entre o valor médio dos pixels e o valor 255 (branco). O grupo de cada imagem segmentada que continha o menor valor de distância foi selecionado como resultado final da segmentação, dessa forma binarizando a imagem. Nesse momento foi verificado (de maneira automática) se a imagem que continha objetos tingidos com o corante hematoxilina e interferência de eosina possuíam, ou não, mais de 5% dos pixels totais da imagem. Caso tivessem, esta imagem era descartada, caso contrário a imagem permanecia no processo. A Figura 27(c) ilustra a binarização das imagens geradas pela primeira fatia do grupo P3A. Nesse exemplo a imagem com interferência de eosina possui mais de 5% dos pixels detectados como objetos, então para a próxima etapa ela é descartada.

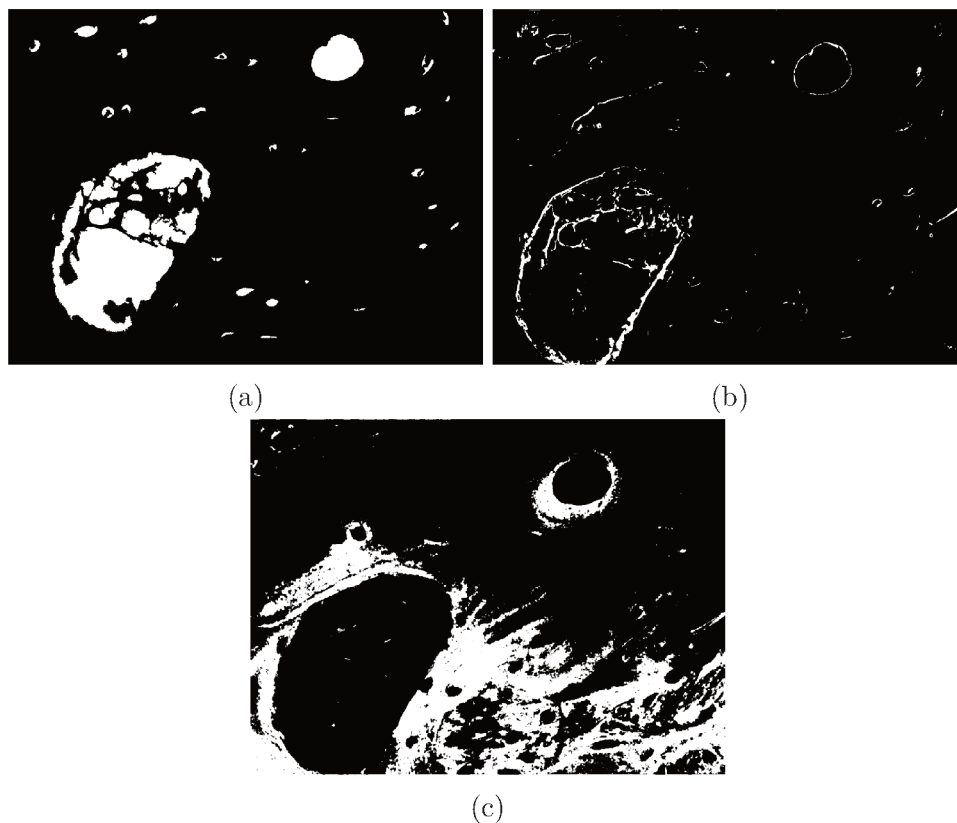


Figura 27 – Imagens resultantes da binarização realizada no resultado do algoritmo k-means. (a) Imagem resultante da binarização realizada no resultado do k-means no canal L*; (b) Imagem binarizada do resultado do k-means na imagem que realça as estruturas coradas com hematoxilina e (c) Imagem binarizada do resultado do k-means na imagem que realça as estruturas coradas com hematoxilina e com interferência de eosina.

A próxima etapa foi unir as imagens segmentadas. Após a união foi realizado o crescimento de regiões guiado pela imagem RGB, detalhado no Capítulo 3. Para esse estudo de caso, o limiar para o crescimento de regiões variou de 0,01 até 0,04, estes valores variaram baseados no critério descrito na Seção 3.3. O limiar calculado é baixo pois a maioria dos pixels de interesse já estão segmentados, precisando agora apenas de

pequenos ajustes. A junção das imagens, bem como o crescimento de regiões da primeira fatia do grupo P3A, está representada na Figura 28.

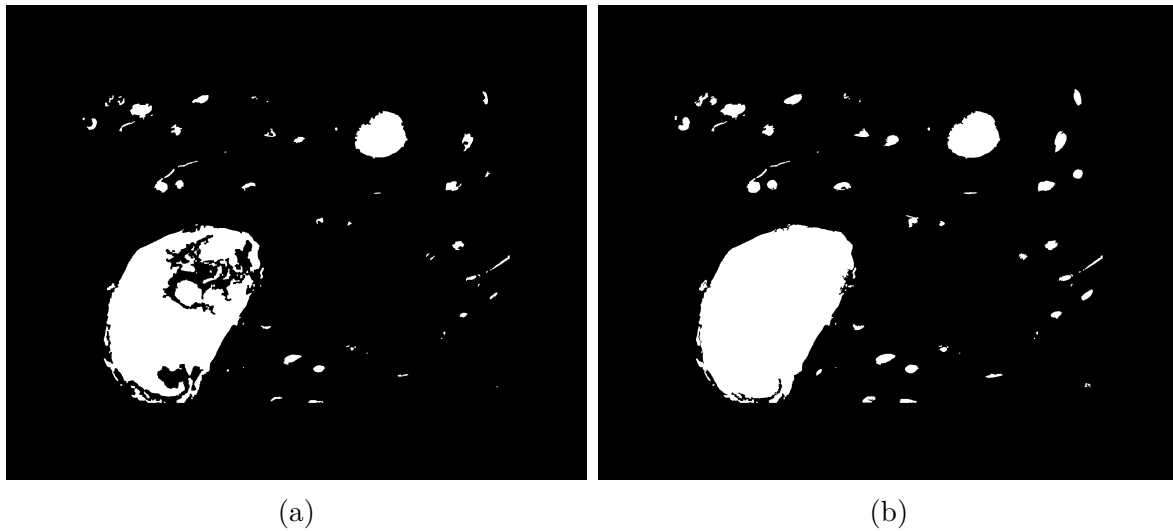


Figura 28 – (a) Junção da imagem L^* e da hematoxilina após a segmentação pelo k-means. (b) Crescimento de regiões aplicado ao resultado da junção entre as imagens segmentadas pelo k-means.

Com o fim do crescimento de regiões guiado, a parte de segmentação das imagens finaliza-se e começa o pós-processamento. A primeira tarefa dessa etapa foi o preenchimento de buracos. Cada conjunto de pixels rotulado como um componente conexo foi analisado. Se ele possuir algum tipo de buraco em sua composição, os pixels destes buracos se tornam parte do objeto (ou seja, são convertidos de 0 para 1). Todos os buracos de cada objeto foram “preenchidos”.

Devido aos problemas no momento da aquisição da imagens, rasgos no tecido e outras deformidades estão presentes no resultado. Para filtrar os objetos que não são canais ósseos nem osteócitos utilizou-se o método PCA, descrito na Seção 2.9, para calcular a elongação de cada objeto. O limiar usado para a circularidade foi 30 (esse valor se refere ao quociente entre os dois maiores eixos do objeto). Se a circularidade do objeto conexo for menor ou igual a 30 ele permanece na imagem, caso contrário é excluído. O valor é consideravelmente grande devido a presença de canais ósseos grandes, que em algumas imagens perdem parte de sua área e consequentemente parte de sua elongação. Após filtrar objetos circulares, ainda existem objetos na imagem que não fazem parte do resultado final, por serem muito pequenos para serem detectados e eliminados na fase anterior ou extremamente grandes. Então, objetos muito grandes e muito pequenos são eliminados no pós-processamento. Apenas objetos entre 80 e 500 pixels de área permanecem no resultado, sendo que esses valores de mínimo e máximo da área dependem do tamanho total da imagem.

A hematoxilina pode tingir objetos que não são canais ósseos e osteócitos, portanto, para um objeto permanecer no resultado final é necessário saber se ele possui alguma

área branca em sua composição. Para isso foi verificado se existe participação de algum pixel da segmentação da imagem L^* no objeto final. Se sim, ele permanece, se não, é eliminado. Por fim, temos que os rasgos nos tecidos enganam o algoritmo no momento da segmentação. Porém, quando um canal ósseo ou osteócito é tingido pelos corantes eosina ou hematoxilina, mesmo eles não contendo núcleo, sua borda é repleta de hematoxilina. Então, caso o objeto segmentado não tenha participação de nenhum pixel proveniente da imagem de realce da hematoxilina, esse objeto também é eliminado. Nesse estudo de caso as duas últimas operações do pós-processamento não seriam necessárias, pois no momento da segmentação já se eliminou os componentes que seriam eliminados por elas. Porém, como é um método automático, elas foram incluídas e realizadas. A Figura 29 ilustra cada um dos passos do pós-processamento.

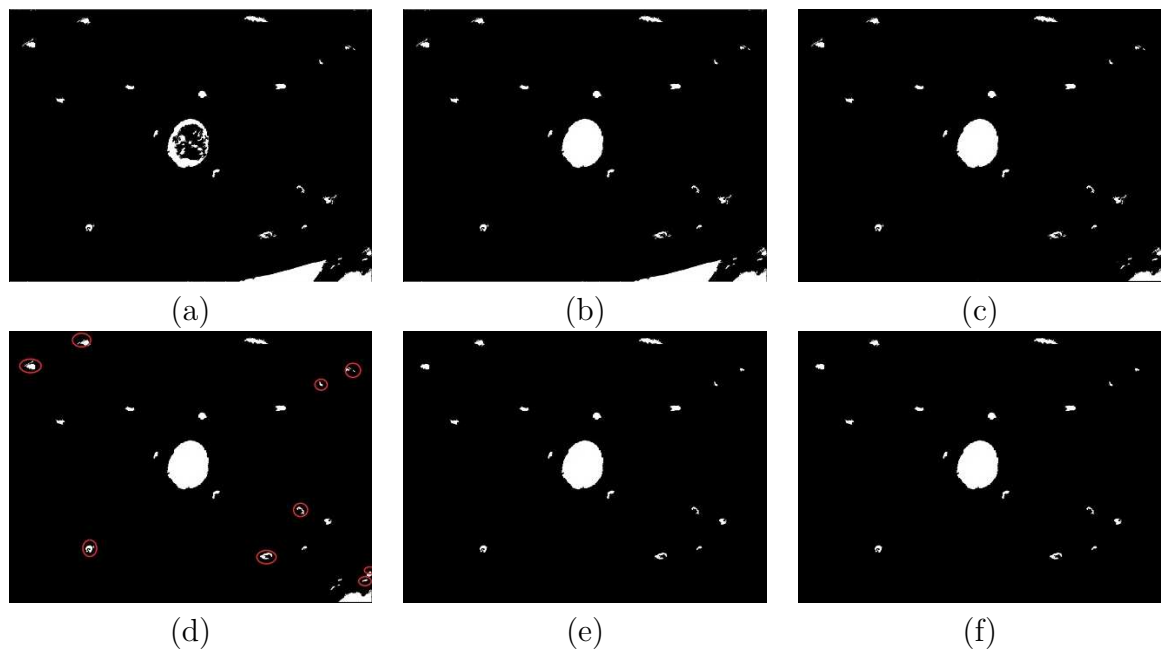


Figura 29 – Conjunto de imagens referentes a fase de pós-processamento. (a) Imagem resultante da fase de segmentação; (b) Imagem após passar pelo preenchimento de buracos; (c) Imagem resultante da eliminação de objetos não circulares; (d) Resultado da remoção de grandes e pequenos objetos, nesse caso nenhum grande objeto foi removido, então a fim de demonstrar a diferença entre as imagens, as regiões dos pequenos objetos removidos estão circuladas em vermelho; (e) Imagem após eliminação de objetos que não continham pixels segmentados na imagem com realce do corante hematoxilina; (f) Remoção de objetos que não possuíam pixels segmentados da imagem L^* , como todos os objetos tinham participação da segmentação do canal L^* o resultado dessa fase foi o mesmo da fase anterior.

Devido aos defeitos como iluminação não uniforme, rasgos no tecido, deformação do tecido na lâmina e borramento, as informações pertencentes às estruturas foram perdidas, fazendo com que nem mesmo os especialistas conseguissem mensurar os artefatos em algumas imagens. Por esse motivo as imagens muito degradadas foram descartadas. Do

total de 154 imagens, 136 foram segmentadas. A Tabela 10 relaciona o grupo, a quantidade total de imagens e a quantidade que foi segmentada. A Figura 30 mostra 3 exemplos das 18 imagens que foram descartadas.

Tabela 10 – Relaciona cada grupo bucal com sua quantidade total de imagens e quantidade segmentada. Primeira coluna contém cada um dos grupos, segunda coluna contém a quantidade total de imagens por grupo, a terceira coluna contém a quantidade de imagens segmentadas e a última linha contém o total.

Conjunto	Quantidade Total	Quantidade Segmentada
P3A	13	12
P3D	20	20
S17	12	12
S19F	10	9
S27	20	20
S29A	17	15
S35	21	19
S36A	13	9
S37	13	12
S39A	14	8
Total	154	136

Com o fim do pós-processamento, termina-se a fase de segmentação automática das imagens e começa a fase de avaliação dos resultados da segmentação. Foram usados 2 métodos de avaliação. O primeiro foi o cálculo de acurácia, sensibilidade e especificidade, detalhado na Seção 2.10.1. O segundo método utilizado foi o coeficiente de Dice, descrito na Seção 2.10.2. Ambos os métodos foram calculados comparando o resultado final do método proposto com o resultado do especialista. A menor acurácia obtida pelo método proposto foi 91,1% no grupo S29A enquanto a maior acurácia foi obtida no grupo S35 com 99,41%. A sensibilidade leva em conta apenas os verdadeiros positivos, por isso é comum dentre os trabalhos de segmentação que esta medida seja inferior as outras. Os resultados detalhados de acurácia, sensibilidade e especificidade estão descritos na Tabela 11. Para o coeficiente de Dice foram comparados os resultados do método proposto com outras técnicas de segmentação: *Otsu* (exposto na Seção 2.7.4), *Valley Emphasis* (VE - descrito na Seção 2.7.5) e *Neighborhood Valley Emphasis* (NVE - detalhado na Seção 2.7.6). Para utilizar as técnicas de comparação as imagens foram transformadas em escala de cinza (foi utilizada uma operação pixel a pixel seguindo a equação - $R*0.2989+G*0.5870+B*0.1140$) e a esse resultado os algoritmos foram aplicados, esse procedimento foi aplicado em todos os estudos de caso. O método proposto se mostrou melhor do que todos os outros métodos. O resultado de Dice para cada método de segmentação por grupo está representado na Tabela 12.

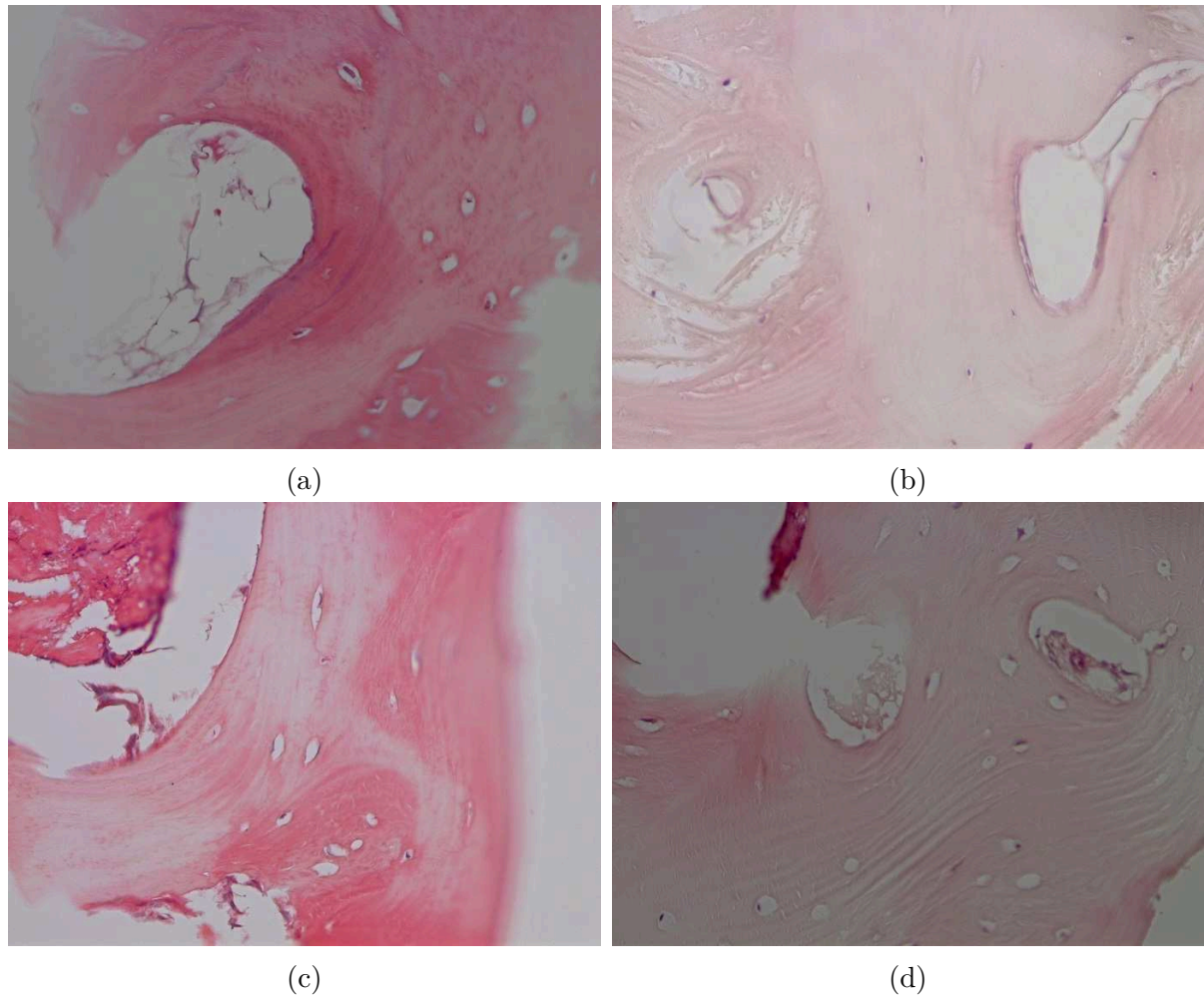


Figura 30 – Exemplos de imagens que não foram segmentadas devido a sua baixa qualidade. (a) Fatia 12 do grupo P3A, na qual a iluminação danificou o lado esquerdo da imagem e também o lado inferior direito, impossibilitando a detecção correta do canal ósseo e osteócitos presentes nestes locais. (b) Fatia 3 pertencente ao grupo S19F, onde devido a vários rasgos no tecido não se consegue separar com clareza o canal ósseo; (c) Fatia 13 do grupo S27, onde houve uma deformação no momento da coleta da imagem, distorcendo os canais ósseos e osteócitos e consequentemente alterando suas propriedades; (d) Fatia 14 pertencente ao grupo S39A, onde devido a um corte e falha de iluminação no canto superior esquerdo, além de outros rasgos do tecido na imagem, ela não foi segmentada.

Tabela 11 – Média do resultado do método proposto para a sensibilidade, especificidade e acurácia de cada grupo

Conjunto	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia
P3A	91,17%	99,91%	98,44%
P3D	67,40%	99,40%	98,37%
S17	83,59%	99,78%	98,97%
S19F	62,16%	99,98%	97,20%
S27	94,51%	98,74%	98,18%
S29A	63,18%	94,15%	91,10%
S35	85,68%	99,95%	99,41%
S36A	97,86%	91,99%	94,20%
S37	81,42%	99,93%	96,95%
S39A	90,33%	99,21%	97,69%
Média	85,99%	98,30%	97,05%

Tabela 12 – Média do coeficiente de Dice para *Neighborhood Valley Emphasis (MVE)*; *Otsu*; *Valley Emphasis (VE)* e o Método Proposto (MP)

Conjunto	NVE	Otsu	VE	MP
P3A	90,67%	89,84%	63,93%	95,08%
P3D	42,25%	43,45%	49,25%	73,58%
S17	72,33%	63,48%	64,87%	88,93%
S19	30,79%	19,58%	18,54%	76,21%
S27	89,50%	87,61%	88,13%	93,60%
S29A	51,74%	48,17%	48,23%	60,81%
S35	63,52%	55,31%	56,55%	91,40%
S36A	78,68%	78,75%	78,75%	92,74%
S37	69,16%	64,82%	64,09%	89,11%
S39A	76,50%	64,60%	64,42%	93,02%
Média	61,51%	53,69%	59,76%	85,44%

4.2 Estudo de caso da rede vascular óssea do fêmur esquerdo de um rato de laboratório

A radioterapia é uma técnica muito impactante para o organismo, que pode danificar a rede vascular óssea durante seu tratamento. Para avaliar se o osso sofreu algum dano e o nível desse dano, foram coletadas amostras de um rato. Essas amostras passaram pelos processos descritos no Capítulo 3. Essa seção trata de todas as fases envolvidas na análise da rede vascular óssea do rato, dando ênfase na parte de segmentação das imagens.

Todas as imagens utilizadas por esse trabalho foram adquiridas em parceria com a Profa. Dra. Paula Dechichi, docente do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia. As imagens coletadas são referentes à parte da diáfise (parte central do osso, como descrito na Seção 2.1). Essa região foi escolhida por concentrar grande parte da rede vascular óssea por onde ocorre irrigação sanguínea e nutrição das

células do osso. O osso em específico é o fêmur, o qual foi escolhido devido a sua facilidade de manipulação.

As imagens foram adquiridas a partir de apenas um rato monitorado no Biotério da Universidade Federal de Uberlândia. O peso do rato estava entre 200g e 300g mantido em gaiola, sendo tratado com água e ração de maneira apropriada. Uma única dose de 30 Gy foi aplicada ao fêmur esquerdo do rato. Essa dose é um acelerador linear de elétrons de 6 MeV. O fêmur direito não sofreu nenhuma aplicação de medicamento, para posteriormente ser utilizado para controle. Após sessenta dias da aplicação o rato foi sacrificado.

As imagens histológicas foram capturadas utilizando-se um Scanner modelo ScanScope At Turbo® de alta resolução. Cada imagem gerada pelo scanner é da ordem de 7844 linhas por 7786 colunas, gerando assim uma de 61.073.384 pixels por imagem. Foram geradas 168 imagens e devido a magnitude dos dados foi necessário reduzir as imagens em 20% para que elas pudessem ser processadas. Na etapa de reconstrução as 168 imagens formam uma imagens 3D. A Figura 31 apresenta uma das imagens originais coletadas.



Figura 31 – Imagem histológica original do fêmur esquerdo do rato.

Ao digitalizar uma fatia histológica de uma região inteira do bloco biológico outros componentes, além do objeto de interesse, podem aparecer na imagem. O primeiro grande desafio desse estudo foi isolar o objeto em que os artefatos analisados estão inseridos. No caso específico desse trabalho os artefatos são os canais ósseos e osteócitos, que estão inseridos na matriz óssea. No fêmur, a matriz óssea possui um formato ovalado. Todos os outros componentes da imagem, exceto esse objeto ovalado, devem ser retirados. Porém os outros componentes estão tão próximos à matriz óssea que ao digitalizar a fatia eles parecem estar anexados a matriz óssea, o que dificulta esse isolamento.

A matriz óssea está destacada na Figura 32. Como se pode perceber existem artefatos tanto na área externa quanto na área interna da matriz. Por esse motivo o algoritmo desenvolvido para isolar o objeto de interesse foi dividido em duas etapas: uma para retirar os objetos no exterior da matriz óssea e outra para eliminar os objetos do interior.



Figura 32 – Primeira fatia de série de imagens histológicas do fêmur esquerdo do rato com a matriz óssea destacada.

O primeiro algoritmo a ser abordado diz respeito à eliminação de artefatos que estão externos à matriz óssea, sendo a primeira fase desse algoritmo a mudança do espaço de cor. A imagem original está no padrão de cores RGB, que em certas circunstâncias não se mostra como o melhor modelo de cor para processamento e análise de imagens. Após testar os modelos de cor HSV, XYZ e até mesmo a deconvolução de cor, foi percebido que o modelo de cor que mais diferenciava as intensidades do fundo da imagem e os objetos era o padrão de cor CIE 1976 L^*a^*b . Então, a primeira parte do algoritmo foi transformar o espaço de cor RGB para CIE 1976 L^*a^*b e a partir desse ponto trabalhar com o canal L^* . Após isolar o canal L^* da imagem foi aplicada a técnica de segmentação Otsu, a qual foi escolhida nesse estágio da segmentação apenas para extrair os objetos do fundo da imagem.

Com a imagem binária o próximo passo foi aplicar a técnica de componentes conexos. A imagem binária é então dividida em n objetos os quais são conectados por vizinhança 8, 4 ou mista, sendo nesse trabalho considerada a vizinhança 8. Após analisar os componentes conexos foi realizada uma filtragem baseada na quantidade de pixels pertencentes a cada objeto. A partir desse ponto apenas o objeto com maior quantidade de pixels passa a compor a imagem binária. Após esta filtragem a imagem possui a matriz óssea e elementos muito próximos que se conectam a ela. A Figura 33 apresenta a imagem binária após a filtragem por quantidade de pixels e também uma representação RGB após a filtragem.

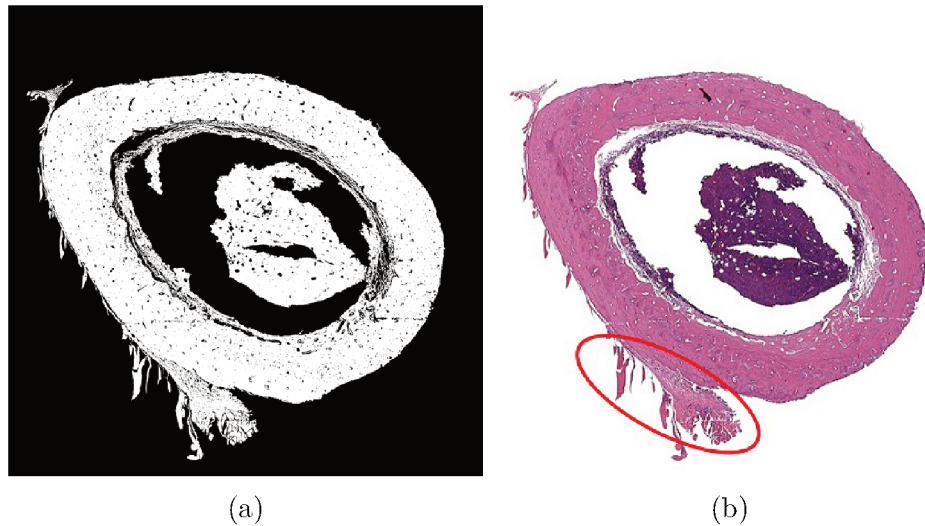


Figura 33 – (a) Imagem binária após sofrer a filtragem por área. b) Imagem RGB após a filtragem por área. A elipse em vermelho destaca a parte mais difícil de remover nas imagens.

Mesmo com a filtragem por área a matriz óssea não está bem definida, prejudicando a segmentação final. Para melhorar a segmentação da matriz óssea foram aplicadas aberturas morfológicas com diferentes elementos estruturantes (ES), com o objetivo de retirar as saliências que ainda restavam na imagem. O primeiro elemento estruturante usado foi uma linha com 100 pixels e 135° de inclinação. O segundo ES aplicado foi um retângulo com 10 linhas e 20 colunas. A combinação de aberturas com a linha e o retângulo são essenciais para a retirada da saliência destacada na Figura 33 (b). O último ES usado foi um disco com raio de 12 pixels para eliminar as outras saliências. O resultado de cada abertura está exemplificado pela Figura 34.

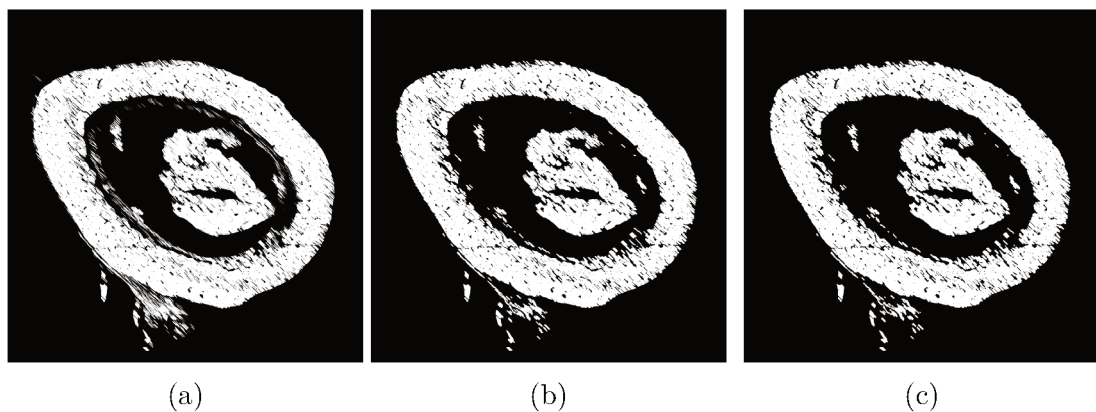


Figura 34 – Cada figura representa uma abertura morfológica com um elemento estruturante específico. Cada abertura foi feita no resultado da sua anterior. (a) Resultado da abertura com ES sendo uma linha de 100 pixels com angulação de 135° ; (b) Resultado da abertura com ES sendo um retângulo de 10 linhas por 20 colunas; (c) Resultado abertura com ES sendo um disco com 12 pixels de raio.

Ao resultado da terceira abertura é aplicado novamente o método de componentes conexos. Mais uma vez o maior componente permanece na imagem binária como objeto, enquanto o restante é transformado em fundo. Este processamento permitiu eliminar tudo o que não pertencia à matriz óssea na parte externa, porém parte da matriz óssea também foi perdida. Mesmo com essa perda, grande parte da silhueta da matriz óssea permaneceu, sendo possível aplicar um fechamento morfológico com um disco de 120 pixels como ES. Apesar de não ter sido possível restaurar toda a matriz óssea, essa operação foi o suficiente para restaurar a silhueta da matriz óssea, sendo assim a última parte do primeiro algoritmo para remover todos os artefatos irrelevantes que estavam exteriores ao objeto foi utilizar o método *convex hull* (o qual cria o menor objeto capaz de conter completamente todas as retas entre quaisquer dois pixels pertencentes ao objeto), após aplicação do método algumas áreas perto da borda da matriz óssea puderam ser restauradas, além disso, extremidades que não estavam conectadas, puderam ser unidas. A Figura 35 representa a imagem binária após a seleção do maior objeto, seguida pelo fechamento e por fim a aplicação do *convex hull*.

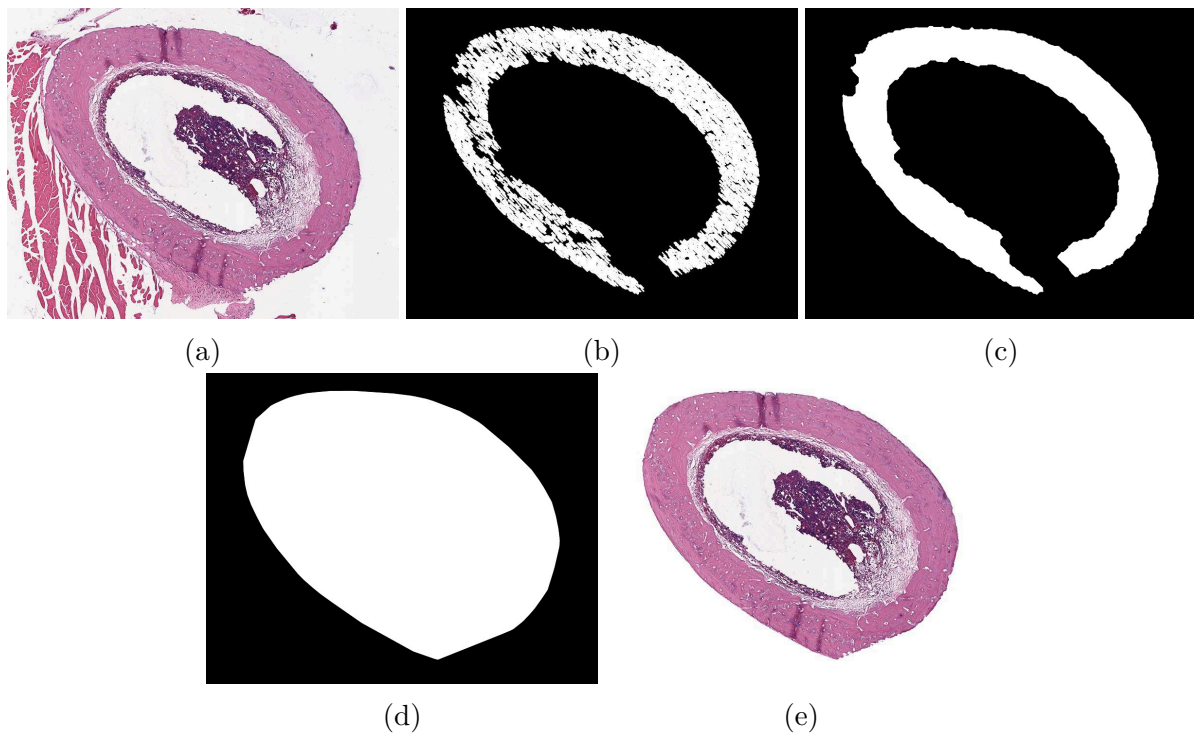


Figura 35 – (a) Imagem original da fatia 379. (b) Resultado da série de aberturas morfológicas; (c) Resultado do fechamento morfológico; (d) Resultado do *convex hull*; (e) Resultado da filtragem com a máscara do *convex hull*.

Após o cálculo do *convex hull* a matriz óssea perdeu seu formato natural. Para que a matriz óssea ficasse com seu formato natural foi necessário binarizar o resultado da filtragem da imagem original com a máscara obtida através do *convex hull* (Figura 35 (e)) através do método Otsu (tendo a matriz óssea como objeto). Essa perda do formato natural ocorreu devido a inclusão de parte do fundo da imagem original como objeto,

esse fundo poderia ser confundido como parte de algum canal ósseo, já que é predominantemente branco. Depois da binarização foi aplicada uma abertura morfológica com ES sendo um disco de 3 pixels de raio (esta operação serviu para desconectar pequenos objetos que o *convex hull* uniu). Após a abertura foram calculadas todas as áreas e apenas o objeto de maior área permaneceu na imagem. Por fim, foi aplicado o preenchimento de buracos e a matriz óssea voltou ao seu formato natural. A Figura 36 ilustra a parte branca que foi anexada a matriz óssea após o *convex hull*, a imagem após a retirada do fundo da imagem original e o resultado final da etapa que visa eliminar objetos fora da matriz óssea na imagem RGB.

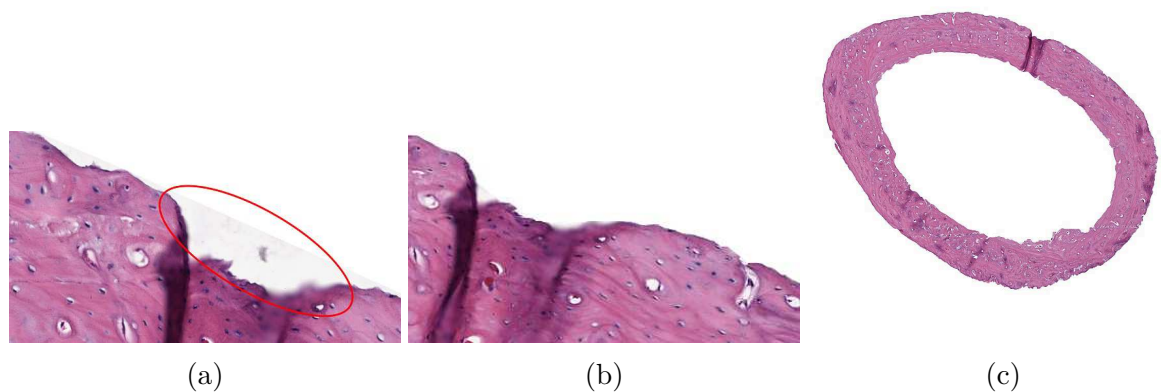


Figura 36 – (a) Recorde da imagem após aplicação do *convex hull*, o círculo em vermelho marca a parte do fundo da imagem original que foi anexada a matriz óssea; (b) Recorte da imagem após aplicação do método Otsu para retirada do fundo da imagem; (c) Resultado da etapa de eliminação de objetos externos a matriz óssea.

Após a remoção dos objetos externos, é necessário remover os objetos internos à matriz óssea. A maioria dos artefatos encontrados no interior da matriz óssea são tingidos por hematoxilina, enquanto a matriz óssea é predominantemente tingida por eosina, ou seja, a tonalidade dos artefatos dentro da matriz óssea é mais escura do que a própria matriz. Como o canal L^* do CIE 1976 $L^*a^*b^*$ é específico para luminosidade ele é usado novamente. Desta vez a imagem foi segmentada utilizando o algoritmo k-means com a quantidade de grupos igual a 3, uma vez que o fundo da imagem é representado pelo branco, a matriz óssea pelo rosa e os artefatos indesejados por um roxo escuro. Foi feita a distância euclidiana da média de cada grupo com o valor 255 (branco) e o grupo que possuía a distância mediana foi o escolhido.

Após a binarização da imagem (resultado da seleção da classe do k-means) foi realizada uma abertura morfológica com elemento estruturante no formato de um disco com raio de 15 pixels e ao resultado dessa operação foi aplicado o método de componentes conexos com vizinhança 8, deixando apenas o maior objeto. A esse resultado foi aplicado fechamento morfológico também com elemento estruturante de disco, porém com 100 pixels de raio.

Essa última etapa serviu para que toda a matriz óssea ficasse conectada e sem nenhum buraco em sua forma. A Figura 37 ilustra cada passo desse segundo algoritmo.

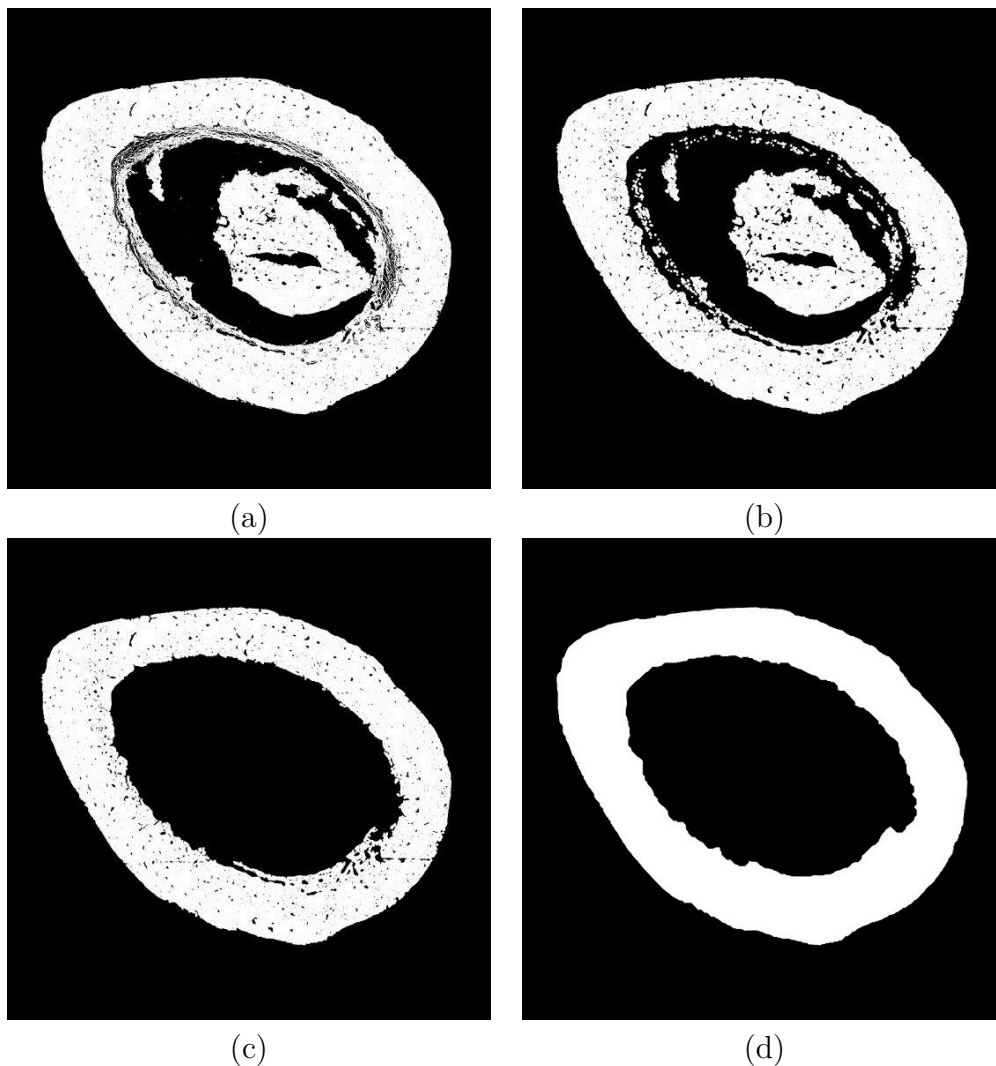


Figura 37 – Resultados de cada etapa proveniente do segundo algoritmo para isolar a matriz óssea na imagem. (a) Imagem binarizada através do k-means; (b) Abertura morfológica com disco de raio 15 pixels; (c) Remoção de todos os objetos com exceção do maior e (d) Fechamento morfológico utilizando um disco de raio 100 pixels.

A imagem resultante do processo de isolamento da matriz óssea serve como uma máscara para a imagem. Os pixels da imagem RGB que tiverem a mesma coordenada de pixels de valor 1 na máscara são mantidos na imagem RGB, enquanto os outros pixels são transformados em 0 (preto) na imagem RGB. Com isso tem-se uma imagem apenas com a matriz óssea, a qual está representada pela Figura 38. As imagens resultantes desse processo foram alinhadas com o método proposto por Wang, Ka e Chen (2014), o qual se mostrou ser o método mais eficiente para alinhamento automático de imagens histológicas. A partir desse momento inicia-se a segmentação dos canais ósseos e osteócitos com o método proposto por esse trabalho.

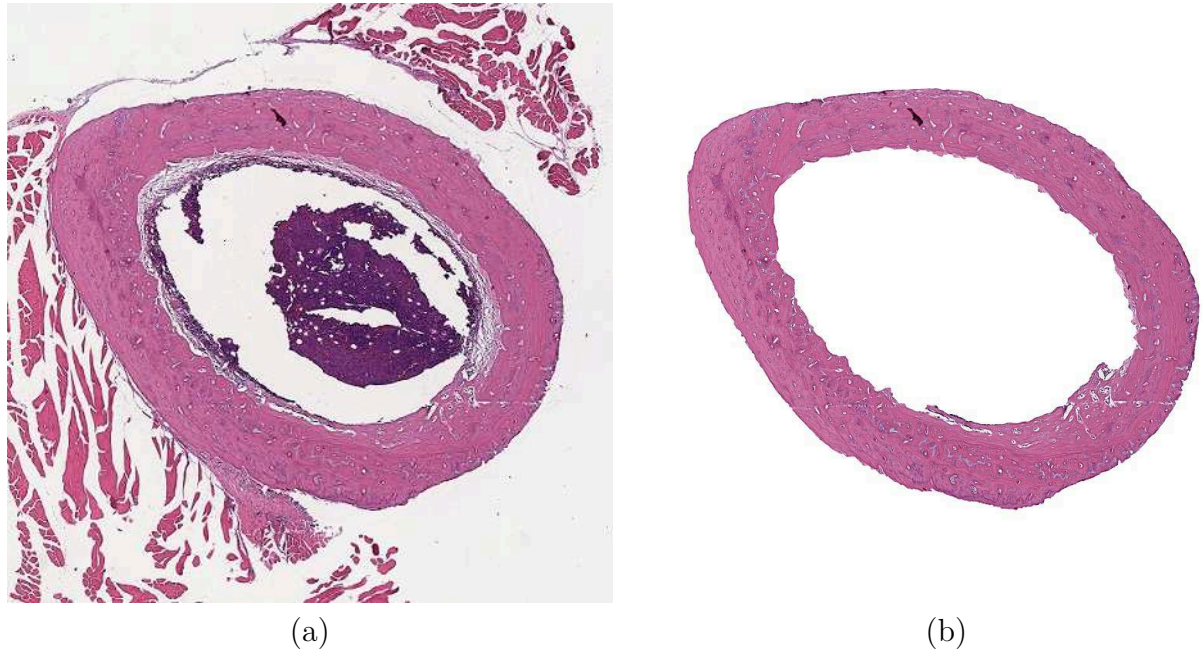


Figura 38 – (a) Imagem original; (b) Resultado do isolamento da matriz óssea.

Depois de obtida a matriz óssea foi feita a correção de contraste como detalhado na Seção 2.3. O resultado dessa etapa é mostrado na Figura 39. Na sequência foi realizada a conversão de espaço de cor de RGB para CIE 1976 $L^*a^*b^*$, gerando assim o canal L^* (o qual destaca as regiões brancas da imagem). Também foi aplicada a deconvolução de cor, a qual gerou 3 imagens em tons de cinza. Uma realçando as regiões tingidas com hematoxilina (será chamada de imagem H), outra representando as regiões marcadas com eosina (será chamada de imagem E) e por fim as regiões marcadas com hematoxilina e interferência de eosina (será chamada de imagem HE). Cada uma das imagens (L^* , H, E e HE) estão exemplificadas na Figura 40.



Figura 39 – (a) Imagem original; (b) Imagem normalizada.

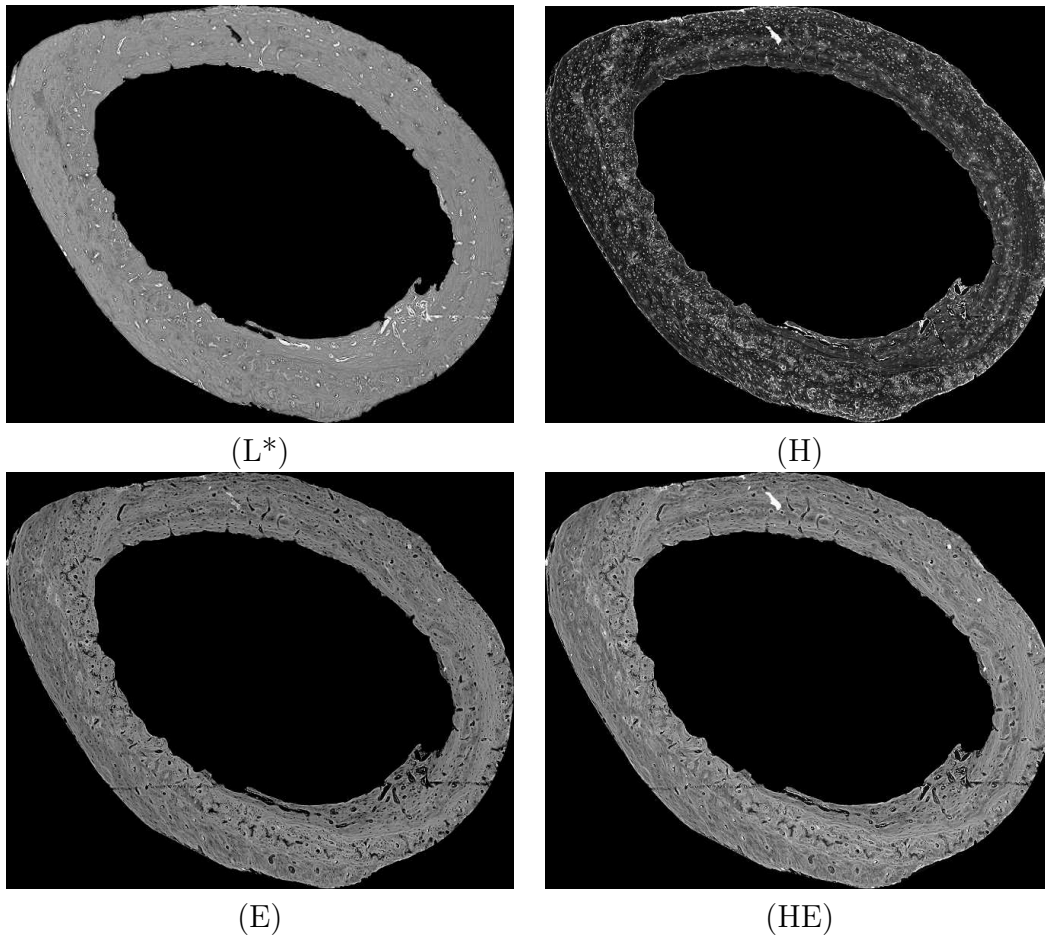


Figura 40 – Resultados da mudança de espaço de cor e deconvolução.

As imagens L^* , H e HE foram submetidas ao algoritmo de agrupamento k -means com $k = 7$. Os resultados do k -means de cada imagem são mostrados na Figura 41. Como todas elas realçam a região de interesse, foi calculada a distância euclidiana entre o branco (255) e a média de cada grupo gerado pelo k -means. O grupo com menor distância foi escolhido para gerar a imagem binarizada. As imagens binarizadas L^* , H e HE estão exemplificadas na Figura 42.

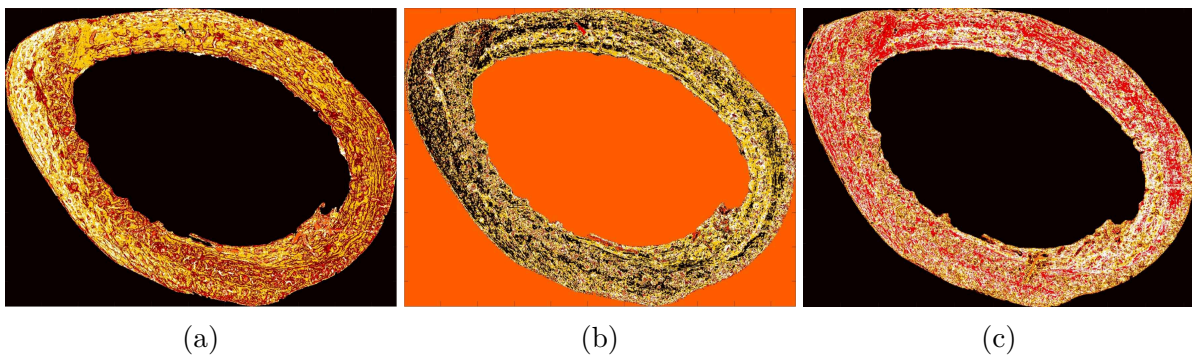


Figura 41 – Imagens resultantes da aplicação do algoritmo k -means com $k = 7$. (a) L^* , (b) H , (c) HE .

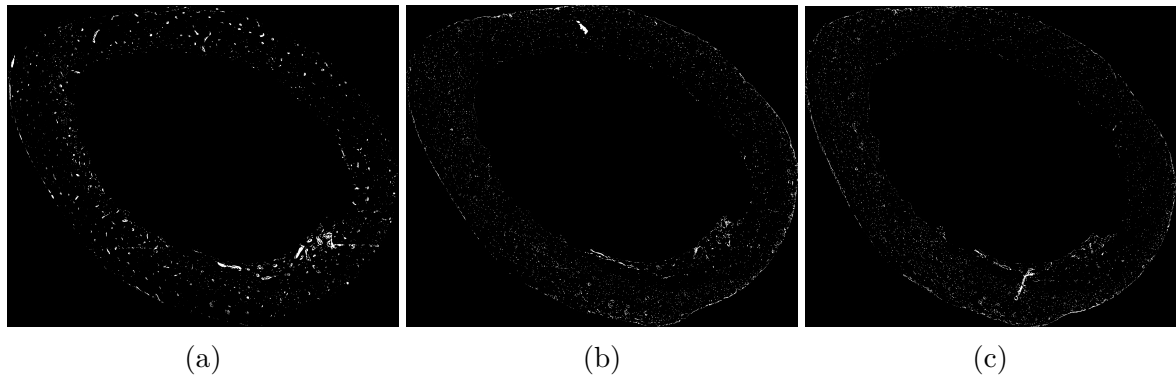


Figura 42 – Imagens binarizadas obtidas de diferentes canais. (a) L*; (b) H; (c) HE.

Após a binarização foi realizada uma união entre as 3 imagens, ou seja, foi gerada uma nova imagem binária que contém todos os pixels brancos das imagens L*, H e HE binarizadas. Na imagem resultante da junção é aplicado o crescimento de regiões guiado pela imagem RGB. O resultado da junção e do crescimento de regiões é mostrado na Figura 43 (esta nova imagem será chamada de imagem J). Após o crescimento de regiões inicia-se o pós-processamento.

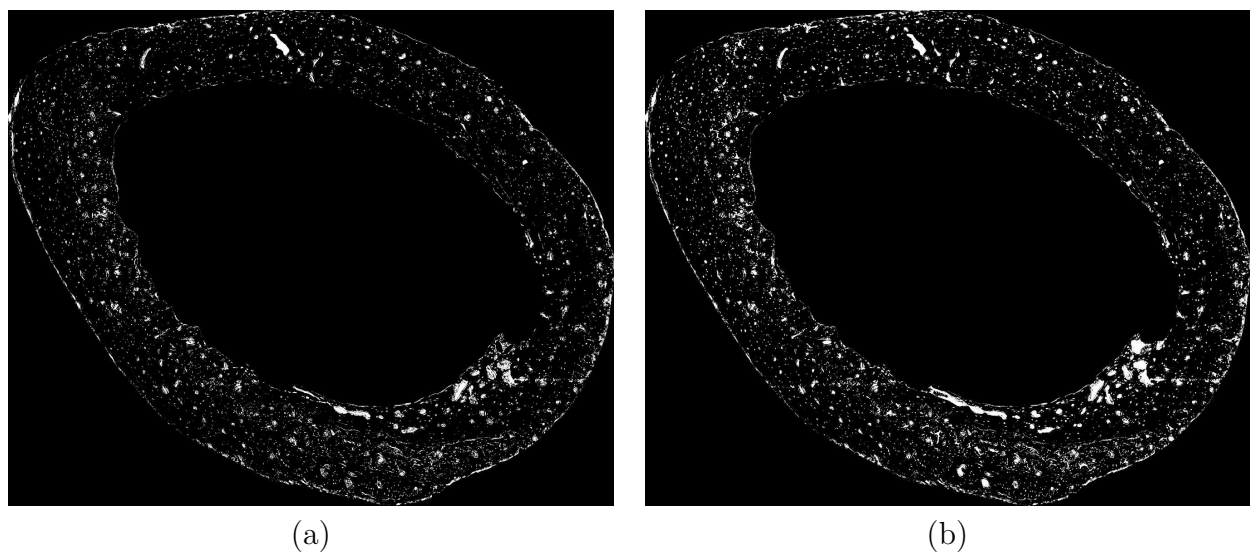


Figura 43 – (a) Junção das imagens binarizadas L*, H e HE. (b) Imagem resultante do crescimento de regiões.

A fase de pós-processamento conta com 5 etapas descritas abaixo, enquanto a Figura 44 mostra os resultados de cada etapa:

- ❑ Preenchimento de buracos;
- ❑ Objetos com elongação maiores que 30 são eliminados da imagem (passo necessário para eliminar objetos não circulares);
- ❑ Objetos menores que 500 e maiores que 20.000 pixels foram descartados;

- ❑ Objetos da imagem J que não possuem pixels segmentados da imagem L* são eliminados (isso significa que aquele objeto conexo era apenas uma marcação basófila proveniente das imagens H ou HE, ou seja não era um canal ósseo);
- ❑ Objetos na imagem J que não possuem pixels segmentados da imagem H ou HE também são eliminados (isso significa que aquele objeto em questão é um rasgo no tecido, pois não tem presença de hematoxilina).

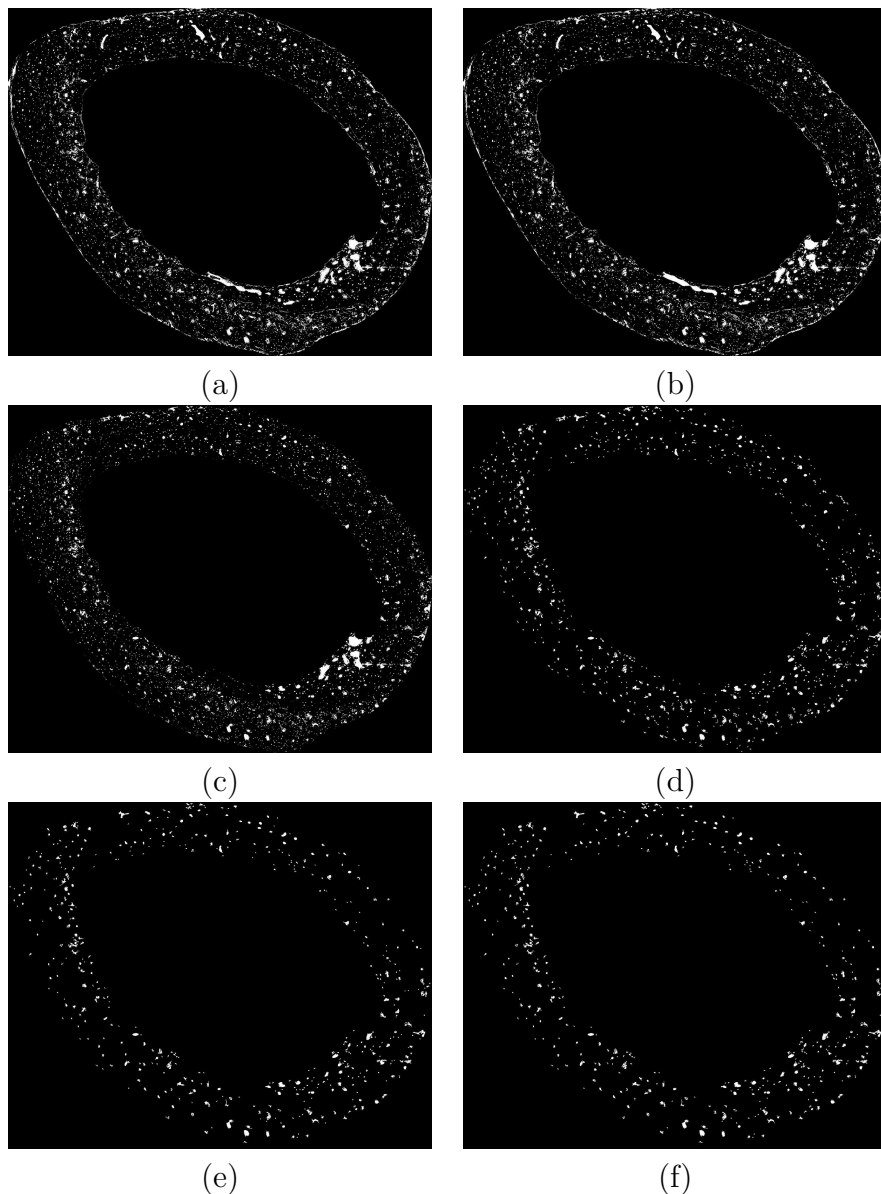


Figura 44 – Resultados do pós-processamento: (a) Resultado final da fase de processamento; (b) Preenchimento de buracos; (c) Remoção de objetos não circulares; (d) Remoção de pequenos e grandes objetos; (e) Remoção de objetos que não possuem participação de pixels segmentados da imagem L*; (f) Remoção de objetos que não possuem participação de pixels segmentados da imagem H ou HE.

Depois de terminada a fase de segmentação dos canais ósseos e osteócitos foi realizada a avaliação dos resultados. Porém, as imagens segmentadas cedidas pelos especialistas estavam apenas marcando a localização de cada canal ósseo e osteócito, sem efetivamente segmentar cada objeto de interesse em seu contorno natural. A Figura 45 mostra os canais ósseos na imagem RGB e a marcação do especialista.

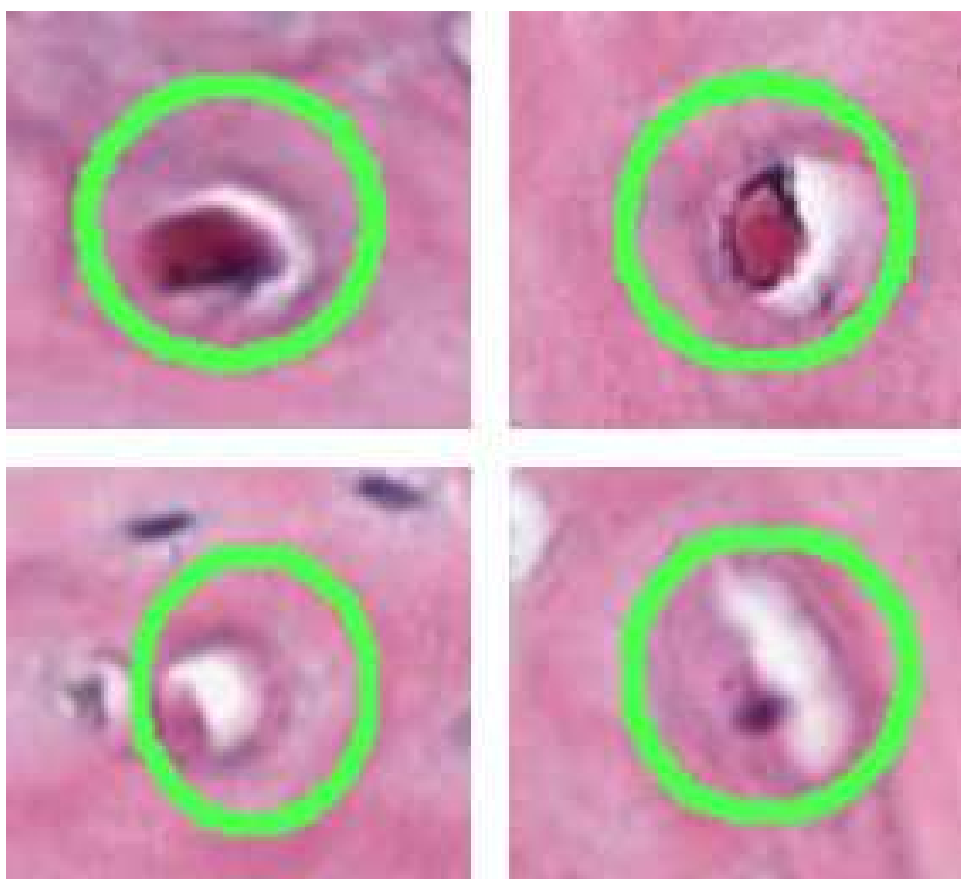


Figura 45 – Exemplo de 4 canais ósseos na imagem RGB. O círculo em verde representa a marcação do especialista

Com o intuito de contornar esse problema, baseado no trabalho de Veta et al. (2013) decidiu-se que se em cada marcação do especialista estivesse pelo menos 20% do objeto segmentado pelo método proposto, esse objeto seria considerado um verdadeiro positivo, caso contrário não. Então pode-se avaliar os resultados com os métodos descritos na Seção 2.10.

Foram utilizados dois métodos para a avaliação. Primeiramente o método proposto foi avaliado nos critérios de sensibilidade, especificidade e acurácia (descritos na Seção 2.10.1), sendo os resultados listados na Figura 46. O outro método de avaliação foi o coeficiente de Dice, o qual visou comparar o método proposto com os métodos *Otsu*, *Valley Emphasis* e *Neighborhood Valley Emphasis*. A avaliação destes métodos e do método proposto está exposta na Figura 47.

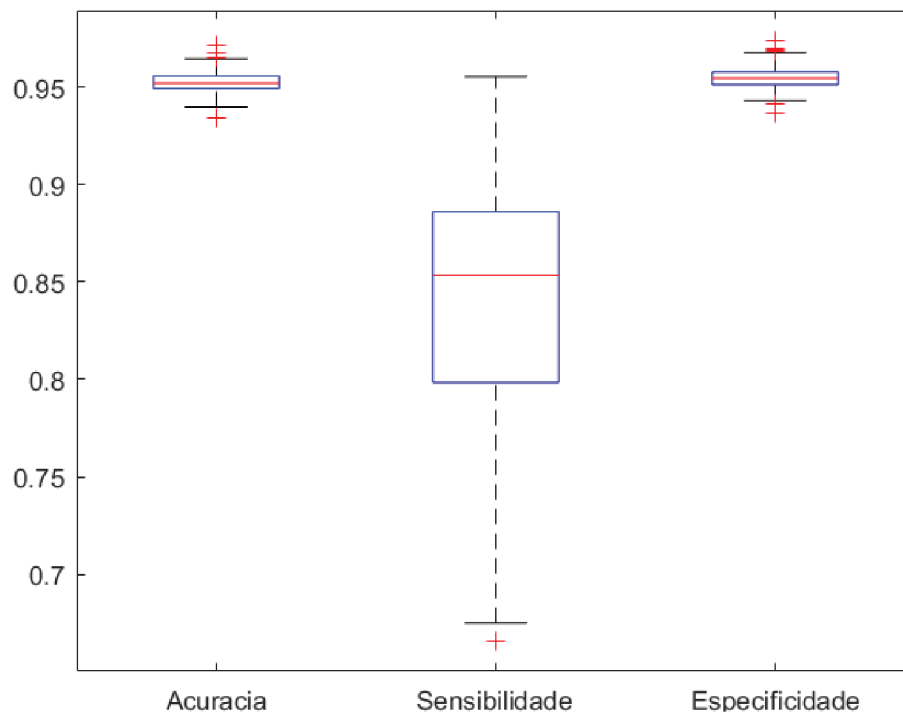


Figura 46 – Gráfico de dispersão *boxplot* representando a avaliação diagnóstica do método proposto por esse trabalho.

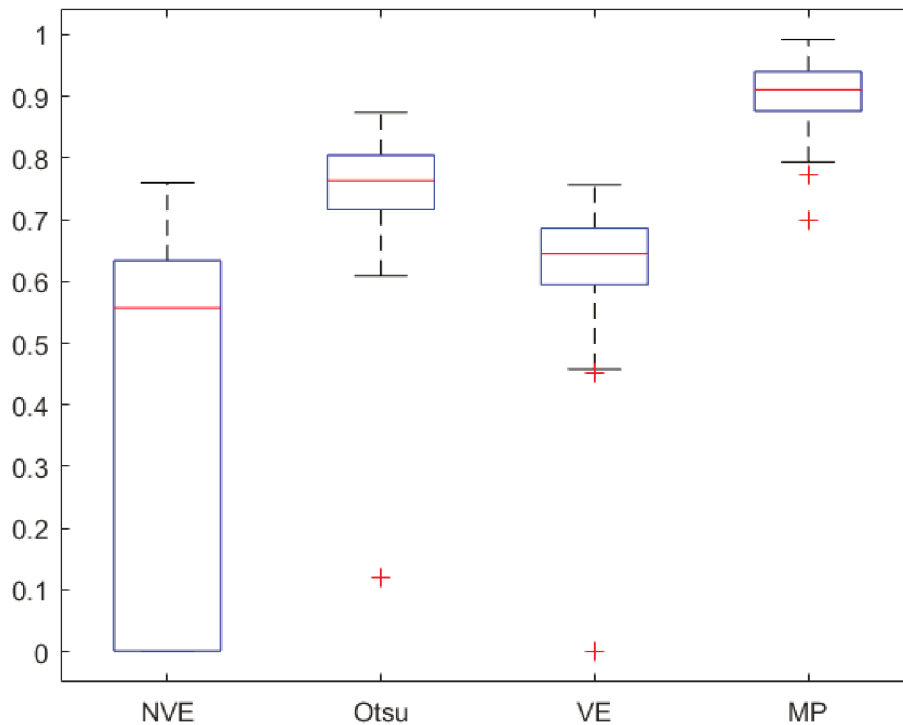


Figura 47 – Gráfico de dispersão *boxplot* representando o coeficiente de Dice para *Neighborhood Valley Emphasis* (NVE), *Otsu*, *Valley Emphasis* (VE) e o Método Proposto (MP).

4.3 Estudo de caso da rede vascular óssea do fêmur direito de um rato de laboratório

Este estudo de caso complementa o estudo de caso descrito na Seção 4.2, pois, as imagens utilizadas são provenientes do fêmur direito do mesmo rato. O fêmur direito estudado aqui foi considerado como amostra de controle e por isso não sofreu nenhum tipo de terapia, ou seja, estava em seu estado original.

O motivo da divisão entre as Seções 4.2 e 4.3 se deu por uma falha no ato da aquisição das imagens. No momento de firmar a fatia biológica na lâmina (para que a amostra pudesse ser visualizada e digitalizada) houve uma distorção no tecido, provocando uma proeminência na parte inferior da amostra. Como resultado, isso ocasionou rasgos no tecido e uma perda considerável nos aspectos morfológicos de todos os artefatos pertencentes ao local afetado. Por conta dessa distorção as dimensões das imagens se alteraram em relação as imagens da Seção 4.2. As imagens analisadas nesta seção são da ordem de 10.700 linhas por 7.133 colunas, totalizando 76.323.100 pixels por imagem. A Figura 48 é um exemplo de imagem utilizada nesse estudo de caso, em que a parte circulada em vermelho representa a distorção ocasionada no momento da digitalização.



Figura 48 – Imagem original cedida pelos especialistas. A marcação em vermelho é referente a distorção ocasionada no momento da coleta das imagens.

Os algoritmos de isolamento da matriz óssea desenvolvidos para o estudo de caso da Seção 4.2 são baseados no formato do objeto, e como o formato da matriz óssea das imagens dessa seção foram alterados, o algoritmo também teve que sofrer alterações. Portanto primeiramente será descrito como a matriz óssea foi isolada.

A eliminação de objetos externos a matriz óssea foi dividida em duas partes. Primeiramente foi necessário excluir objetos não conectados a matriz óssea e com poucas conexões. A outra parte do algoritmo foi focada em eliminar objetos que estavam bem conectados a matriz óssea. Testou-se usar apenas a segunda parte do algoritmo, porém devido aos rasgos (ocasionados pela fixação da amostra na lâmina) partes da matriz óssea eram perdidas.

Na primeira parte do algoritmo para eliminação de objetos externos à matriz óssea foi realizada uma segmentação utilizando o k-means com 5 grupos no canal L^* do espaço de cor CIE 1976 $L^*a^*b^*$. Dois grupos formaram o resultado da segmentação: o primeiro grupo foi aquele cujo valor da distância euclidiana entre a média de intensidade daquele grupo e o branco era a segunda menor (devido ao fundo da imagem original ser branco) e o segundo grupo foi aquele cujo valor da distância euclidiana era o segundo mais alto. Foi então realizada a junção destes dois grupos formando uma imagem binária (resultado da segmentação do k-means) como ilustra a Figura 49(b).

Após a obtenção da imagem binária, apenas o maior objeto conexo permaneceu e o restante foi transformando em fundo (pixels receberam valor 0 - preto). Na sequência, foi aplicada a abertura morfológica com o elemento estruturante sendo uma linha de 30 pixels com um ângulo de 75° e novamente apenas o maior objeto persiste na imagem, como mostrado na Figura 49(d). Mesmo testando diferentes valores para a segmentação, muita informação do objeto da imagem foi perdida.

Então foi necessário realizar um grande fechamento morfológico, sendo que o elemento estruturante precisou variar para cada imagem. Caso o ES fosse muito pequeno o fechamento morfológico não conseguiria unir as partes necessárias para formar a silhueta natural da matriz óssea. Se fosse muito grande, após o fechamento morfológico o objeto gerado se conectava as extremidades da imagem deformando a silhueta da matriz óssea.

A solução encontrada foi começar com um elemento estruturante (no formato de um círculo) com 800 pixels de raio, a partir daí era analisado se o resultado do fechamento tinha atingido a borda da imagem. Em caso afirmativo eram removidos 100 pixels do ES e o fechamento era reaplicado. Esse procedimento era realizado até que o resultado não atingisse a borda. Após esta etapa foi realizado o fechamento de buracos. Todo o processo da primeira parte do algoritmo para retirar objetos exteriores a matriz óssea está representado na Figura 49, assim como o resultado dessa eliminação e a marcação da saliência a ser removida a posteriori.

Na segunda etapa usa-se o mesmo procedimento da primeira para realizar a segmentação. Após a segmentação é realizada uma abertura morfológica com ES sendo uma

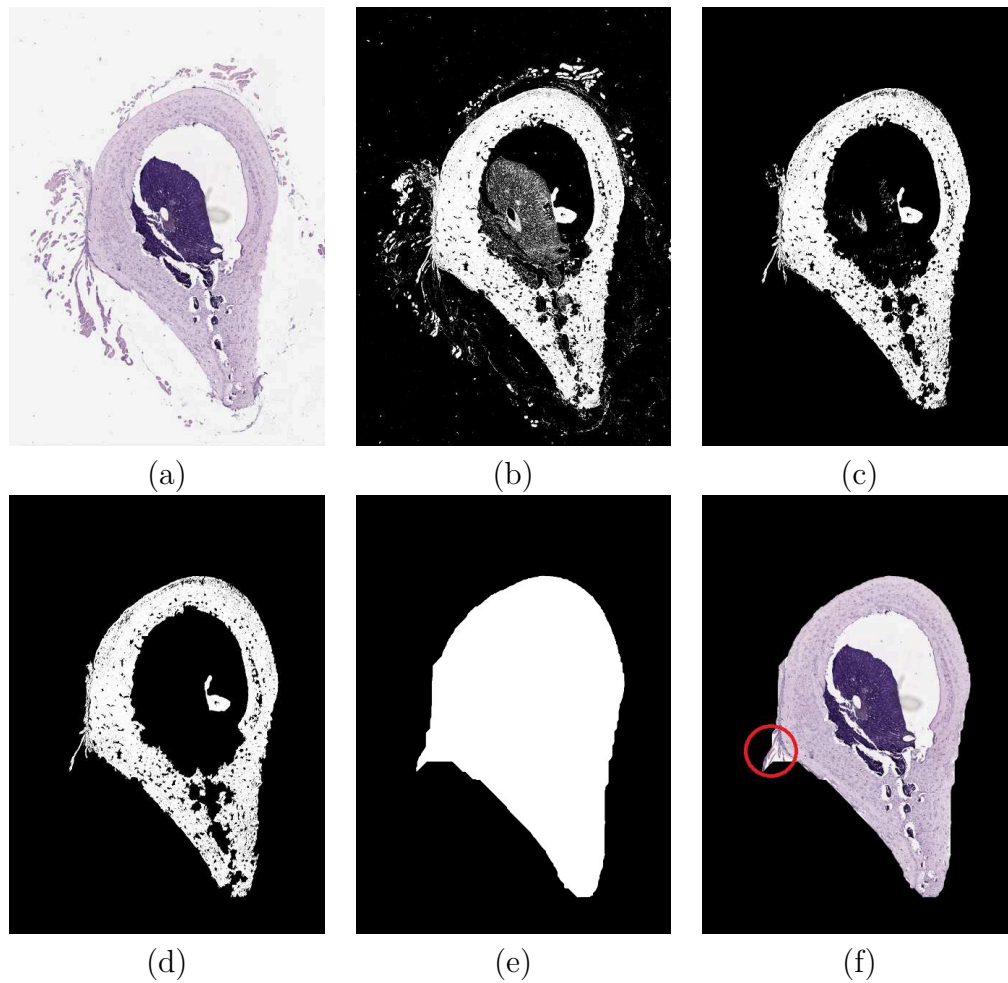


Figura 49 – Processamento para remoção de objetos pouco conectados a matriz óssea: (a) Imagem original; (b) Resultado segmentação k-means com $k = 5$; (c) Abertura com ES sendo uma linha de 30 pixels e ângulo de 75° ; (d) Remoção de objetos menores que o maior objeto; (e) Resultado da dilatação e preenchimento de buracos; (f) Resultado final desse etapa – o círculo em vermelho marca a saliência que ainda persiste no objeto e será removida pela segunda parte do algoritmo.

linha de 30 pixels com inclinação de 120° e a esse resultado é aplicado o fechamento morfológico, com ES no formato de um círculo com 7 pixels de raio. Após a aplicação da abertura e fechamento morfológicos apenas o maior objeto continua na imagem. A partir desse ponto é realizado outro fechamento morfológico com ES também no formato de um disco, mas dessa vez com 100 pixels de raio. Essa segunda parte do algoritmo também se mostrou eficiente para eliminar objetos dentro da matriz óssea, então ao resultado do fechamento morfológico foi aplicado um preenchimento de buracos, exceto para o maior buraco. Todo o processo dessa segunda etapa é ilustrado na Figura 50.

Após isolar à matriz óssea a imagem foi cortada nos seus 4 lados com a finalidade de diminuir a dimensionalidade. Também foi necessário descartar a parte que foi deformada no momento da aquisição. A parte deformada se encontra no inferior da imagem, assim

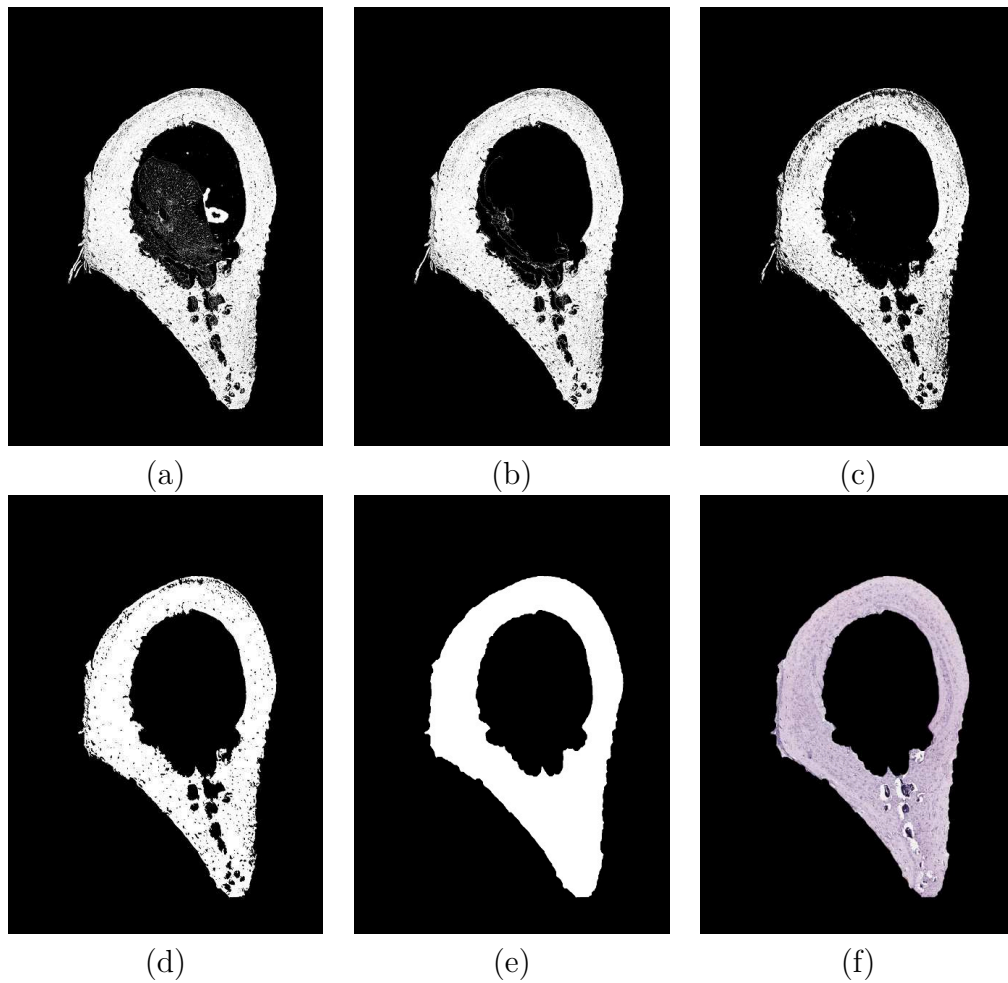


Figura 50 – Processamento para remoção de objetos conectados à matriz óssea: (a) Resultado da segmentação do k-means com $k = 5$; (b) Resultado da remoção de objetos conexos menores que o maior; (c) Resultado da abertura morfológica com ES sendo uma linha de 30 pixels inclinada a 120° e também o fechamento morfológico com ES sendo um raio de 7 pixels; (d) Remoção de todos os objetos exceto o maior; (e) Fechamento morfológico com ES sendo um disco de 100 pixels e preenchimento dos buracos, exceto o maior buraco; (f) Resultado final dessa etapa.

sendo, é possível usar o buraco na matriz óssea para guiar o corte da imagem. O buraco dentro da matriz óssea é então segmentado e a imagem é cortada na coordenada da linha do último pixel do buraco. Mesmo com o buraco sendo o guia para o corte, a imagem resultante ainda possuía uma parte da deformação. Sendo assim, um quarto das últimas linhas das imagens foram também eliminadas. Devido a diminuição de mais da metade da imagem não foi necessário redimensioná-las como havia sido feito nas imagens da Seção 4.2. Cada passo para o corte da imagem está exemplificado na Figura 51.

Uma vez isolada à matriz óssea e a parte danificada retirada, foram aplicados diversos métodos para o alinhamento automático, porém nenhum deles se mostrou capaz de alinhar as imagens de maneira satisfatória. A partir da sexta fatia muitos canais ósseos e osteócitos não se alinhavam, e como o alinhamento depende do resultado anterior, o

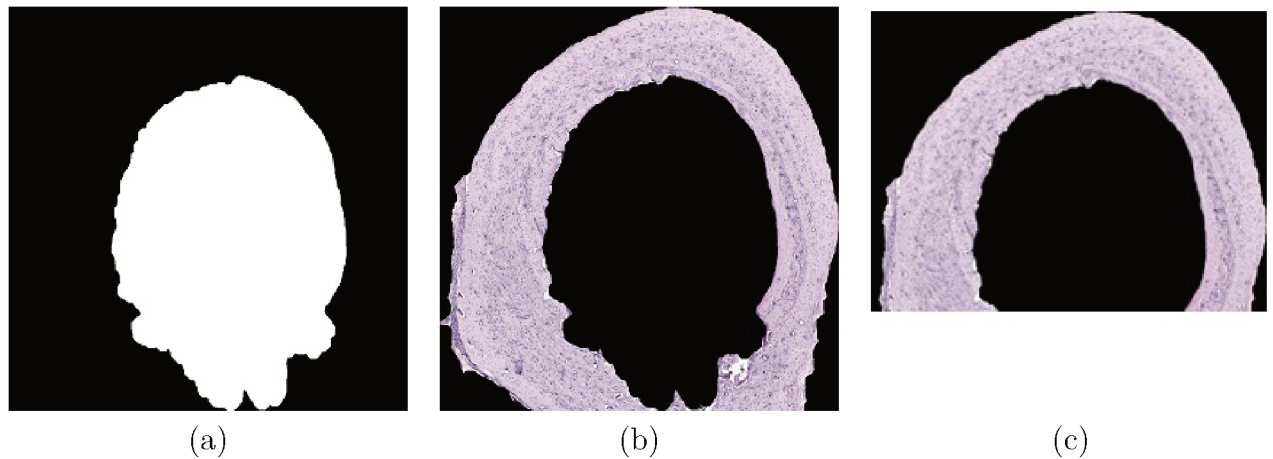


Figura 51 – Processamento para remoção de objetos dentro da matriz óssea e eliminação de deformação na parte inferior da imagem; (a) Máscara de remoção dos artefatos dentro da matriz óssea; (b) Imagem após retirada dos objetos; (c) Imagem após remoção de um quarto do seu interior.

erro se acumulava, resultando em um alinhamento cada vez menor, o erro de alinhamento entre a fatia 5 e 6 está exemplificado na Figura 52. Uma alternativa testada foi realizar o alinhamento manualmente, mas devido a alta dimensionalidade dos dados, grande quantidade de objetos para alinhar e uma complexa tarefa de realizar diferentes deformações para diferentes partes da imagem inviabilizaram esta tentativa, pois o tempo despendido nesta tarefa era muito alto.

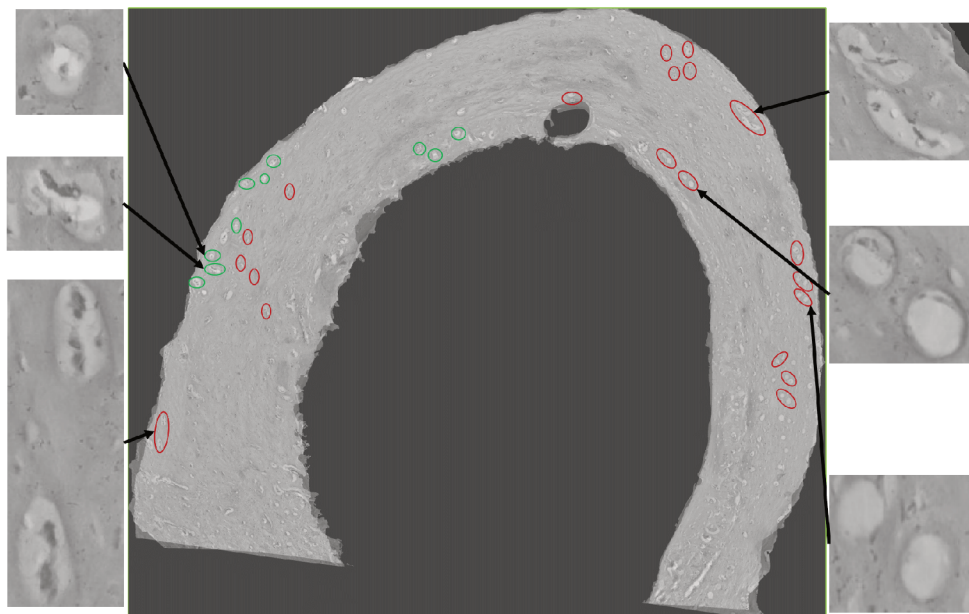


Figura 52 – Imagem 6 sobreposta a imagem 5, com 50% de transparência. Os círculos em vermelho são exemplos de canais ósseos que não se alinharam e os círculos em verde são os que alinharam adequadamente.

Então após o isolamento da matriz óssea o método proposto por esse trabalho foi aplicado diretamente nas imagens. Como esse estudo de caso é um complemento do estudo

de caso da Seção 4.2, o método desenvolvido pelos autores desse trabalho foi aplicado de maneira idêntica aos dois estudos de caso. Por esse motivo serão apresentadas apenas as imagens da fase de pós-processamento do método proposto. As imagens são mostradas na Figura 53.

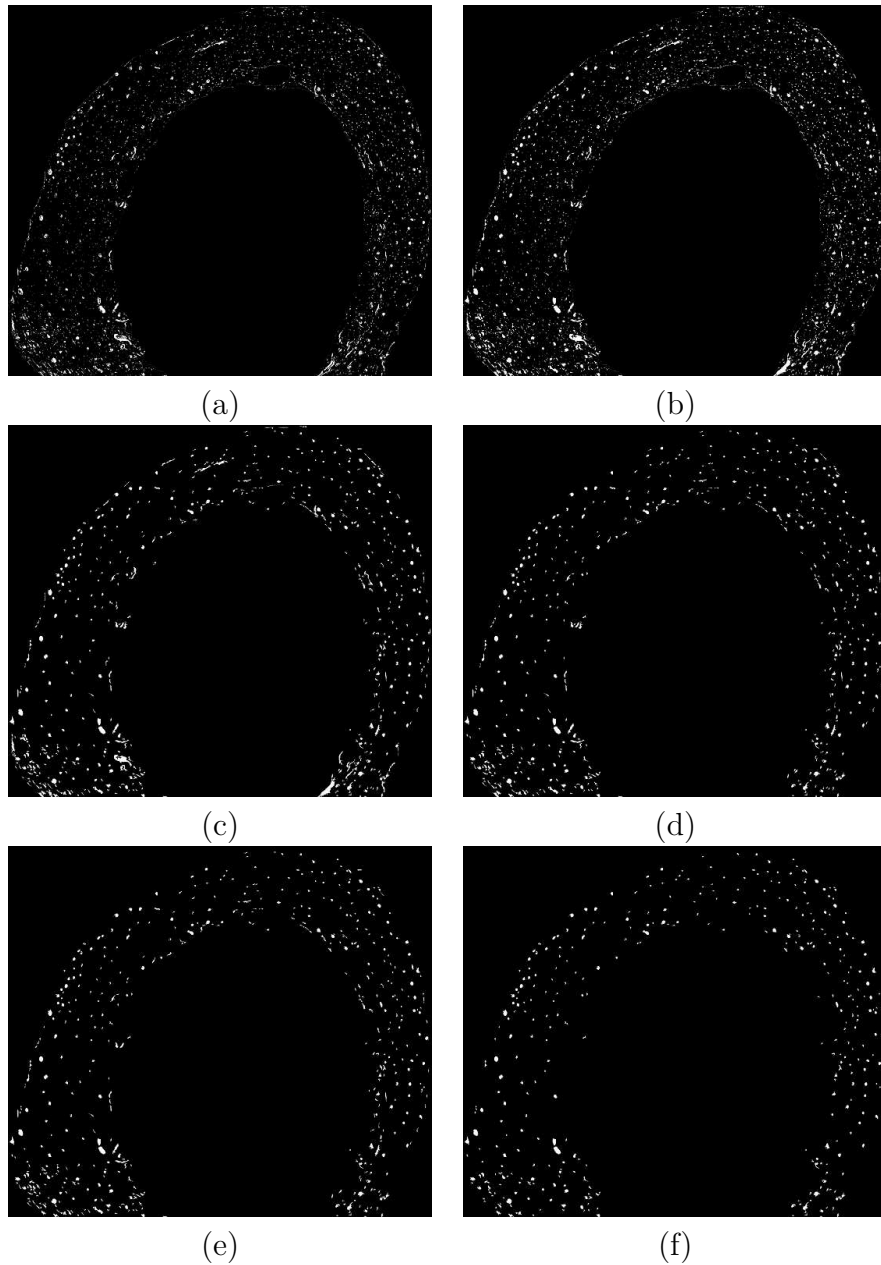


Figura 53 – Resultados do pós-processamento: (a) Resultado final da fase de processamento; (b) Preenchimento de buracos; (c) Remoção de objetos não circulares; (d) Remoção de pequenos e grandes objetos; (e) Remoção de objetos que não possuem participação de pixels segmentados da imagem L^* ; (f) Remoção de objetos que não possuem participação de pixels segmentados da imagem H ou HE.

Após a obtenção da segmentação final, foram aplicados os métodos de avaliação dos resultados, a acurácia, sensibilidade, especificidade e o coeficiente de Dice, sendo que o

resultado desse último foi comparado com os métodos de segmentação automática Otsu, *Valley Emphasis (VE)* e *Neighborhood Valley Emphasis (NVE)*. Os valores dos resultados da acurácia, sensibilidade e especificidade são expostos na Figura 54 enquanto os valores de Dice são mostrados na Figura 55.

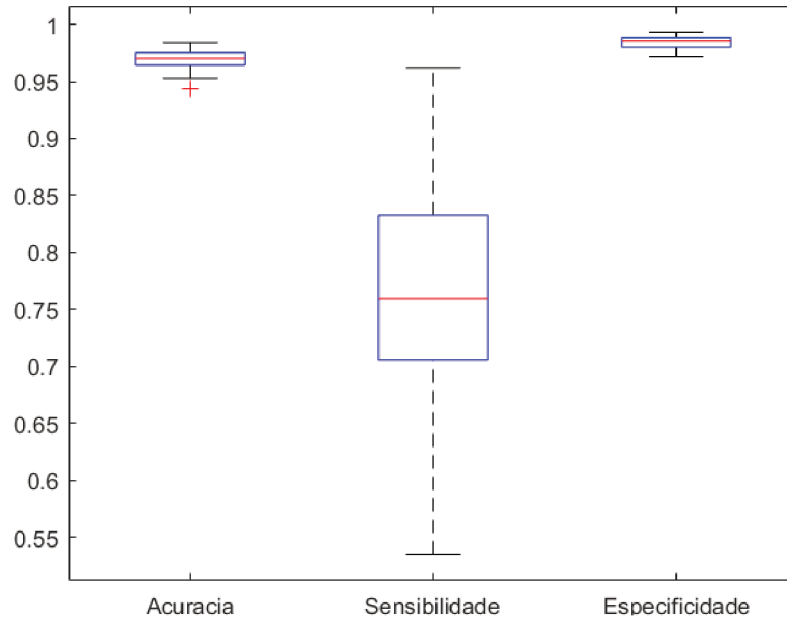


Figura 54 – Gráfico de dispersão *boxplot* representando a avaliação diagnóstica do método proposto por esse trabalho.

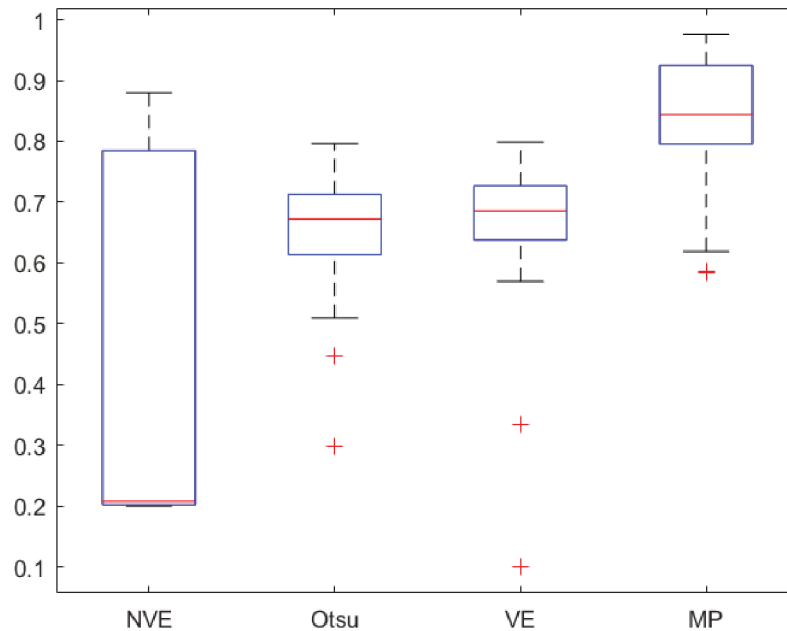


Figura 55 – Gráfico de dispersão *boxplot* representando o coeficiente de Dice para *Neighborhood Valley Emphasis (NVE)*, *Otsu*, *Valley Emphasis (VE)* e o Método Proposto (MP).

Conclusão

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método capaz de segmentar canais ósseos e osteócitos em imagens histológicas da rede vascular óssea. Para isso o método desenvolvido foi aplicado a três grupos de imagens diferentes. O primeiro grupo descrito na Seção 4.1 foi importante pois nele estão contidas imagens danificadas durante a coleta, o que dificulta a segmentação, fazendo com que o método seja exposto a imperfeições que podem ocorrer em outras imagens. As imagens da Seção 4.2 e 4.3 possuem alta dimensionalidade, além de rasgos no tecido histológico. Essas características expuseram o método a mais problemas. Após o método ser aplicado a imagens com características diferentes pode-se concluir que os resultados obtidos através dele foram satisfatórios, sendo superiores a outros métodos automáticos. Com os resultados apresentados nesta pesquisa pode-se dizer que o método apresentado aqui é capaz de auxiliar pesquisadores na área da análise da rede vascular óssea. Além disso este trabalho pode auxiliar futuros pesquisadores no estudo, desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas de segmentação automática da rede vascular óssea, já que não existem muitos trabalhos focados nesta área.

Ao longo do processo da pesquisa e dos vários métodos e técnicas testadas, pode-se constatar que a fase de coleta da imagem é de suma importância para análises e processamentos futuros. Ao avaliar as imagens da Seção 4.1 percebe-se muitas deformidades e algumas imagens tiveram que ser descartadas, prejudicando assim a etapa de análise. Outro problema resultante das dificuldades na coleta de dados foi a dificuldade de alinhamento destas imagens. A priori as imagens seriam coletadas, alinhadas, segmentadas, reconstruídas 3D e por fim seria utilizado o algoritmo de esqueletização proposto por Abreu (2016), para se realizar uma análise completa da rede vascular óssea. Estas etapas não foram feitas pois não foi possível realizar o alinhamento das imagens da Seção 4.3.

Foram avaliados diversos métodos para o alinhamento automático das imagens da Seção 4.1. Porém, nenhum deles foi capaz de alinhar as imagens de maneira correta, de modo que sempre causavam uma grande deformação e comprometiam as características morfológicas dos objetos analisados. Mesmo não conseguindo um método automático

os autores foram capazes de alinhar as imagens manualmente. Tal alinhamento manual não foi possível para as imagens das Seções 4.2 e 4.3. Isso ocorre porque essas imagens apresentam alta dimensionalidade e os objetos a serem alinhados ficam difíceis de serem visualizados em monitores comuns (devido ao tamanho), dificultando assim o alinhamento manual. Outro obstáculo encontrado pelo autor para realizar o alinhamento manual foi redimensionar as imagens, pois quando se redimensionava a fim de alinhar uma lado da imagem, outro lado que já estava alinhado era desalinhado.

5.1 Trabalhos Futuros

Com o objetivo de analisar completamente a rede vascular óssea pretende-se como trabalho futuro alinhar manualmente as imagens na Seção 4.3. Em seguida, pretende-se aplicar o método de segmentação proposto por este trabalho em todas as imagens já alinhadas. Após a segmentação o resultado de cada grupo de imagens será reconstruído 3D, após a reconstrução será aplicado o algoritmo de esqueletização desenvolvido por Abreu (2016). Após o resultado do algoritmo, as características de cada objeto serão calculadas e repassadas aos especialistas para que eles possam avaliar cada conjunto de imagem. No caso das imagens da Seção 4.1 o especialista poderá avaliar se as incisões ocasionadas pela fixação do aparelho danificaram a rede vascular óssea. Já nas imagens das Seções 4.2 e 4.3 os pesquisadores podem avaliar se a radioterapia influencia da rede vascular óssea.

Referências

ABREU, A. F. de. **Estudo e Desenvolvimento de Algoritmos de Esqueletização com Aplicação em Redes Vasculares Ósseas**. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Uberlândia, 2016.

ASMARE, M. H.; ASIRVADAM, V. S.; IZNITA, L. Color space selection for color image enhancement applications. **International Conference on Signal Acquisition and Processing**, p. 208–212, 2009.

AVANTS, B. B. et al. A reproducible evaluation of ants similarity metric performance in brain image registration. **NeuroImage**, v. 54, n. 3, p. 2033–2044, fev. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.09.025>>.

BOYLE, M. S. V. H. R. **Image processing, analysis, and machine vision**. 3. ed. [S.l.]: Thomson, 2007. ISBN 9780495244387.

BROADBENT, A. D. A critical review of the development of the cie1931 rgb color-matching functions. **Wiley Periodicals** 2004, v. 29, n. 4, ago. 2004.

CHEN, T.-W.; CHEN, Y.-L.; CHIEN, S.-Y. Fast image segmentation based on k-means clustering with histograms in hsv color space. **IEEE 10th Workshop on Multimedia Signal Processing**, p. 322–325, out. 2008. Disponível em: <<https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/4665097/>>.

COSTA, L. D. F.; CESAR, R. M. **Shape Classification and Analysis: Theory and Practice**. 2. ed. [S.l.: s.n.], 2009. ISBN 9780849379406.

DHANACHANDRA, N.; MANGLEM, K.; CHANU, Y. J. Image segmentation using k-means clustering algorithm and subtractive clustering algorithm. **International Multi-Conference on Information Processing**, v. 54, p. 764–771, 2015.

DUDA, R. O.; HART, P. E.; STORK, D. G. **Pattern Classification**. 2. ed. [S.l.]: Wiley, 2012. ISBN 9781118586006.

FAN, J.-L.; LEI, B. A modified valley-emphasis method for automatic thresholding. **Pattern Recognition Letters**, v. 33, n. 6, p. 703–708, abr. 2012. ISSN 0167-8655. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167865511004284>>.

LOY, G.; ZELINSKY, A. Fast radial symmetry for detecting points of interest. **IEEE TRANSACTIONS ON PATTERN ANALYSIS AND MACHINE INTELLIGENCE**, v. 25, n. 8, August 2003.

MANJUNATH, B. S. et al. Color and texture descriptors. **IEEE TRANSACTIONS ON CIRCUITS AND SYSTEMS FOR VIDEO TECHNOLOGY**, v. 11, n. 6, p. 13, jun. 2001. Disponível em: <<https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/927424/>>.

MCCANN, M. T. **Tools for Automated Histology Image Analysis**. Tese (phdthesis) — Carnegie Mellon University, Pittsburgh, PA, maio 2015.

NARKHEDE, P. R.; GOKHALE, A. V. Color image segmentation using edge detection and seeded region growing approach for cielab and hsv color spaces. **International Conference on Industrial Instrumentation and Control**, p. 1214–1218, maio 2015. ISSN 978-1-4799-7165-7/15.

NG, H.-F. Automatic thresholding for defect detection. **Pattern Recognition Letters - Elsevier**, v. 27, p. 1644–1649, 2006. ISSN 0167-8655. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016786550600119X>>.

OHM, J.-R. **Multimedia Content Analysis**. Springer, 2016. ISBN 978-3-662-52828-0. Disponível em: <<https://www.springer.com/us/book/9783662528266>>.

OLIVEIRA, R. C. de et al. Bone histomorphometry of broilers submitted to different phosphorus sources in growing and finisher rations. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 10, p. 1517–1523, out. 2006. ISSN 1678-3921. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2006001000009>.

OTSU, N. A threshold selection method from gray-level histograms. **IEEE TRANSACTIONS ON SYSTEMS, MAN, AND CYBERNETICS**, SMC-9, n. 1, p. 62–66, jan. 1979. Disponível em: <<http://web-ext.u-aizu.ac.jp/course/bmclass/documents/otsu1979.pdf>>.

RABELO, G. D.; BELETTI marcelo E.; DECHICHI, P. Histological analysis of the alterations on cortical bone channels network after radiotherapy: A rabbit study. **MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE**, v. 73, p. 1015–1018, 2010.

RABELO, G. D. et al. Changes in cortical bone channels network and osteocyte organization after the use of zoledronic acid. **Scielo - Archives of Endocrinology and Metabolism**, p. 507–514, 2015. ISSN 2359-4292.

RUIFROK, A. C.; JOHNSTON, D. A. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. **Analytical and quantitative cytology and histology**, v. 23, n. 4, p. 291–299, 2001.

SHUO ZHANG et al. Cardiac magnetic resonance t1 and extracellular volume mapping with motion correction and co-registration based on fast elastic image registration. **Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine - Springer**, v. 31, p. 115–129, 2018. Disponível em: <<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs10334-017-0668-2.pdf>>.

- SOTIRAS, A.; DAVATZIKOS, C.; PARAGIOS, N. Deformable medical image registration: A survey. **IEEE TRANSACTIONS ON MEDICAL IMAGING**, v. 32, n. 7, p. 1153–1190, jul. 2013. ISSN 0278-0062.
- SU, Q.; HU, Z. Color image quantization algorithm based on self-adaptive differential evolution. **Computational Intelligence and Neuroscience**, 2013.
- THEÂPAUT, O.; KPALMA, K.; RONSIN, J. Automatic registration of ers and spot multisensor images in a data fusion context. **Forest Ecology and Management - Elsevier**, v. 128, p. 93–100, set. 2000. ISSN 0378-1127/00. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378112799002765>>.
- TRAVENÇOLO, B. A. N. **Métodos computacionais para a caracterização e análise da relação entre anatomia e expressão gênica em sistemas biológicos**. Tese (Doutorado) — Universidade Federal de São Paulo, dez. 2007. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/95/95131/tde-27052008-211038/pt-br.php>>.
- VETA, M. et al. Automatic nuclei segmentation in h&e stained breast cancer histopathology images. **PLOS ONE**, v. 8, n. 7, jul. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070221>>.
- VINCENT, L. Morphological grayscale reconstruction: Definition, efficient algorithm and applications in image analysis. **IEEE Conf. on Comp. Vision and Pattern Recog**, p. 633–635, 1992.
- WANG, C.-W.; ; CHEN2, H.-C. Improved image alignment method in application to x-ray images and biological images. **Bioimage informatics**, v. 29, n. 15, p. 1879–1887, maio 2013. Disponível em: <<http://www-o.ntust.edu.tw/~cweiwang/ImprovedImageRegistration/>>.
- WANG, C.-W.; KA, S.-M.; CHEN, A. Robust image registration of biological microscopic images. **Nature - Scientific Reports**, 2014. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep06050.pdf>>.
- ZHANG, Q.; KAMATA, S. ichiro. A novel color space based on rgb color barycenter. **IEEE International Conference on Acoustics, Speech and Signal Processing**, 2016. ISSN 978-1-4799-9988-0/16.
- ZHU, Q.; MAI, J.; SHAO, L. A fast single image haze removal algorithm using color attenuation prior. **IEEE Transactions on Image Processing**, 2015. Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/iel7/83/7131605/07128396.pdf>>.
- ZITOVÁ, B.; FLUSSER, J. Image registration methods: a survey. **Image and Vision Computing - Elsevier**, v. 21, p. 977–1000, 2003. ISSN 0262-8856/03. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0262885603001379>>.