

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA

LUAN PRINCE FERREIRA

Quantificação de fibras em imagens de cortes histológicos de tecido mamário de gatas

Uberlândia - MG

2022

LUAN PRINCE FERREIRA

Quantificação de fibras em imagens de cortes histológicos de tecido mamário de gatas

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Engenharia Biomédica

Área de concentração: Processamento de Imagens Digitais

Orientador(a): Ana Cláudia Patrocínio

Uberlândia

2022

LUAN PRINCE FERREIRA

Quantificação de fibras em imagens de cortes histológicos de tecido mamário de gatas

Trabalho de Conclusão de Curso à Faculdade de Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de bacharel, especialista, em Engenharia Biomédica.

Área de concentração: Processamento de Imagens

Uberlândia, 19 de agosto de 2022.

Banca Examinadora:

Ana Cláudia Patrocínio – Dra. (FEELT-UFU)

Mariana Fernandes Jorge – Dra. (FMVZ-Unesp)

Pedro Cunha Carneiro – Dr. (FEELT-UFU)

Dedico este trabalho a minha família, por estar sempre presente, ainda que nos momentos mais distantes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a vida, por permitir que eu desfrutasse da oportunidade de fazer um curso de nível superior, em instituição pública e de renome, oportunidade com a qual sonhei, mas que jamais imaginei tornar-se, um dia, real.

Agradeço a minha família biológica, pelo suporte, pelo carinho, pelo voto de confiança. Por ter sonhado alto, junto comigo e por ter acreditado em mim, na minha capacidade.

Agradeço também a família que construí em Uberlândia, pelos anos de convivência, pela paciência, pela amizade e pela união.

Agradeço aos colegas de curso, pelo empenho junto a mim durante esta jornada, por terem proposto extrema dedicação, mesmo diante a muitos percalços.

Agradeço a empresa de mineração, pelo aporte financeiro.

Agradeço a coorientadora Ana Cláudia, por ter visto em mim além de um aluno, um amigo. Por ter feito dos momentos de aprendizado, momentos de troca, de diversão e de inspiração.

Agradeço a coorientadora e especialista contribuinte neste trabalho, Mariana, por todo o apoio, pela sabedoria, pela paciência e por toda sua gentileza.

Agradeço, ao fim, a todos aqueles que se puseram à minha disposição, na reta final, com palavras de consideração, com atitudes proativas, com sugestões positivas e com conselhos reconfortantes.

“E que nos momentos de derrota, tenhamos suficiente humildade para reconhecer as falhas, pois só assim poderemos seguir confiantes.”

(Autor desconhecido)

RESUMO

O carcinoma mamário é o terceiro que mais acomete a espécie felina, e representa grande parte das neoplasias mamárias das gatas. Os fatores de risco para câncer de mama em mulheres e carcinoma mamário em gatas são similares, e, as gatas compõem um ótimo modelo para estudos comparativos com as mulheres. Contudo, os estudos de tumores em tecidos mamários felinos, que utilizam o processamento digital de imagens são escassos. Um dos fatores que altera a proliferação celular no tecido mamário das gatas e, conseqüentemente, contribui para o aparecimento de neoplasias mamárias é o aumento da densidade do estroma mamário. Isso ocorre devido a deposição descontrolada de fibras colágenas nessas regiões. Dentre elas, tem-se fibras colágenas tipo I e tipo III. Uma maneira de se diferenciar as fibras é através do método histoquímico Picrosirius Red, em que um corte histológico do tecido mamário felino é corado e, mediante a luz polarizada, as fibras do tipo I refletem tons de vermelho e, as do tipo III refletem tons de verde. Analisou-se, então, um banco de imagens de cortes histológicos classificadas pelo grau histológico (controle, Grau I, Grau II e Grau III) e pela localização (centro ou periferia). Através de técnicas de Processamento de Imagens Digitais, este trabalho quantificou a proporção de vermelho e verde das imagens, por meio da determinação de um método de segmentação, validado por especialista, por meio de três avaliações cegas distintas. Foi possível quantificar regiões vermelhas e verdes das imagens do banco utilizado, o que poderá contribuir com os modelos comparativos entre carcinoma mamário felino e o câncer de mama, e, conseqüentemente, com o diagnóstico desses tumores.

Palavras-chave: processamento de imagens digitais, carcinoma mamário felino, cortes histológicos, Picrosirius Red.

ABSTRACT

Mammary carcinoma is the third that most affects the feline species, and represents a large part of mammary neoplasms in cats. The risk factors for breast cancer in women and mammary carcinoma in cats are, and, like cats, a great model for comparative studies with women. However, studies of tumors in feline mammary tissues using digital image processing are scarce. One of the factors that alter breast tissue cells and, consequently, contribute to the increase in breast cancer is the increase in breast stroma density. This is due to the uncontrolled deposition of collagen fibers in these regions. Among them, there are type I and type III collagen fibers. One way to differentiate as red fibers is through the method of a feline histological section is stained and, through a polarized tissue, as type I fibers seen red and, as type III, red tons of green. An image bank of histological sections was then analyzed, classified by histological grade (control, Grade I, Grade II and Grade III) and by location (center or periphery). Using digital image processing techniques, this reliable work quantified the proportions of red and green in the images, by determining a differentiation method, validated by an expert, through three different estimates. It was possible to quantify the green and used regions of the bank images, which may contribute to the comparative models between breast cancer and breast cancer, and, consequently, to the diagnosis of these tumors.

Keywords: digital image processing, feline mammary carcinoma, histological sections, Picrosirius Red.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 -	Exemplo de uma imagem digital de 8 bits	17
Figura 02 -	Canais de uma imagem RGB.....	18
Figura 03 -	Histograma e os modos de uma imagem	20
Figura 04 -	Exemplos de máscaras de filtros espaciais	22
Figura 05 -	Exemplo de tons de cinza	24
Figura 06 -	Exemplo de tons de amarelo	24
Figura 07 -	Exemplo de tons de magenta	24
Figura 08 -	Exemplo de tons de ciano	25
Figura 09 -	Exemplo de demais pixels	25
Figura 10 -	Exemplo de montagem da pasta na avaliação (Pasta 11)	31
Figura 11 -	Exemplo de informações enviadas em um arquivo	32
Figura 12 -	Imagem 2: original.....	36
Figura 13 -	Imagem 2: Processamento P1 (D).....	37
Figura 14 -	Imagem 2: Processamento P2 (E)	37
Figura 15 -	Imagem 2: Processamento P3 (A).....	38
Figura 16 -	Imagem 2: Processamento P4 (B)	38
Figura 17 -	Imagem 2: Processamento P5 (C)	39
Figura 18 -	Imagem 16: original	39
Figura 19 -	Imagem 16: Processamento P1 (B)	40
Figura 20 -	Imagem 16: Processamento P2 (D)	40
Figura 21 -	Imagem 16: Processamento P3 (A).....	41
Figura 22 -	Imagem 16: Processamento P4 (E)	41
Figura 23 -	Imagem 16: Processamento P5 (C)	42
Figura 24 -	Imagem 4 da Segunda Avaliação: original	44
Figura 25 -	Processamento P1 da Imagem 4	44
Figura 26 -	Processamento P2 da Imagem 4	45
Figura 27 -	Processamento P3 da Imagem 4	45
Figura 28 -	Imagem 11 da Segunda Avaliação: original	46
Figura 29 -	Processamento P1 da Imagem 11	46
Figura 30 -	Processamento P2 da Imagem 11.....	47
Figura 31 -	Processamento P3 da Imagem 11	47
Figura 32 -	Imagem 4: original	50
Figura 33 -	Processamento F1 da Imagem 4	50
Figura 34 -	Processamento F2 da Imagem 4	51
Figura 35 -	Processamento F3 da Imagem 4	51
Figura 36 -	Processamento F4 da Imagem 4	52
Figura 37 -	Imagem 20: original	52
Figura 38 -	Processamento F1 da Imagem 20	53
Figura 39 -	Processamento F2 da Imagem 20	53
Figura 40 -	Processamento F3 da Imagem 20	54
Figura 41 -	Processamento F4 da Imagem 20	54
Figura 42 -	Comparativo da imagem original com a imagem processada, da imagem “N2 3C CENTRAL”, grupo Controle, Centro	56
Figura 43 -	Comparativo da imagem original com a imagem processada, da imagem “N1 4P PERIF 4”, grupo Controle, Periferia	57
Figura 44 -	Comparativo da imagem original com a imagem processada, da imagem “13347-14 2C”, Grau I, Centro	57

Figura 45 -	Comparativo da imagem original com a imagem processada, da imagem “13347-14 2C”, Grau I, Centro	58
Figura 46 -	Comparativo da imagem original com a imagem processada, da imagem “1407-14 1C central 2”, Grau II, Centro	58
Figura 47 -	Comparativo da imagem original com a imagem processada, da imagem “12178-14 4P”, Grau II, Periferia	59
Figura 48 -	Comparativo da imagem original com a imagem processada, da imagem “11032-14 1C”, Grau III, Centro	59
Figura 49 -	Comparativo da imagem original com a imagem processada, da imagem “11032-14 1C”, Grau III, Centro	60
Figura 50 -	Comparativo da imagem original com a imagem processada, da imagem “N1 5C CENTRAL”, grupo Controle, Centro	61
Figura 51 -	Comparativo da imagem original com a imagem processada, da imagem “48-09 5C”, Grau I, Centro	62
Figura 52 -	Comparativo da imagem original com a imagem processada, da imagem “N3 1C marcação interlobular”, Controle, Centro	62
Figura 53 -	Comparativo da imagem original com a imagem processada, da imagem “11032-14 1C”, Grau III, Centro	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Organização do banco de imagens	23
Tabela 2 -	Imagens escolhidas, ao acaso, para a Primeira Avaliação, e suas características	30
Tabela 3 -	Tabela Verdade do embaralhamento dos processamentos, na Primeira Avaliação	31
Tabela 4 -	Imagens da Primeira Avaliação reenviadas para a Segunda Avaliação	33
Tabela 5 -	Novas imagens selecionadas, ao acaso, para a avaliação da Segunda Etapa	33
Tabela 6 -	Lista de imagens que definiram a avaliação da Segunda Etapa	33
Tabela 7 -	Imagens escolhidas, ao acaso, com os respectivos grupos, posição e número na avaliação	35
Tabela 8 -	Resumo dos votos da especialista em cada processamento, na avaliação da Primeira Etapa	42
Tabela 9 -	Tabela verdade com os votos da especialista	43
Tabela 10 -	Resumo dos votos da especialista, por processamento, na avaliação da Segunda Etapa	48
Tabela 11 -	Tabela Verdade com cada voto da especialista, na avaliação da Segunda Etapa	48
Tabela 12 -	Imagens reenviadas na Segunda Avaliação e a decisão do processamento em ambas as etapas	49
Tabela 13 -	Resultados da avaliação da Terceira Avaliação	55
Tabela 14 -	Tabela Verdade com os votos da especialista, da Terceira Avaliação	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CMF	Carcinoma mamário felino
MEC	Membrana extra celular
PSR	Picrossirus Red
R	Canal vermelho
G	Canal verde
B	Canal azul

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	FATORES DE RISCO	13
2.2	TECIDO DE SUSTENTAÇÃO E AS CÉLULAS NEOPLÁSICAS	14
2.3	HISTOPATOLOGIA	15
2.4	PICROSSIRIUS RED	16
2.5	IMAGEM DIGITAL	16
2.6	HISTOGRAMA DE UMA IMAGEM DIGITAL	18
2.7	RUÍDO	19
2.8	SEGMENTAÇÃO DE IMAGENS DIGITAIS	19
2.9	FILTRAGEM ESPACIAL	20
3	METODOLOGIA	22
3.1	BANCO DE IMAGENS	22
3.2	SEGMENTAÇÃO DE IMAGENS COLORIDAS	23
3.2.1	REMOÇÃO DE PIXELS	26
3.2.2	LIMARIZAÇÃO DE INTENSIDADE	26
3.3	QUANTIFICAÇÃO DE FIBRAS POR COR	27
3.3.1	CLASSIFICAÇÃO DOS PIXELS	27
3.3.2	CONTAGEM DE PIXELS DE INTERESSE	28
3.4	AValiação DA TÉCNICA DE SEGMENTAÇÃO PELA ESPECIALISTA	29
3.4.1	PRIMEIRA AVALIAÇÃO	29
3.4.2	SEGUNDA AVALIAÇÃO	32
3.4.3	TERCEIRA AVALIAÇÃO	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
4.1	IMAGENS FINAIS DOS PROCESSAMENTOS DA PRIMEIRA AVALIAÇÃO	36
4.1.1	IMAGEM 2	36
4.1.2	IMAGEM 16	39
4.2	PRIMEIRA AVALIAÇÃO	42
4.3	IMAGENS FINAIS DOS PROCESSAMENTOS DA SEGUNDA AVALIAÇÃO	43
4.3.1	IMAGEM 4	43
4.3.2	IMAGEM 11	46

4.4 SEGUNDA AVALIAÇÃO	48
4.5 IMAGENS FINAIS DOS PROCESSAMENTOS DA TERCEIRA AVALIAÇÃO	49
4.5.1 IMAGEM 4	49
4.5.2 IMAGEM 20	52
4.6 TERCEIRA AVALIAÇÃO	55
4.7 COMPARATIVO ENTRE ORIGINAIS E PROCESSADAS	56
4.8 DESCARTE DE IMAGENS	60
5 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	66
APÊNDICE A – PROPORÇÃO DE VERDE E VERMELHO DAS IMAGENS DO BANCO	71

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias, em pequenos animais, têm se tornado mais comuns, tanto em cadelas (*Canis lupus familiaris*) como em gatas (*Felis catus*). É a terceira mais incidente na espécie felina (AMORIM et al., 2006; MISDORP, 2008; RUTTEMAN; WITHROW; MACEWEN, 2013), atrás, apenas, das neoplasias de pele e de medula óssea (OVERLEY et al., 2005).

O comportamento agressivo de neoplasias em gatas reduz a expectativa de vida, ainda que seja instituído o tratamento oncológico adequado (SCIBELLI et al., 2003). Dentre as gatas que possuem carcinoma mamário, cerca de 80% sofrem metástases (LANA, S. E.; RUTTEMAN, G. R.; WITHOROW, 2007).

A organização da estrutura do parênquima mamário apresenta fatores que interferem no desenvolvimento do carcinoma mamário (ZAPPULLI et al., 2005), sendo similar nas mulheres e nas gatas (MARIA et al., 2005). A sustentação do parênquima mamário é composta, em abundância, por fibras colágenas do tipo I e do tipo III e fazem parte da composição da matriz extracelular (MEC) (LIPTON et al., 2018).

Pelo método histoquímico PSR sob luz polarizada, é possível diferenciar fibras pela cor. Fibras colágenas do tipo I têm coloração avermelhada e do tipo III coloração esverdeada (MONTES et al., 1980). A técnica histoquímica é utilizada na especificação e padronização de fibras colágenas, em tecidos diversos de diferentes espécies (AUGSBURGER; HENZI, 2008; TEKUL et al., 1996). Entretanto, são escassos os estudos com tecido mamário felino (JORGE, 2019).

Cortes histológicos de tecido mamário normais e neoplásicos de gatas, corados pelo método PSR, foram fotografados e classificados de acordo com a posição (centro e periferia) e o grau histopatológico (controle, grau I, grau II ou grau III). As imagens compõem um banco com um total de 353 registros.

Por meio de Processamento de Imagens Digitais, é possível separar regiões de interesse de uma imagem digital, pelo uso de funções matemáticas conhecidas e algoritmos predeterminados (OSÓRIO, 2000) e atenuar-se captações indesejadas, chamadas de ruídos (DA SILVA, 2019).

O objetivo deste trabalho é determinar a proporção de regiões vermelhas e verdes das imagens de cortes histológicos de amostras de tecido mamário felino, saudável e maligno, corados com o método Picrossirius Red, do banco de imagens, através da determinação de um método para separar regiões de interesse de imagens. Logo, fazendo, então, referência à

proporção de colágeno tipo I e III das amostras, o que pode aprimorar o diagnóstico do carcinoma mamário felino.

Os objetivos específicos são:

- segmentação de imagens coloridas;
- quantificação de fibras por cor;
- avaliação da técnica de segmentação pela especialista;
- desenvolvimento de metodologia de leitura de imagens para a validação da técnica de processamento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fatores de Risco

De 80% a 96% dos tumores mamários em gatas são considerados malignos e agressivos, classificados como carcinomas mamários (HUGHES; DOBSON, 2012). Esse comportamento maligno é caracterizado pela infiltração local e dos tecidos adjacentes (SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013). Os locais comumente atingidos por metástases são linfonodos regionais e pulmões, mas outros podem ser atingidos (MORRIS et al., 2008; SOARES et al., 2016a) e o tempo médio de sobrevivência das gatas é menor que um ano. (SEIXAS et al., 2011).

O processo de metástase no câncer de mama é o estágio com menor possibilidade de cura e muito estudado em mulheres (GUNASINGHE et al., 2012). No meio científico, tanto em gatas como em cadelas, o carcinoma mamário espontâneo é considerado um bom modelo para se compreender os diferentes tipos de câncer de mama, mas deve aprimorar-se o conhecimento em relação às espécies felina e canina. (MUNSON; MORESCO, 2007).

Fatores biológicos que influenciam o câncer, em mulheres, são semelhantes aos que influenciam no carcinoma mamário felino, (MARIA et al., 2005; MATOS et al., 2012), sendo eles, carcinogênese, fatores de risco, idade de incidência, prognóstico, avaliação histopatológica, padrão de metástase e resposta a terapia (HAHN; BRAVO; AVENELL, 1994). Essas características reforçam que felinos constituem um bom modelo de estudo comparado com cânceres de mama mais agressivos, classificados como tipo basal. (C.S. et al., 2018; MARQUES et al., 2017; TAMAMOTO et al., 2014; ZAPPULLI et al., 2005).

Alguns fatores de risco estabelecidos para o desenvolvimento do câncer de mama, são o aumento da idade, a etnia, o histórico de menarca, as características estruturais da mama, os padrões reprodutivos, o uso de hormônios, de álcool e de tabaco, e a baixa prática de atividade física (WINTERS et al., 2017).

Em relação às características estruturais da mama, em mulheres, a redução da densidade do parênquima mamário ao longo tempo, está relacionado ao menor risco ao desenvolvimento do câncer de mama, comparado àquelas com densidade estável (LOKATE et al., 2013). A mamografia é uma importante ferramenta na detecção precoce do câncer de mama (ALOWAMI et al., 2003), sendo um exame não invasivo, que identifica aumento da densidade mamária (MCCORMACK; SILVA, 2006; WINTERS et al., 2017), recomendado às mulheres a partir dos 40 anos de idade (BOYD et al., 2000; BRIGHT et al., 1988; CHECKA et al., 2012; LI et al., 2005).

2.2 Tecido de sustentação e as células neoplásicas

As fibras colágenas possuem diferentes funções e estão em diferentes tecidos. A matriz intersticial, rica em fibras colágenas tipo I e III, é constituinte do estroma, o qual é remodelado durante a carcinogênese (LIPTON et al., 2018). O desenvolvimento do câncer está relacionado ao enrijecimento do parênquima mamário, devido a deposição de colágeno na MEC (PROVENZANO et al., 2006).

O estroma neoplásico apresenta aspectos similares ao saudável, o que permite um aspecto heterogêneo ao longo de sua extensão e facilita a progressão do tumor. (DVORAK, 1986). Nas mulheres portadoras de câncer de mama, quanto maior for a deposição de colágeno, maior a possibilidade de invasão e metástase. (GILKES et al., 2013b; XIONG et al., 2014).

A influência entre o estroma mamário e o epitélio, por meio de interações moleculares, está relacionada à invasão de tecidos e metástase (DE WEVER; MAREEL, 2003). O recrutamento de fibroblastos ocorre para modificar a estrutura do estroma com a produção de colágenos dos tipo I e III (DE WEVER; MAREEL, 2003). Quando um tumor cresce, ele estimula a deposição de colágeno ao longo do estroma. (LIN et al., 2003).

Estudos comparativos entre tecidos mamários saudáveis e tumorogênicos, demonstraram alterações nas fibras colágenas, seja por danos na continuidade da membrana basal, ou pelo desaparecimento dela (BENAZZI et al., 1993), seja pelo aumento de sua

deposição na MEC (PROVENZANO et al, 2006), o que indica que existe uma relação com a capacidade de invasão e agressividade da célula cancerígena. Entretanto, não existem muitos estudos que avaliem as fibras colágenas de tipo I e III em tumores mamários (JORGE, 2019).

2.3 Histopatologia

O exame histopatológico utiliza a coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) como padrão na rotina laboratorial. Ele permite um diagnóstico definitivo, e outros fatores, dentre eles a tipificação morfológica e a graduação da neoplasia. (GOLDSCHMIDT et al., 2011; MATOS et al., 2012; MILLS et al., 2015; MISDORP, 2008; MISDORP et al., 1999; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013).

A técnica histoquímica PSR é utilizada para detalhar e padronizar fibras colágenas em diferentes tecidos e espécies (AUGSBURGER; HENZI, 2008; TEKGUL et al., 1996). Contudo, trabalhos acadêmicos relacionados ao tecido mamário das gatas ainda são escassos (JORGE, 2019).

O padrão morfológico permite a classificação em tipos e subtipos, mas para o carcinoma mamário de gatas, o grau é a principal ferramenta diagnóstica deste exame (BETZ et al., 2012). As lesões são classificadas de acordo com suas características morfológicas, ou seja, o grau de diferenciação celular. Grau I é a classificação de um tumor bem diferenciado, com maior proximidade morfológica ao tecido saudável. Grau II é a classificação de um tumor moderadamente diferenciado. Já o Grau III define um tumor pouco diferenciado, com pior prognóstico (ELSTON; ELLIS, 1991; GOLDSCHMIDT et al., 2011). A expectativa, em relação à graduação de um tumor mamário, é que, quanto maior é o grau, maior é a sua agressividade e menor é o tempo de sobrevivência (DE CAMPOS et al., 2015).

Essa graduação para os carcinomas mamários felinos foi elaborada com base na classificação para tumores de mama de mulheres (ELSTON & ELLIS, 1991), método mais utilizado no meio científico (SEIXAS et al., 2011; CASSALI, 2018).

A atividade biológica é mais intensa na periferia de um tumor, que no seu centro, devido ao forte aporte vascular dessa região, o que determina diferentes características de progressão tumoral nas diferentes regiões (KUHL, 2000). Logo, é importante avaliar ambas regiões para melhor prever sobre dinâmica estromal dos tecidos saudáveis e neoplásicos. (QUAIL; JOYCE, 2013).

2.4 Picrossirius Red (PSR)

Nos tecidos de mamíferos, o colágeno conecta-se facilmente a corantes ácidos. Através de birrefringência em campo escuro e pode-se identificar as estruturas de fibras colágenas, coradas pelo método do Picrossirius Red (MONTES; JUNQUEIRA, 1991). Esta coloração seletiva permite a visualização de fibras colágenas coloridas (SWEAT et al., 1964; MONTES, 1996).

Devido a suas fibras espessas, o colágeno tipo I é altamente birrefringente, e revela uma coloração avermelhada. Já o colágeno tipo III é mais delgado, com birrefringência em tons esverdeados (MONTES et al., 1980). A espessura do corte do tecido histológico é imprescindível para uma interpretação adequada dos resultados, padronizada em cinco micrômetros, assegurando a devida birrefringência (JUNQUEIRA; MONTES; SANCHEZ, 1982).

O uso da técnica de PSR já se mostrou eficaz no diagnóstico de lesões mamárias em mulheres (DRIFKA et al., 2016) e em animais (WEGNER et al., 2017). A densidade estromal do parênquima mamário de gatas já se demonstrou alterado em estudo anterior, através da análise digital de imagem binárias, tanto por atributos com propriedades de luminescência (kurtosis) como propriedades de textura (entropia) (JORGE, 2019).

2.5 Imagem Digital

Uma imagem é formada quando um algo sensível à radiação eletromagnética registra uma interação com um objeto físico. É gerada pela discretização dos valores da intensidade de uma determinada localização espacial. (GONZALEZ e WOODS, 2010)

Ela consiste em uma matriz bidimensional, em que os valores de suas coordenadas (x e y) indicam pontos, e o valor desses pontos, também chamados de elementos, identificam o nível de cinza da imagem (GONZALEZ e WOODS, 2010). Um elemento ou ponto de uma matriz que compõe uma imagem digital é chamado de pixel (GONZALEZ e WOODS, 2010).

A resolução espacial é definida pelo total de pixels utilizados para representar um objeto, em uma imagem (GONZALEZ e WOODS, 2010). A resolução de contraste é definida pelo total de cores disponíveis para representar-se um objeto, ou ainda, a quantidade de tons de cinza que podem representá-lo, a chamada profundidade do pixel (GONZALEZ e WOODS, 2010). Um bit representa a variedade de tons de cinza de uma imagem digital. Um

bit representa dois tons de cinza. Dois bits representam 4 tons de cinza. Três bits, 8 tons de cinza. A variedade de tons de cinza, então, determina a quantidade de bits, pela equação:

$$\text{bit}^2 = \text{tons de cinza}$$

Em que “bit” é a quantidade de bits de uma imagem (GONZALEZ e WOODS, 2010).

Para que uma imagem seja representada em cores, é necessário haver um espaço de cores, com capacidade de representar o máximo de cores possível. Alguns modelos de representação de cores são o RGB e o CMYK (ACHARYA e REY, 2005).

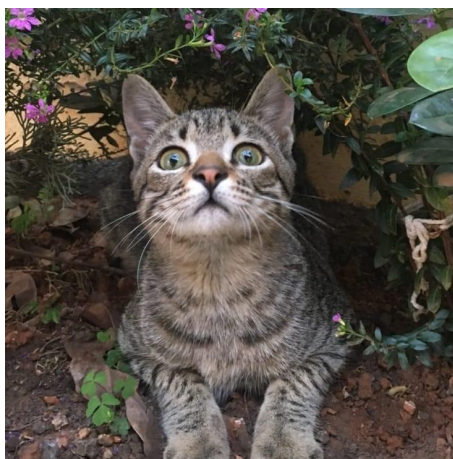
A importância do uso de cores no processamento de imagens está relacionada a este ser um excelente método de descrição, que auxilia na identificação e localização de formas ou objetos em um registro, e pela ampla faixa de cores que os humanos são capazes de identificar, comparada a poucos tons de cinza identificáveis. (GONZALEZ, 2010).

O olho humano possui cones sensíveis a uma faixa de comprimento de onda do espectro eletromagnético. Cada cone capta ondas de um comprimento. Há cones que captam vermelho (700 nm), outros, verde (546,1 nm) e outros, azul (435,8 nm). Devido a essa característica, essas cores são chamadas de cores primárias (GONZALEZ e WOODS, 2010).

No modelo RGB (red, green, blue), temos a representação de cores em seus espectros primários, verde, vermelho e azul e ele é comumente utilizado em monitores e câmeras de vídeo. A combinação de cores primárias resulta na formação de cores secundárias: o ciano, o magenta e o amarelo. A mistura das 3 cores primárias resulta em branco. A mistura de uma cor secundária e sua cor primária oposta, também resulta em branco. É claro que, em proporções adequadas (ACHARYA e REY, 2005).

É importante ressaltar que não há relação entre as cores primárias do espectro eletromagnético e as cores primárias provenientes de pigmentos (GONZALEZ e WOODS, 2010).

Figura 01: Exemplo de uma imagem digital de 8 bits.



Fonte: o autor.

Imagens que utilizam o modelo RGB possuem 3 componentes de imagens, chamados de “canais”, em que cada um representa uma cor primária. Quando reproduzidas em um monitor, a combinação destes três canais formam uma imagem final, com vários tons de cores, chamadas de cores compostas (GONZALEZ e WOODS, 2010).

A Figura 02 mostra, separadamente, os canais da Figura 01, na respectiva sequência: canal vermelho (R), canal verde (G) e canal azul (B).

Figura 02: Canais de uma imagem RGB.



Fonte: o autor.

A quantidade de bits utilizados para representar uma imagem define a profundidade dos pixels, em uma imagem RGB. No caso das imagens de 8 bits, é possível ter-se 16.777.216 (2^8^3) cores distintas e, em cada canal, variação de profundidade de 0 a 255 (GONZALEZ e WOODS, 2010).

Com o uso de funções matemáticas conhecidas, com algoritmos predeterminados, pode-se transformar uma imagem original em uma imagem de interesse. (OSÓRIO, 2000).

2.7 Histograma de uma imagem digital

Um histograma é a representação gráfica de uma imagem, através da distribuição estatística das ocorrências de cada nível de cinza da imagem, em ordem crescente. Ele mostra a distribuição dos pixels por intensidade de cinza. É importante para o uso de técnicas de

processamento no domínio espacial, pois demonstra características de concentração de pixels de uma imagem (RENCZ e RYERSON, 1999).

2.8 Ruído

Captações indesejadas, que atuam corrompendo os sinais de interesse, associadas à instrumentação do sensor ou à digitalização da captura são chamados de ruídos. (DA SILVA, 2019). São geralmente causados por variações do brilho e por informações falsas nas imagens (SANCHES, 2015). Capturas de imagens são naturalmente propícias a ruídos (SEARA, 1998). Os mais comuns em imagens digitais são os ruídos Gaussiano e Sal e Pimenta. O Ruído Gaussiano é causado por baixa iluminação do objeto, por problemas na transmissão dos dados pelo sensor, ou por altas temperaturas de exposição. Ele tem esse nome pois é um artefato estatístico com função de densidade e de probabilidade e pode deixar imagens altamente danificadas (KLEIN ET AL, 2001). O Ruído Sal e Pimenta é causado por problemas na transmissão de dados, que ocorre quando um pixel tem seus valores corrompido nesse processo, o que causa alteração de tons de pixels vizinhos. Ele possui esse nome pois, na imagem, pode ser visualizado como pequenos pontos brancos e pretos (RIBEIRO, 2006).

2.9 Segmentação de imagens digitais

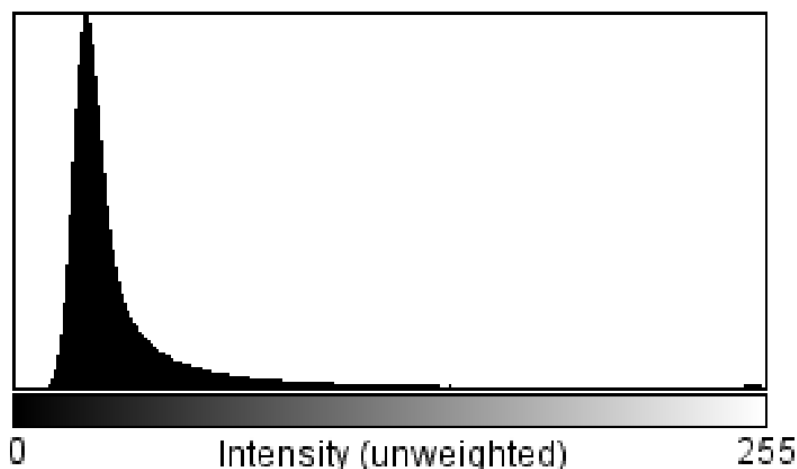
A segmentação de imagens é um processamento que consiste em dividir uma imagem em regiões, ou objetos de interesse, de outros tipos de informação (DA SILVA, 2019).

A limiarização é um tipo de segmentação que possui alta velocidade de processamento, propriedades intuitivas e implementação simples. Ela se baseia em valores de intensidades definidos (GONZALEZ e WOODS, 2010).

Para o caso de uma imagem composta por objetos claros, sobre um fundo escuro, o histograma dessa imagem seria composto por dois grandes grupos, chamados de modos. Definido um ponto T entre esses dois picos no histograma, poder-se-ia zerar pixels de valores menores que T. Esse é o princípio da Limiarização por Intensidade, caracterizada pela remoção de valores menores que um limiar definido, que, no exemplo citado, resultaria na preservação dos objetos mais claros da imagem (GONZALEZ e WOODS, 2010).

A Figura 03 apresenta o histograma de uma imagem, em que pode-se observar a concentração de pixels da imagem, em duas regiões. Estes são os modos deste histograma. O primeiro, próximo a 50, e o segundo, em 255.

Figura 03: Histograma e os modos de uma imagem.



Fonte: o autor. ImageJ, 2022.

Contudo, há grande dificuldade de se determinar um valor fixo de limiar para um conjunto de imagens. Logo, é mais vantajoso trabalhar-se com limiares variáveis, dentro de um método ou função comum (DA SILVA, 2019). Quanto mais distantes e definidos os modos, melhores as chances de eficácia de uma limiarização (GONZALEZ e WOODS, 2010).

Alguns fatores comprometem diretamente as técnicas de limiarização por intensidade, como por exemplo, o índice de ruído da imagem. Eles aumentam a largura dos modos, diminuindo a distância entre eles, reduzindo as chances da segmentação bem sucedida. Outro fator comprometedor é a uniformidade da fonte de iluminação, na aquisição da imagem. Quanto menos iluminada, ou menos uniforme sobre o objeto, mais próximas às regiões de fundo escuro e objetos claros e menores as chances da segmentação bem sucedida (GONZALEZ e WOODS, 2010).

2.10 Filtragem Espacial

Uma das técnicas de ampla utilização no processamento de imagens é a filtragem, que através de uma ou um conjunto de operação, busca reduzir, ou mesmo remover, ruídos da imagem. Ela também é capaz de extrair um conjunto específico de elementos de uma imagem, como por exemplo, as suas bordas. Pode ser utilizada no domínio espacial ou

domínio da frequência, havendo filtros equivalentes nos dois domínios (DA SILVA et al, 2019).

Uma técnica é considerada espacial quando atua no próprio plano da imagem, sem que haja transformações para outros domínios. Em geral, as técnicas em domínio espacial requerem processamentos simples e são altamente eficientes (GONZALEZ e WOODS, 2010).

Esse tipo de técnica trabalha considerando um pixel central e sua vizinhança. Em geral, essa vizinhança considerada é muito menor que a imagem original. Um quadrado 3x3 pixels seria um exemplo de uma vizinhança considerada, em que o “pixel central” é aquele localizado ao centro. O processamento ocorre no pixel central, de acordo com os valores da vizinhança e, em seguida, a janela considerada, também chamada de máscara, caminha para o pixel seguinte, até que toda a imagem seja percorrida e processada (MULLER; DARONCO, 2000).

Uma técnica espacial acompanhada de uma função matemática é chamada de “filtro espacial” e seu nome varia conforme a função matemática utilizada (GONZALEZ e WOODS, 2010).

Um pixel submetido a um filtro espacial terá, então, seu valor alterado de acordo com os valores de seus pixels vizinhos considerados e da função matemática utilizada (GONZALEZ e WOODS, 2010).

Um filtro funciona permitindo que algumas informações passem e outras fiquem retidas, ou seja, sejam atenuadas, removidas. No caso de um filtro espacial, a imagem processada apresentará um aspecto borrado, isto é, suavizado, devido a remoção de algumas informações (GONZALEZ e WOODS, 2010).

Um Filtro Espacial de Suavização atua suavizando bordas e removendo ruídos. Quanto maior a janela ou máscara utilizada, maior é o efeito de borramento (GONZALEZ e WOODS, 2010).

O Filtro de Mediana é um filtro espacial, chamado de não linear (pois não envolve uma função matemática linear) que considera a vizinhança de um pixel central e a janela definida, substituindo o valor do pixel central pelo valor da mediana dos pixels da vizinhança, incluso o valor original do pixel central. Destacam-se na remoção de ruídos impulsivos, o chamado “ruído sal e pimenta”, que consiste em pontos brancos e pretos na imagem, e, por terem baixo efeito de borramento, comparado a outros filtros de mesmo tamanho (GONZALEZ e WOODS, 2010).

Já o Filtro Espacial de Média, determina a média aritmética de uma janela de pixels, substituindo o valor do pixel central, pelo valor determinado. Ele considera janelas quadradas. Quanto maior a janela, maior o efeito de borramento. É muito utilizado para remover variações locais e ruídos, devido ao seu efeito de borramento (GONZALEZ e WOODS, 2010).

O Filtro Circular de Média também utiliza a média aritmética de uma região e substitui o valor do pixel central, por este. A diferença entre um filtro de média está na máscara. Um filtro espacial de média utiliza uma janela quadrada. Já o filtro circular de média possui uma janela circular, com raio variável, em que sua matriz quadrada tem lado definido por $2 \times \text{raio} + 1$ (MATHWORKS, 2022.)

A Figura 04 apresenta exemplos de máscaras utilizadas em filtros espaciais. À esquerda, uma máscara quadrada 3x3 sobre imagem, com os pixels da vizinhança em vermelho, e, com pixel central em laranja. À direita, em linhas vermelhas, uma máscara circular de raio 3, com pixel central em laranja.

Figura 04: Exemplos de máscaras de filtros espaciais.

155	37	76	77	60	176	64	155	37	76	77	60	176	64
68	139	113	111	156	205	99	68	139	113	111	156	205	99
218	90	245	112	84	84	112	218	90	245	112	84	84	112
161	233	196	79	193	246	83	161	233	196	79	193	246	83
161	159	72	4	76	110	13	161	159	72	4	76	110	13
167	73	159	45	73	142	218	167	73	159	45	73	142	218
123	187	170	144	185	163	145	123	187	170	144	185	163	145

Fonte: o autor.

3 METODOLOGIA

3.1 Banco de Imagens

Neste trabalho foram usadas imagens de lâminas de amostras de tecidos mamários de gatas. O banco de imagens possui 353 imagens de cortes histológicos corados pelo método histoquímico PSR. As imagens são divididas em grupos, Grau I, Grau II, Grau III e Controle, com base na definição da forma da lesão. Os agrupamentos “Graus” são compostos por

imagens de cortes histológicos de carcinomas mamários felinos, enquanto o “Controle” é formado por imagens de cortes saudáveis. Também são classificadas em relação à posição, podendo ser de Centro ou de Periferia. A Tabela 1 mostra como o banco de imagens foi organizado.

Tabela 1: Organização do banco de imagens.

Grupo	Posição	Quantidade de Imagens
Grau I	Centro	15
Grau I	Periferia	15
Grau II	Centro	65
Grau II	Periferia	66
Grau III	Centro	76
Grau III	Periferia	75
Controle	Centro	21
Controle	Periferia	20

Fonte: Jorge (2019).

3.2 Segmentação das Imagens Coloridas

Toda a metodologia foi dividida em três etapas, sendo a primeira, o desenvolvimento de cinco tipos diferentes de processamentos e a avaliação pela especialista, através de leitura cega das imagens processadas.

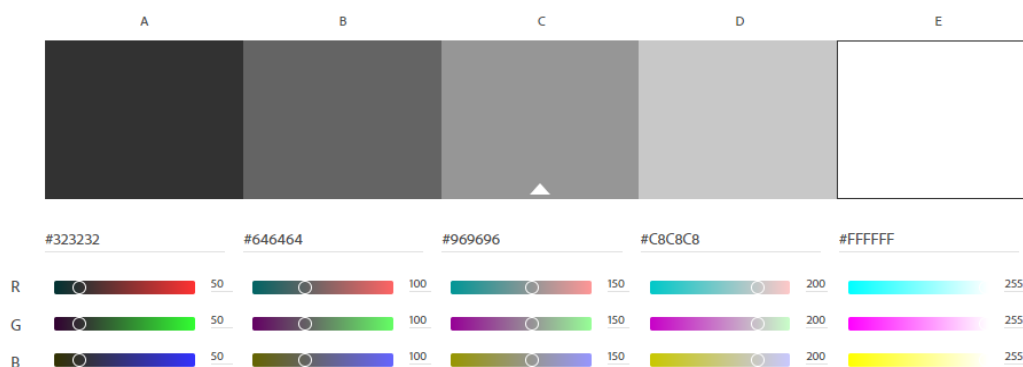
Na segunda etapa, baseado nos resultados da avaliação das imagens resultantes dos cinco processamentos, dois processamentos foram descartados e novas imagens foram processadas e inseridas no conjunto de imagens a serem avaliadas pela especialista, somente com os três melhores processamentos.

Na terceira etapa, os dois processamentos mais indicados pela especialista, na segunda etapa, foram mantidos e inseridas novas técnicas para redução de ruídos, e, as imagens foram novamente avaliadas pela especialista, com leituras cegas, a fim de validar o melhor processamento de segmentação e quantização dos tipos de fibras colágeno nas imagens.

Em uma etapa preliminar, foi definido junto à especialista a separação de tons de pixels para este trabalho. Foram consideradas as escalas de:

- Cinza: pixels com valores iguais nos 3 canais conforme mostra a Figura 05.

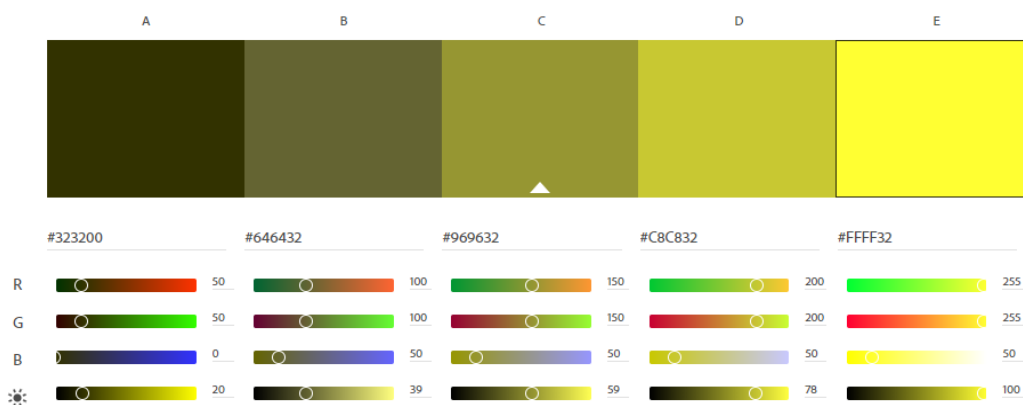
Figura 05: Exemplo de tons de cinza.



Fonte: o autor. Adobe Color, 2022.

- Amarelo: pixels com valores nos canais R e G igual, maiores que o valor do canal B ($R = G > B$), conforme mostra a Figura 06.

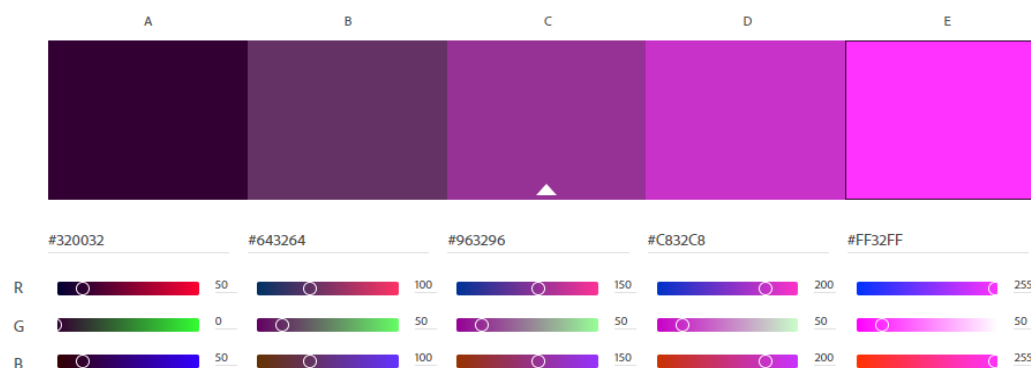
Figura 06: Exemplo de tons de amarelo.



Fonte: o autor. Adobe Color, 2022.

- Magenta: pixels com valores nos canais R e B igual, maiores que o valor do canal G ($R = B > G$), conforme mostra a Figura 07.

Figura 07: Exemplo de tons de magenta.



Fonte: o autor. Adobe Color, 2022.

- Ciano: pixels com valores nos canais G e B igual, maiores que o valor do canal R ($G = B > R$), conforme mostra a Figura 08.

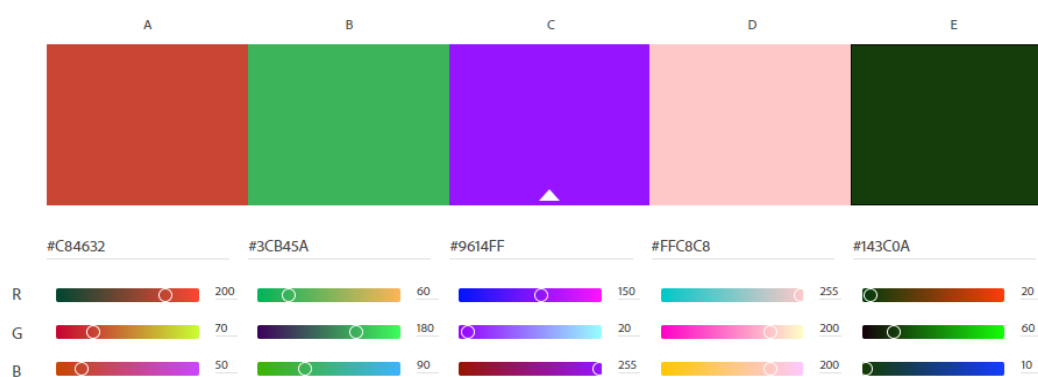
Figura 08: Exemplo de tons de ciano.



Fonte: o autor. Adobe Color, 2022.

- Demais pixels: pixels com 3 valores distintos ($R \neq G \neq B$) ou dois valores iguais nos canais e um canal com valor maior que os outros dois ($B > R = G$ ou $R > B = G$ ou $G > R = B$), conforme mostra a Figura 09.

Figura 09: Exemplo de demais pixels.



Fonte: o autor. Adobe Color.

3.2.1 Remoção de pixels

Nem todos os tons de pixel foram considerados tons de interesse, pois o objetivo deste trabalho é a segmentação das imagens, visando a contagem de pixels verdes e vermelhos.

Tons de cinza possuem valores iguais nos 3 canais, R, G e B. Valores iguais nos canais não permitem que se conclua tratar de um tom de vermelho ou verde.

Tons de amarelo possuem valores iguais nos canais R e G, com valor B menor. Valores iguais nos canais R e G não permitem que se conclua tratar de um pixel vermelho ou verde.

Já os tons de azul não estão relacionados a algum tipo de colágeno. A pigmentação das fibras por birrefringência, mediante a emissão de luz polarizada, apenas permite cores entre combinações de verde e vermelho. Pixels azuis em uma imagem estão relacionados a artefatos de fundo na lâmina, ou mesmo pela espessura grosseira das próprias fibras que compõem o estroma. Desta maneira, chegou-se a um consenso, junto a especialista, que pixels em tons de cinza, amarelo e azul poderiam ser removidos das imagens, pois são inconclusivos diante da consideração de regiões verdes e vermelhas. A imagem de interesse está relacionada a pixels de valores distintos e também a pixels em tons de magenta e ciano.

Assim, o primeiro processamento consistiu na remoção de pixels cinzas, amarelos e azuis. Todos os pixels de valores absolutos dentro das especificações de cada uma das escalas receberam valor zero nos 3 canais, sendo transformados em pixels pretos.

Após este processamento, tem-se imagens sem pixels em escala de cinza, amarelo e azul.

3.2.2 Limiarização por Intensidade

O objetivo deste método é remover pixels de baixos valores absolutos, relacionados ao fundo da imagem, que não fazem parte da região de interesse. Foram testados 5 tipos de limiarização:

- **limiar de média geral:** Um único limiar, utilizado nos 3 canais, determinado pela média geral dos valores dos pixels de uma imagem.

- **limiar de média mais desvio padrão, geral:** Um único limiar, utilizado nos 3 canais, determinado pela média geral dos valores dos pixels de uma imagem, somado ao desvio padrão.

- **limiar de média por canal:** Três limiares (limiar R, limiar G e limiar B), cada um comparado ao seu respectivo canal, na imagem, determinado pela média dos valores dos pixels de cada canal.

- **limiar de média mais desvio padrão, por canal:** Três limiares (limiar R, limiar G e limiar B), cada um comparado ao seu respectivo canal, na imagem, determinado pela média dos valores, somada ao desvio padrão dos pixels de cada canal.

- **maior limiar dentre os limiares de média geral mais desvio padrão, por canal:** O maior limiar, dentre os 3 determinados através da soma da média com o desvio padrão, de cada canal.

Definidos os limiares, prosseguiu-se para a remoção de valores. Pixels cujos valores eram menores que o valor do limiar, ou dos limiares, foram minimizados.

Para o caso de um limiar geral, para os 3 canais da imagem:

$$R < \text{Limiar ?}$$

$$R = 0$$

Ou, para o caso de um limiar por cada canal, da imagem:

$$R < \text{Limiar R ?}$$

$$R = 0$$

Ao fim deste processamento, os pixels relacionados ao fundo estão zerados, permanecendo apenas os pixels de interesse.

3.3 Quantificação de fibras por cor

3.3.1 Classificação de pixels

Neste método, comparou-se os valores absolutos de cada canal de um pixel. Os pixels de interesse foram divididos em dois grandes grupos: “verdes” e “vermelhos”.

Um pixel foi considerado “verde” em duas situações:

- quando se tratava de um tom de verde, ou seja, o valor do canal G era maior que os valores dos outros canais, R e B.
- quando se tratava de tom de ciano.

Um pixel foi considerado “vermelho” em duas situações:

- quando se tratava de um tom de vermelho, ou seja, o valor do canal R era maior que os valores dos demais canais, G e B.
- quando se tratava de um tom de magenta.

Quando um pixel foi considerado verde, o valor do canal G foi maximizado (recebeu valor máximo igual a 255, para a imagem de 8 bits), enquanto o valor dos outros canais, canal R e canal B, foram minimizados (recebem valor 0).

Se Pixel pertence ao grupo “verde”

Então $R = 0; G = 255; B = 0;$

O mesmo foi feito com pixels do grupo “vermelho”.

Se Pixel pertence ao grupo “vermelho”

Então $R = 255; G = 0; B = 0;$

Essa definição permite que se tenha tons máximos de verdes e vermelhos na imagem final. Ao fim deste processamento, tem-se imagens apenas com pixels verdes e vermelhos, além de pixels pretos (valores zerados).

3.3.2 Contagem de pixels de interesse

Tendo uma imagem composta apenas por pixels de interesse (verdes e vermelhos) e pixels pretos, é possível determinar a proporção entre verde e vermelho numa imagem.

Contou-se pixel a pixel, verdes e vermelhos, das imagens, desprezando-se pixels pretos. Através da quantidade total de pixels vermelhos e verdes, foi possível determinar a quantidade de pixels de interesse de cada imagem.

$$\textit{Verdes} + \textit{Vermelhos} = \textit{Pixels de Interesse}$$

Depois, determinou-se a proporção de cada cor, para cada imagem.

$$\% \textit{Verde} = \frac{\textit{Verdes}}{\textit{Pixels de Interesse}} \times 100$$

$$\% \textit{Vermelho} = \frac{\textit{Vermelhos}}{\textit{Pixels de Interesse}} \times 100$$

Todos os processamentos foram desenvolvidos em MatLab 2016a - MathWorks Inc.

3.4 Avaliação da técnica de segmentação pela especialista

A fim de definir-se as melhores técnicas aplicadas no método de segmentação de imagens, 3 avaliações foram realizadas com a especialista, através de testes cegos, em que os resultados de uma avaliação impactaram diretamente nas premissas da próxima.

3.4.1 Primeira avaliação

A primeira avaliação foi composta por imagens que passaram pela remoção de pixels e, em seguida, por 5 processamentos distintos, formados pela combinação das técnicas de limiarização citadas, e ao fim, pela classificação e contagem de pixels.

Os 5 processamentos se diferenciam apenas pelo tipo e valor de limiar utilizado na limiarização.

Processamento 01 (P1)

Neste processamento, realizou-se a limiarização através de limiar determinado pela média geral dos pixels da imagem colorida.

Processamento 2 (P2)

Neste processamento, realizou-se a limiarização através de limiar determinado pela média geral dos pixels da imagem colorida, somada ao desvio padrão geral dela.

Processamento 3 (P3)

Neste processamento, realizou-se a limiarização através de limiares individuais, por canal, determinado pela média dos pixels de cada canal da imagem colorida.

Processamento 4 (P4)

Neste processamento, realizou-se a limiarização através de limiares individuais, por canal, determinado pela média dos pixels de cada canal da imagem colorida, somado ao desvio padrão de cada canal.

Processamento 5 (P5)

Neste processamento, realizou-se a limiarização através do limiar de maior valor, dentre os 3 limiares de cada canal, que foi determinado pela média dos pixels de cada canal da imagem colorida.

Na avaliação da primeira etapa, 20 imagens foram escolhidas, aleatoriamente, do banco de imagens. Buscou-se equilibrar a quantidade de imagens de cada grupo, por grau e por posição. Cada uma das 20 imagens foi submetida aos 5 processamentos citados e as 100

imagens resultantes compuseram o conjunto de imagens para a avaliação. A Tabela 2 apresenta o conjunto da Primeira Avaliação.

Tabela 2: Imagens escolhidas, aleatoriamente, para a Primeira Avaliação, e suas características.

Imagem Original	Grupo	Posição	Número na Avaliação
1929-14 3C	Grau I	Centro	1
1929-14 5P	Grau I	Periferia	2
48-09 4C	Grau I	Centro	3
48-09 5P	Grau I	Periferia	4
144-04 3C	Grau II	Centro	5
150-09 3C	Grau II	Centro	6
198-12 3C	Grau II	Centro	7
509-13 4C	Grau II	Centro	8
10770-14 4P	Grau II	Periferia	9
12686-14 3P	Grau II	Periferia	10
150-09 1P	Grau II	Periferia	11
198-12 2P	Grau II	Periferia	12
11032-14 2C	Grau III	Centro	13
12635-14 m2 2C	Grau III	Centro	14
13095-14 4C	Grau III	Centro	15
8355-14 5C	Grau III	Centro	16
N1 3P PERIF 3	Controle	Periferia	17
N2 2P 20x perf 2	Controle	Periferia	18
N3 1P PERIF 2	Controle	Periferia	19
N4 1P PERIF 2	Controle	Periferia	20

Fonte: JORGE, 2019.

A avaliação foi composta por 20 pastas, nomeadas de 1 a 20. Cada uma possuía uma imagem “original” e 5 processamentos, nomeados de A a E. Nenhuma imagem original foi enviada com seu nome verdadeiro para a avaliação. Todas receberam o pseudônimo “original”.

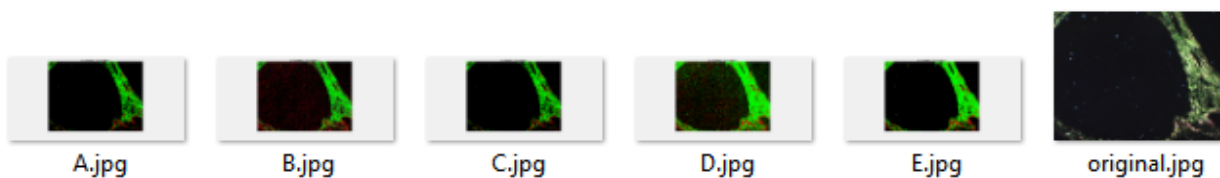
Os processamentos foram embaralhados, dentro da avaliação de cada imagem, para evitar-se tendências na decisão de um único processamento, pela especialista. A Tabela 3 mostra a tabela verdade dos processamentos renomeados para apresentação a especialistas. A Figuras 10 mostra como a pasta era apresentada à especialista.

Tabela 3: Tabela Verdade do embaralhamento dos processamentos, na Primeira Avaliação.

Original	P1	P2	P3	P4	P5
1	A	B	C	D	E
2	D	E	A	B	C
3	E	A	B	C	D
4	E	D	C	B	A
5	C	B	D	E	A
6	B	C	E	A	D
7	A	E	D	C	B
8	D	C	E	A	B
9	B	A	D	E	C
10	E	C	B	D	A
11	D	C	E	A	B
12	B	E	D	C	A
13	A	C	B	E	D
14	D	B	E	A	C
15	E	A	C	B	D
16	B	D	A	E	C
17	B	A	D	C	E
18	A	C	E	B	D
19	C	B	A	D	E
20	C	A	B	D	E

Fonte: o autor.

Figura 10: Exemplo de montagem da pasta na avaliação (Pasta 11).

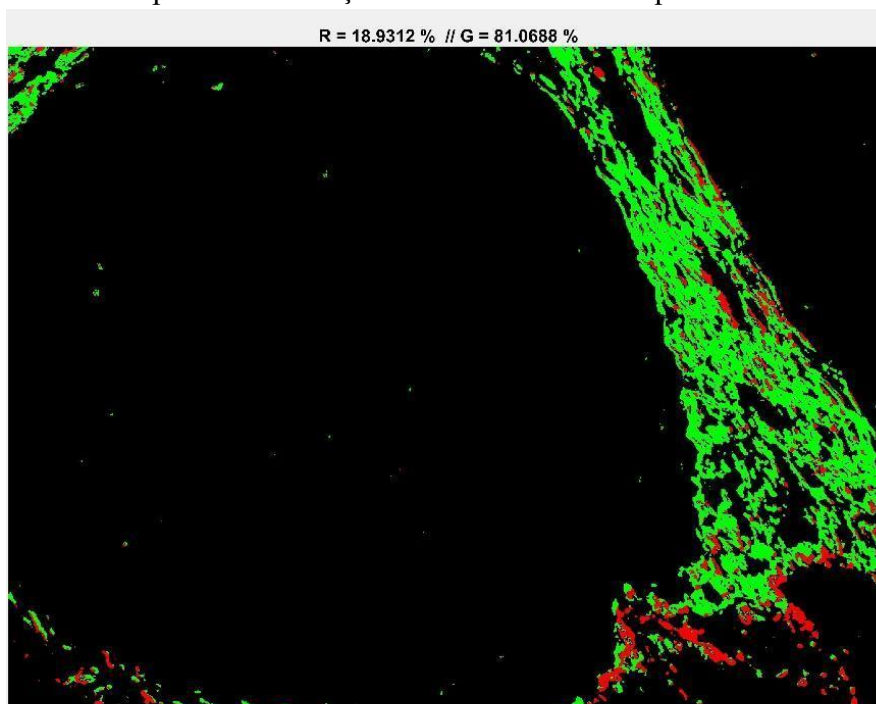


Fonte: o autor.

A avaliação da primeira etapa consistiu em determinar o processamento que representou melhor a análise visual da especialista, da segregação entre verde e vermelho, com base na imagem processada, e nos valores da proporção de pixels.

A Figura 11 mostra um exemplo das informações de cada imagem enviada à especialista. Cada arquivo contava com o processamento e a proporção entre verde e vermelho determinada.

Figura 11: Exemplo de informações enviadas em um arquivo.



Fonte: o autor.

3.4.2 Segunda avaliação

A segunda avaliação se inicia a partir dos resultados da primeira. Os três processamentos mais escolhidos na primeira avaliação foram utilizados nesta, sem nenhuma alteração no código ou lógica das técnicas, ou na sequência de execução de cada técnica, característica de cada processamento, citado na etapa anterior.

Aqui, foi feita uma combinação entre imagens da avaliação antiga e novas imagens, escolhidas aleatoriamente no banco. 8 imagens da primeira etapa, somadas a 12 novas, definiram 20 imagens para a segunda avaliação. Os detalhamentos das imagens utilizadas podem ser vistos nas Tabelas 4, 5 e 6. Na Tabela 4 tem-se a lista de imagens da Primeira Avaliação, que foram utilizadas novamente na Segunda Avaliação. Na Tabela 5 tem-se as imagens novas, escolhidas do banco, aleatoriamente. Na Tabela 6 tem-se o conjunto total de imagens que compuseram a Segunda Avaliação e suas características.

Tabela 4: Imagens da avaliação da Primeira Etapa reenviadas para a avaliação da Segunda Etapa.

Número na 1ª Avaliação	Imagem Original	Grau	Posição	Número na 2ª Avaliação
2	1929-14 5P	Grau I	Periferia	1
6	150-09 3C	Grau II	Centro	12
9	10770-14 4P	Grau II	Periferia	17
13	11032-14 2C	Grau III	Centro	19
14	12635-14 m2 2C	Grau III	Centro	5
15	13095-14 4C	Grau III	Centro	2
17	N1 3P PERIF 3	Controle	Periferia	13
18	N2 2P 20x perf 2	Controle	Periferia	20

Fonte: o autor.

Tabela 5: Novas imagens selecionadas, ao acaso, para a avaliação da Segunda Etapa.

Original	Grupo	Posição	Na Avaliação
13347-14 1C	Grau I	Periferia	3
13347-14 2C	Grau I	Periferia	6
509-13 1P perf 2	Grau II	Periferia	4
13347-14 4C	Grau I	Periferia	7
44-03 1C	Grau II	Centro	8
12178-14 2C	Grau II	Centro	9
12686-14 2C	Grau II	Centro	10
12178-14 4P	Grau II	Periferia	11
12686-14 1P	Grau II	Periferia	14
190-12 4C	Grau III	Centro	15
5845-14 1C	Grau III	Centro	16
13095-14 2C	Grau III	Centro	18

Fonte: o autor.

Tabela 6: Lista de imagens que definiram a avaliação da Segunda Etapa.

Na Avaliação	Grupo	Posição	Original
1	Grau I	Periferia	1929-14 5P
2	Grau III	Centro	13095-14 4C
3	Grau I	Periferia	13347-14 1C
4	Grau II	Periferia	509-13 1P perf 2
5	Grau III	Centro	12635-14 m2 2C
6	Grau I	Periferia	13347-14 2C
7	Grau I	Periferia	13347-14 4C
8	Grau II	Centro	44-03 1C
9	Grau II	Centro	12178-14 2C
10	Grau II	Centro	12686-14 2C
11	Grau II	Periferia	12178-14 4P
12	Grau II	Centro	150-09 3C

13	Controle	Periferia	N1 3P PERIF 3
14	Grau II	Periferia	12686-14 1P
15	Grau III	Centro	190-12 4C
16	Grau III	Centro	5845-14 1C
17	Grau II	Periferia	10770-14 4P
18	Grau III	Centro	13095-14 2C
19	Grau III	Centro	11032-14 2C
20	Controle	Periferia	N2 2P 20x perf 2

Fonte: o autor.

Nesta etapa, 20 pastas foram enviadas, cada uma com uma imagem “original” e outros 3 processamentos, nomeados de A a C. Novamente, todos os arquivos receberam nomes fictícios para evitar-se o reconhecimento de alguma característica.

O objetivo foi definir quais processamentos, entre os 3 mais votados na Primeira Etapa, melhor representam a segregação entre regiões verdes e vermelhas. A avaliação foi baseada na avaliação visual das imagens, e no valor da proporção entre vermelho e verde.

3.4.3 Terceira avaliação

Na terceira avaliação, os dois processamentos mais escolhidos, na segunda avaliação, foram submetidos a mais uma técnica de processamento de imagens digitais, a filtragem espacial, e, uma nova avaliação foi feita pela especialista, para validar o melhor resultado.

Adicionou-se aos processamentos mais escolhidos, na avaliação da segunda etapa, dois diferentes filtros espaciais de suavização:

- filtro espacial de mediana 3x3;
- filtro espacial circular de média (disk) de raio 3.

Cada filtro foi aplicado em uma etapa diferente do processamento.

Os dois processamentos mais votados, na avaliação da etapa anterior compuseram 4 novos processamentos nesta etapa. Foram compostos por:

Processamento com Filtro 1 (F1)

- a. Primeiro processamento escolhido + Filtro de Mediana.

Processamento com Filtro 2 (F2)

- b. Segundo processamento escolhido + Filtro de Mediana.

Processamento com Filtro 3 (F3)

c. Filtro Circular de Média + Primeiro processamento escolhido.

Processamento com Filtro (F4)

d. Filtro Circular de Média + Segundo processamento escolhido.

Nesta avaliação, escolheu-se ao acaso 20 imagens do banco de imagens, podendo repetir imagens das avaliações anteriores. As 20 imagens passaram pelos 4 processamentos novos e foram enviadas, nos mesmos critérios anteriores, à especialista. A Tabela 7 mostra as imagens escolhidas para a Terceira Avaliação e suas respectivas características.

Tabela 7: Imagens escolhidas, ao acaso, com os respectivos grupos, posição e número na avaliação.

Imagem Original	Grupo	Posição	Na Avaliação
48-09 3 C	Grau I	Centro	1
48-09 4 C	Grau I	Centro	2
1929-14 4C	Grau I	Centro	3
48-09 1P	Grau I	Periferia	4
48-09 5P	Grau I	Periferia	5
44-03 C3	Grau II	Centro	6
10770-14 3C	Grau II	Centro	7
12686-14 5C	Grau II	Centro	8
1407-14 1P perif 1	Grau II	Periferia	9
13452-14 4P	Grau II	Periferia	10
190-12 1C	Grau III	Centro	11
190-12 5C	Grau III	Centro	12
3756-13 2C	Grau III	Centro	13
4840-14 5P	Grau III	Periferia	14
11032-14 2P perif 2	Grau III	Periferia	15
N1 5C CENTRAL	Controle	Centro	16
N3 5C CENTRAL	Controle	Centro	17
N4 3C CENTRAL 2	Controle	Centro	18
N2 2P 20x perf 2	Controle	Periferia	19
N2 4P perif 3	Controle	Periferia	20

Fonte: o autor.

Uma pasta dentro desta avaliação continha 4 processamentos e a imagem original. A especialista definiu o processamento que melhor identificou regiões verdes e vermelhas, dentre os 4, comparado a imagem original. Para essa decisão, ela contou com as imagens e os valores percentuais de verde e vermelho. Mais uma vez, todos os nomes originais foram trocados.

O diferencial desta avaliação, em relação às outras duas anteriores, é que nesta, além da escolha de um processamento, a especialista pode optar por não escolher um processamento, ou mesmo considerar o descarte da imagem.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

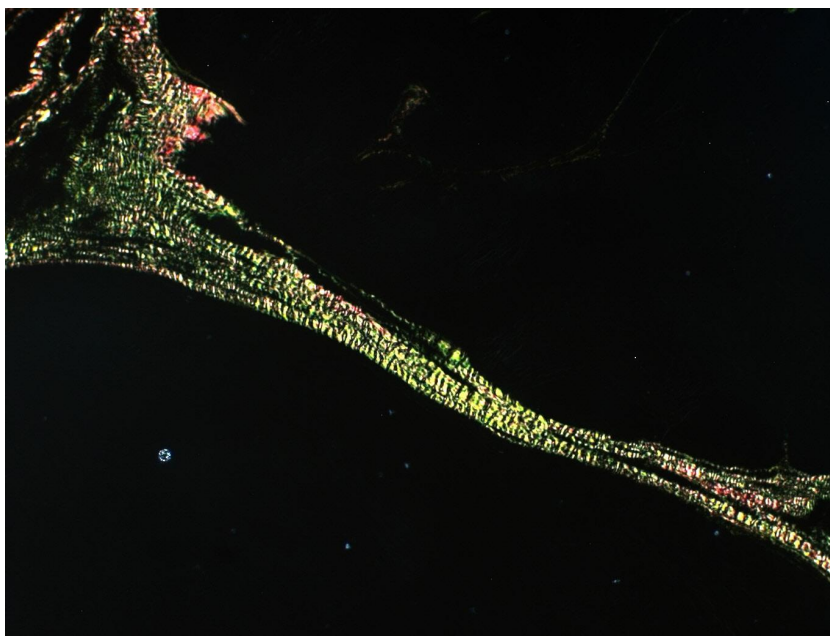
4.1 Imagens finais dos processamentos da Primeira Avaliação

Obteve-se 100 imagens processadas para esta avaliação. A seguir, exemplos de alguns dos resultados.

4.1.1 Imagem 2

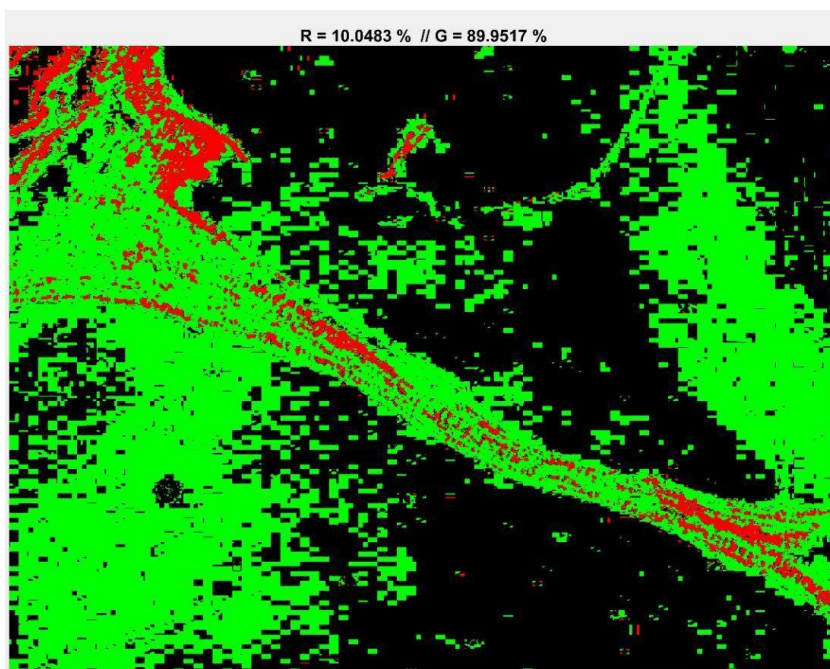
As figuras a seguir mostram a Imagem 2 da Primeira Avaliação e os processamentos feitos, a partir dela, para esta avaliação. A Figura 12 mostra a imagem original. As Figuras 13, 14, 15, 16 e 17 mostram, respectivamente, os processamentos P1, P2, P3, P4 e P5 da Imagem 2.

Figura 12: Imagem 2: original.



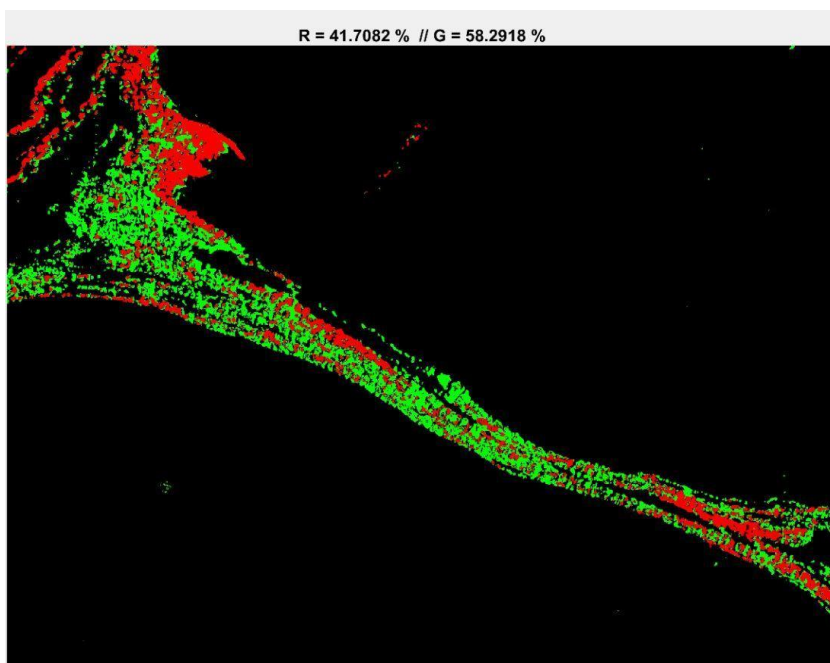
Fonte: JORGE, 2019.

Figura 13: Imagem 2: Processamento P1 (D).



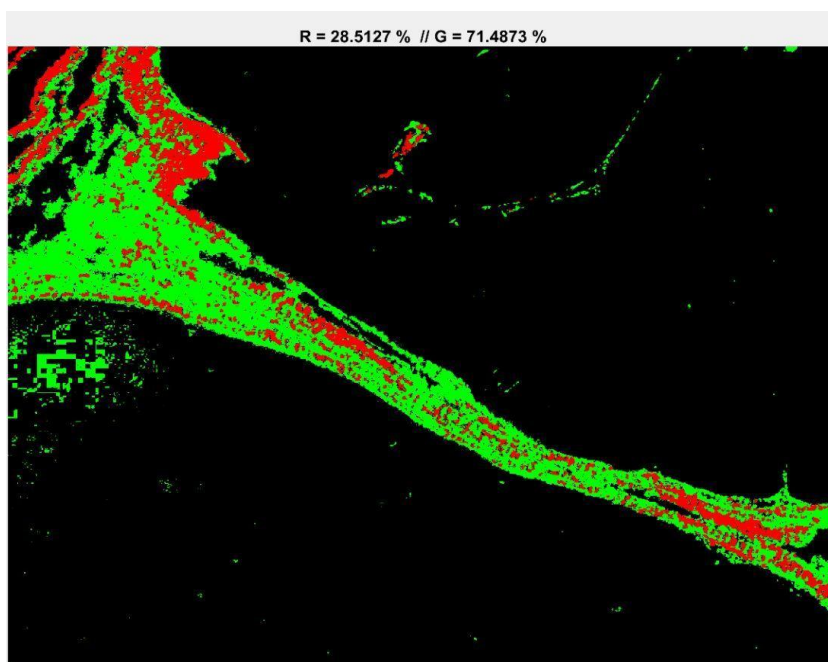
Fonte: o autor.

Figura 14: Imagem 2: Processamento P2 (E).



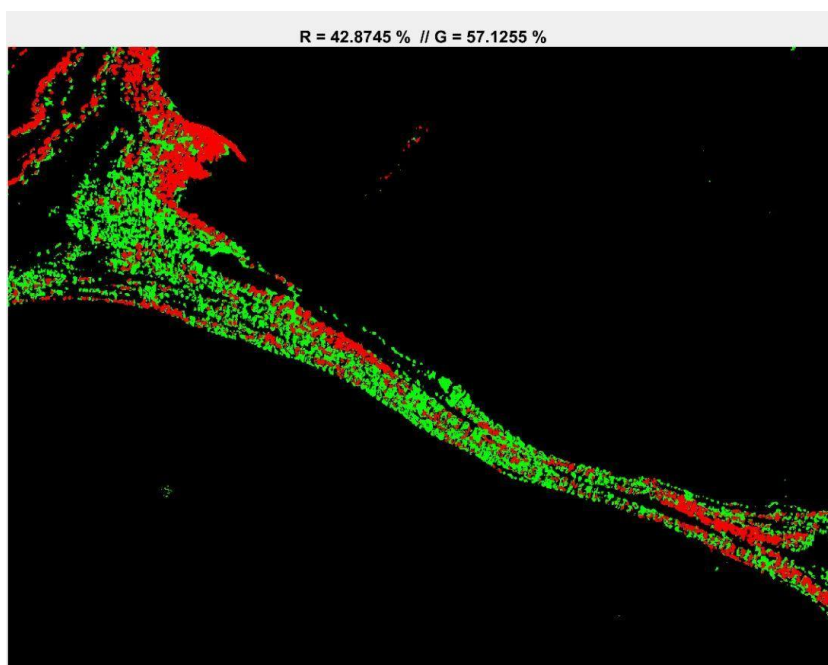
Fonte: o autor.

Figura 15: Imagem 2: Processamento P3 (A).



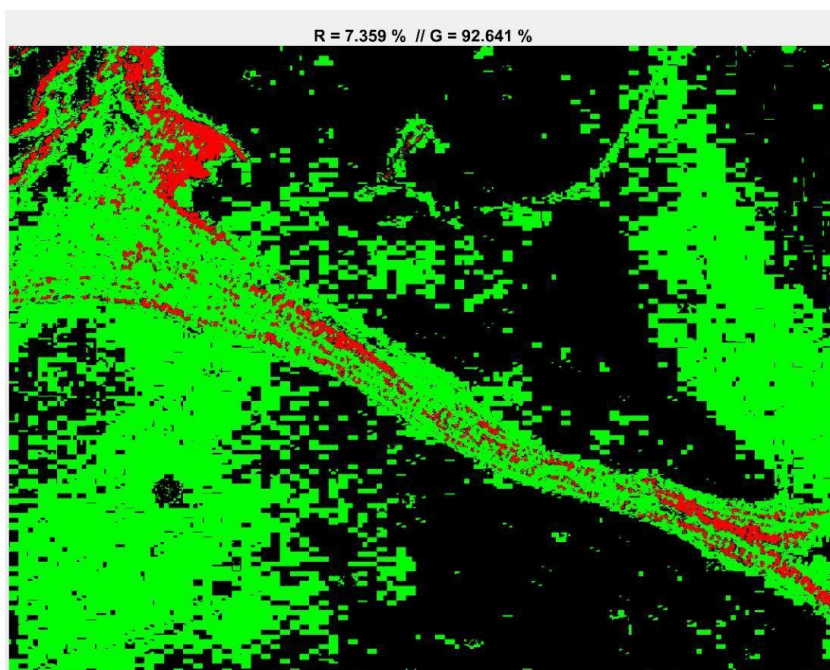
Fonte: o autor.

Figura 16: Imagem 2: Processamento P4 (B).



Fonte: o autor.

Figura 17: Imagem 2: Processamento P5 (C).

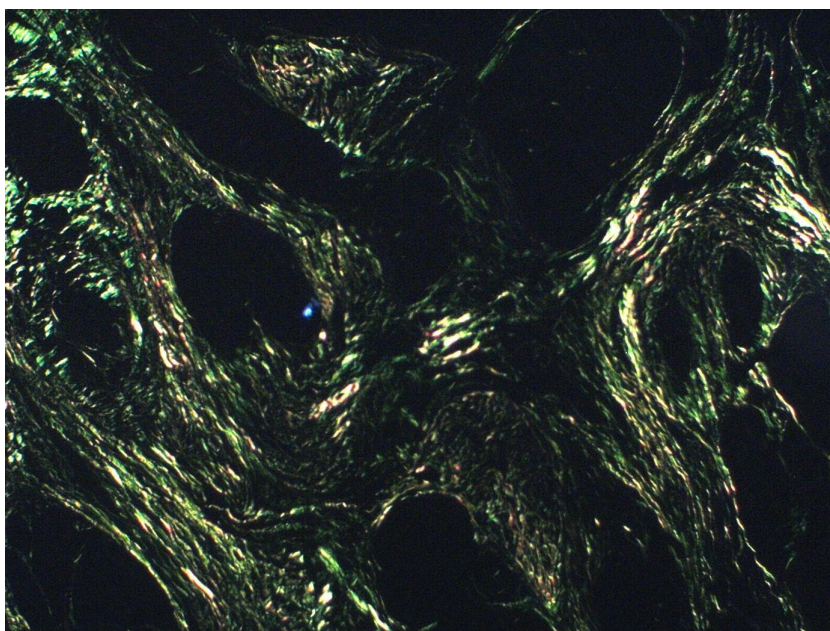


Fonte: o autor.

4.1.2 Imagem 16

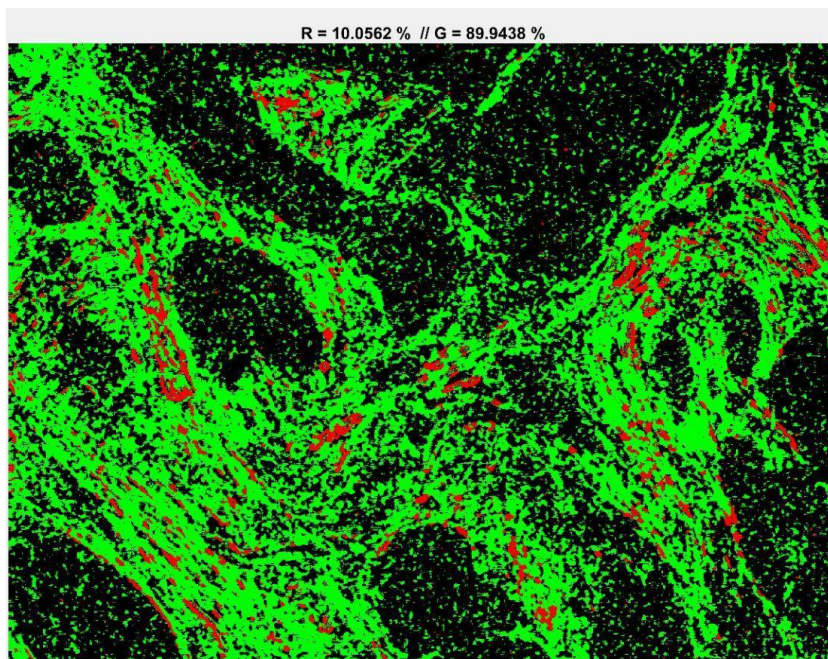
As Figuras a seguir mostram a Imagem 16 da Primeira Avaliação e os processamentos feitos, a partir dela, para esta avaliação. A Figura 18 mostra a imagem original. As Figuras 19, 20, 21, 22 e 23 mostram, respectivamente, os processamentos P1, P2, P3, P4 e P5 da Imagem 16.

Figura 18: Imagem 16: original.



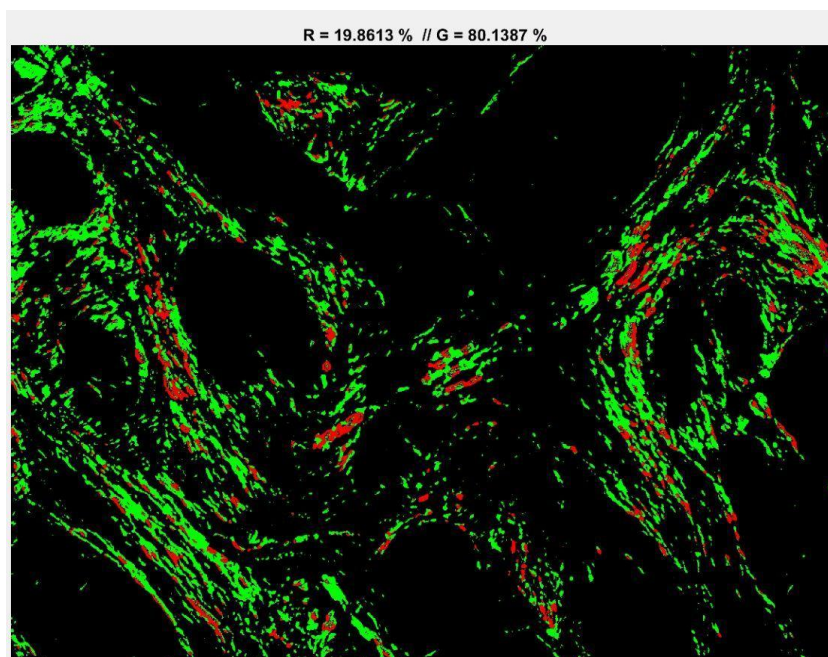
Fonte: o autor.

Figura 19: Imagem 16: Processamento P1 (B).



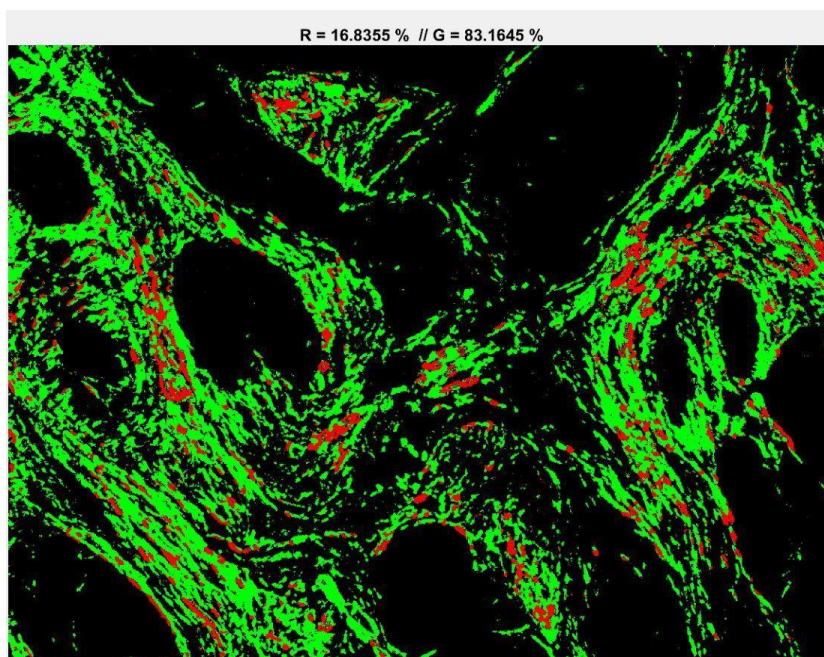
Fonte: o autor.

Figura 20: Imagem 16: Processamento P2 (D).



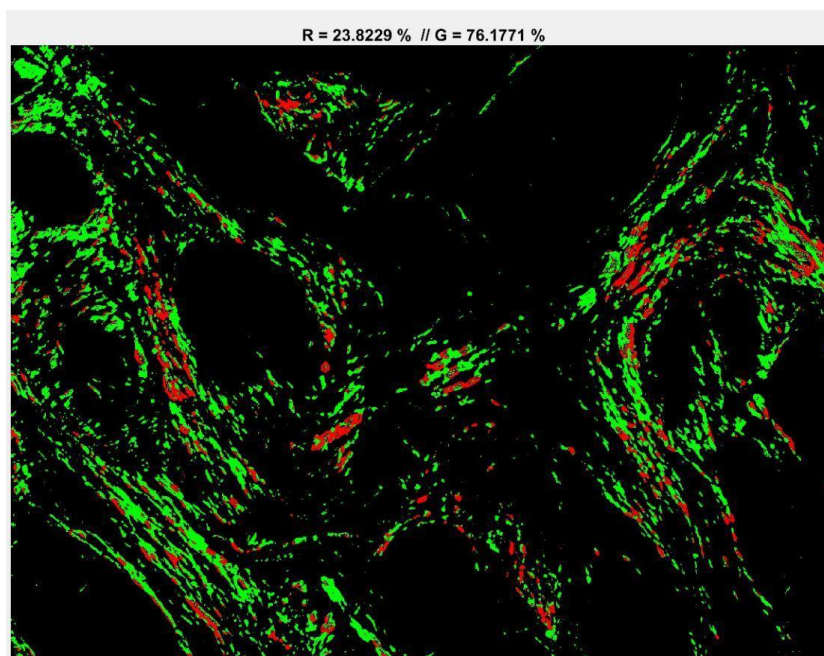
Fonte: o autor.

Figura 21: Imagem 16: Processamento P3 (A).



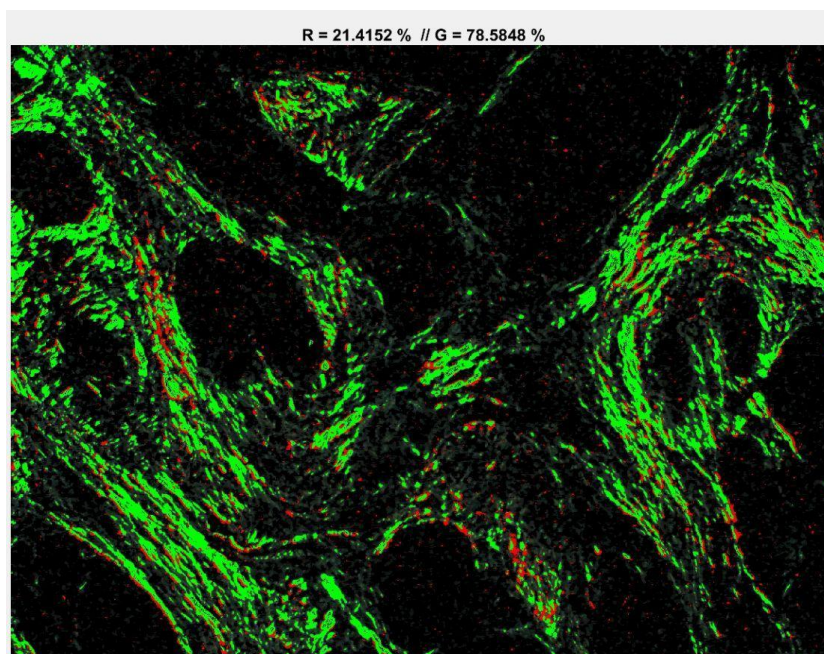
Fonte: o autor.

Figura 22: Imagem 16: Processamento P4 (E).



Fonte: o autor.

Figura 23: Imagem 16: Processamento P5 (C).



Fonte: o autor.

4.2 Primeira avaliação

Nesta avaliação, obteve-se 14 votos no processamento P4, 3 votos no P2 e 2 votos do P5.

Esses 3 processamentos (P2, P4 e P5) seguiram para a Segunda Etapa, enquanto os demais (P1 e P3) foram descartados. A Tabela 08 mostra, em resumo, os votos da especialista, por processamento. Já a Tabela 09 mostra o detalhamento dos votos.

Tabela 8: Resumo das escolhas da especialista em cada processamento, na avaliação da Primeira Etapa.

Processamento	Número de vezes escolhido
P1	0
P2	3
P3	1
P4	14
P5	2
Total	20

Fonte: o autor.

Tabela 9: Tabela verdade com as escolhas da especialista.

Original	P1	P2	P3	P4	P5
1	A	B	C	D	E
2	D	E	A	B	C
3	E	A	B	C	D
4	E	D	C	B	A
5	C	B	D	E	A
6	B	C	E	A	D
7	A	E	D	C	B
8	D	C	E	A	B
9	B	A	D	E	C
10	E	C	B	D	A
11	D	C	E	A	B
12	B	E	D	C	A
13	A	C	B	E	D
14	D	B	E	A	C
15	E	A	C	B	D
16	B	D	A	E	C
17	B	A	D	C	E
18	A	C	E	B	D
19	C	B	A	D	E
20	C	A	B	D	E

Fonte: o autor.

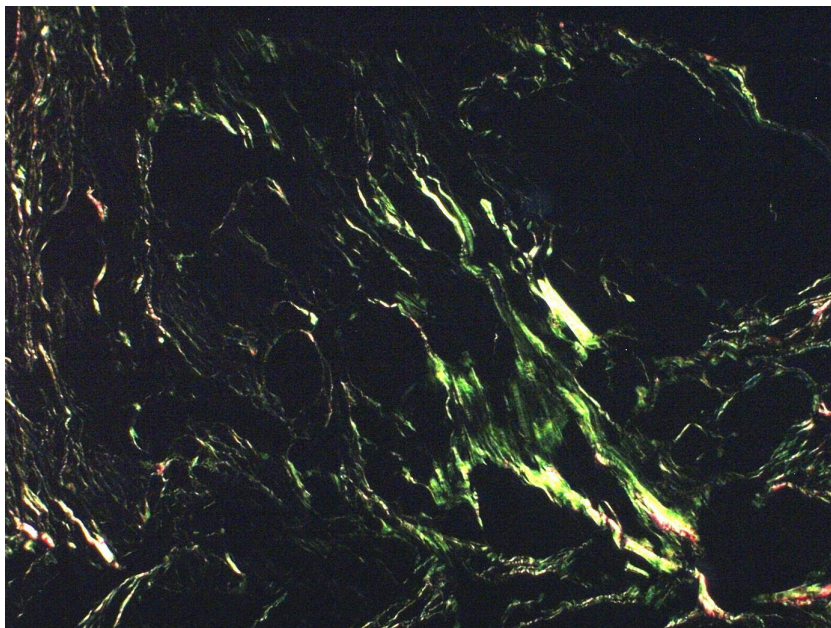
4.3. Imagens finais dos processamentos da Segunda Avaliação

Obteve-se 60 imagens processadas para esta avaliação. A seguir, exemplos de alguns dos resultados.

4.3.1 Imagem 4

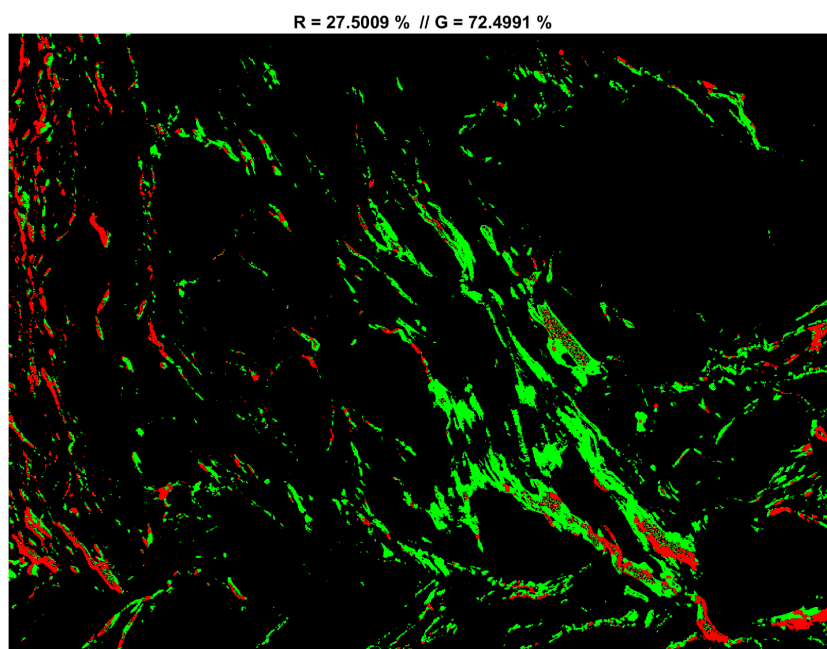
As figuras a seguir mostram a Imagem 4 da Segunda Avaliação e os processamentos feitos, a partir dela, para esta avaliação. A Figura 24 mostra a imagem original. As Figuras 25, 26 e 27 mostram, respectivamente, os processamentos P1, P2, P3, da Imagem 4.

Figura 24: Imagem 4 da Segunda Avaliação: original.



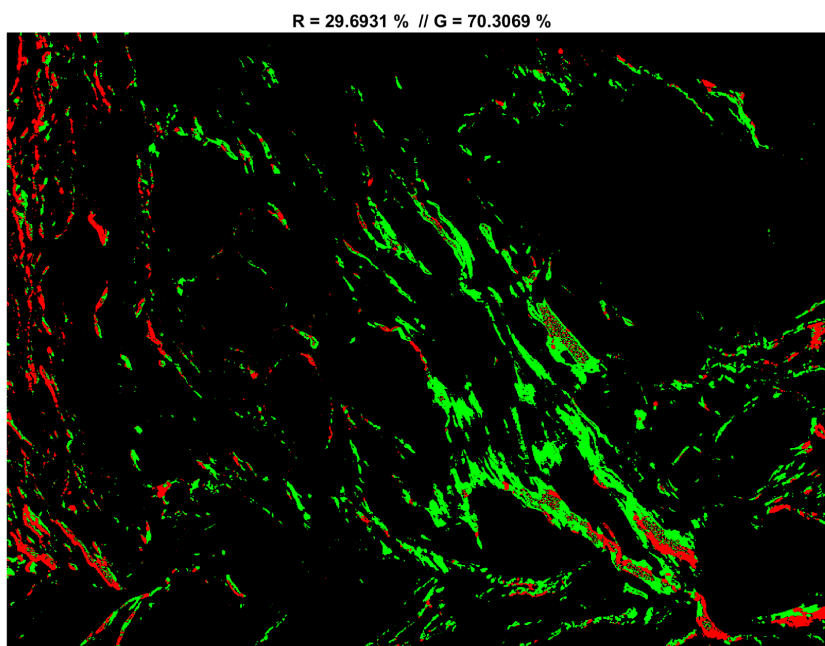
Fonte: o autor.

Figura 25: Processamento P1 da Imagem 4.



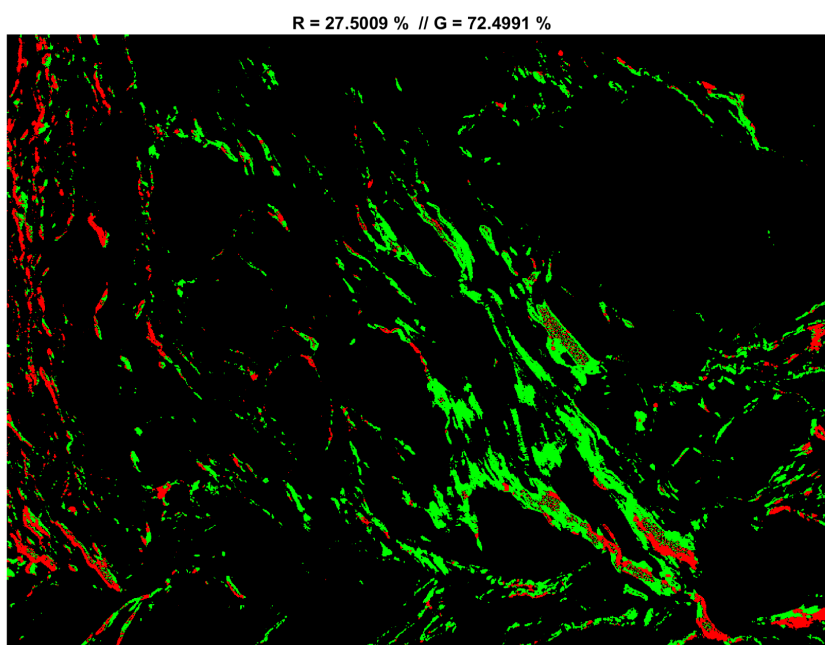
Fonte: o autor.

Figura 26: Processamento P2 da Imagem 4.



Fonte: o autor.

Figura 27: Processamento P3 da Imagem 4.

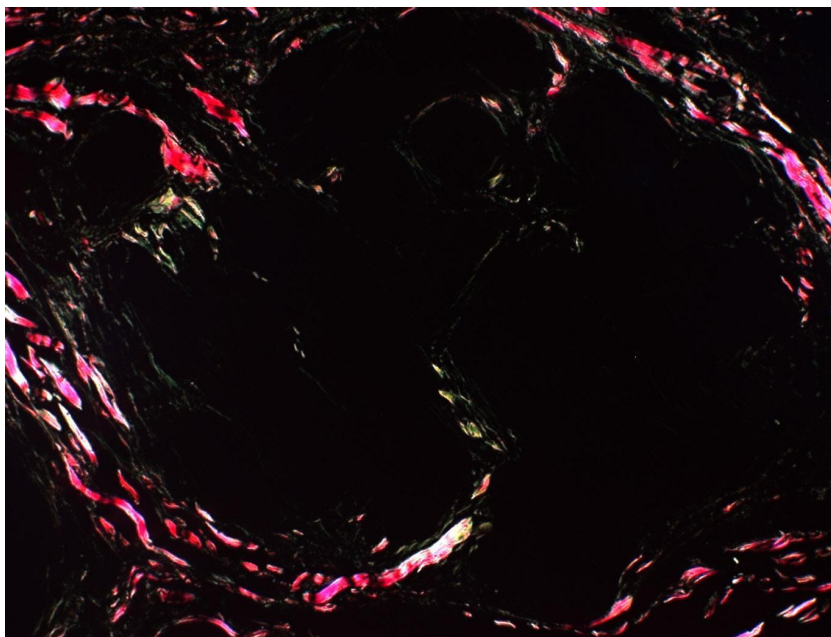


Fonte: o autor.

4.3.2 Imagem 11

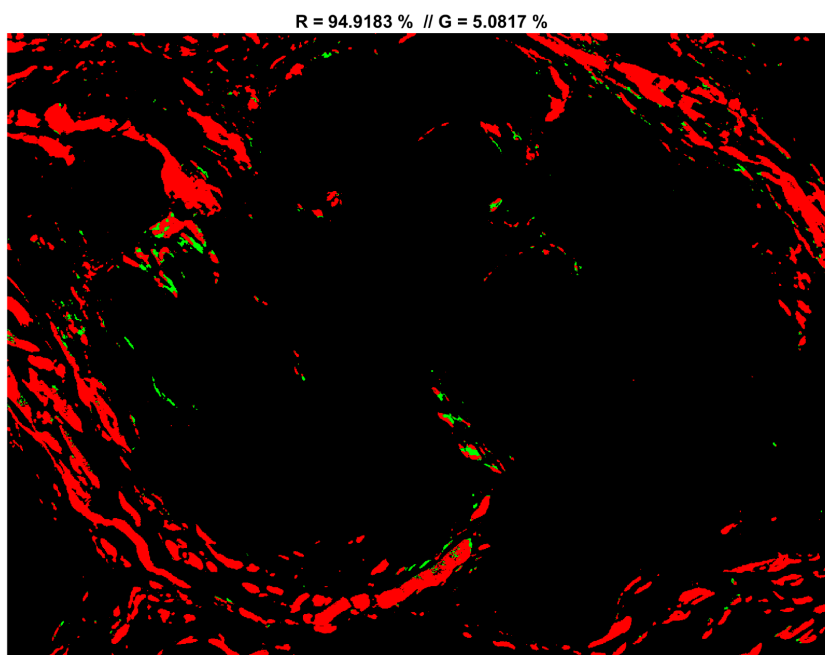
As figuras a seguir mostram a Imagem 11 da Segunda Avaliação e os processamentos feitos, a partir dela, para esta avaliação. A Figura 28 mostra a imagem original. As figuras 29, 30 e 31 mostram, respectivamente, os processamentos P1, P2, P3, da Imagem 11.

Figura 28: Imagem 11 da Segunda Avaliação: original.



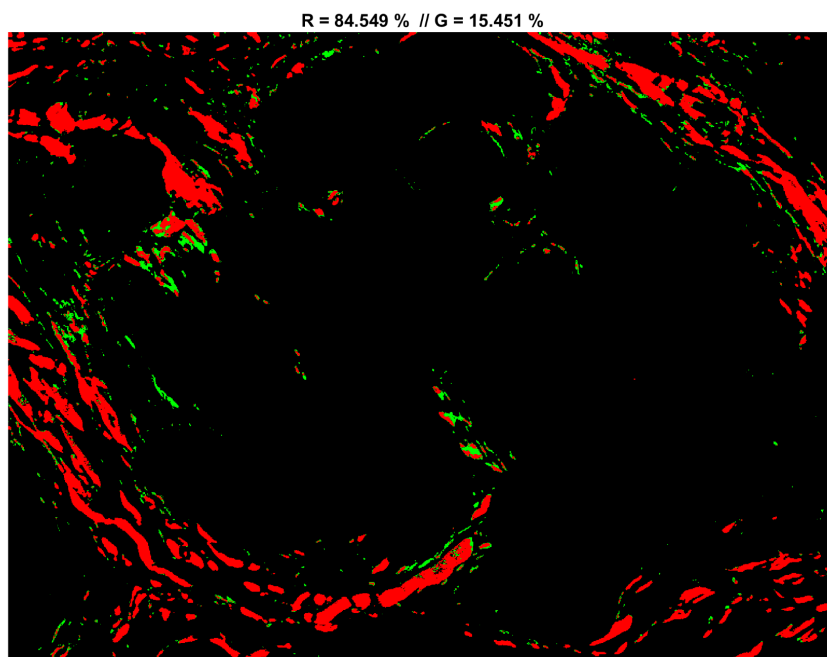
Fonte: JORGE, 2019.

Figura 29: Processamento P1 da Imagem 11.



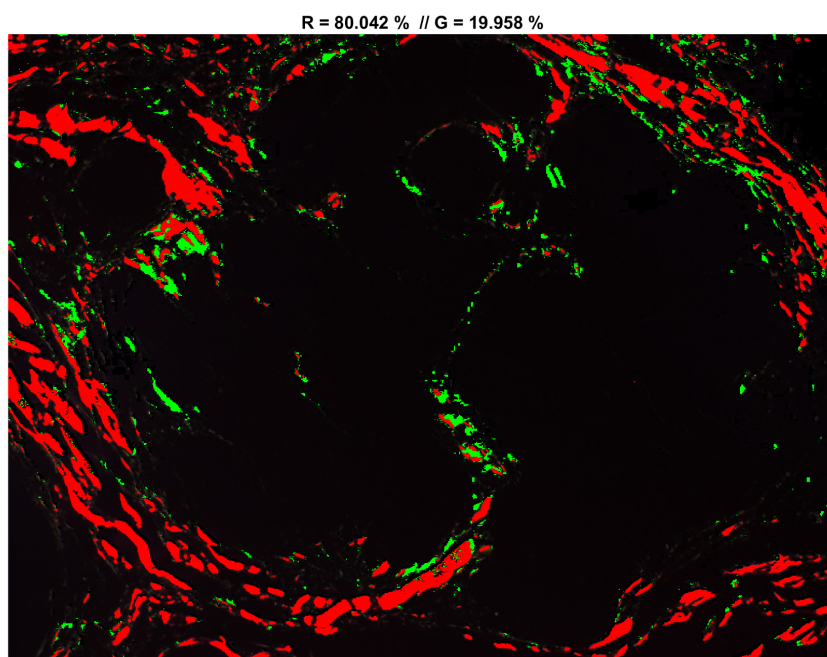
Fonte: o autor.

Figura 30: Processamento P2 da Imagem 11.



Fonte: o autor.

Figura 31: Processamento P3 da Imagem 11.



Fonte: o autor.

4.4 Segunda Avaliação

Nesta avaliação, o processamento P4 foi o mais escolhido e recebeu 14 votos. O processamento P2 foi o segundo mais escolhido, com 5 votos e o P5 o menos escolhido, 1 voto. Assim, o processamento P5 foi descartado, enquanto o P4 e P2 seguiram para a próxima etapa. A Tabela 10 mostra o resumo das escolhas da especialista, por processamento. Já a Tabela 11 mostra o detalhamento dessas escolhas. Em verde, o processamento escolhido.

Tabela 10: Resumo das escolhas da especialista, por processamento, na avaliação da Segunda Etapa.

Processamento	Número de vezes escolhido
P2	5
P4	14
P5	1
Total	20

Fonte: o autor.

Tabela 11: Tabela Verdade com cada voto da especialista, na avaliação da Segunda Etapa.

Original	P2	P4	P5
1	B	A	C
2	A	B	C
3	C	B	A
4	C	A	B
5	B	A	C
6	A	C	B
7	B	C	A
8	A	B	C
9	C	A	B
10	B	C	A
11	A	C	B
12	C	A	B
13	A	C	B
14	B	A	C
15	C	B	A
16	A	B	C

17	A	B	C
18	B	C	A
19	C	A	B
20	C	B	A

Fonte: o autor.

Em relação às imagens reutilizadas nesta etapa, dentre 8 imagens, 7 receberam o mesmo voto nas duas avaliações. A Tabela 12 mostra o comparativo dos votos nas imagens da Primeira Avaliação, que foram repetidas na Segunda Avaliação. Em verde, as imagens em que a especialista escolheu o mesmo processamento, e, em vermelho, a imagem em que ela optou por um processamento diferente.

Tabela 12: Imagens reenviadas na Segunda Avaliação e a decisão do processamento em ambas as etapas

Imagem	Grupo	Posição	1ª	2ª
1929-14 5P	1	Periferia	P4	P4
150-09 3C	2	Centro	P4	P4
10770-14 4P	2	Periferia	P4	P4
11032-14 2C	3	Centro	P2	P2
12635-14 m2 2C	3	Centro	P4	P2
13095-14 4C	3	Centro	P4	P4
N1 3P PERIF 3	Controle	Periferia	P4	P4
N2 2P 20x perf 2	Controle	Periferia	P4	P4

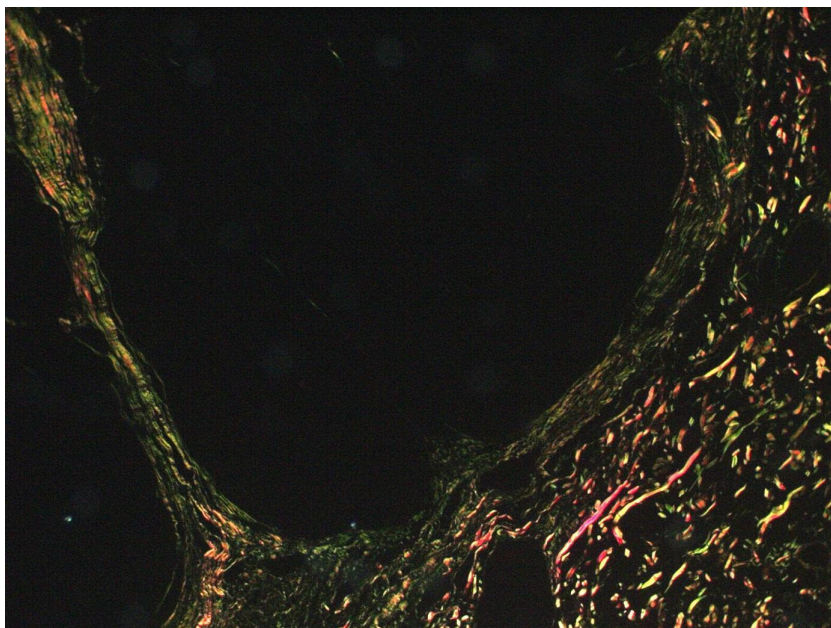
Fonte: o autor.

4.5 Imagens finais dos processamentos da Terceira Avaliação

4.5.1 Imagem 4

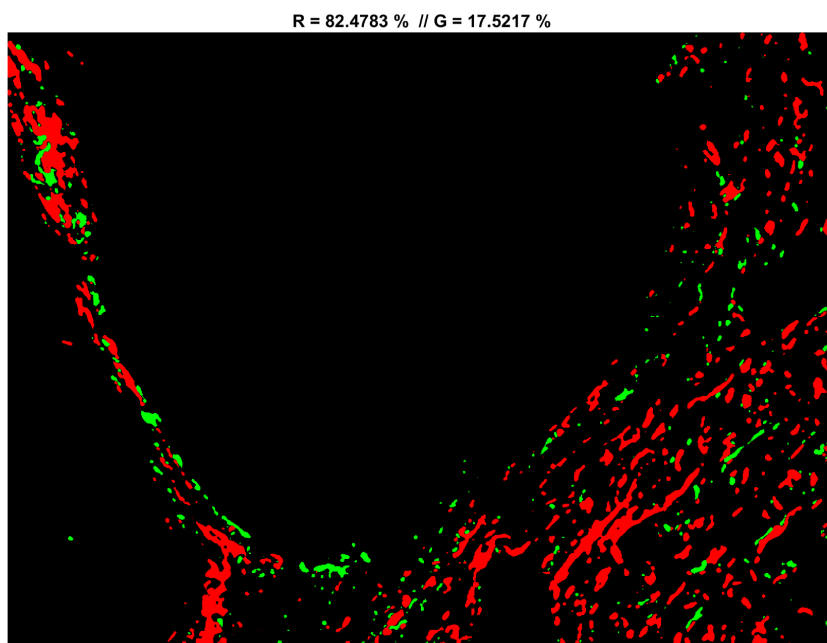
As figuras a seguir mostram a Imagem 4 da Terceira Avaliação e os processamentos feitos, a partir dela, para esta avaliação. A Figura 32 mostra a imagem original. As figuras 33, 34, 35 e 36 mostram, respectivamente, os processamentos F1, F2, F3 e F4 da Imagem 4.

Figura 32: Imagem 4: original.



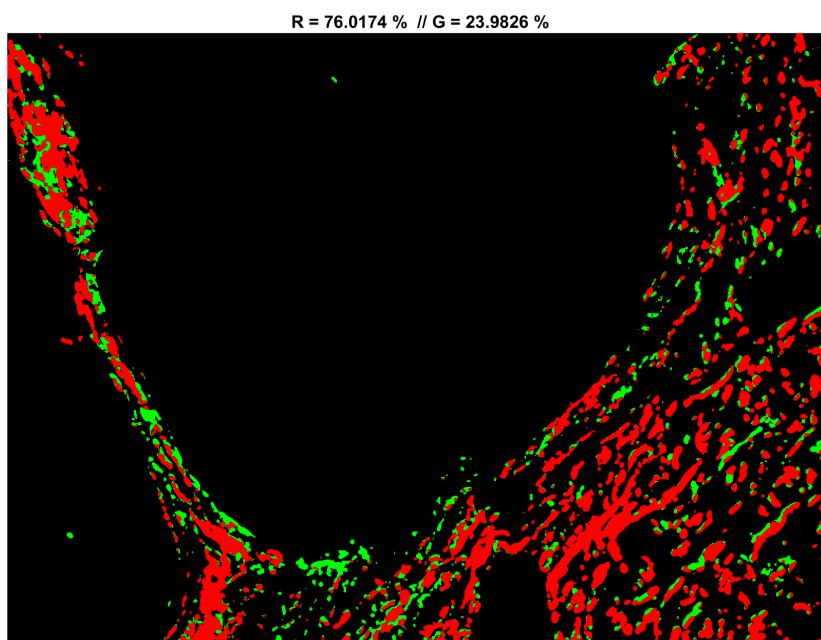
Fonte: JORGE, 2019.

Figura 33: Processamento F1 da Imagem 4.



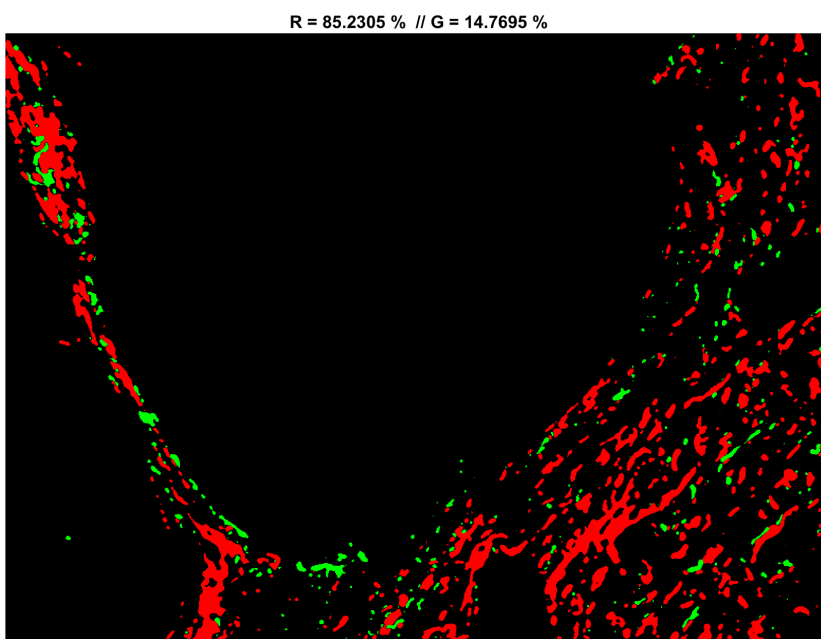
Fonte: o autor.

Figura 34: Processamento F2 da Imagem 4.



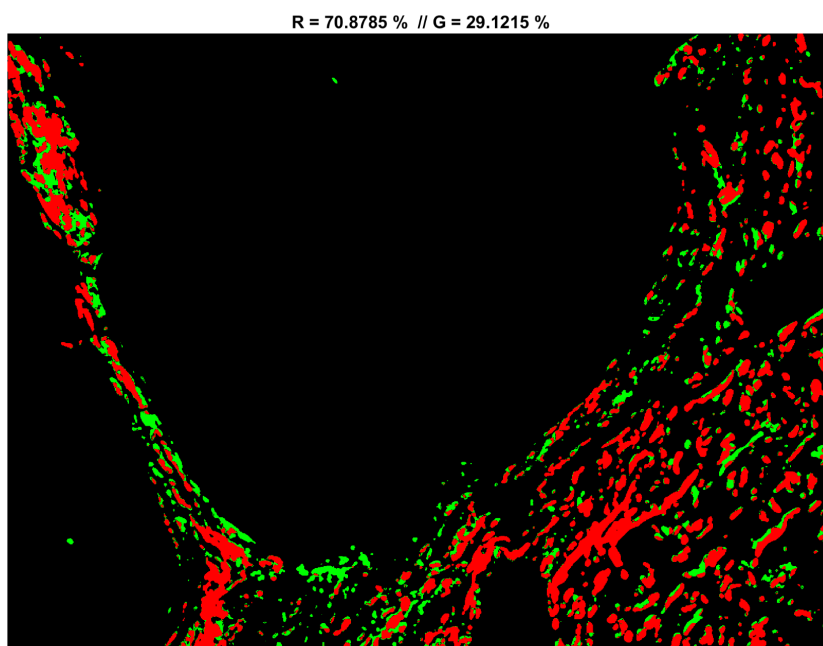
Fonte: o autor.

Figura 35: Processamento F3 da Imagem 4.



Fonte: o autor.

Figura 36: Processamento F4 da Imagem 4.

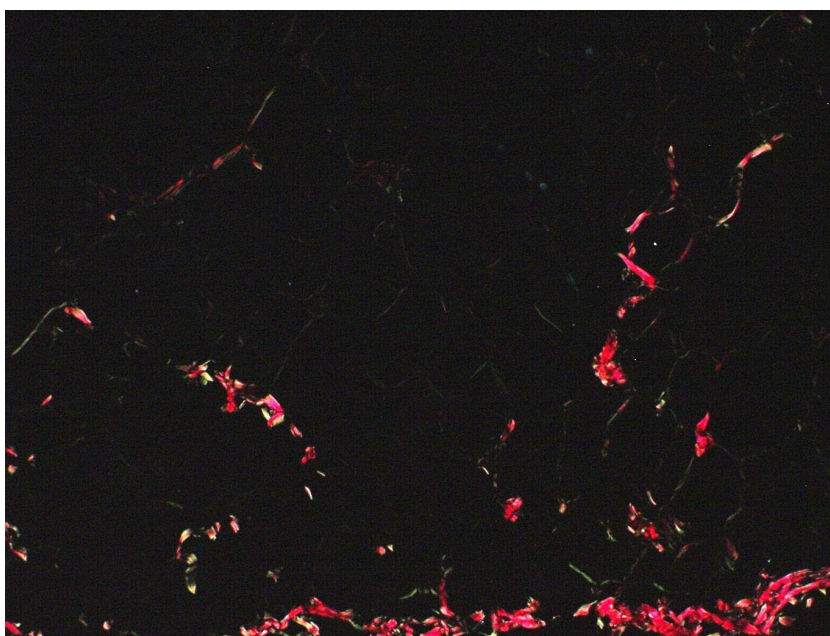


Fonte: o autor.

4.5.2 Imagem 20

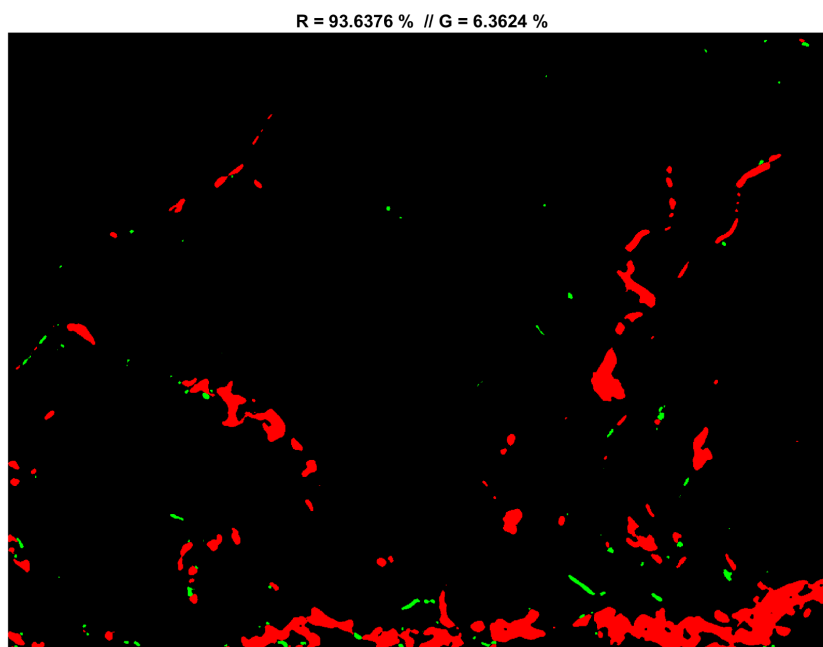
As figuras a seguir mostram a Imagem 20 da Terceira Avaliação e os processamentos feitos, a partir dela, para esta avaliação. A Figura 37 mostra a imagem original. As figuras 38, 39, 40 e 41 mostram, respectivamente, os processamentos F1, F2, F3 e F4 da Imagem 20.

Figura 37: Imagem 20: original.



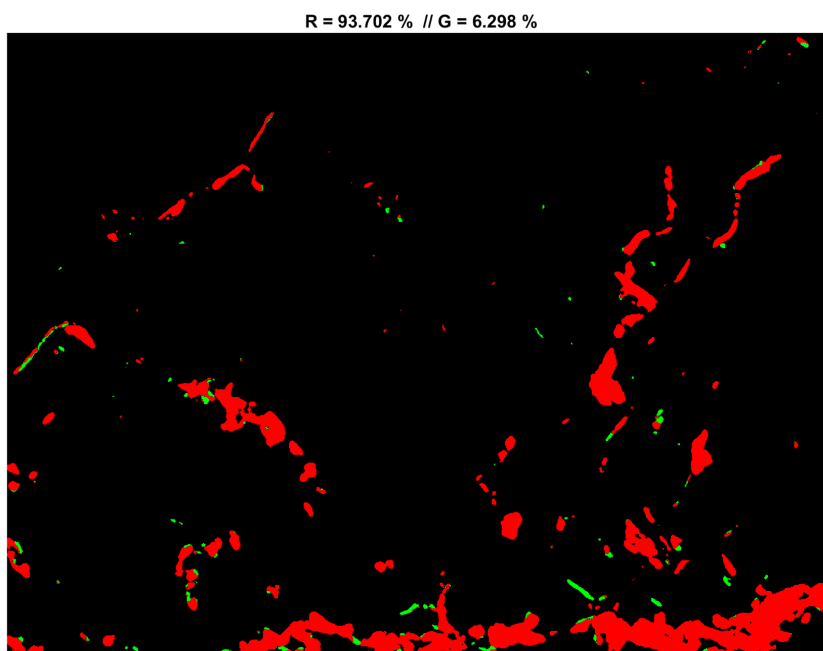
Fonte: JORGE, 2019.

Figura 38: Processamento F1 da Imagem 20.



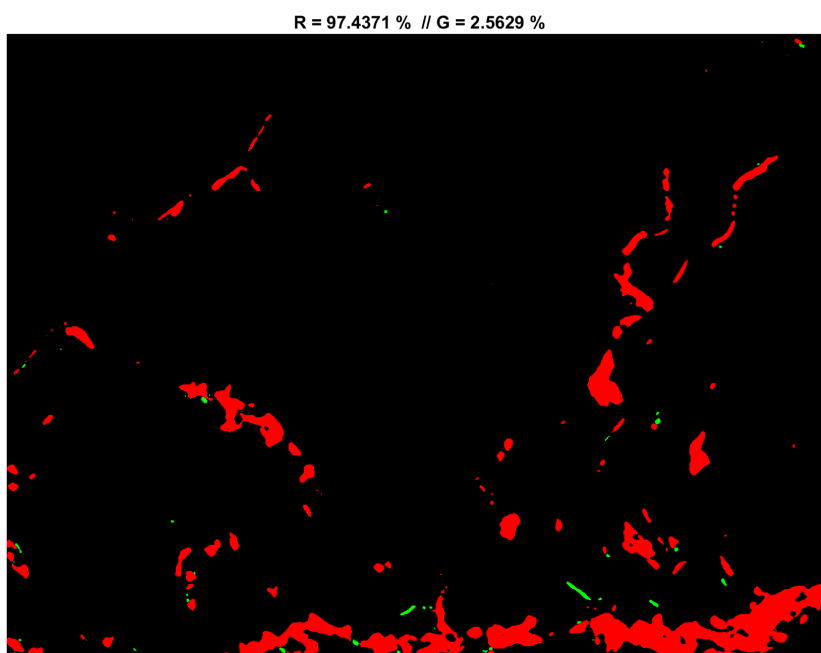
Fonte: o autor.

Figura 39: Processamento F2 da Imagem 20.



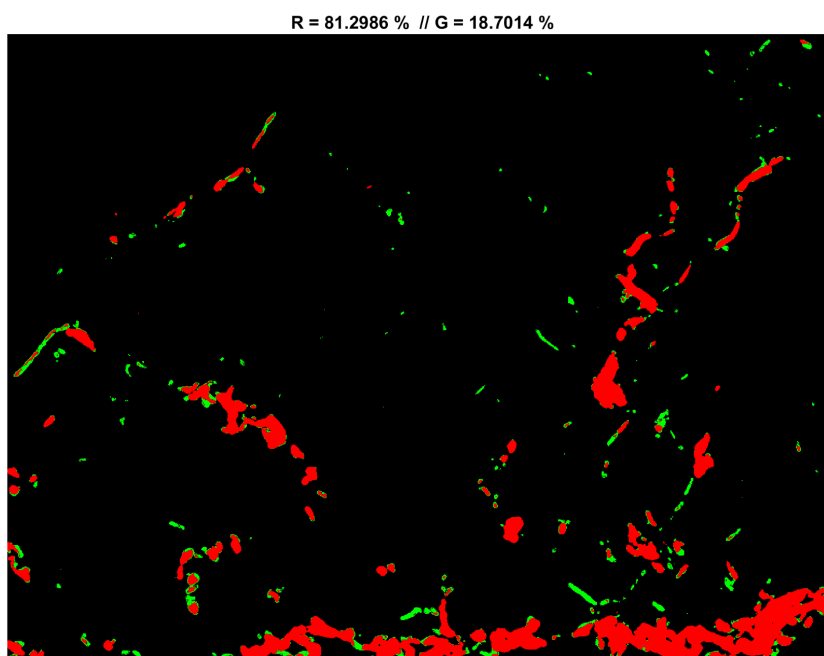
Fonte: o autor.

Figura 40: Processamento F3 da Imagem 20.



Fonte: o autor.

Figura 41: Processamento F4 da Imagem 20.



Fonte: o autor.

4.6 Terceira Avaliação

Nesta etapa, o processamento F3 foi o mais escolhido. Ou seja, Filtro Espacial Circular de Média (disk) + Processamento Escolhido (P4), tiveram melhor resultado, de acordo com a especialista.

A especialista considerou que “nenhum processamento foi efetivo” em uma das imagens. Considerou também que 3 poderiam ser descartadas. A Tabela 13 mostra o resumo das escolhas da especialista em cada imagem. Já a Tabela 14 mostra o detalhamento dessas escolhas.

Tabela 13: Resultados da avaliação da Terceira Avaliação.

Processamento	Número de vezes escolhido
F1	4
F2	3
F3	0
F4	9
Nenhum processamento escolhido	1
Possível imagem descartada	3
Total	20

Fonte: o autor.

Tabela 14: Tabela Verdade com as escolhas da especialista, da Terceira Avaliação.

Imagem	F1	F2	F3	F4	Nenhum	Descartar
1	A	B	C	D		
2	D	A	B	C		
3	A	B	C	D		
4	D	C	B	A		
5	C	B	D	A		
6	B	C	A	D		
7	A	D	C	B		
8	D	C	A	B		
9	B	A	D	C		
10	C	B	D	A		
11	D	C	A	B		
12	B	D	C	A		
13	A	C	B	D		
14	D	B	A	C		
15	A	C	B	D		
16	B	D	A	C		

17	B	A	D	C		
18	A	C	B	D		
19	C	B	A	D		
20	C	A	B	D		

FONTE: O AUTOR.

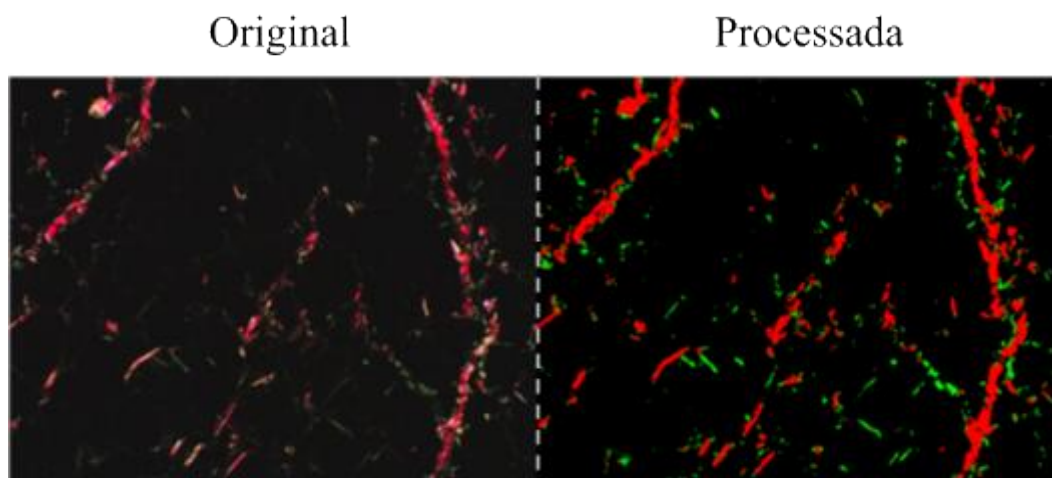
Dessa maneira, de acordo com a avaliação da especialista, o resultado mais efetivo de separação e contabilização das regiões vermelhas e verdes de imagens de cortes histológicos de tecidos mamário felino, corados pelo método histoquímico PSR, foi aquele que combinou a utilização de filtro circular de média, de raio 3, com limiarização por média mais desvio padrão, por canal. Este é o processamento final resultante deste trabalho.

4.7 Comparativo entre originais e processadas

Selecionou-se uma imagem de cada grau e localização para ser apresentada de maneira comparativa, nesta sessão. As figuras são compostas, respectivamente, por imagem original e processamento escolhido.

A Figura 42 mostra o comparativo da imagem “N2 3C CENTRAL”, grupo Controle, Centro. À esquerda, a imagem original e, à direita, a imagem processada com o processamento F4, escolhido pela especialista (Vermelho: 71,35%; Verde: 28,65%).

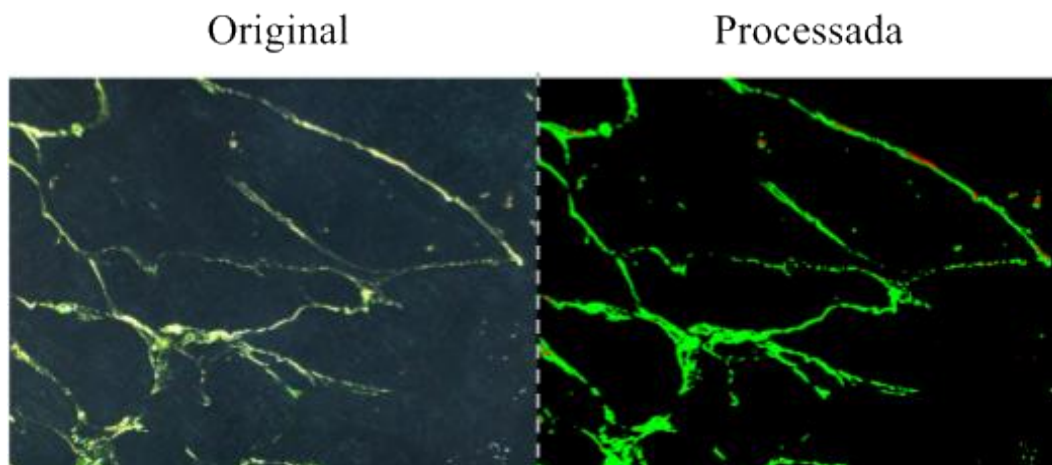
Figura 42: Comparativo da imagem original com a imagem processada, da imagem “N2 3C CENTRAL”, grupo Controle, Centro.



Fonte: JORGE, 2019. O autor.

A Figura 43 mostra o comparativo da imagem “N1 4P PERIF 4”, grupo Controle, Periferia. À esquerda, a imagem original e, à direita, a imagem processada com o processamento F4, escolhido pela especialista (Vermelho: 87,02%; Verde: 12,98%).

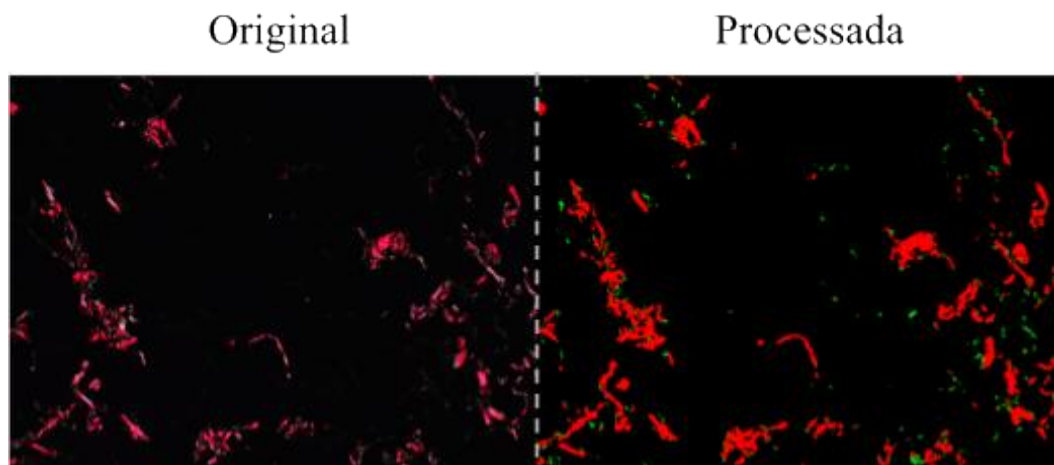
Figura 43: Comparativo da imagem original com a imagem processada, da imagem “N1 4P PERIF 4”, grupo Controle, Periferia.



Fonte: JORGE, 2019. O autor.

A Figura 44 mostra o comparativo da imagem “13347-14 2C”, Grau I, Centro. À esquerda, a imagem original e, à direita, a imagem processada com o processamento F4, escolhido pela especialista (Vermelho: 5,15%; Verde: 94,85%).

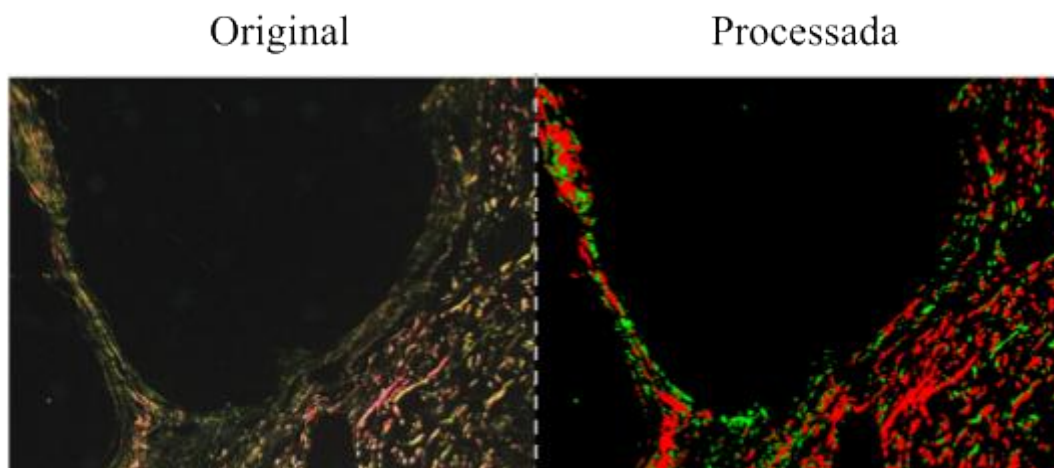
Figura 44: Comparativo da imagem original com a imagem processada, da imagem “13347-14 2C”, Grau I, Centro.



Fonte: JORGE, 2019. O autor.

A Figura 45 mostra o comparativo da imagem “48-09 1P”, Grau I, Periferia. À esquerda, a imagem original e, à direita, a imagem processada com o processamento F4, escolhido pela especialista (Vermelho: 70,88%; Verde: 29,12%).

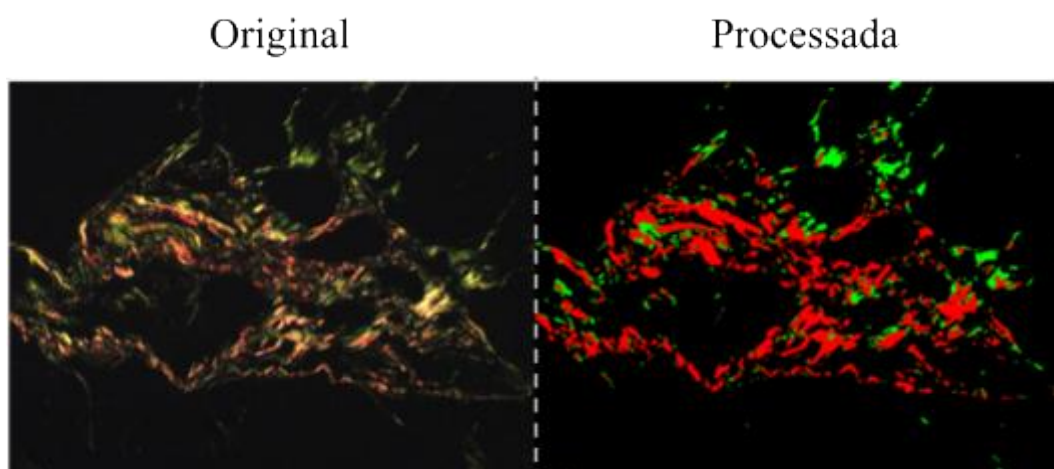
Figura 45: Comparativo da imagem original com a imagem processada, da imagem “48-09 1P”, Grau I, Periferia.



Fonte: JORGE, 2019. O autor.

A Figura 46 mostra o comparativo da imagem “1407-14 1C central 2”, Grau II, Centro. À esquerda, a imagem original e, à direita, a imagem processada com o processamento F4, escolhido pela especialista (Vermelho: 71,72%; Verde: 28,28%).

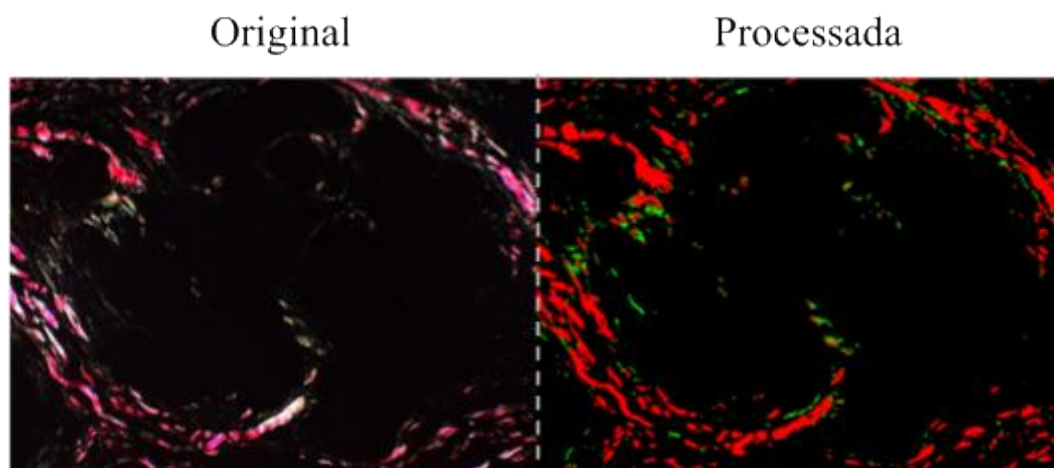
Figura 46: Comparativo da imagem original com a imagem processada, da imagem “1407-14 1C central 2”, Grau II, Centro.



Fonte: JORGE, 2019. O autor.

A Figura 47 mostra o comparativo da imagem “12178-14 4P”, Grau II, Periferia. À esquerda, a imagem original e, à direita, a imagem processada com o processamento F4, escolhido pela especialista (Vermelho: 83,96%; Verde: 16,04%).

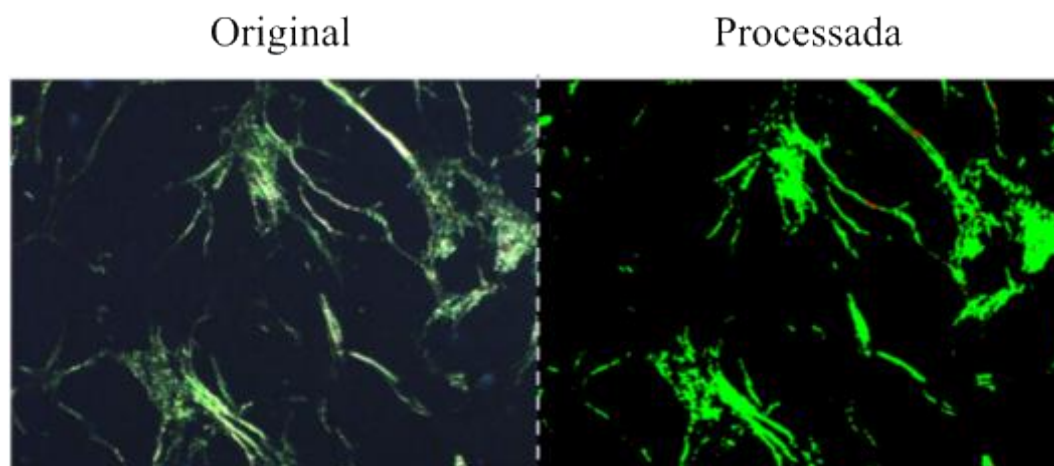
Figura 47: Comparativo da imagem original com a imagem processada, da imagem “12178-14 4P”, Grau II, Periferia.



Fonte: JORGE, 2019. O autor.

A Figura 48 mostra o comparativo da imagem “11032-14 1C”, Grau III, Centro. À esquerda, a imagem original e, à direita, a imagem processada com o processamento F4, escolhido pela especialista (Vermelho: 1,98%; Verde: 98,02%).

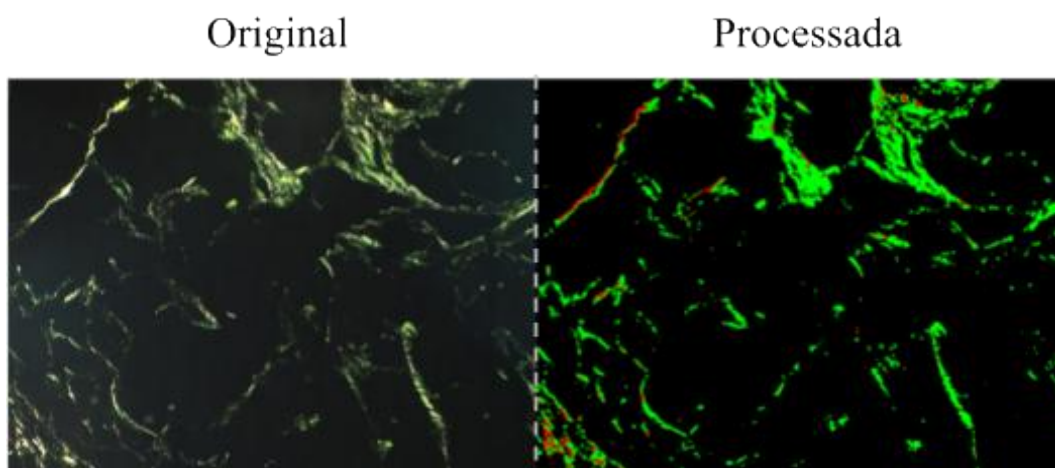
Figura 48: Comparativo da imagem original com a imagem processada, da imagem “11032-14 1C”, Grau III, Centro.



Fonte: JORGE, 2019. O autor.

A Figura 49 mostra o comparativo da imagem “11032-14 4P”, Grau III, Periferia. À esquerda, a imagem original e, à direita, a imagem processada com o processamento F4, escolhido pela especialista (Vermelho: 10,02%; Verde: 89,98%).

Figura 49: Comparativo da imagem original com a imagem processada, da imagem “11032-14 1C”, Grau III, Centro.



Fonte: JORGE, 2019. O autor.

4.8 Descarte de imagens

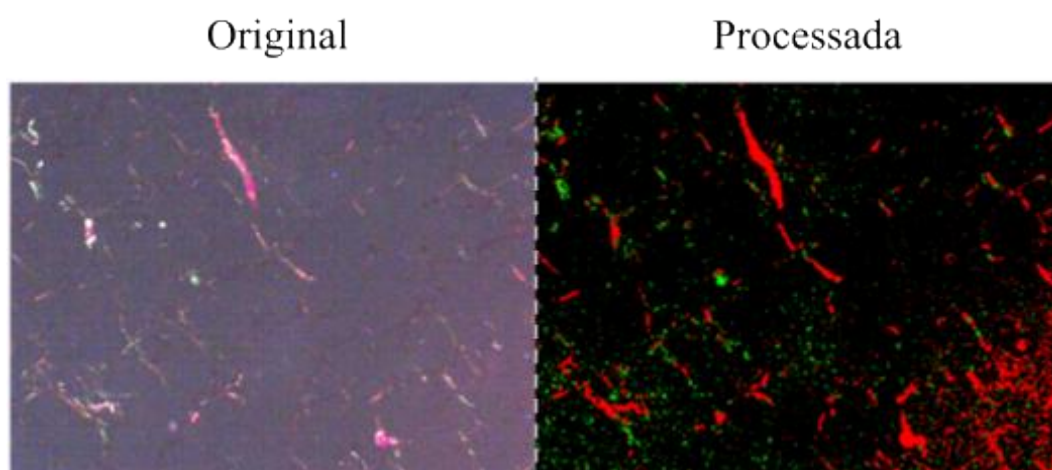
O processamento definido, aplicado à grande maioria das imagens, atingiu resultados satisfatórios, em relação a separação das regiões de interesse (vermelhas e verdes). Entretanto, durante a Terceira Avaliação, foi constatado, pela especialista, que para algumas imagens, tal processamento não foi satisfatório. Em geral, problemas relacionados à aquisição da imagem resultaram na inviabilização do processamento. A aquisição não uniforme, entre as imagens, se dá pelo brilho intenso de algumas regiões causado por maior birrefringência de fibras. Contudo, tratam-se de regiões de não-interesse.

Então, para alguns casos, a especialista optou pelo descarte da imagem do banco. Foi determinada a remoção de 45 imagens. Ao analisá-las, notou-se algumas semelhanças, sendo elas:

- Fundo da imagem muito claro.

A Figura 50 mostra a imagem original, à esquerda, e o resultado do processamento, à direita, da imagem “N1 5C CENTRAL”, grupo Controle, Centro. A imagem original possui um fundo mais claro, comparado às outras do banco.

Figura 50: Comparativo da imagem original com a imagem processada, da imagem “N1 5C CENTRAL”, grupo Controle, Centro.



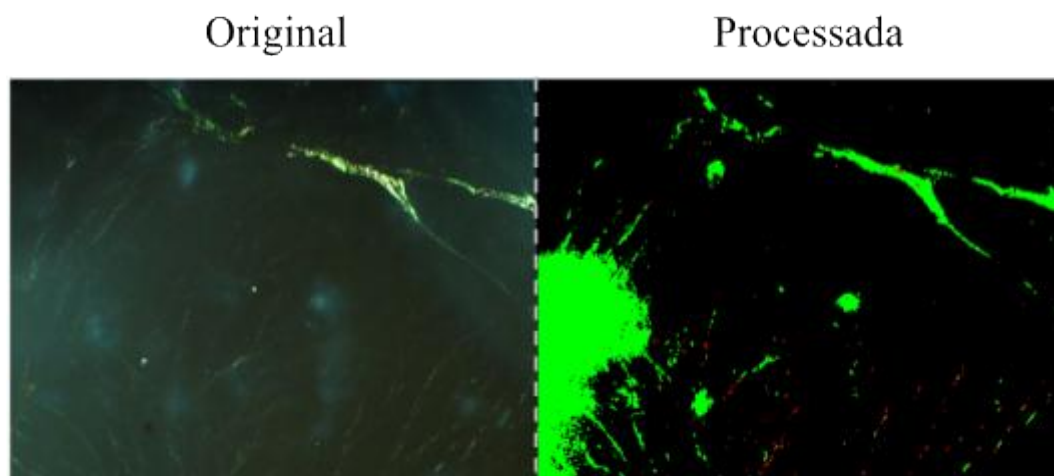
Fonte: JORGE, 2019. O autor.

O problema dessa imagem, mediante a um processamento, está na proximidade de valores de pixels de fundo e pixels de interesse, ou seja, os modos, no histograma, entre a concentração de pixels relacionados ao fundo e à região de interesse, estão muito próximos, ou até juntos. Essa é uma das limitações da Limiarização por Intensidade. Modos muito próximos dificultam a definição de um limiar preciso entre as regiões, devido a proximidade de intensidade entre essas regiões e o fundo. Dessa maneira, a técnica não consegue segregar pixels de fundo e pixels de interesse e, acaba por considerar pixels de fundo, como pixels de interesse.

- Fundo da imagem muito claro, apenas em algumas regiões.

A Figura 51 mostra a imagem original, à esquerda, e o resultado do processamento, à direita, da imagem “48-09 5C”, Grau I, Centro. A imagem original possui um fundo mais claro, em algumas regiões, comparado às outras do banco.

Figura 51: Comparativo da imagem original com a imagem processada, da imagem “48-09 5C”, Grau I, Centro.



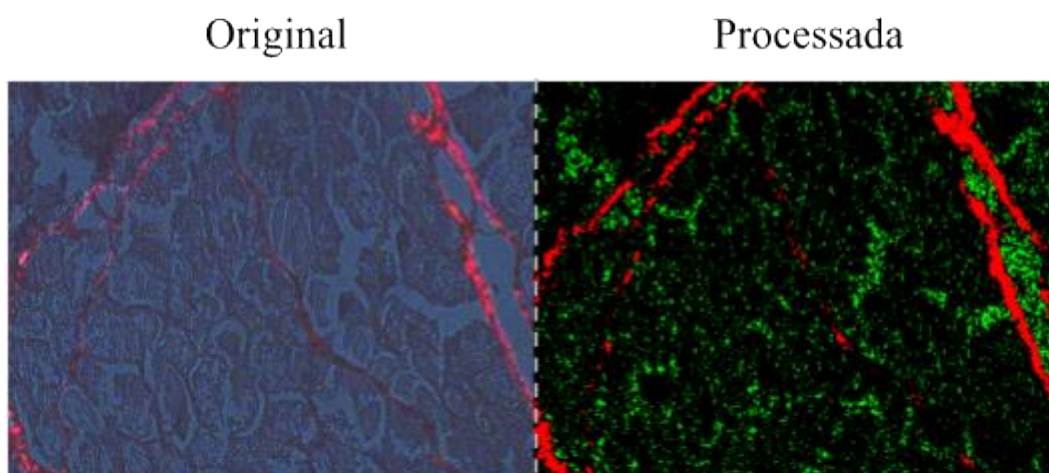
Fonte: JORGE, 2019. O autor.

Neste caso, devido a configuração manual do padrão de aquisição, algumas regiões da imagem são mais claras que outras. Assim como no caso anterior, essas regiões comprometem a limiarização por intensidade, pois pixels de maior intensidade, relacionados ao fundo, são confundidos com pixels de interesse.

- Fundo de imagem muito denso

A Figura 52 mostra a imagem original, à esquerda, e o resultado do processamento, à direita, da imagem “N3 1C marcação interlobular”, Controle, Centro. A imagem original possui um fundo mais claro, em algumas regiões, comparado às outras do banco.

Figura 52: Comparativo da imagem original com a imagem processada, da imagem “N3 1C marcação interlobular”, Controle, Centro.



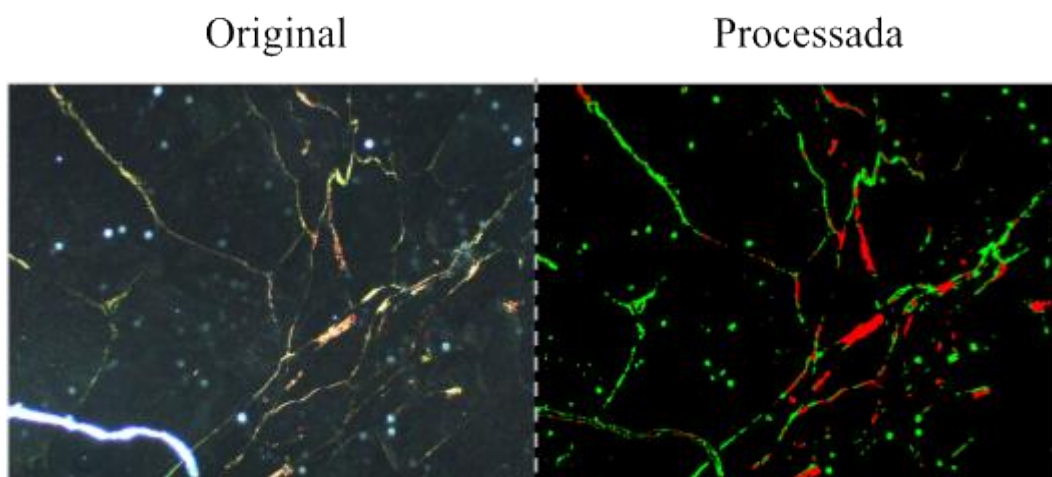
Fonte: JORGE, 2019. O autor.

Um corte histológico um pouco mais grosseiro faz com que o fundo fique mais claro que em outros cortes, com tendências de cor para ciano, tom considerado no processamento como cor de interesse. Aqui, temos uma mescla entre o problema citado anteriormente, intensidade de pixels de fundo e de interesse muito próximas, o que compromete a limiarização e a contagem de pixels ciano, como pixels verdes de interesse.

- Imagem com ruídos de tons cianos

A Figura 53 mostra a imagem original, à esquerda, e o resultado do processamento, à direita, da imagem “150-09 3C”, Grau II, Centro. É possível observar ruídos azuis que tendem para ciano, na imagem original.

Figura 53: Comparativo da imagem original com a imagem processada, da imagem 150-09 3C”, Grau II, Centro.



Fonte: JORGE, 2019. O autor.

Como citado anteriormente, pixels de tom azul não fazem parte da imagem de interesse e estão relacionados a ruídos na aquisição da imagem, relacionados a bolhas de ar ou água na lâmina. Em algumas aquisições, os tons de azul tendem a tons de ciano. Tons de ciano foram considerados pixels de interesse verdes, durante o desenvolvimento da lógica.

Dessa maneira, tons de ciano relacionados a ruídos estão sendo tolerados na lógica e são contados como pixels verde na imagem final.

Após três avaliações cegas, realizadas pela especialista, o método de processamento determinado para a segmentação deste tipo de imagem é aquele em que:

- aplica-se um Filtro Espacial Circular de Média de raio 3, na imagem;
- remove-se tons de cinza, amarelo e azul da imagem;
- realiza-se uma Limiarização por Intensidade, individual em cada canal, em que o limiar de cada um é determinado pela soma da média dos valores de pixels e do desvio padrão de cada canal. Valores menores que cada limiar, em cada canal, são zerados;
- realiza-se a maximização de pixels verdes e cianos, no canal verde da imagem, atenuando-se os valores dos canais vermelho e azul.
- realiza-se a maximização de pixels vermelhos e magentas, no canal vermelho da imagem, atenuando-se os valores dos canais verde e azul.

Feitos os processamentos citados, realiza-se a contagem de pixels de interesse vermelhos e verdes de cada imagem e, obtém-se uma proporção entre esses pixels, para cada imagem. O resultado dessa proporção, para todas as imagens, pode ser visto no Anexo 01.

Além disso, constatou-se a necessidade de uma avaliação preliminar de imagens, antes do processamento, para que se garanta que o método definido funcione para todas elas. Deve então descartar imagens com:

- fundos muito iluminados;
- regiões mais iluminadas que outras;
- fundos muito densos, tendendo a tons de azul;
- excesso de ruídos em tons de ciano.

Dentre as 353 imagens do banco, 45 foram indicadas ao descarte.

5 CONCLUSÃO

A partir deste trabalho, foi possível realizar a quantificação da proporção de regiões vermelhas e verdes em imagens de cortes histológicos de tecido mamário felino, corados pelo método PSR, advindas do banco de imagens considerado.

O uso da técnica de filtragem com Filtro Circular de Média como pré-processamento foi importante para redução de ruídos nas imagens, o que contribuiu para uma melhor quantização de fibras colágenas. A Limiarização por Intensidade, com uso de limiar de média somada ao desvio padrão, por canal, resultou na correta separação de regiões de interesse para a maioria das imagens, o que também contribuiu para uma quantificação adequada de fibras vermelhas e verdes.

As avaliações cegas feitas pela especialista contribuíram para a determinação e validação do processamento mais adequado para este tipo de imagem e foram importantes para que se utilizasse do conhecimento e experiência de um profissional desta área, que pudesse avaliar a qualidade da separação e quantificação de fibras colágenas do tipo I e do tipo III. Para além disso, o teste cego e embaralhamento dos processamentos foram importantes para que não houvesse tendências na escolha de um processamento específico e para confirmar escolhas de avaliações anteriores, como foi o caso da Segunda Avaliação, em relação à Primeira.

A quantificação de diferentes fibras nas imagens de cortes histológicos corados por PSR é importante para que, futuramente, se entenda qual a relação entre a deposição das fibras colágenas, do tipo I e III, sobre a MEC, o grau histológico dos tecidos saudáveis e malignos e a localização das neoplasias.

Estudos posteriores a este trabalho poderiam ser dedicados à comparação entre os percentuais de verde e vermelho das imagens, mediante a uso ou não de filtro de remoção de ruídos, e, à correlação estatística das proporções das duas cores, a fim de compreender-se se há relação entre fibras colágenas tipo I e III, os graus histológicos e a localização de carcinoma mamário felino. Também pode ser feita a ampliação da técnica utilizada para cortes histológicos em tecidos mamários de outras espécies.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, T., RAY, A. K. Image Processing- Principles and Applications. John Wiley & Sons, Inc. 2005.
- ALOWAMI, S. et al. Mammographic density is related to stroma and stromal proteoglycan expression. *Breast Cancer Research*, v. 5, n. 5, p. R129, 2003.
- AMORIM F. V., SOUZA H. J. M., FERREIRA, A. M. R., FONSECA, A. B. M., Clinical, cytological and 196 histopathological evaluation of mammary masses in cats from Rio de Janeiro, Brazil. *J Feline Med Surg*. 2006;8(6):379–88.
- AUGSBURGER, H. R.; HENZI, D. Immunohistochemical expression of collagen types I, III, IV and α -actin in the uterine horns of nulliparous and multiparous beagles. *Theriogenology*, v. 69, n. 9, p. 1070–1076, 2008.
- CANNON, C. M. *Cats, Cancer and Comparative Oncology*. p. 111–126, 2015.
- CASSALI, G. D. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of feline mammary tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 55. 2018.
- CASE, A. et al. Identification of prognostic collagen signatures and potential therapeutic stromal targets in canine mammary gland carcinoma. *PloS one*, v. 12, n. 7, p. e0180448–e0180448, 6 jul. 2017.
- BETZ, D. et al. Postoperative treatment outcome in canine mammary tumors. Multivariate analysis of the prognostic value of pre- and postoperatively available information. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere.*, v. 40, n. 4, p. 235–42, 2012.
- BOYD, N. F. et al. Mammographic densities as a marker of human breast cancer risk and their use in chemoprevention. *Curr Oncol Rep*, v. 3, 2001.
- BRIGHT, R. A. et al. Relationship between mammographic and histologic features of breast tissue in women with benign biopsies. *Cancer*, v. 61, 1988.
- BYRNE, C. et al. Effects of mammographic density and benign breast disease on breast cancer risk (United States). *Cancer Causes Control*, v. 12, 2001.
- CHECKA, C. M. et al. The Relationship of Mammographic Density and Age: Implications for Breast Cancer Screening. *American Journal of Roentgenology*, n. March, p. 292–295, 2012.
- C.S., M. et al. CXCR4 and its ligand CXCL12 display opposite expression profiles in feline mammary metastatic disease, with the exception of HER2- overexpressing tumors. *BMC Cancer*, v. 18, n. 1, 2018.

DA SILVA, Ana Maria Marques; PATROCÍNIO, Ana Cláudia; SCHIABEL, Homero. Processamento e análise de imagens médicas. REVISTA BRASILEIRA DE FÍSICA MÉDICA (ONLINE), 2019.

DE CAMPOS, C. B. et al. Evaluation of prognostic factors and survival rates in malignant feline mammary gland neoplasms. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 18, n. 12, p. 1003–1012, 2015.

DE LAS MULAS, J. M. et al. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in feline mammary gland benign and malignant lesions: comparison with biochemical assay☆. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 18, n. 1, p. 111–125, 2000.

DRIFKA, C. R. et al. Comparison of Picrosirius Red Staining With Second Harmonic Generation Imaging for the Quantification of Clinically Relevant Collagen Fiber Features in Histopathology Samples. v. 64, n. 9, 2016.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, v. 19, p. 403–410, 1991.

FSPECIAL, create predefined 2-D filter. Mathworks, 2022. Disponível em: <<https://www.mathworks.com/help/images/ref/fspecial.html>>. Acesso em: 10 de agosto de 2022.

GOLDSCHMIDT, M. et al. Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. *Veterinary Pathology*, v. 48, n. 1, p. 117–131, 1 jan. 2011.

GONZALEZ, Rafael C.; WOODS, Richard E. *Digital Image Processing*. 3. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2010.

GUNASINGHE, N. P. A. D. et al. Mesenchymal-epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, v. 31, n. 3–4, p. 469–478, 2012.

HAHN, K. A.; BRAVO, L.; AVENELL, J. S. Feline breast carcinoma as a pathologic and therapeutic model for human breast cancer. *In vivo (Athens, Greece)*, v. 8, n. 5, p. 825–828, 1994.

HUGHES, K.; DOBSON, J. M. Prognostic histopathological and molecular markers in feline mammary neoplasia. *Veterinary Journal*, v. 194, n. 1, p. 19–26, 2012.

JORGE, Mariana Fernandes. Avaliação histoquímica da densidade estromal e tipificação imuno-histoquímica de fibras colágenas envolvidas no carcinoma mamário de gatas. 2019.

JUNQUEIRA, L. C.; MONTES, G. S.; SANCHEZ, E. M. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-polarization method. *Histochemistry*, v. 74, n. 1, p. 153–156, 1982.

KLEIN, T. E. e GALLAGER, R. G.(2001). Power control for the additive white Gaussian noise channel under channel estimation errors. *IEEE International Symposium*. 14nd Edition.

KUHL, C.K. Review article MRI of breast tumors. 2000;58:46–58.

LANA, S. E.; RUTTEMAN, G. R.; WITHOROW, S. J. Tumors of the mammary gland. In: Withrow e MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. first edit ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2007. p. 619–636.

LOKATE, M. et al. Age-related Changes in Mammographic Density and Breast Cancer Risk. American Journal of Epidemiology, v. 178, n. 1, p. 101–109, 2013.

LIPTON, A. et al. High turnover of extracellular matrix reflected by specific protein fragments measured in serum is associated with poor outcomes in two metastatic breast cancer cohorts. International Journal of Cancer, v. 143, n. 11, p. 3027–3034, 20 jun. 2018.

MARIA, R. DE et al. Spontaneous Feline Mammary Carcinoma Is a Model of HER2 Overexpressing Poor Prognosis Human Breast Cancer. Cancer Research, v. 65, n. 3, p. 907–912, 2005.

MARQUES, C. S. et al. Serum SDF-1 levels are a reliable diagnostic marker of feline mammary carcinoma, discriminating HER2-overexpressing tumors from other subtypes. Oncotarget, v. 8, n. 62, p. 105775–105789, 2017.

MATOS, A. J. F. et al. Prognostic studies of canine and feline mammary tumours: The need for standardized procedures. Veterinary Journal, v. 193, n. 1, p. 24–31, 2012.

MCCORMACK, V. A.; SILVA, I. DOS S. Breast Density and Parenchymal Patterns as Markers of Breast Cancer Risk: A Meta-analysis. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, v. 15, n. 6, p. 1159 LP – 1169, 1 jun. 2006.

MILLS, S. W. et al. Prognostic Value of Histologic Grading for Feline Mammary Carcinoma: A Retrospective Survival Analysis. Veterinary Pathology, v. 52, n. 2, p. 238–249, 2015.

MISDORP, W. et al. Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat. [s.l.] Armed Forces Institute of Pathology, 1999.

MISDORP W. Tumors of the Mammary Gland. In: Tumors in Domestic Animals [Internet]. 199 Ames, Iowa, USA: Iowa State Press; 2008 [cited 2018 May 14]. p. 575–606. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470376928.ch12>

MONTES, G. S. et al. Histochemical and morphological characterization of reticular fibers. Histochemistry, v. 65, n. 2, p. 131–141, 1980.

MULLER, D. N. e DARONCO, E. L.(2000). Filtros espaciais passa-baixa. Disponível em <http://www.inf.ufrgs.br/danielnm/docs/FiltrosEspaciaisPassaBaixa.pdf>. Acesso em : 20/05/2014.

MONTES, G. S.; JUNQUEIRA, L. C. The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1991. p. 582–586, 1996.

MUNSON, L.; MORESCO, A. Comparative Pathology of Mammary Gland 91 Cancers in Domestic and Wild Animals. v. 28, p. 7–21, 2007.

OSÓRIO, F. S.; BITTENCOURT, J. R. Sistemas inteligentes baseados em redes neurais artificiais aplicados ao processamento de imagens. In: WORKSHOP DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL, 1., 2000, Santa Cruz do Sul.

OVERLEY, B. et al. Association between ovariectomy and feline mammary carcinoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 19, n. 4, p. 560–563, 2005.

PROVENZANO, P. P. et al. Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Medicine*, v. 4, p. 38, 26 dez. 2006.

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine*, v. 19, p. 1423, 7 nov. 2013.

RENCZ, A. N., RYERSON, R. A. (Eds.) *Manual of Remote Sensing, Remote Sensing for the Earth Sciences*. John Wiley & Sons, Inc. 1999, 3rd ed.

RIBEIRO, B.(2006). Suavização de Imagens. Disponível em: www.ic.uff.br/aconci/suavizacao.pdf. Acesso em: 26/05/2014

RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology, 5th Edition. In: 5 ed ed. New York: WB Saunders, 2013. p. 547–556.

SANCHES, Carlos H. et al. Técnicas de Suavização de Imagens e Eliminação de Ruídos. *Anais do EATI–Encontro Anual de Tecnologia da Informação*. Frederico Westphalen–RS, p. 21-30, 2015.

SCIBELLI, A. et al. Expression levels of the focal adhesion-associated proteins paxillin and p130^{CAS} in canine and feline mammary tumors. *Vet. Res.*, v. 34, n. 2, p. 193–202, mar. 2003.

SEARA, D. M.(1998). Visão Geral de Detecção de Bordas. Disponível em: www.inf.ufsc.br/visao/bordas.html. Acesso em: 20/05/2014.

SEIXAS, F. et al. Grade is an independent prognostic factor for feline mammary carcinomas: A clinicopathological and survival analysis. *Veterinary Journal*, v. 187, n. 1, p. 65–71, 2011.

SORENMO, K. U.; WORLEY, D. R.; GOLDSCHMIDT, M. H. Tumors of the Mammary Gland. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M.; PAGE, R. L. B. T.-W. AND M. S. A. C. O. (FIFTH E. (Eds.). . Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology (Fifth Edition). Saint Louis: W.B. Saunders, 2013. p. 538– 556.

SWEAT, F.; PUCHTLER,H.; ROSENTHAL, SI. Sirius red F3BA as a stain for connective tissue. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v.78, p.69-72, 1964.

URSIN, G. et al. Greatly increased occurrence of breast cancers in areas of mammographically dense tissue. *Breast Cancer Research*, v. 7, n. 5, p. R605,

2005.

TAMAMOTO, T. et al. Serum Amyloid A Promotes Invasion of Feline Mammary Carcinoma Cells. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 76, n. 8, p. 1183– 1188, 2014.

TEKGUL, S. et al. Collagen Types I and III Localization by In Situ Hybridization and Immunohistochemistry in the Partially Obstructed Young Rabbit Bladder. *The Journal of Urology*, v. 156, n. 2, Supplement,

THURFJELL, E. Breast density and the risk of breast cancer. *N Engl J Med*, v. 347, 2002.

WEGNER, K. A. et al. Fluorescence of Picrosirius Red Multiplexed With Immunohistochemistry for the Quantitative Assessment of Collagen in Tissue Sections. v. 65, n. 8, 2017.

WINTERS, S. et al. Chapter One - Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. In: LAKSHMANASWAMY, R. B. T.-P. IN M. B. AND T. S. (Ed). *Approaches to Understanding Breast Cancer*. [s.l.] Academic Press, 2017. v. 151p. 1–32

ZAPPULLI, V. et al. Feline mammary tumours in comparative oncology. *Journal of Dairy Research*, v. 72, n. SPEC. ISS., p. 98–106, 2005.

**APÊNDICE A – PROPORÇÃO DE VERDE E VERMELHO DAS
IMAGENS DO BANCO**

Nº	Imagem	Grupo	Localização	Vermelho (%)	Verde (%)
1	N1 1C central	Controle	Centro	67,55360372	32,44639628
2	N1 3C CENTRAL 2	Controle	Centro	53,92926601	46,07073399
3	N1 4C CENTRAL 3	Controle	Centro	77,62855469	22,37144531
4	N1 5C CENTRAL	Controle	Centro	72,01153545	27,98846455
5	N2 2C central 20x	Controle	Centro	81,09552078	18,90447922
6	N2 3C CENTRAL	Controle	Centro	71,354107	28,645893
7	N2 4C CENTRO 2	Controle	Centro	15,14359506	84,85640494
8	N2 5C CENTRO 3	Controle	Centro	15,9236847	84,0763153
9	N2 6C CENTRO 4	Controle	Centro	21,47490517	78,52509483
10	N3 1C marcação interlobular	Controle	Centro	37,69395226	62,30604774
11	N3 2C CENTRAL 2	Controle	Centro	67,84107479	32,15892521
12	N3 3C CENTRAL 3	Controle	Centro	69,37485802	30,62514198
13	N3 4C CENTRAL 4	Controle	Centro	86,21639132	13,78360868
14	N3 5C CENTRAL	Controle	Centro	66,62234043	33,37765957
15	N4 1C 20x	Controle	Centro	57,38001327	42,61998673
16	N4 2C 20x central	Controle	Centro	54,554985	45,445015
17	N4 3C CENTRAL 2	Controle	Centro	35,0634938	64,9365062

18	N4 4C CENTRAL 3	Controle	Centro	25,0868262	74,9131738
19	N4 5C CENTRAL 4	Controle	Centro	26,17687457	73,82312543
20	N4 6C CENTRAL	Controle	Centro	39,58868895	60,41131105
21	n1 2C central 2	Controle	Centro	48,51861919	51,48138081
22	N1 2P PERIF 2	Controle	Periferia	88,64	11,36
23	N1 3P PERIF 3	Controle	Periferia	87,45630832	12,54369168
24	N1 4P PERIF 4	Controle	Periferia	87,01830527	12,98169473
25	N1 5P PERIF	Controle	Periferia	87,97203287	12,02796713
26	N2 1P periferia corada e centro não 20x	Controle	Periferia	39,61659226	60,38340774
27	N2 2P 20x perf 2	Controle	Periferia	65,11687425	34,88312575
28	N2 4P perif 3	Controle	Periferia	81,29858726	18,70141274
29	N2 5P perif 4	Controle	Periferia	68,86626907	31,13373093
30	N3 1P PERIF 2	Controle	Periferia	80,98107363	19,01892637
31	N3 2P PERIF 3	Controle	Periferia	87,97576553	12,02423447
32	N3 3P PERIF 4	Controle	Periferia	89,36488617	10,63511383
33	N3 4P PERIF	Controle	Periferia	81,61808283	18,38191717
34	N3 5P perif	Controle	Periferia	85,47965951	14,52034049
35	N4 1P PERIF 2	Controle	Periferia	79,73791834	20,26208166
36	N4 2P PERIF 3	Controle	Periferia	65,1059434	34,8940566
37	N4 3P PERIF 4	Controle	Periferia	78,20363142	21,79636858
38	N4 4P PERIF	Controle	Periferia	84,27160352	15,72839648
39	N4 5P perif	Controle	Periferia	82,11495956	17,88504044
40	n1 1P periferia 20x	Controle	Periferia	45,02745157	54,97254843
41	n2 3P 20x perif	Controle	Periferia	84,89120032	15,10879968
42	13347-14 1C	Grau 1	Centro	78,08270287	21,91729713
43	13347-14 2C	Grau 1	Centro	5,145373657	94,85462634
44	13347-14 3C	Grau 1	Centro	54,29985972	45,70014028

45	13347-14 4C	Grau 1	Centro	87,47702611	12,52297389
46	13347-14 5C	Grau 1	Centro	15,44951527	84,55048473
47	1929-14 1C	Grau 1	Centro	80,13023451	19,86976549
48	1929-14 2C	Grau 1	Centro	22,11032047	77,88967953
49	1929-14 3C	Grau 1	Centro	13,14683226	86,85316774
50	1929-14 4C	Grau 1	Centro	32,41034035	67,58965965
51	1929-14 5C	Grau 1	Centro	80,08418181	19,91581819
52	48-09 1C	Grau 1	Centro	21,54780684	78,45219316
53	48-09 2 C	Grau 1	Centro	34,11159478	65,88840522
54	48-09 3 C	Grau 1	Centro	17,90034562	82,09965438
55	48-09 4C	Grau 1	Centro	32,08902105	67,91097895
56	48-09 5C	Grau 1	Centro	2,664084754	97,33591525
57	13347-14 1P	Grau 1	Periferia	83,52011504	16,47988496
58	13347-14 2P	Grau 1	Periferia	78,41675576	21,58324424
59	13347-14 3P	Grau 1	Periferia	77,7523052	22,2476948
60	13347-14 4P	Grau 1	Periferia	74,30470697	25,69529303
61	13347-14 5P	Grau 1	Periferia	48,13395596	51,86604404
62	1929-14 1P	Grau 1	Periferia	73,13797398	26,86202602
63	1929-14 2P	Grau 1	Periferia	71,40500063	28,59499937
64	1929-14 3P	Grau 1	Periferia	69,71695986	30,28304014
65	1929-14 4P	Grau 1	Periferia	68,90063837	31,09936163
66	1929-14 5P	Grau 1	Periferia	38,53121674	61,46878326
67	48-09 1P	Grau 1	Periferia	70,87854044	29,12145956
68	48-09 2P	Grau 1	Periferia	76,00069456	23,99930544
69	48-09 3P	Grau 1	Periferia	63,53193445	36,46806555
70	48-09 4P	Grau 1	Periferia	17,95234536	82,04765464
71	48-09 5P	Grau 1	Periferia	11,67164749	88,32835251
72	10770-14 1C	Grau 2	Centro	23,58659593	76,41340407
73	10770-14 2C	Grau 2	Centro	5,346296766	94,65370323
74	10770-14 3C	Grau 2	Centro	33,75448601	66,24551399
75	10770-14 4C	Grau 2	Centro	47,92732222	52,07267778

76	10770-14 5C	Grau 2	Centro	20,86307326	79,13692674
77	12178-14 1C area central densa e esverdiada	Grau 2	Centro	75,35173591	24,64826409
78	12178-14 2C	Grau 2	Centro	68,08934871	31,91065129
79	12178-14 3C verde	Grau 2	Centro	22,57201564	77,42798436
80	12178-14 4C	Grau 2	Centro	7,51974227	92,48025773
81	12178-14 5C	Grau 2	Centro	52,122044	47,877956
82	12635-14 M3 3C	Grau 2	Centro	24,66536674	75,33463326
83	12635-14 M3 4C	Grau 2	Centro	12,53399129	87,46600871
84	12635-14 M3 5C	Grau 2	Centro	11,70287556	88,29712444
85	12635-14 m3 1C	Grau 2	Centro	52,71537745	47,28462255
86	12635-14 m3 2C	Grau 2	Centro	53,72814321	46,27185679
87	12686-14 1C centro esverdiado	Grau 2	Centro	4,771911759	95,22808824
88	12686-14 2C	Grau 2	Centro	53,570471	46,429529
89	12686-14 3C	Grau 2	Centro	15,65221193	84,34778807
90	12686-14 4C	Grau 2	Centro	74,73740622	25,26259378
91	12686-14 5C	Grau 2	Centro	5,462715911	94,53728409
92	13452-14 2C	Grau 2	Centro	8,688645363	91,31135464
93	13452-14 3C	Grau 2	Centro	13,45000774	86,54999226
94	13452-14 4C	Grau 2	Centro	20,07672268	79,92327732
95	13452-14 5C	Grau 2	Centro	31,01716848	68,98283152
96	13452-14 m2 1C	Grau 2	Centro	69,05917351	30,94082649
97	1407-14 1C central 2	Grau 2	Centro	71,71629943	28,28370057
98	1407-14 2C central 3	Grau 2	Centro	10,80182723	89,19817277

99	1407-14 3C central 4	Grau 2	Centro	20,39671309	79,60328691
100	1407-14 4C central 5 foco necrotico	Grau 2	Centro	16,97268299	83,02731701
101	1407-14 5C	Grau 2	Centro	39,27325384	60,72674616
102	144-04 1C	Grau 2	Centro	24,05371964	75,94628036
103	144-04 2C	Grau 2	Centro	73,30854139	26,69145861
104	144-04 3C	Grau 2	Centro	60	40
105	144-04 4C	Grau 2	Centro	4,059894034	95,94010597
106	144-04 5C	Grau 2	Centro	2,19044635	97,80955365
107	150-09 1C	Grau 2	Centro	8,930217959	91,06978204
108	150-09 2C	Grau 2	Centro	20,37544657	79,62455343
109	150-09 3C	Grau 2	Centro	37,87634526	62,12365474
110	150-09 4C	Grau 2	Centro	5,154309765	94,84569023
111	150-09 5C	Grau 2	Centro	43,43866119	56,56133881
112	1626-13 1C	Grau 2	Centro	62,29929586	37,70070414
113	1626-13 2C	Grau 2	Centro	76,24549534	23,75450466
114	1626-13 3C	Grau 2	Centro	74,46633303	25,53366697
115	1626-13 4C reg central tumor - parece encapsulado	Grau 2	Centro	67,92483328	32,07516672
116	1626-13 5C	Grau 2	Centro	71,33597407	28,66402593
117	198-12 1C -----bras pouco mais espessas e verdes	Grau 2	Centro	63,31594635	36,68405365
118	198-12 2C	Grau 2	Centro	77,39924321	22,60075679
119	198-12 3C	Grau 2	Centro	83,65910055	16,34089945
120	198-12 4 C	Grau 2	Centro	40,90539812	59,09460188
121	198-12 5C	Grau 2	Centro	70,03316107	29,96683893
122	2857-13 1C	Grau 2	Centro	54,03720601	45,96279399
123	2857-13 2C	Grau 2	Centro	65,31544331	34,68455669
124	2857-13 3C	Grau 2	Centro	6,161050782	93,83894922

125	2857-13 4C	Grau 2	Centro	17,49627822	82,50372178
126	2857-13 5C	Grau 2	Centro	37,48798577	62,51201423
127	44-03 1C	Grau 2	Centro	40,86264378	59,13735622
128	44-03 2C	Grau 2	Centro	58,65903426	41,34096574
129	44-03 C3	Grau 2	Centro	25,32192115	74,67807885
130	44-03 C4	Grau 2	Centro	4,009465284	95,99053472
131	44-03 C5	Grau 2	Centro	9,119746919	90,88025308
132	509-13 1C	Grau 2	Centro	11,82854146	88,17145854
133	509-13 2C interlobular 3	Grau 2	Centro	20,53325714	79,46674286
134	509-13 3C interlobular 4	Grau 2	Centro	7,901957912	92,09804209
135	509-13 4C	Grau 2	Centro	45,34415672	54,65584328
136	509-13 5C	Grau 2	Centro	17,22633968	82,77366032
137	10770-14 1P	Grau 2	Periferia	20,9610058	79,0389942
138	10770-14 2P	Grau 2	Periferia	69,13478687	30,86521313
139	10770-14 3P	Grau 2	Periferia	78,11967955	21,88032045
140	10770-14 4P	Grau 2	Periferia	9,076169449	90,92383055
141	10770-14 5P	Grau 2	Periferia	6,06258967	93,93741033
142	12178-14 1P	Grau 2	Periferia	74,07201493	25,92798507
143	12178-14 2P	Grau 2	Periferia	76,54007974	23,45992026
144	12178-14 3P	Grau 2	Periferia	72,38527881	27,61472119
145	12178-14 4P	Grau 2	Periferia	83,96264718	16,03735282
146	12178-14 5P	Grau 2	Periferia	64,12846391	35,87153609
147	12635-14 M3 4P	Grau 2	Periferia	48,34710363	51,65289637
148	12635-14 M3 5P	Grau 2	Periferia	34,90901501	65,09098499
149	12635-14 m3 1P	Grau 2	Periferia	76,29291138	23,70708862
150	12635-14 m3 2P	Grau 2	Periferia	47,85586851	52,14413149
151	12635-14 m3 3P	Grau 2	Periferia	86,111909	13,888091

152	12686-14 1P	Grau 2	Periferia	54,92522097	45,07477903
153	12686-14 2P	Grau 2	Periferia	69,49679296	30,50320704
154	12686-14 3P	Grau 2	Periferia	69,83684158	30,16315842
155	12686-14 4P	Grau 2	Periferia	81,1923018	18,8076982
156	12686-14 5P	Grau 2	Periferia	71,30393576	28,69606424
157	13452-14 4P	Grau 2	Periferia	60,52705689	39,47294311
158	13452-14 5P	Grau 2	Periferia	36,34234453	63,65765547
159	13452-14 m2 1P	Grau 2	Periferia	80,51334522	19,48665478
160	13452-14 m2 2P	Grau 2	Periferia	72,7535027	27,2464973
161	13452-14 m2 3P	Grau 2	Periferia	81,43815474	18,56184526
162	1407-14 1P perif 1	Grau 2	Periferia	84,09501926	15,90498074
163	1407-14 2P	Grau 2	Periferia	73,65551572	26,34448428
164	1407-14 3P	Grau 2	Periferia	76,27754001	23,72245999
165	1407-14 4P	Grau 2	Periferia	54,67828737	45,32171263
166	1407-14 5P	Grau 2	Periferia	89,13178692	10,86821308
167	144-04 1P	Grau 2	Periferia	69,05314767	30,94685233
168	144-04 2P	Grau 2	Periferia	33,34615132	66,65384868
169	144-04 3P	Grau 2	Periferia	23,98156133	76,01843867
170	144-04 4P	Grau 2	Periferia	20,06241373	79,93758627
171	144-04 5P	Grau 2	Periferia	4,270688349	95,72931165
172	150-09 1P	Grau 2	Periferia	16,26228941	83,73771059
173	150-09 2P	Grau 2	Periferia	20,10214127	79,89785873
174	150-09 3P	Grau 2	Periferia	35,21368696	64,78631304
175	150-09 4P	Grau 2	Periferia	58,4223298	41,5776702
176	150-09 5P	Grau 2	Periferia	39,67363346	60,32636654
177	1626-13 1P	Grau 2	Periferia	68,78851911	31,21148089
178	1626-13 3P	Grau 2	Periferia	76,02215687	23,97784313
179	1626-13 4P	Grau 2	Periferia	79,91737532	20,08262468
180	1626-13 5P	Grau 2	Periferia	73,75057036	26,24942964

181	1626-1626-13 2P	Grau 2	Periferia	70,12631939	29,87368061
182	198-12 1P	Grau 2	Periferia	75,16678407	24,83321593
183	198-12 2P	Grau 2	Periferia	81,48117423	18,51882577
184	198-12 3P	Grau 2	Periferia	83,74948715	16,25051285
185	198-12 5P	Grau 2	Periferia	67,78115711	32,21884289
186	198-12 P4	Grau 2	Periferia	89,59520694	10,40479306
187	2857-13 1P	Grau 2	Periferia	27,55279288	72,44720712
188	2857-13 2P	Grau 2	Periferia	51,7041587	48,2958413
189	2857-13 3P	Grau 2	Periferia	79,3302985	20,6697015
190	2857-13 4P	Grau 2	Periferia	66,18637463	33,81362537
191	2857-13 5P	Grau 2	Periferia	15,21907036	84,78092964
192	44-03 1P	Grau 2	Periferia	79,87271549	20,12728451
193	44-03 2P	Grau 2	Periferia	73,04686257	26,95313743
194	44-03 P3	Grau 2	Periferia	8,128299472	91,87170053
195	44-03 P4	Grau 2	Periferia	3,48835875	96,51164125
196	44-03 P5	Grau 2	Periferia	15,54916866	84,45083134
197	509-13 1P perf 2	Grau 2	Periferia	29,77308568	70,22691432
198	509-13 2P perif 1	Grau 2	Periferia	80,05960181	19,94039819
199	509-13 3P	Grau 2	Periferia	10,34084344	89,65915656
200	509-13 4P	Grau 2	Periferia	8,366348972	91,63365103
201	509-13 5P	Grau 2	Periferia	12,67317191	87,32682809
202	509-13 6P	Grau 2	Periferia	8,252201128	91,74779887
203	10816-14 1C	Grau 3	Centro	88,0582754	11,9417246
204	10816-14 2C	Grau 3	Centro	85,85077256	14,14922744
205	10816-14 3C	Grau 3	Centro	79,75091613	20,24908387
206	10816-14 4C	Grau 3	Centro	83,13026877	16,86973123
207	10816-14 5C	Grau 3	Centro	77,4332472	22,5667528
208	11032-14 1C	Grau 3	Centro	1,979602154	98,02039785
209	11032-14 2C	Grau 3	Centro	44,06222688	55,93777312

210	11032-14 3C	Grau 3	Centro	2,396371124	97,60362888
211	11032-14 4C	Grau 3	Centro	54,49218924	45,50781076
212	11032-14 5C	Grau 3	Centro	46,09082956	53,90917044
213	11543-14 1C central 2	Grau 3	Centro	37,52756935	62,47243065
214	11543-14 2C central 3	Grau 3	Centro	2,306519031	97,69348097
215	11543-14 3C central 4	Grau 3	Centro	46,76292881	53,23707119
216	11543-14 4C	Grau 3	Centro	37,16326852	62,83673148
217	11543-14 5C	Grau 3	Centro	18,72500381	81,27499619
218	12635-14 M2 4C	Grau 3	Centro	58,51267052	41,48732948
219	12635-14 M2 5C	Grau 3	Centro	69,98141559	30,01858441
220	12635-14 m2 1C	Grau 3	Centro	34,14776404	65,85223596
221	12635-14 m2 2C	Grau 3	Centro	49,60610751	50,39389249
222	12635-14 m2 3C	Grau 3	Centro	80,39046753	19,60953247
223	13095-14 1C central	Grau 3	Centro	1,433758362	98,56624164
224	13095-14 2C	Grau 3	Centro	3,77365214	96,22634786
225	13095-14 3C	Grau 3	Centro	23,66491472	76,33508528
226	13095-14 4C	Grau 3	Centro	88,47128992	11,52871008
227	13095-14 5C	Grau 3	Centro	85,98325285	14,01674715
228	1384-14 1C	Grau 3	Centro	77,67523256	22,32476744
229	1384-14 2C	Grau 3	Centro	70,60536669	29,39463331
230	1384-14 3C	Grau 3	Centro	52,43272628	47,56727372
231	1384-14 4C	Grau 3	Centro	38,66299381	61,33700619
232	1384-14 5C	Grau 3	Centro	28,86307538	71,13692462
233	146-05 1C	Grau 3	Centro	3,488656472	96,51134353
234	146-05 2C	Grau 3	Centro	12,67401236	87,32598764
235	146-05 3C	Grau 3	Centro	1,555343898	98,4446561

236	146-05 4C	Grau 3	Centro	81,70435914	18,29564086
237	146-05 5C	Grau 3	Centro	62,27146144	37,72853856
238	190-12 1C	Grau 3	Centro	28,85263371	71,14736629
239	190-12 2C interlobular 3	Grau 3	Centro	14,1503822	85,8496178
240	190-12 3C interlobular 4	Grau 3	Centro	11,36920189	88,63079811
241	190-12 4C	Grau 3	Centro	89,16911003	10,83088997
242	190-12 5C	Grau 3	Centro	93,70315958	6,296840422
243	3564-14 1C	Grau 3	Centro	21,42954701	78,57045299
244	3564-14 2C	Grau 3	Centro	69,47747981	30,52252019
245	3564-14 3C	Grau 3	Centro	63,59066128	36,40933872
246	3564-14 4C	Grau 3	Centro	3,955035559	96,04496444
247	3564-14 5C	Grau 3	Centro	20,4436087	79,5563913
248	3756-13 1C	Grau 3	Centro	21,66432542	78,33567458
249	3756-13 2C	Grau 3	Centro	11,71302077	88,28697923
250	3756-13 3C	Grau 3	Centro	20,64333251	79,35666749
251	3756-13 4C	Grau 3	Centro	73,19861989	26,80138011
252	3756-13 5C	Grau 3	Centro	3,991666272	96,00833373
253	4840-14 1C	Grau 3	Centro	2,336737014	97,66326299
254	4840-14 2C	Grau 3	Centro	3,524727621	96,47527238
255	4840-14 3C	Grau 3	Centro	5,541687062	94,45831294
256	4840-14 4C	Grau 3	Centro	5,126308553	94,87369145
257	4840-14 5C	Grau 3	Centro	8,494886277	91,50511372
258	5845-14 1C	Grau 3	Centro	16,53047369	83,46952631
259	5845-14 2C	Grau 3	Centro	6,714437641	93,28556236
260	5845-14 3C	Grau 3	Centro	82,37038243	17,62961757
261	5845-14 4C	Grau 3	Centro	23,79082634	76,20917366
262	5845-14 5C	Grau 3	Centro	19,46659049	80,53340951
263	5863-14 1C	Grau 3	Centro	70,27426639	29,72573361
264	5863-14 2C	Grau 3	Centro	2,953245158	97,04675484
265	5863-14 3	Grau 3	Centro	56,77226762	43,22773238

266	5863-14 3C	Grau 3	Centro	3,939813182	96,06018682
267	5863-14 4C	Grau 3	Centro	20,27969743	79,72030257
268	5863-14 5C	Grau 3	Centro	20,4607517	79,5392483
269	8355-14 1C	Grau 3	Centro	16,41055763	83,58944237
270	8355-14 2C	Grau 3	Centro	15,36956908	84,63043092
271	8355-14 3C	Grau 3	Centro	2,705134276	97,29486572
272	8355-14 4C	Grau 3	Centro	2,091624061	97,90837594
273	8355-14 5C	Grau 3	Centro	25,00925583	74,99074417
274	88-05 1C inter e intralobular 5	Grau 3	Centro	1,001727806	98,99827219
275	88-05 2 C interlobular 4	Grau 3	Centro	0,6254550268	99,37454497
276	88-05 3C	Grau 3	Centro	3,858753709	96,14124629
277	88-05 4C	Grau 3	Centro	3,334817377	96,66518262
278	88-05 5C	Grau 3	Centro	4,402115161	95,59788484
279	10816-14 1P	Grau 3	Periferia	38,01256129	61,98743871
280	10816-14 2P	Grau 3	Periferia	40,88174602	59,11825398
281	10816-14 3P	Grau 3	Periferia	74,26900585	25,73099415
282	10816-14 4P	Grau 3	Periferia	41,4526587	58,5473413
283	10816-14 5P	Grau 3	Periferia	47,91300991	52,08699009
284	11032-14 1P perif 1	Grau 3	Periferia	62,11387159	37,88612841
285	11032-14 2P perif 2	Grau 3	Periferia	39,75726099	60,24273901
286	11032-14 3P	Grau 3	Periferia	50,85198111	49,14801889
287	11032-14 4P	Grau 3	Periferia	10,01669597	89,98330403
288	11032-14 5P	Grau 3	Periferia	20,26262661	79,73737339
289	11543-14 1P perif 1	Grau 3	Periferia	85,70522979	14,29477021
290	11543-14 2P	Grau 3	Periferia	38,71338991	61,28661009
291	11543-14 3P	Grau 3	Periferia	56,58415885	43,41584115
292	11543-14 4P	Grau 3	Periferia	13,28733317	86,71266683
293	11543-14 5P	Grau 3	Periferia	54,34466924	45,65533076

294	12635-14 M2 4P	Grau 3	Periferia	66,7644076	33,2355924
295	12635-14 M2 5P	Grau 3	Periferia	48,6741471	51,3258529
296	12635-14 m2 2P	Grau 3	Periferia	80,61877019	19,38122981
297	12635-14 m2 1P	Grau 3	Periferia	75,92543975	24,07456025
298	12635-14 m2 3P	Grau 3	Periferia	72,7715322	27,2284678
299	13095-14 1P periferia	Grau 3	Periferia	74,66865431	25,33134569
300	13095-14 2P	Grau 3	Periferia	66,40976465	33,59023535
301	13095-14 3P	Grau 3	Periferia	90,55424953	9,445750471
302	13095-14 4P	Grau 3	Periferia	91,30465366	8,695346337
303	13095-14 5P	Grau 3	Periferia	90,93013696	9,069863043
304	1384-14 1P	Grau 3	Periferia	77,20395078	22,79604922
305	1384-14 2P	Grau 3	Periferia	48,15573065	51,84426935
306	1384-14 3P	Grau 3	Periferia	25,77938081	74,22061919
307	1384-14 4P	Grau 3	Periferia	80,48307931	19,51692069
308	1384-14 5P	Grau 3	Periferia	62,14467923	37,85532077
309	146-05 1P	Grau 3	Periferia	76,21891942	23,78108058
310	146-05 2P	Grau 3	Periferia	74,6865089	25,3134911
311	146-05 3P	Grau 3	Periferia	86,51339658	13,48660342
312	146-05 4P	Grau 3	Periferia	92,27310893	7,726891069
313	146-05 5P	Grau 3	Periferia	38,82930723	61,17069277
314	190-12 1 P periferia 1	Grau 3	Periferia	71,86875004	28,13124996
315	190-12 2 P periferia 2	Grau 3	Periferia	74,96054798	25,03945202
316	190-12 3P	Grau 3	Periferia	95,29288957	4,707110431
317	190-12 4P	Grau 3	Periferia	92,33498422	7,665015785
318	190-12 5P	Grau 3	Periferia	97,16511794	2,834882059
319	3564-14 1P	Grau 3	Periferia	75,25171755	24,74828245
320	3564-14 2P	Grau 3	Periferia	37,16851353	62,83148647

321	3564-14 3P	Grau 3	Periferia	67,54208369	32,45791631
322	3564-14 4P	Grau 3	Periferia	19,15502527	80,84497473
323	3564-14 5P	Grau 3	Periferia	24,14298494	75,85701506
324	3756-13 1P	Grau 3	Periferia	73,80361448	26,19638552
325	3756-13 2P	Grau 3	Periferia	61,98124117	38,01875883
326	3756-13 3P	Grau 3	Periferia	52,00166601	47,99833399
327	3756-13 4P	Grau 3	Periferia	54,16999275	45,83000725
328	3756-13 5P	Grau 3	Periferia	52,76519319	47,23480681
329	4840-14 1P	Grau 3	Periferia	69,62303174	30,37696826
330	4840-14 2P	Grau 3	Periferia	54,2089588	45,7910412
331	4840-14 3P	Grau 3	Periferia	16,55066891	83,44933109
332	4840-14 4P	Grau 3	Periferia	84,7939422	15,2060578
333	4840-14 5P	Grau 3	Periferia	5,72122919	94,27877081
334	5845-14 1P	Grau 3	Periferia	38,72192803	61,27807197
335	5845-14 2P	Grau 3	Periferia	31,92018519	68,07981481
336	5845-14 3P	Grau 3	Periferia	31,51789127	68,48210873
337	5845-14 4P	Grau 3	Periferia	67,29644654	32,70355346
338	5845-14 5P	Grau 3	Periferia	42,5093495	57,4906505
339	5863-14 1P	Grau 3	Periferia	22,71369081	77,28630919
340	5863-14 2P	Grau 3	Periferia	63,39359349	36,60640651
341	5863-14 3P	Grau 3	Periferia	24,19288066	75,80711934
342	5863-14 4P	Grau 3	Periferia	55,64973749	44,35026251
343	5863-14 5P	Grau 3	Periferia	48,06073626	51,93926374
344	8355-14 1P	Grau 3	Periferia	47,76616302	52,23383698
345	8355-14 2P	Grau 3	Periferia	80,04909644	19,95090356
346	8355-14 3P	Grau 3	Periferia	81,28433484	18,71566516
347	8355-14 4P	Grau 3	Periferia	73,01413895	26,98586105
348	8355-14 5P	Grau 3	Periferia	70,86397059	29,13602941
349	88-05 2P	Grau 3	Periferia	72,65370186	27,34629814
350	88-05 1P perif 1	Grau 3	Periferia	70,21920649	29,78079351

351	88-05 3P	Grau 3	Periferia	72,71831405	27,28168595
352	88-05 4P	Grau 3	Periferia	87,96066713	12,03933287
353	88-05 5P	Grau 3	Periferia	94,23694414	5,763055858