

ANÁLISE DE IMAGENS DE IMUNO- HISTOQUÍMICA DA PLACENTA E DO PULMÃO USANDO SEGMENTAÇÃO E DESCRITORES DE FORMA

Trabalho de Conclusão de Curso

Engenharia da Computação

Ariel Tarcísio do Nascimento Custódio
Orientador: Prof. Wellington Pinheiro dos Santos



UNIVERSIDADE
DE PERNAMBUCO

**ARIEL TARCÍSIO DO NASCIMENTO
CUSTÓDIO**

**ANÁLISE DE IMAGENS DE IMUNO-
HISTOQUÍMICA DA PLACENTA E DO
PULMÃO USANDO SEGMENTAÇÃO
E DESCRITORES DE FORMA**

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do diploma de Bacharel em Engenharia da Computação pela Escola Politécnica de Pernambuco – Universidade de Pernambuco.

Recife, Novembro de 2009.

Agradecimentos

Agradeço ao professor Wellington Pinheiro dos Santos, por sua orientação e apoio no desenvolvimento deste trabalho, mostrando sempre confiança na minha capacidade.

Aos meus familiares e amigos que de algum modo me ajudaram na conclusão deste trabalho.

Resumo

Este trabalho apresenta uma proposta de um *plugin* para a ferramenta ImageJ que possibilita a identificação e cálculo de medidas referentes a macrófagos em imagens histológicas de placenta e pulmão obtidas por meio de processos de imunohistoquímica. O *plugin* desenvolvido utiliza métodos de segmentação de imagens como o k-médias e de extração de características como a morfometria e a fotomicrometria. Os resultados obtidos mostram que a utilização do *plugin* por patologistas permite uma análise mais objetiva se comparada com a subjetividade dos métodos tradicionais possibilitando um diagnóstico final mais preciso.

Abstract

This project presents a proposal of a plugin for ImageJ tool which makes possible the identification and measures calculations of macrophages present in histological images of placenta and lung got over immunohistochemical processes. The developed plugin uses images segmentation methods like k-means and features extraction like morphometry and photomicrometry. The achieved results show that the plugin usage by pathologists allows an analysis more objective compared to the traditional subjective methods completing the final diagnosis.

Sumário

Resumo	i
Abstract	ii
Sumário	iii
Índice de Figuras	v
Capítulo 1 Introdução	7
1.1 Organização do Trabalho	8
Capítulo 2 Análise de Imagens em Patologia	9
2.1 Introdução	9
2.2 Imuno-histoquímica	11
2.3 Observações Conclusivas	14
Capítulo 3 Segmentação	15
3.1 Introdução	15
3.2 Técnicas para Segmentação de Imagens	16
3.2.1 Métodos de Segmentação em Amplitude	16
3.2.2 Métodos de Segmentação Baseados em <i>Clusters</i>	17
3.2.3 Métodos de Segmentação Por Região	18
3.3 K-médias	19
3.4 Observações Conclusivas	20
Capítulo 4 Classificação de Macrófagos em Imagens de Imuno-Histoquímica	21
4.1 Introdução	21

4.2	Ferramentas Utilizadas	22
4.3	<i>Plugin</i> Desenvolvido	24
4.4	Resultados	26
4.5	Discussão dos Resultados	39
Capítulo 5 Conclusão e Trabalhos Futuros		41
Bibliografia		42
Apêndice A Análise Morfométrica		47
Apêndice B Análise Fotomicrométrica		51
Apêndice C Solução para Imagens com <i>Zoom</i> Maior		53
Apêndice D Solução para Imagens com <i>Zoom</i> Menor		55

Índice de Figuras

Figura 1.	Exemplo de Segmentação por Projeção de Linha e Coluna [32]	17
Figura 2.	Segmentação Baseada em <i>Clusters</i>	18
Figura 3.	Tela inicial do ImageJ.....	22
Figura 4.	Opções de cálculos no ImageJ.....	23
Figura 5.	Editor de texto do ImageJ.....	24
Figura 6.	Execução do <i>Plugin</i>	25
Figura 7.	Imagem Original	26
Figura 8.	Imagem segmentada utilizando k=10	27
Figura 9.	Imagem binarizada	27
Figura 10.	Resultado final.....	28
Figura 11.	Medições referentes à imagem	28
Figura 12.	Imagem Original	29
Figura 13.	Imagem segmentada utilizando k=10	29
Figura 14.	Imagem binarizada	30
Figura 15.	Resultado Final.....	30
Figura 16.	Medições referentes à imagem	30
Figura 17.	Imagem original.....	31
Figura 18.	Imagem segmentada utilizando k=10.....	31
Figura 19.	Imagem binarizada	32

Figura 20.	Resultado final.....	32
Figura 21.	Medições referentes à imagem	33
Figura 22.	Imagem original.....	33
Figura 23.	Imagem segmentada utilizando k=10.....	33
Figura 24.	Imagem binarizada	34
Figura 25.	Resultado Final.....	34
Figura 26.	Contagem de células.....	35
Figura 27.	Imagem original.....	35
Figura 28.	Imagem segmentada utilizando k=10.....	35
Figura 29.	Imagem binarizada	36
Figura 30.	Resultado Final.....	36
Figura 31.	Contagem de células.....	37
Figura 32.	Imagem original.....	37
Figura 33.	Imagem segmentada utilizando k=10.....	37
Figura 34.	Imagem binarizada	38
Figura 35.	Resultado Final.....	38
Figura 36.	Contagem de células.....	39
Figura 37.	Diagrama em blocos do processamento envolvido em um sistema de análise morfológica [39]	49

Capítulo 1

Introdução

A análise de macrófagos¹ em imagens de tecidos de placenta e pulmão, nos dias de hoje, tem se baseado essencialmente na experiência do patologista. Análise essa que está sujeita a erros devido a imprecisões nas técnicas utilizadas (geralmente utilização de grades oculares) e a erros humanos uma vez que o patologista realiza várias análises em um curto espaço de tempo ficando sujeito ao desgaste tanto físico como mental [4,39].

Aliado a isso, pode-se ressaltar que há um alto custo na geração dessas imagens, já que, elas apresentam-se inicialmente transparentes, o que impossibilita a identificação de estruturas de interesse. O uso de técnicas como imuno-histoquímica apresenta resultados satisfatórios quando comparadas com as imagens originais. No entanto o padrão de cores gerado por essa técnica nem sempre corresponde ao padrão esperado pelo patologista resultando no descarte dessas imagens [4,39].

Com o auxílio de um computador e de técnicas de processamento de imagens essas imagens, inicialmente consideradas inutilizáveis, podem ser consideradas próprias para análise, gerando resultados mais rápidos e precisos [4,39].

O presente trabalho propõe-se a estudar aplicações de processamento digital de imagens a imagens de imuno-histoquímica de placenta e pulmão, bem como

¹ Macrófagos são células de defesa que fagocitam restos celulares, elementos anormais da matriz extracelular, células neoplásicas (cancerosas), bactérias e elementos inertes que penetram no organismo [6].

desenvolver um ambiente para caracterização de macrófagos para o apoio de análise de imagens em patologia.

1.1 Organização do Trabalho

Este trabalho está dividido em 5 capítulos onde este primeiro corresponde ao capítulo de introdução e exposição dos objetivos.

No capítulo 2 é apresentado uma visão geral de análise de imagens em patologia, assim como a exposição da técnica de imuno-histoquímica e dos métodos de extração de características a partir de análises morfométricas e fotomicrométricas.

No capítulo 3 são abordados conceitos referentes a segmentação de imagens, incluindo técnicas para a mesma, além da exposição do algoritmo de k-médias.

O capítulo 4 apresenta as estratégias utilizadas para os experimentos realizados, assim como os resultados obtidos.

O capítulo 5 apresenta as conclusões gerais observadas com o desenvolvimento do algoritmo. Também são apresentadas sugestões para a melhoria do algoritmo e para trabalhos futuros.

Capítulo 2

Análise de Imagens em Patologia

2.1 Introdução

As ciências biomédicas vêm, nas últimas décadas, sofrendo uma verdadeira revolução devido à introdução da informática no contexto biomédico. O rápido desenvolvimento das técnicas e tecnologias envolvidas no processamento digital de imagens aliado à crescente quantidade de informações requeridas na área biomédica têm, cada vez mais, conduzido ao uso de ferramentas digitais nos laboratórios (de pesquisa ou de diagnóstico), clínicas e hospitais [27].

A patologia – especialidade da Medicina que é responsável em grande parte pelos fundamentos científicos da prática moderna – é uma das áreas médicas que se fundamenta basicamente em análise de imagens. Durante muito tempo, o estudo e o diagnóstico de doenças foi realizado utilizando-se apenas o olho humano e a experiência do patologista. No entanto, mais recentemente, por meio de sistemas óptico-digitais de computadores contendo sistemas especialistas de análise de imagens, os processos patológicos vêm se beneficiando dos novos caminhos e horizontes abertos por esses sistemas [27].

A análise digital de imagens tem resultado em grandes inovações na armazenagem, discriminação e estudo estatístico de dados numéricos. A habilidade de programas especializados em análise de imagens em apresentar gráficos complexos, avaliar padrões de cor e diferenciar imagens tem sido largamente utilizada nas análises morfométricas de padrões histológicos e citológicos [12,19].

Várias técnicas morfométricas foram desenvolvidas durante os últimos anos com a esperança de inserir na prática da patologia critérios objetivos e reprodutíveis

referentes ao diagnóstico e ao prognóstico de doenças. No entanto, os estudos quantitativos não foram inicialmente considerados práticos diante da complexidade dos métodos e o longo tempo necessário no processo de aquisição desses dados [4]. Além do que, fatores como a não padronização entre os diferentes sistemas de processamento de imagens, o custo elevado, e principalmente o baixo entendimento, o receio de novas tecnologias e de métodos que envolvam processos matemáticos, tem dificultado a afirmação desta tecnologia na rotina dos serviços de anatomia patológica [27].

Várias empresas de tecnologia biomédica têm se dedicado à elaboração de tecnologias (*hardware* e *software*) que utilizem técnicas da inteligência artificial e da estatística, juntamente com o processamento de imagens, para auxílio no diagnóstico por imagem [39].

Ainda que muitos profissionais da área de médica ainda estejam relutantes ao uso de computadores nos laboratórios de análises, a análise digital de imagens vem solucionando um número cada vez maior de problemas, trazendo melhorias que se estendem da simples automação do processo repetitivo de realizar análises visuais – processo este desgastante e sujeito a inúmeras imprecisões e erros – ao aumento da precisão na detecção de estruturas de interesse em análises cito e histológicas [39].

Avaliações histológicas por meio da imuno-histoquímica, imunofluorescência, entre outras, aliadas à técnicas morfométricas realizadas em computador têm fornecido resultados mais precisos e completos para as mínimas alterações morfológicas que não podem ser visualizadas na microscopia tradicional [33].

A elaboração de métodos para o processamento de imagens tem facilitado aos interessados em extrair cada vez mais informações devido à capacidade de se excluir, delimitar e realçar certas características obtidas pela imagem digital. Estas imagens digitais são representadas por uma matriz cujos elementos são chamados *pixels* (*picture elements*) que representam a unidade fundamental de análise de uma figura através de tonalidades específicas de cor [19]. Com isso, vários atributos podem ser gerados, como por exemplo: contagem de objetos, determinação de forma, medidas lineares, estereologia (conjunto de métodos de quantificação de

estruturas morfológicas [22]), além de medições mais complexas e multiparamétricas [30].

Uma série de vantagens são obtidas com a medição das estruturas biológicas na histopatologia e na citopatologia como por exemplo [13,42]:

- i. Diminuição da variabilidade na quantificação dos aspectos celulares e teciduais;
- ii. Promoção de uma escala numérica e reprodutível dos aspectos qualitativos;
- iii. Aumento da sensibilidade na detecção de alterações mínimas;
- iv. Avaliação dos efeitos de diferentes métodos de processamento histológico;
- v. Emprego no controle de qualidade;
- vi. Determinação da forma e tamanho padrões para ensino e diagnóstico;
- vii. Maximização como ferramenta de pesquisa.

Nas seções seguintes serão apresentados conceitos relevantes sobre a técnica da imuno-histoquímica bem como sobre análises em imagens considerando aspectos morfométricos e fotomicrométricos.

2.2 Imuno-histoquímica

Imuno-histoquímica é uma técnica utilizada na prática clínica que permite a coloração de componentes celulares e matrizes extracelulares por anticorpos específicos. Na patologia cirúrgica ela é utilizada como um auxílio no diagnóstico para diferenciar tecidos benignos e malignos. Como uma ferramenta de prognóstico, ela é usada para o estudo da presença de moléculas envolvidas com câncer [2].

A idéia básica desse método consiste na identificação do antígeno a ser analisado por um anticorpo específico, associado a vários tipos de mecanismos de

visualização. Cada anticorpo, que pode estar presente em uma célula normal ou neoplásica (de neoplasia, nome dado às células com código genético alterado, resultantes da ação do câncer) ou de um microorganismo, reconhece exclusivamente um único antígeno. Esse reconhecimento é realizado por meio de um anticorpo que, ao entrar em contato com um antígeno específico, libera uma substância cromógena (ou simplesmente cromógeno, gerador de cor), ou seja, uma substância que colore a célula onde o antígeno está presente, usando uma determinada cor [4].

O cromógeno mais utilizado na imuno-histoquímica é o diaminobenzidina, também conhecido com DAB, que colore o precipitado com a cor marrom, assim as áreas "positivas" recebem a cor marrom, enquanto nas "negativas" é utilizado um corante para contra coloração, normalmente a hematoxilina (que colore com a cor azul) [8].

Essa técnica, por ser baseada no princípio da reação antígeno-anticorpo, proporciona a identificação de atributos celulares normalmente não identificáveis pela histologia. Este fato permite a caracterização histogenética, sendo considerada uma das técnicas mais eficientes disponível ao patologista [17,23,40].

As reações imuno-histoquímicas podem ser empregadas nas mais diferentes ocasiões em um laboratório de patologia cirúrgica. Dentre elas podemos citar [8]:

- i. Diagnóstico de tumores indiferenciados: determinar se um tumor é um carcinoma (tumor maligno epitelial ou glandular), linfoma (tumor maligno que ocorre no sangue), melanoma (tumor maligno epitelial com pior prognóstico) ou sarcoma (tumor maligno que ocorre em tecidos conectivos como gorduras, vasos sanguíneos, nervos, ossos, músculos e cartilagens);
- ii. Diagnóstico diferencial entre tumores e estados reacionais: como por exemplo, linfadenites (inflamação de um ou mais gânglios linfáticos) x linfoma; alterações prostáticas (provenientes da próstata) benignas x câncer de próstata; doenças benignas x câncer de mama;

- iii. Diagnóstico de diversas doenças infecciosas: identificando as moléculas produzidas por vários agentes infecciosos, como o da toxoplasmose e outros vírus, como o Citomegalovírus (CMV), vírus de Epstein-Barr (EBV), Herpes simplex tipos I e II, vírus das Hepatites B e C, HSV8 etc.;
- iv. Determinação de fatores preditivos de neoplasias: identificando moléculas alvo para alguns tratamentos, como os receptores de estrogênio e progesterona e oncoproteína c-erbB2/Her-2-neu no câncer de mama, o CD20 nos linfomas, o EGFR e VEGFR em diversos tipos de tumores etc.;
- v. Determinação de fatores prognósticos de neoplasias: identificando o provável comportamento de uma determinada neoplasia, como a oncoproteína p53 e o antígeno Ki-67 em carcinomas, linfomas e tumores cerebrais etc.;
- vi. Determinação / sugestão de sítio primário de adenocarcinoma (derivado de adeno, que significa pertencente a uma glândula): sugestão do sítio primário mais provável e auxiliar na escolha do tratamento mais adequado, como também no conhecimento do prognóstico;
- vii. Determinação de tipo / subtipo de linfomas e leucemias: tratamento personalizado e mais eficaz, assim como conhecimento do prognóstico;

Embora esse método seja relativamente simples, ele possui algumas peculiaridades e seu resultado é influenciado por vários fatores, começando pela fixação do espécime, seguido pela escolha dos anticorpos a serem analisados em cada caso e pelas reações propriamente ditas, e por fim chegando até a interpretação das lâminas. Em outras palavras, o grau de utilidade e contribuição da imuno-histoquímica para resolução de problemas em patologia cirúrgica é diretamente proporcional à experiência dos especialistas que realizam as reações e interpretam os resultados [2,17,20,35,41,44].

2.3 Observações Conclusivas

Nesse capítulo foi abordada a análise de imagens em Patologia que possui o objetivo de auxiliar o patologista em seu diagnóstico e não substituir o mesmo uma vez que, a análise de imagens completa a análise realizada pelo patologista. O apêndice A apresenta a Análise Morfométrica e o apêndice B apresenta a Análise Fotomicrométrica que foram análises utilizadas nos cálculos de elementos a partir das imagens de imuno-histoquímica no presente trabalho.

Capítulo 3

Segmentação

3.1 Introdução

Segmentação em imagens envolve a divisão ou separação da imagem em regiões com atributos similares, para que seja possível a extração de características desta imagem. O atributo mais básico para segmentação é a amplitude da luminância (intensidade luminosa) da imagem para imagens monocromáticas (em escala de cinza) e componentes de cor para imagens coloridas. Bordas da imagem e texturas também são atributos comuns para segmentação [27].

Em uma mesma imagem, áreas espacialmente diferentes são identificadas como regiões com mesma textura, com nível de cinza semelhante, ou outra característica em comum. Deste modo, pode-se caracterizar o processo de segmentação em imagens como a atribuição de um rótulo a cada *pixel* da imagem, identificando-o a qual área ele pertence, de acordo com suas características comuns [1,43].

Por dividir a imagem em sub-regiões, o nível para cada subdivisão depende do problema a ser resolvido. Ou seja, a segmentação deve ser interrompida quando os objetos de interesse na aplicação estiverem isolados. Por exemplo, na inspeção automatizada de componentes eletrônicos, o interesse consiste em analisar as imagens dos produtos com o objetivo de determinar a presença ou ausência de determinadas anomalias, como a falta de componentes ou conexões quebradas [10].

Nas seções seguintes serão apresentados alguns métodos gerais para segmentação de imagens.

3.2 Técnicas para Segmentação de Imagens

A segmentação de imagens pode ser realizada através de diversos métodos com características próprias de cada um. Alguns desses métodos serão apresentados abaixo [32].

3.2.1 Métodos de Segmentação em Amplitude

Neste método a segmentação é baseada na limiarização da luminância ou dos componentes de cor da imagem. Pode ser dividida em [32]:

- Limiarização da Luminância em 2 Níveis: consiste em estabelecer um limiar único para a luminância de uma imagem.
- Limiarização da Luminância em Vários Níveis: consiste em um processo recursivo de limiarização. Inicialmente, define-se um limiar para separar regiões claras e escuras da imagem. Forma-se então um histograma de cada imagem resultante. Se o histograma não for unimodal² é definido um novo limiar e a imagem é segmentada novamente até que o histograma resultante seja unimodal.
- Projeção em Amplitude: consiste em isolar elementos de interesse de uma imagem através de projeções de linha e coluna da mesma [5,18]. A figura 1 [32] apresenta um exemplo de segmentação baseado na projeção de tons de cinza de uma imagem.

² As modas são os picos do histograma. Quando o histograma tem mais de uma moda, isso significa que existe mais de uma classe presente na imagem.

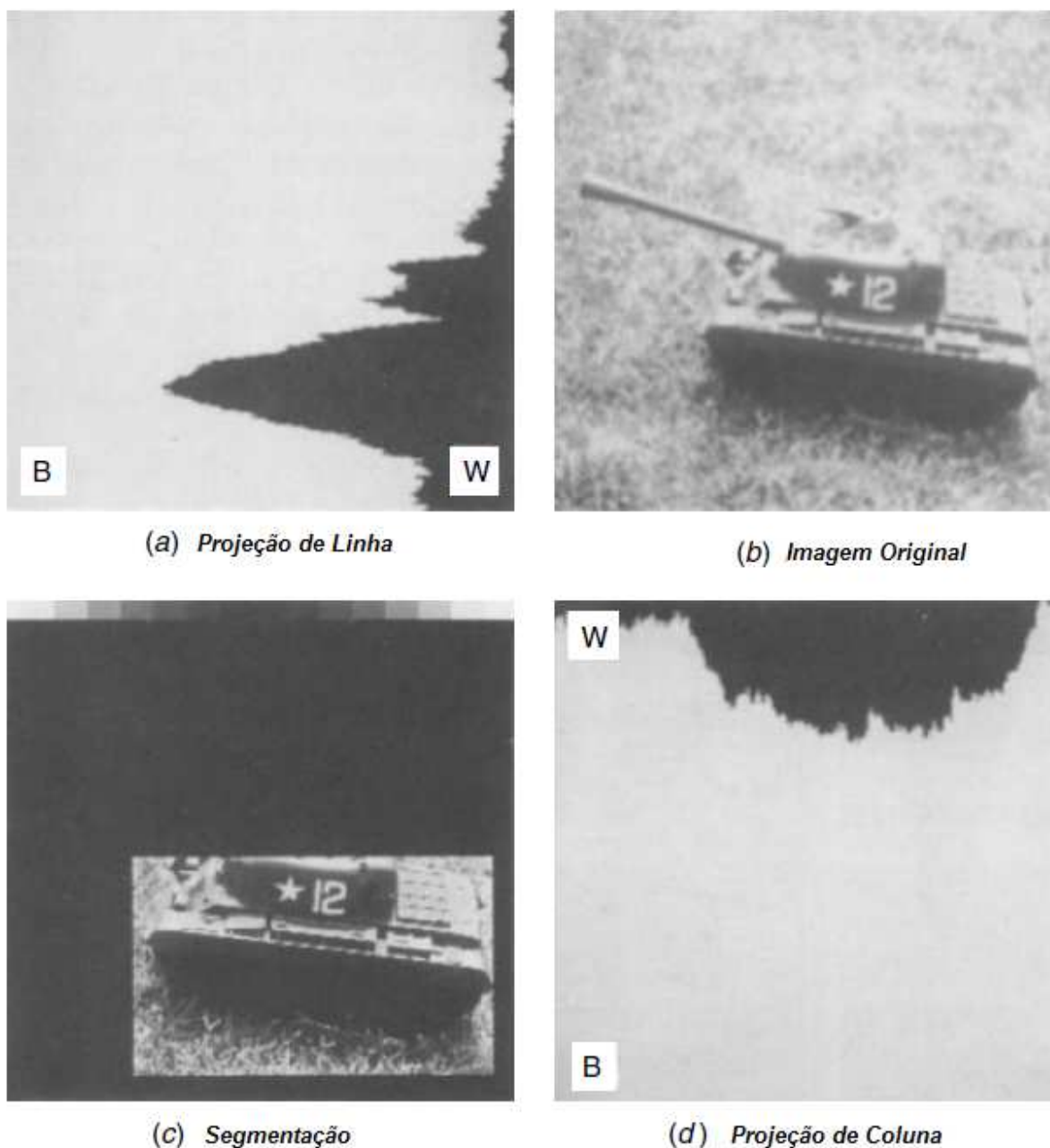


Figura 1. Exemplo de Segmentação por Projeção de Linha e Coluna [32]

3.2.2 Métodos de Segmentação Baseados em *Clusters*

Métodos de segmentação baseados em *clusters* consistem em técnicas que segmentam a imagem agrupando elementos com características semelhantes em classes ou *clusters* [32]. A Figura 2 apresenta uma amostra desse tipo de segmentação. Um dos principais representantes desse conjunto de técnicas é o algoritmo de k-médias também conhecido como *k-means*.

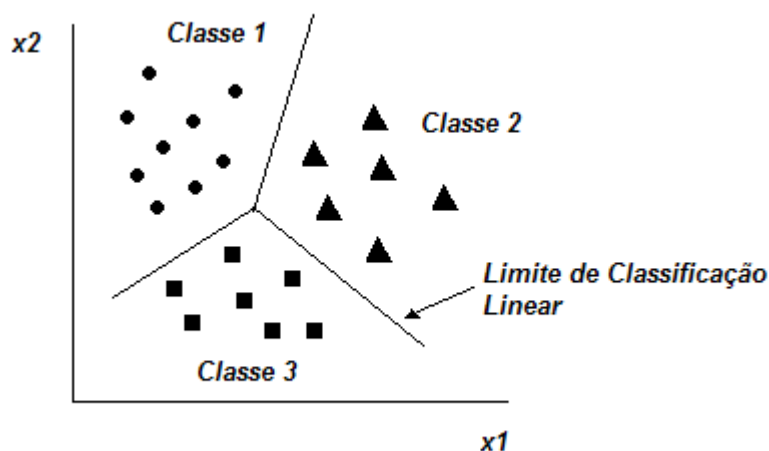


Figura 2. Segmentação Baseada em *Clusters*

3.2.3 Métodos de Segmentação Por Região

- Crescimento de Região: é um procedimento que agrupa *pixels* ou sub-regiões em regiões maiores baseadas em algum critério pré-definido [10].
- *Split* e *Merge*: as técnicas de segmentação de imagens por *split* e *merge* são baseadas na representação dos dados na *quad tree* onde um segmento quadrado da imagem é dividido (*split*) em quatro quadrantes se o segmento original da imagem é não-uniforme em algum atributo. Se quatro quadrados vizinhos são uniformes, eles são substituídos (*merge*) por um único quadrado composto pelos quatro quadrados adjacentes [32].
- *Watershed*: essa técnica se baseia no princípio de “inundar” relevos topográficos, onde os níveis de cinza de uma imagem podem ser vistos como relevos topográficos constituídos por vales, que representam as áreas mais escuras da imagem, e por montanhas, que representam as áreas mais claras [32,34,38].

3.3 K-médias

O algoritmo de k-médias é um algoritmo de segmentação baseado em *clustering* [28,31]. Seu funcionamento se dá a partir dos seguintes passos [14]:

1. Inicialização: são escolhidos valores aleatórios para os centros iniciais; a única restrição é que estes valores iniciais sejam diferentes.
2. Amostragem: nesse passo são calculadas as distâncias entre cada ponto e os centros.
3. Similaridade: os pontos são classificados de acordo com sua distância dos centros de cada classe. O ponto que estiver mais próximo de um centro vai pertencer à classe representada por ele.

$$C_i = \min_{1 \leq i \leq n} \left\{ \left\| \vec{x} - \vec{w}_i \right\| \right\}$$

onde:

C_i representa a classe “vencedora”

\vec{x} representa o vetor de entrada (pixel)

w_i constitui o centróide que representa a classe C_i

4. Atualização: os centros são atualizados. É calculada a média de cada atributo dos pontos para cada classe que possui mais de um ponto. Esse será o novo valor do centro:

$$w_{i,j}(t+1) = \begin{cases} w_{i,j}(t) + \eta[x_j - w_{i,j}(t)] & , i = t \\ w_{i,j}(t) & , i \neq t \end{cases}$$

onde:

η representa a taxa de aprendizado, $0 < \eta < 1$.

5. Repetição: o algoritmo retorna ao passo 2 e continua até que não haja mudanças nos centros.

As desvantagens para o uso do k-médias são [28]:

- O usuário precisa informar a quantidade de centros;
- A abordagem usada no algoritmo tende a soluções não-ideais

3.4 Observações Conclusivas

Nesse capítulo foram apresentados métodos referentes à segmentação de imagens bem como o funcionamento de um algoritmo de segmentação baseado em *clustering*: o k-médias que foi utilizado nos experimentos práticos presentes no capítulo seguinte.

Capítulo 4

Classificação de Macrófagos em Imagens de Imuno-Histoquímica

4.1 Introdução

Neste capítulo é apresentada uma solução para o problema de identificação de macrófagos em imagens de imuno-histoquímica, utilizando processamento de imagens e reconhecimento de padrões. Serão abordados os parâmetros utilizados na realização dos experimentos que visaram a elaboração de um *plugin* para a ferramenta ImageJ com o objetivo de fornecer a profissionais de saúde, em particular patologistas, subsídios para uma análise objetiva de imagens patológicas obtidas através de processos de imuno-histoquímica. Serão apresentados também resultados obtidos com a execução da solução proposta bem como a apresentação da ferramenta ImageJ.

Para a realização dos experimentos foram utilizadas imagens de amostras histológicas de pulmões e placentas de neomortos obtidas a partir do banco de imagens utilizado no projeto “Implantação da Unidade Laboratorial de Apoio ao Diagnóstico das Infecções Congênitas Transplacentárias”, financiado pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) de 1999 a 2000 e coordenado pelo Dr. Antonio Fernando de Sousa Bezerra [39].

Os experimentos envolveram dois grupos distintos de imagens: um com uma aproximação maior onde buscou-se o cálculo de medidas referentes aos macrófagos e outro grupo com imagens com uma aproximação menor com o objetivo de realizar contagem de células doentes. Em ambos os grupos foram realizadas segmentações de imagens utilizando o algoritmo de k-médias, variando-se o número de classes

entre 5, 10 e 15 (valores obtidos empiricamente), seguidos por uma binarização com limiar definido pelo usuário em cada execução do código e por fim o cálculo de medidas de interesse como área, perímetro, fator de forma. Além disso, foram realizados ajustes de contraste nas imagens na tentativa de realçar as regiões de interesse.

4.2 Ferramentas Utilizadas

Todos os experimentos realizados foram feitos utilizando a ferramenta ImageJ disponível em [16], possuindo versões para os seguintes sistemas operacionais: Windows, Mac OS, Mac OS X e Linux.

O ImageJ constitui um programa em Java para processamento de imagens baseado no “NIH Image” (ferramenta desenvolvida para Macintosh para processamento de imagens). Ele pode ser executado tanto como um *applet online* como em qualquer computador possuindo a Máquina Virtual Java versão 1.4 ou superior. A figura 3 apresenta uma visão inicial da ferramenta [16].

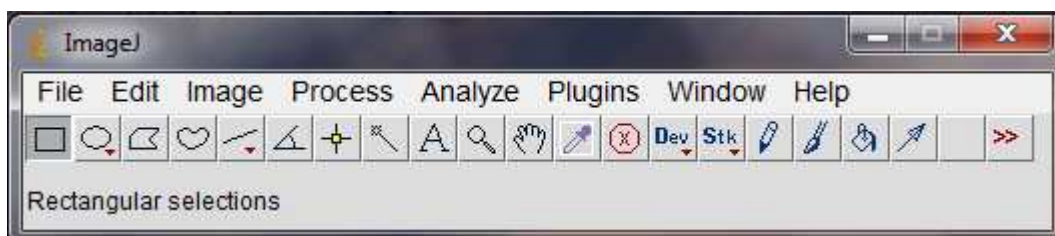


Figura 3. Tela inicial do ImageJ

Essa ferramenta permite mostrar, editar, analisar, processar, salvar e imprimir imagens com 8, 16 ou 32 bits. Ela possibilita a leitura de diversos formatos de imagens como: TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM, FITS; suporta *stacks* (pilhas) que constituem várias imagens em uma única tela. Além disso, ela é *multi-thread*, logo operações que consomem tempo como leitura de um arquivo de imagem podem ser realizadas em paralelo com outras operações [16].

O ImageJ ainda permite o cálculo da área e de valores estatísticos (Figura 4) de *pixels* selecionados pelo usuário. Ele possibilita a medição de distâncias e

ângulos e a criação de histogramas de densidade. Adicionalmente, ele suporta funções padrões de processamento de imagens como alterações no contraste, *sharpening*, suavizações, detecções de bordas, etc. [16].

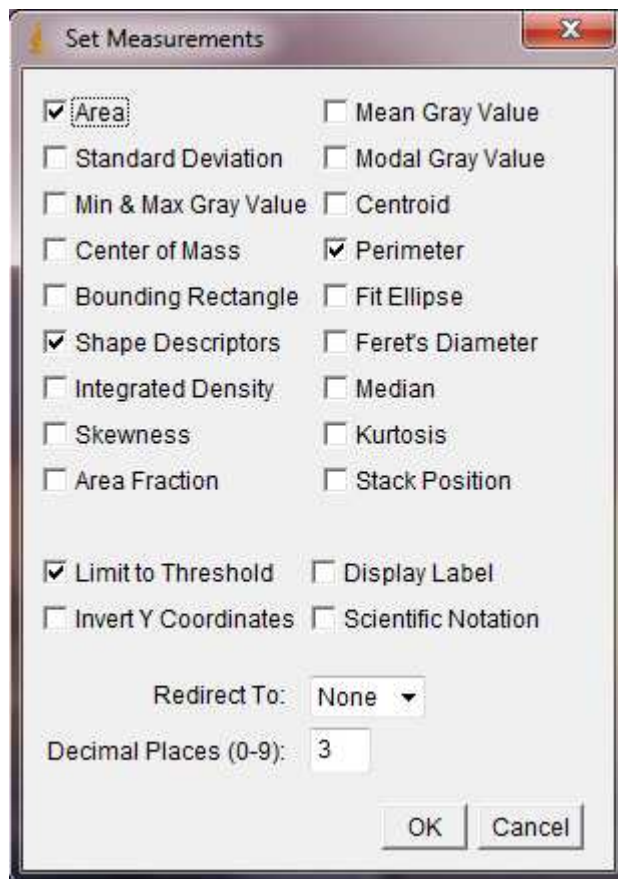


Figura 4. Opções de cálculos no ImageJ

O programa foi projetado com uma arquitetura aberta que provê extensibilidade através de *plugins* Java. Adicionalmente *plugins* para análise e processamento de imagens podem ser desenvolvidos utilizando o editor do imageJ (Figura 5) e um compilador Java. Os códigos gerados por esse editor são chamados de macros e constituem programas que automatizam uma série de comandos do ImageJ [16].

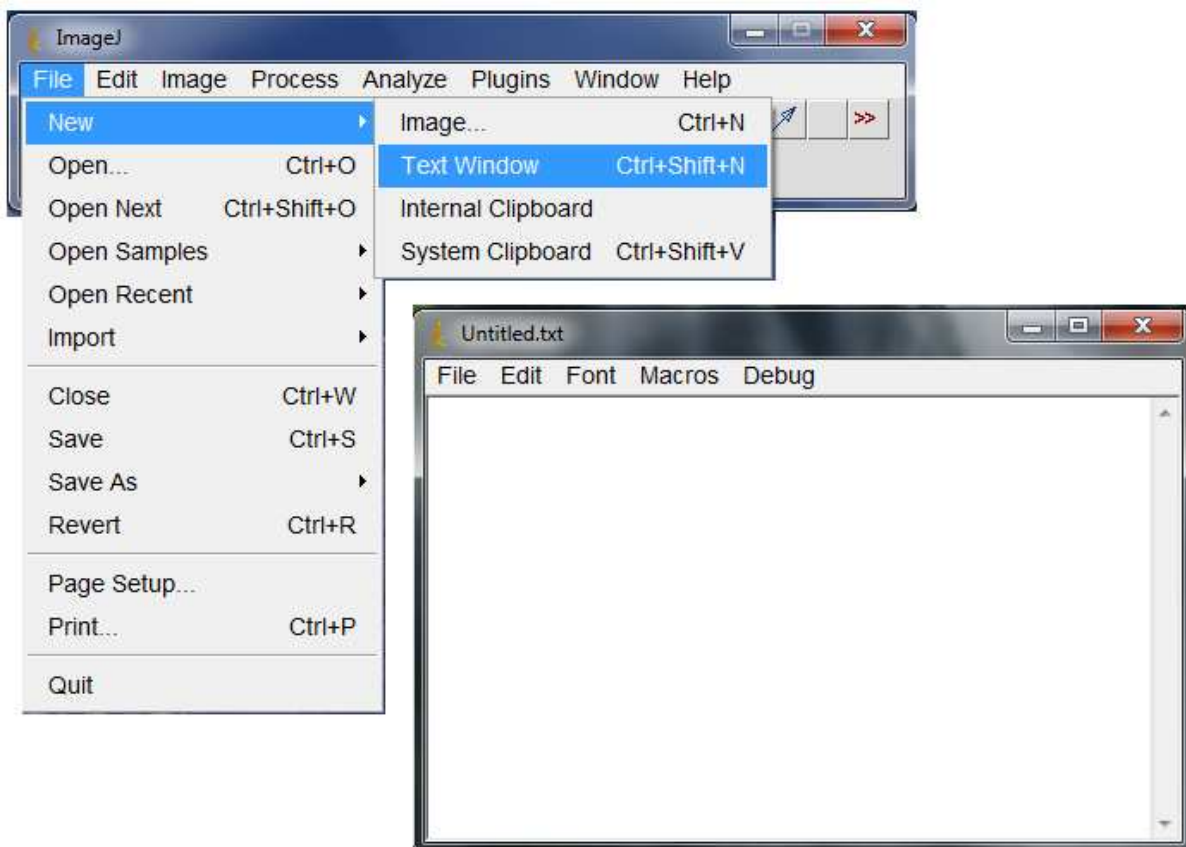


Figura 5. Editor de texto do ImageJ

4.3 *Plugin* Desenvolvido

O *plugin* desenvolvido no decorrer deste projeto utilizou o conceito de macros para a realização das suas funcionalidades que podem ser descritas como:

- Segmentação: utilizando o algoritmo de k-médias por meio de um *plugin* disponível em [15] considerando 10 classes ou *clusters*. Após a segmentação é exibida uma caixa de diálogo solicitando que o usuário escolha uma região que melhor caracterize um macrófago, como mostrado na Figura 6.



Figura 6. Execução do *Plugin*

- Binarização: a partir dos valores RGB (*Red*, *Green* e *Blue*) que foram capturados após o usuário escolher uma área que represente os macrófagos são definidos limiares para binarização com base nesses valores. Os *pixels* que possuírem os 3 valores em RGB receberão a cor preta e os demais a cor branca.
- Rotulação/Numeração dos Elementos: após a etapa da binarização, as estruturas com tamanhos pequenos (menores que 100 *pixels* para as imagens com *zoom* maior e menores que 50 *pixels* para as imagens com *zoom* menor) são eliminadas pois não possuem relevância na análise. As demais estruturas são numeradas para a realização dos cálculos na etapa seguinte.

- Cálculo/Contagem dos Elementos: por fim o *plugin* realiza os cálculos referentes a área, perímetro e descritores de forma nas imagens com *zoom* maior ou a contagem de macrófagos nas imagens com *zoom* menor.

4.4 Resultados

Nessa seção serão apresentados os resultados obtidos com a execução do *plugin*. Imagens histológicas com uma aproximação (*zoom*) maior são mostradas nas figuras 7, 12 e 17, seguidas pelas imagens segmentadas nas figuras 8, 13 e 18 respectivamente, pelas imagens binárias nas figuras 9, 14 e 19 respectivamente, pelos resultados finais nas figuras 10, 15 e 20 respectivamente e pelos cálculos referentes às imagens nas figuras 11, 16 e 21. Analogamente imagens histológicas com uma aproximação menor são mostradas nas figuras 22, 27 e 32, seguidas pelas imagens segmentadas nas figuras 23, 28 e 33, pelas imagens binárias nas figuras 24, 29 e 34, pelos resultados finais nas figuras 25, 30 e 35 e pelos cálculos referentes às imagens nas figuras 26, 31 e 36.

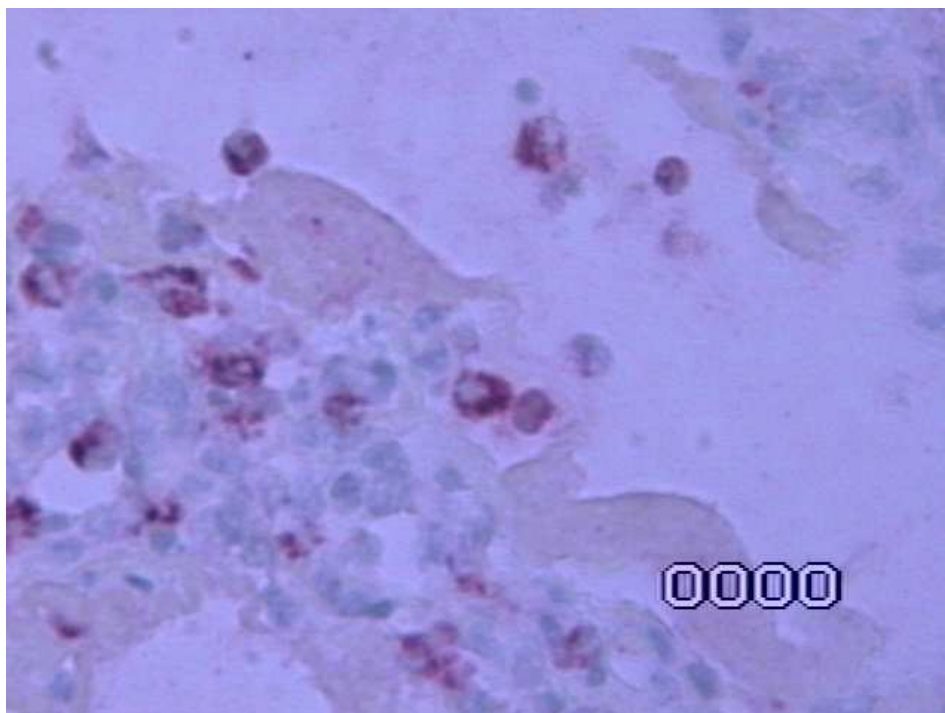


Figura 7. Imagem Original

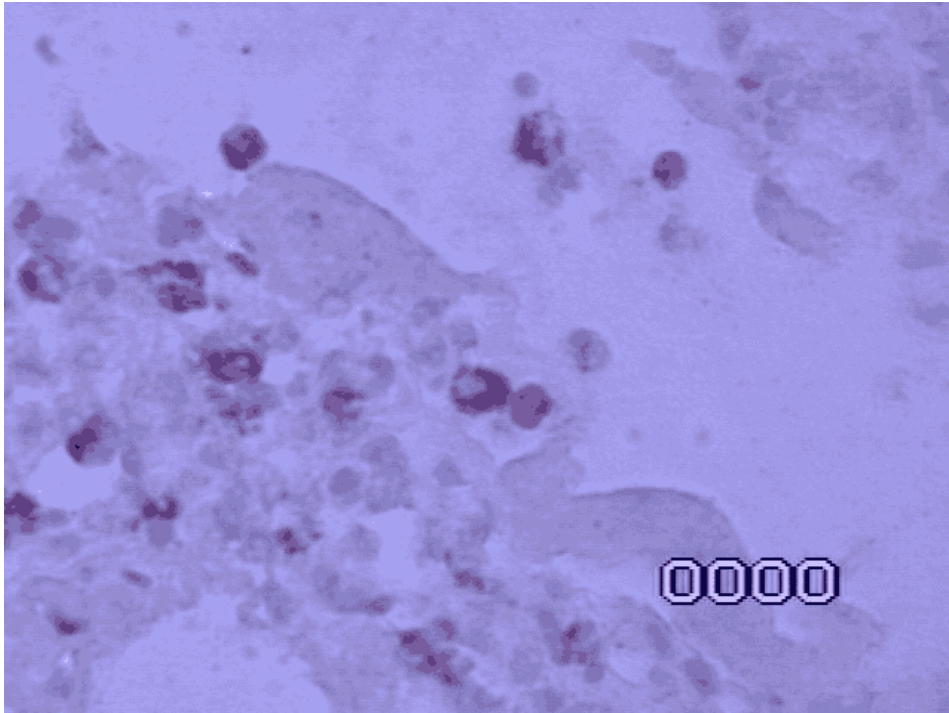


Figura 8. Imagem segmentada utilizando $k=10$

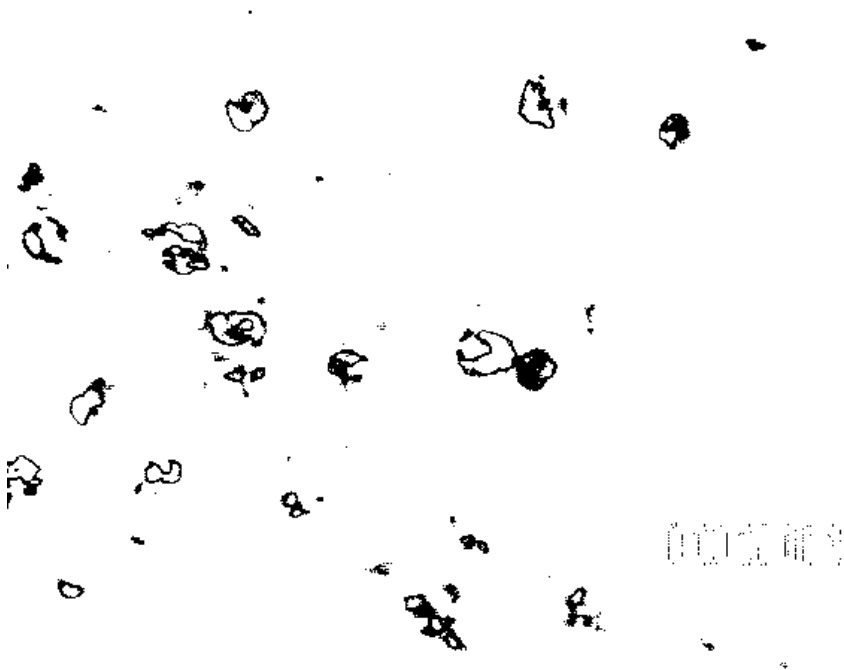


Figura 9. Imagem binarizada



Figura 10. Resultado final

	Area	Perim.	Circ.	AR	Round	Solidity
1	270	103.640	0.316	1.476	0.678	0.444
2	257	218.735	0.068	1.183	0.845	0.418
3	282	77.740	0.586	1.181	0.846	0.728
4	187	63.841	0.577	1.721	0.581	0.803
5	126	54.184	0.539	2.583	0.387	0.720
6	564	217.279	0.150	1.543	0.648	0.459
7	225	93.397	0.324	2.098	0.477	0.481
8	460	293.848	0.067	1.697	0.589	0.478
9	869	258.635	0.163	2.338	0.428	0.439
10	305	113.054	0.300	1.016	0.984	0.583
11	102	51.598	0.481	1.315	0.760	0.648
12	232	116.024	0.217	1.806	0.554	0.401
13	148	87.497	0.243	1.605	0.623	0.400
14	137	65.012	0.407	1.714	0.584	0.579
15	126	59.012	0.455	2.396	0.417	0.698
16	219	119.581	0.192	1.591	0.629	0.504
17	503	157.823	0.254	2.861	0.350	0.575

Figura 11. Medições referentes à imagem



Figura 12. Imagem Original

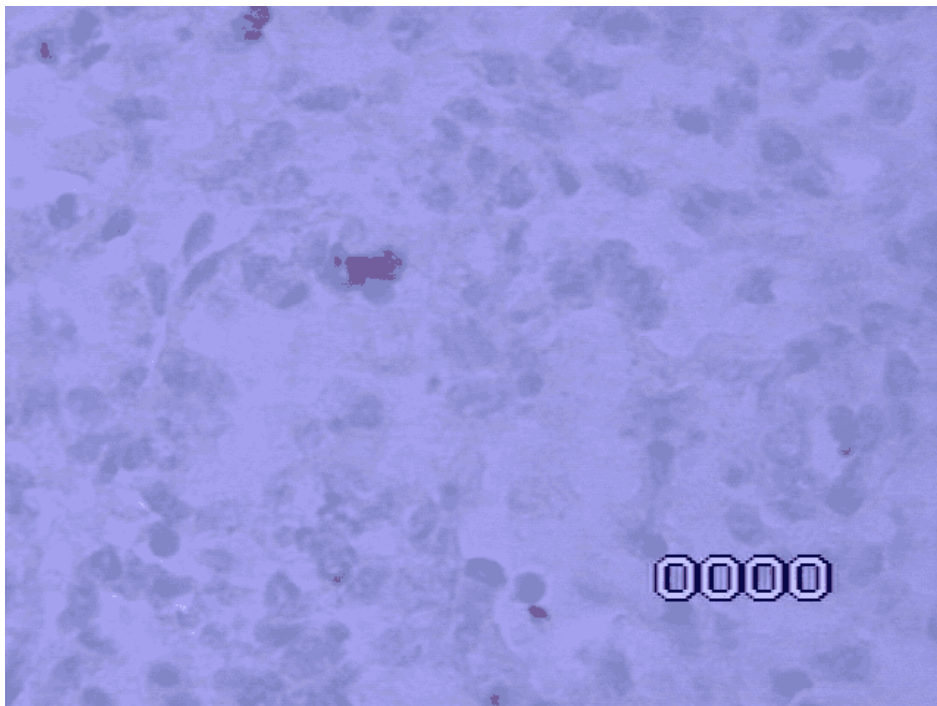


Figura 13. Imagem segmentada utilizando $k=10$

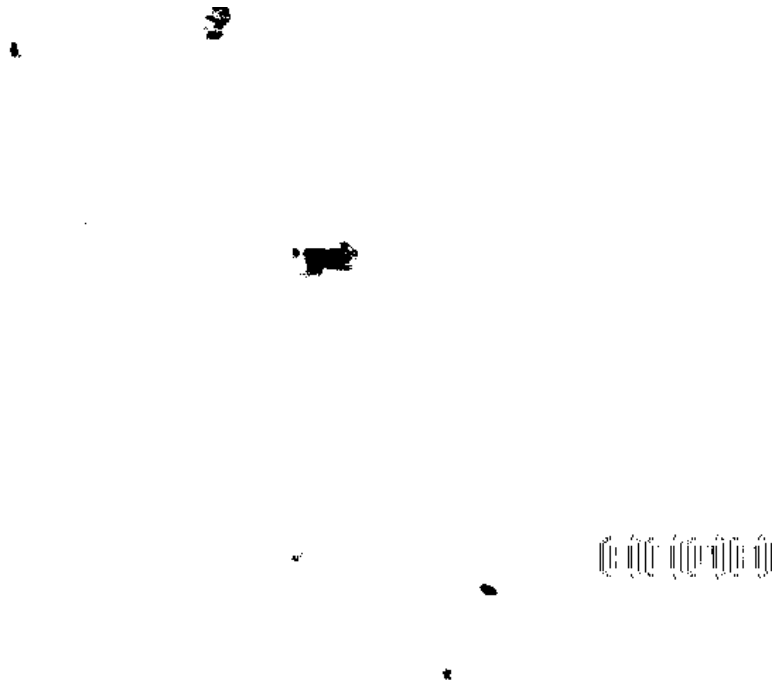


Figura 14. Imagem binarizada



Figura 15. Resultado Final

	Area	Perim.	Circ.	AR	Round	Solidity
1	571	132.711	0.407	2.005	0.499	0.754

Figura 16. Medições referentes à imagem

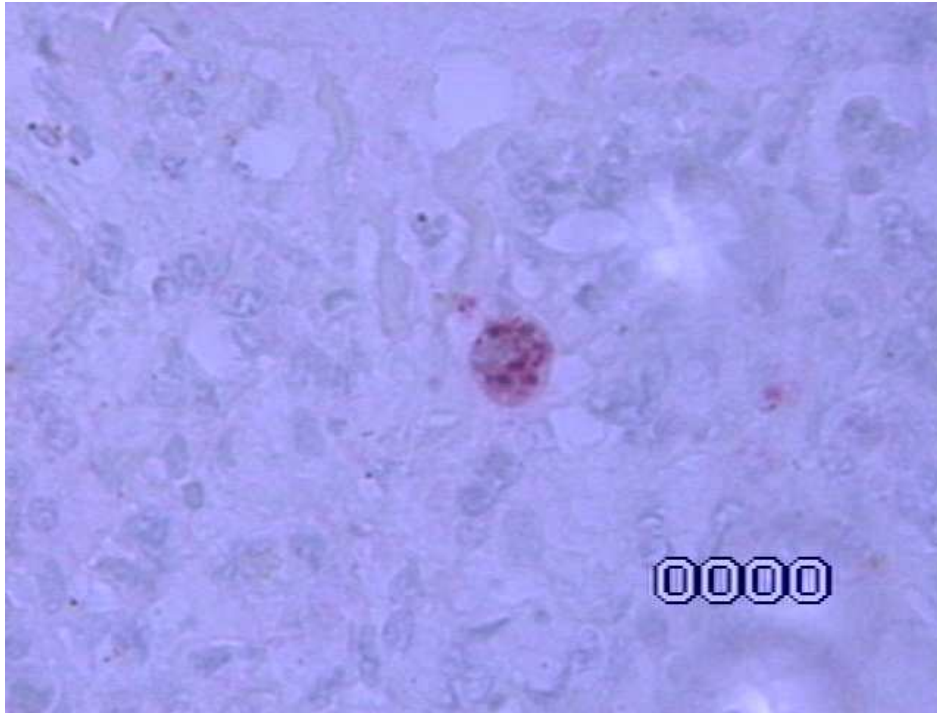


Figura 17. Imagem original

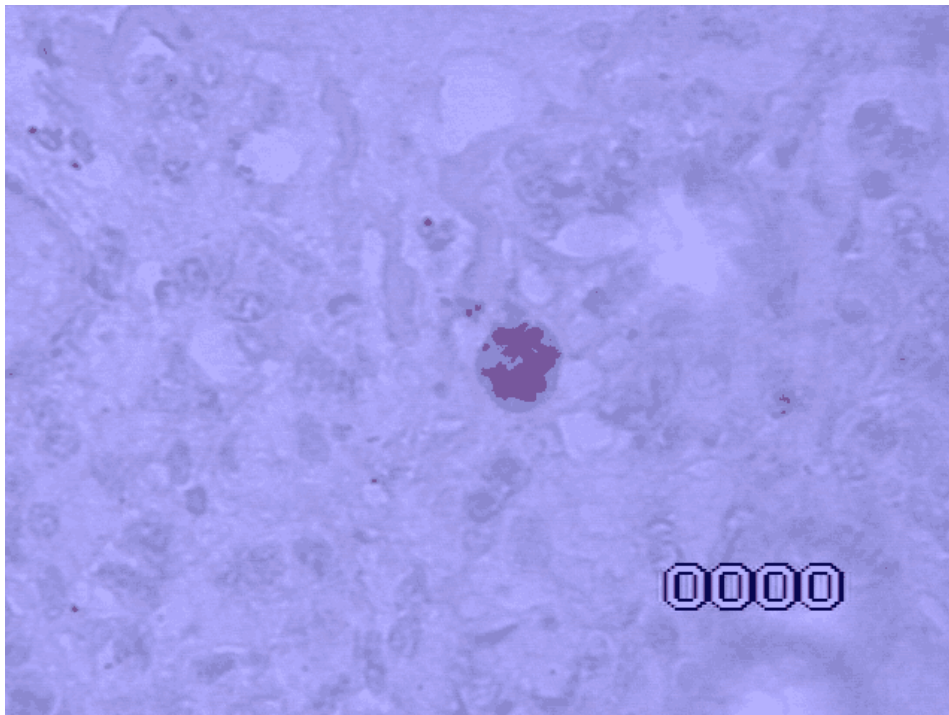


Figura 18. Imagem segmentada utilizando $k=10$

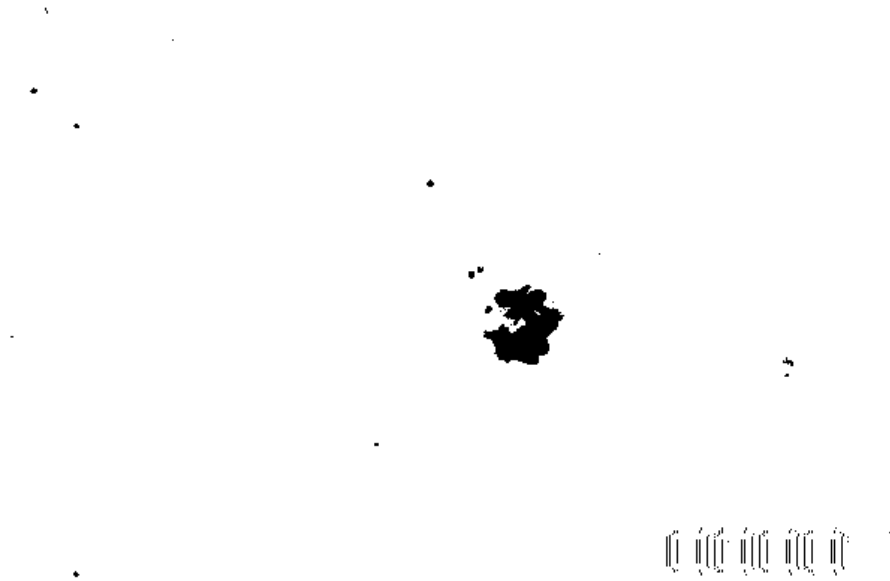


Figura 19. Imagem binarizada



Figura 20. Resultado final

	Area	Perim.	Circ.	AR	Round	Solidity
1	1636	261.120	0.302	1.242	0.805	0.761

Figura 21. Medições referentes à imagem



Figura 22. Imagem original



Figura 23. Imagem segmentada utilizando k=10

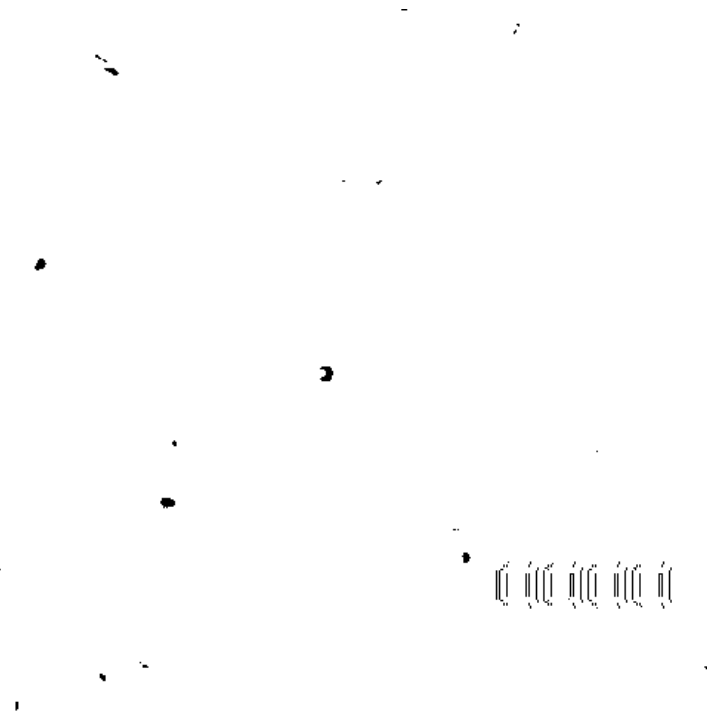


Figura 24. Imagem binarizada

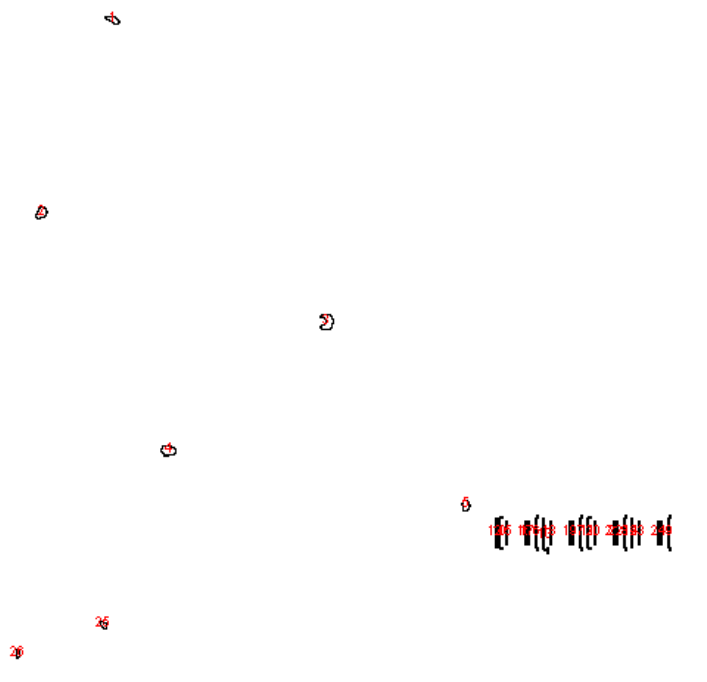


Figura 25. Resultado Final

Slice	Count	Total Area	Average Size	Area Fraction
Cluster centroid values	26	639.000	24.577	0.2

Figura 26. Contagem de células



Figura 27. Imagem original

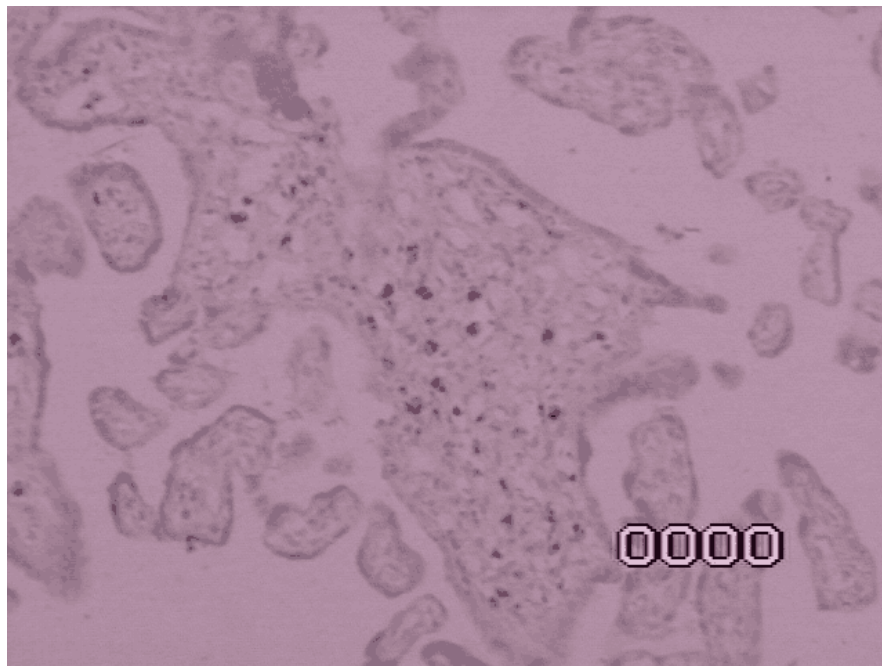


Figura 28. Imagem segmentada utilizando $k=10$

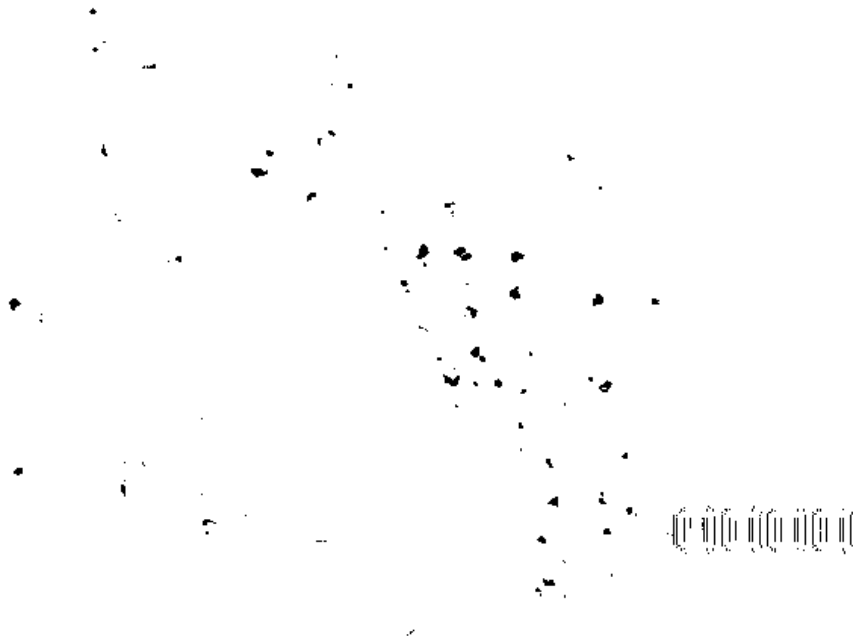


Figura 29. Imagem binarizada

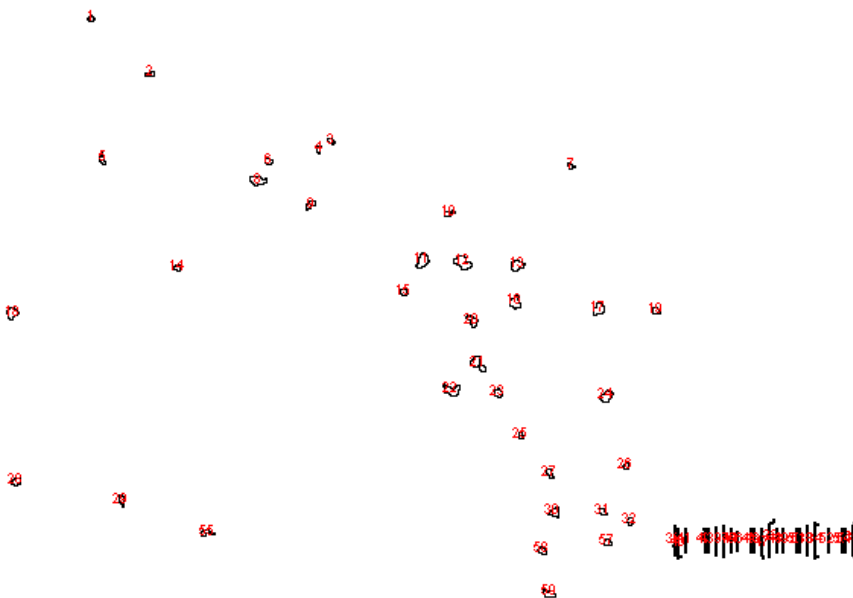


Figura 30. Resultado Final

File	Edit	Font			
Slice	Count	Total Area	Average Size	Area Fraction	
Cluster centroid values	59	1331.000	22.559	0.4	

Figura 31. Contagem de células



Figura 32. Imagem original

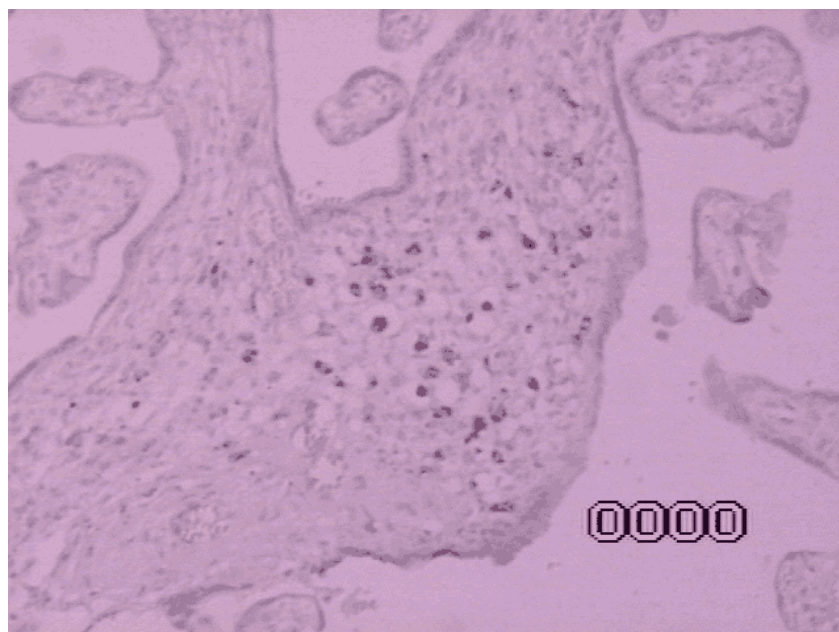


Figura 33. Imagem segmentada utilizando $k=10$

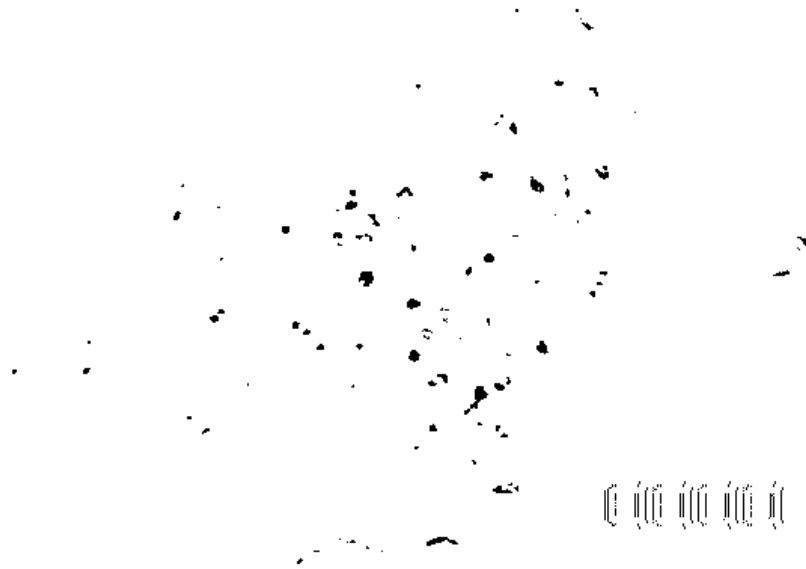


Figura 34. Imagem binarizada

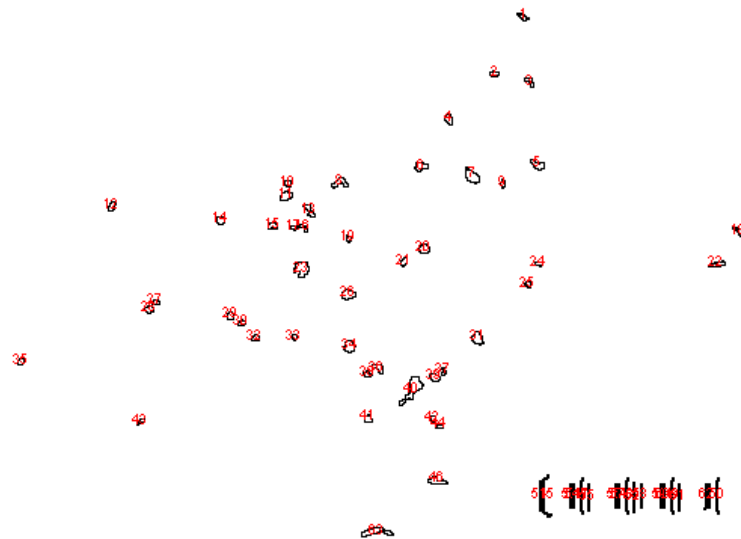


Figura 35. Resultado Final

File	Edit	Font			
Slice	Count	Total Area	Average Size	Area Fraction	
Cluster centroid values	63	1534.000	24.349	0.5	

Figura 36. Contagem de células

4.5 Discussão dos Resultados

A análise geral das imagens com a utilização da ferramenta ImageJ incrementada com o *plugin* desenvolvido tem potencial para o uso na identificação e no cálculo de medidas, tais como área e perímetro de imagens histológicas de placenta e pulmão. No entanto, verificou-se que não foi possível eliminar as marcações presentes no canto inferior direito das imagens, o que afeta a contagem de células, mas elas podem ser eliminadas manualmente pelo analista. Uma outra alternativa seria eliminar automaticamente essas marcações da imagem original, para que, no processo de aquisição de imagens, não sejam inseridas informações a cerca da captura na própria imagem, dado que diversos formatos de imagem utilizados em medicina, como o formato DICOM, permitem a inserção de informação textual, sem prejuízo da visualização e da análise por imagem.

Na fase de pré-processamento, foram aplicadas mudanças de contraste nas imagens para realçar os macrófagos. No entanto, após a análise dos resultados, verificou-se que o realce ocorreu apenas em um número pequeno de imagens. Por esse motivo optou-se em não realizar essas alterações, realizando os experimentos com os níveis de contraste padrões de cada imagem.

Nos experimentos realizados variou-se o número de classes no algoritmo de k-médias entre 5, 10 e 15 classes, e após a análise dos resultados foram verificados melhores resultados na utilização de 10 classes. Algumas imagens apresentaram resultados mais satisfatórios no que se refere à identificação dos macrófagos quando submetidas à segmentação utilizando 5 e 15 classes. Contudo, não apresentaram uma quantidade maior de resultados favoráveis, se comparados aos resultados anteriores.

No quesito referente à binarização, a proposta inicial apresentava um algoritmo que realizaria a mesma de forma automática sem a intervenção do usuário. Entretanto, devido aos níveis de coloração diferentes nas imagens, essa automatização não apresentou resultados que pudessem ser generalizados e, assim, aplicados às outras imagens do banco, levando à escolha de um limiar variável para a binarização definido pelo usuário a cada execução do código.

Em outras palavras, após diversos experimentos chegou-se a definição do algoritmo proposto como constituído de um código que realiza análises em imagens com contraste nativo de cada uma, com um limiar de binarização variável e realizando a segmentação utilizando o algoritmo de k-médias com 10 classes.

Capítulo 5

Conclusão e Trabalhos Futuros

A realização dos experimentos propostos no decorrer deste trabalho mostrou que o descarte de imagens feito pelos patologistas devido a padrões de cores não condizentes com o esperado, nem sempre deve ser considerado, pois através de técnicas computacionais, imagens inicialmente consideradas impróprias para análise apresentaram resultados satisfatórios no quesito de identificação de macrófagos e cálculo de medidas referentes aos mesmos.

É importante ressaltar que para um resultado final mais preciso torna-se necessária uma aprendizagem por parte dos patologistas na geração das imagens, pois as marcações presentes nas mesmas alteraram o resultado final, sendo esta a principal dificuldade encontrada durante o desenvolvimento deste projeto.

Como trabalho futuro, sugere-se uma etapa mais rigorosa de pré-processamento nas imagens visando melhorar a qualidade das mesmas e o destaque das estruturas de interesse. Além disso, sugere-se o desenvolvimento de um processo que realize a limiarização de maneira automática, sem que seja necessária a intervenção do usuário. Também é sugerida a utilização de um método de classificação como redes neurais que permitam analisar as imagens e classificar os macrófagos identificados em grupos que caracterizem doenças em estágios iniciais, intermediários e avançados.

Bibliografia

- [1] ALBUQUERQUE, V. H. C.; *et al.* Sistema de segmentação de imagens para quantificação de microestruturas em metais utilizando redes neurais artificiais. **Matéria (Rio J.)**, v. 12, n. 2, p. 394-407. 2007.
- [2] ALVES, V. A. F.; BACCHI, C. E.; VASSALO, J. **Manual de imuno-histoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.
- [3] BAAK, J. P. A. **Manual of quantitative pathology in cancer diagnosis and prognosis**. New York: Springer Verlag, 1991.
- [4] BARTELS, P. H., MARCHEVSKY, A. M., **Image Analysis. A primer for pathologists**. New York: Raven Press, 1994.
- [5] BECKER, H. C.; *et al.* Digital Computer Determination of a Medical Diagnostic Index Directly from Chest X-ray Images, **IEEE Trans. Biomedical Engineering**, v. BME-11, p. 67–72. 1964.
- [6] CARNEIRO, J., JUNQUEIRA, L. C., **Histologia Básica texto | atlas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- [7] CASTLEMAN, K. R. **Digital image analysis**. Englewood Cliffs. N.J.: Prentice-Hall; 1979.
- [8] **Fonte M.D. - Aplicações da imuno-histoquímica**. Disponível em: <<http://www.fontemd.com.br/ihq2.html>> Acesso em: 17 de agosto de 2009.
- [9] GIL, J.; MARCHEVSKY, A. M.; SILAGE, D. A. Applications of computerized interactive morphometry in pathology: Tracings and generation of graphic Standards. **Lab Invest**, v. 54, n. 2, p. 222-227. 1986.
- [10] GONZALEZ, R. C. and WOODS, R. E. **Digital Image Processing**, 2. ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice-Hall, 2002.
- [11] GRIFFITHS, A. J. F., *et al*, **Introdução à genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

- [12] HAMILTON, P. W. **Quantitative Clinical Pathology**. USA: Blackwell-Science Press, 1997. 342 p.
- [13] HAMILTON, P. W.; ALLEN, D. C. Morphometry in histopathology. **The Journal of Pathology**, v. 175, n. 4, p. 369-379. 1995.
- [14] HAYKIN, S. **Neural Networks a Comprehensive Foundation**, Prentice Hall, 1999.
- [15] **IJ Plugins: Clustering**. Disponível em <<http://ij-plugins.sourceforge.net/plugins/clustering/index.html>> Acesso em: 14 de novembro de 2009.
- [16] **ImageJ**. Disponível em <<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>> Acesso em 14 de novembro de 2009.
- [17] JAFFER, S.; BLEIWEISS, I. Beyond hematoxylin and eosin – the role of immunohistochemistry in surgical pathology. **Cancer Invest**, v. 22, n. 3, p. 445-465. 2004.
- [18] KRUGER, R. P.; *et al.* Radiographic Diagnosis via Feature Extraction and Classification of Cardiac Size and Shape Descriptors, **IEEE Trans. Biomedical Engineering**, v. BME-19, p. 174–186. 1972.
- [19] LAMBERT, W. C.; LAPIDUS, A.; RAO, B. K. Melanoma diagnosis by computerized analysis of clinical images. **Archives of Dermatology**, v. 137, n. 3, p. 377-378, 2001.
- [20] LEONG, A. S.; WRIGHT, J. The contribution of immunohistochemical staining in tumor diagnosis. **Histopathology**, v. 11, n. 12, p. 1295-1305, 1987.
- [21] LIMA, F. O.; *et al.* Regiões organizadoras nucleolares argirofílicas no sarcoma sinovial. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n. 5, 2005.

- [22] LOPES-PAULO, F. Emprego da estereologia em pesquisas colorretais. **Revista Brasileira de Colo-Proctologia**. Rio de Janeiro, v. 22, n. 2, p. 73-76, 2002.
- [23] MANGINI, J.; LI, N.; BHAWAN, J. Immunohistochemical markers of melanocytic lesions. A review of their diagnostic usefulness. **The American journal of dermatopathology**, v. 24, n. 3, p. 270-281. 2002.
- [24] MARCHEVSKY, A. M.; GIL, J. Applications of computerized interactive morphometry in pathology. II: A model for computer generated “diagnosis.” **Lab Invest**, v. 54, n. 6, p. 708-716. 1986.
- [25] MARCHEVSKY, A. M.; HAUPTMAN, E.; GIL, J.; WATSON, C. Computerized interactive morphometry as an aid for the diagnosis of pleural effusions. **Acta Cytol**, v. 31, n. 2, p.131-136. 1987.
- [26] MARCHEVSKY, A. M.; GIL, J.; CACCAMO, D. Computerized interactive morphometry as a potentially useful tool for the distinction between malignant mesothelioma and mesothelial hyperplasia in pleural biopsies. **Arch Pathol Lab Méd**, v. 109, p. 1102-1105. 1985.
- [27] MELO-JÚNIOR, M. R.; *et al.* Análise Digital de Imagens em Patologia – A Interface com a Engenharia Biomédica. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 22, n. 3, p. 239-242, dezembro 2006.
- [28] NETO, E. B. M. **Aplicando a programação evolucionária na segmentação de imagens**. 2009. 47 f. Trabalho de Conclusão de Curso de Engenharia da Computação, Universidade de Pernambuco, Recife.
- [29] NETO, R. T.; *et al.* Avaliação do índice mitótico e numero de células bi e multinucleadas dos mastocitomas cutâneos caninos no exame citopatológico. **Vet. e Zootec.** supl. ao v. 15, n.3, dez., p.25-28, 2008.
- [30] OBERHOLZER, M.; *et al.* Methods in quantitative image analysis, **Histochemistry and cell biology**, v. 105, n. 5, p. 333-355. 1996.

- [31] OMRAN, M.; ENGELBRECHT, A.; SALMAN, A. Particle Swarm Optimization Method for Image Clustering, **International Journal of Pattern Recognition and Artificial Intelligence**, v.19, n. 3, p. 297–322. 2005.
- [32] PRATT, W. K. **Digital Image Processing: PIKS Inside**, 3. ed. Nova York: John Wiley & Sons, Inc, 2001.
- [33] RASHBASS, J. The impact of information technology on histopathology, **Histopathology**, v. 36, n. 1, p. 1-7. 2000.
- [34] ROERDINK, J. B.; MEIJSTER, A. **A disjoint set algorithm for the watershed transform**. In EUSIPCO'98 - IX European Signal Processing Conference, 1998, Island of Rhodes, Greece. p. 1665–1668.
- [35] ROSAI, J. **Surgical Pathology**. 8. ed. Nova York: Mosby-Year Book, 1996.
- [36] RUBIO, C. A.; MAY, I. A Method for quantitating the nuclear area of gastric polyps using image analysis. **Anal Quant Cytol Histol**, v. 12, n. 2, p. 117-121. 1990.
- [37] RUBIO, C. A.; PORWIT, M. A. A Method to quantitate the relative nuclear area of colorectal polyps by image analysis. **Anal Quant Cytol Histol**, v. 13, n. 3, p. 155-158. 1991.
- [38] RUSS, J. C. **The Image Processing Handbook**. 3. ed. Boca Raton, Flórida: CRC Press, 1998.
- [39] SANTOS, W. P. **Análise Digital de Imagens em Patologia: Ferramentas de Morfologia Matemática e Lógica Fuzzy**. New York: CreateSpace, 2009.
- [40] SMOLLER, B. R. **Practical immunopathology of the skin**. Totowa: Humana Press, 2002.
- [41] TAYLOR, C. R.; COTE, R. J. **Immunomicroscopy: a diagnostic tool for the surgical pathologist**. Nova York: WB Saunders, 1994.
- [42] TRUE, L. D. Morphometry applications in anatomic pathology. **Human Pathology**, v. 27, n. 5, p. 450-467. 1996.

- [43] VAN DER HEIDJEN, F. **Image based Measurement Systems Object Recognition and Parameter Estimation**. Inglaterra: John Wiley & Sons Ltd, 1994. 348 p.
- [44] WERNER, M.; *et al.* Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 24, n. 7, p. 1016-1019. 2000.

Apêndice A

Análise Morfométrica

Morfometria é um termo geral que tem sido usado largamente que inclui vários métodos quantitativos utilizados para análise de células e tecidos. Ele foi definido como a "descrição quantitativa de uma estrutura". Baak *et al.* (1991) [3,4] definiram o termo morfometria como a reunião de métodos designados para a medida geométrica de atributos de células e de tecidos. Na prática, o termo é normalmente aplicado à técnicas quantitativas que medem características referentes à tamanho, forma, e textura em duas dimensões e/ou relações espaciais de estruturas celulares ou teciduais [4].

A análise morfométrica de imagens vem sendo utilizada em Patologia desde muito antes da popularização do uso dos microcomputadores no laboratório biomédico e patológico [39].

A maioria dos métodos desenvolvidos para a medição em tempo real de imagens microscópicas com sistemas computadorizados baseados em vídeo envolve a quantificação de estruturas com duas dimensões e são portanto morfométricas. É importante para os patologistas entender as diferenças entre uma estrutura real a ser medida (células, núcleos, ou nucléolos), as medidas morfométricas obtidas de imagens com duas dimensões daquela estrutura (perímetro, área, textura), e estimativas tri-dimensionais calculadas por técnicas estereológicas (métodos desenvolvidos para estimar características geométricas de estruturas tri-dimensionais de células e tecidos como, por exemplo, o volume, a partir de imagens bi-dimensionais utilizando axiomas matemáticos e fórmulas baseadas na probabilidade) [4].

Os estudos morfométricos podem ser realizados de várias formas como, por exemplo, utilizando-se [4]:

- i. Micrômetro e grades oculares (provavelmente os dispositivos mais simples e mais largamente usados nos estudos morfométricos):

consistem em régua calibradas ou grades compostas de círculos concêntricos, quadrados, ou outras estruturas geométricas de dimensões conhecidas.

- ii. Projeção usando câmara lúcida³: o procedimento consiste em projetar uma imagem em uma superfície plana e traçar seus contornos.
- iii. Sobreposições gráficas: consiste em sobrepor a imagem com folhas de plástico transparentes com marcadores com múltiplos pontos colocados em distâncias específicas.
- iv. Mesas digitalizadoras: consistem em um microcomputador, um periférico interativo (mesa digitalizadora com um sensor eletromagnético acoplado a uma espécie de mouse denominada *hand-held puck*) e um dispositivo para visualizar as imagens de interesse.
- v. Sistemas de análise de imagens baseado em vídeo: as medições são realizadas em imagens digitais com o auxílio do computador ao invés de representações gráficas ou outras características geométricas.

Os sistemas computacionais foram utilizados inicialmente para substituir as grades oculares. Logo, é comum encontrar *softwares* de análise médicas dotados de grades, permitindo ao patologista ou biomédico realizar as análises extraindo atributos da maneira tradicional [39].

Atualmente, os atributos são extraídos automaticamente e muitos desses atributos não têm necessariamente uma interpretação tangível do ponto de vista biológico ao patologista ou biomédico [39].

Um diagrama em blocos genéricos de um sistema de análise morfométrica é exibido na figura 37 [39].

³ Um aparelho surgido no início do século XIX, que permite, através de um prisma, ver simultaneamente o objeto que se deseja representar e a folha em que será feito o desenho.

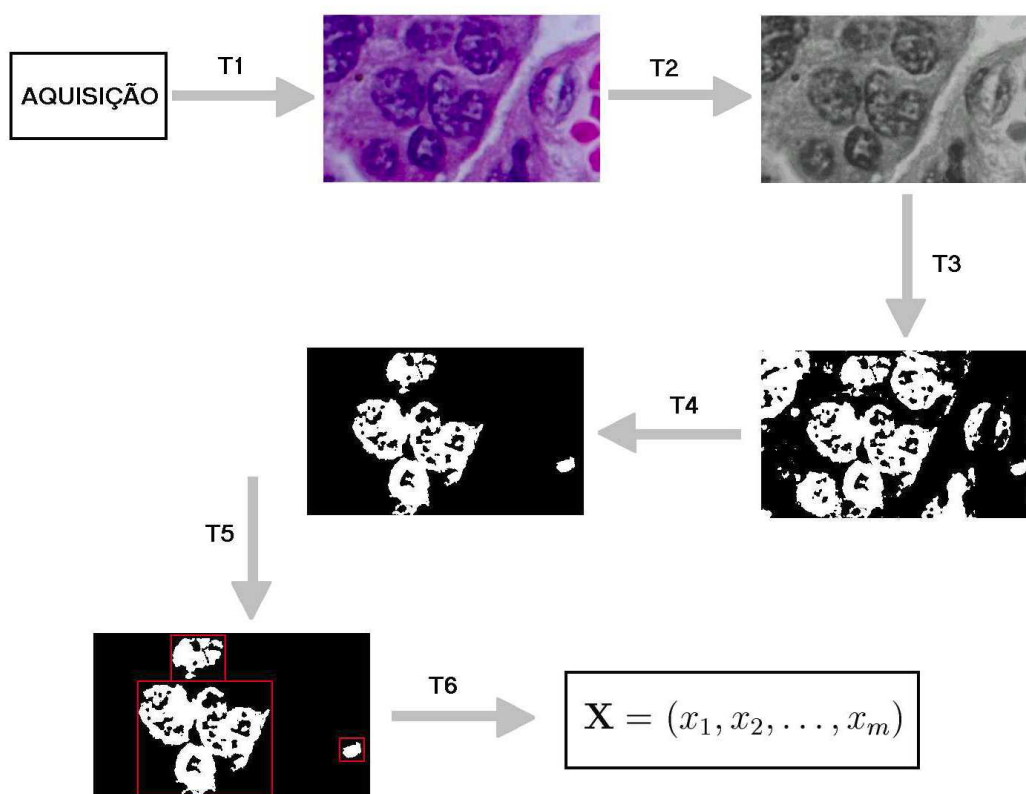


Figura 37. Diagrama em blocos do processamento envolvido em um sistema de análise morfométrica [39]

Após realizar a aquisição da imagem (transformação T1, ver figura 1), obtém-se uma imagem colorida, que no caso da figura é uma amostra histológica de carcinoma (tumor maligno epitelial ou glandular) de mama. Gera-se então uma imagem em níveis de cinza, que pode ser simplesmente a seleção de uma das bandas presentes na imagem original ou sua intensidade (transformação T2). No exemplo da figura extrai-se a intensidade da imagem original. Depois realiza-se a binarização segundo o método mais adequado (transformação T3). É realizada então uma segmentação, a qual consiste na geração de uma outra imagem contendo apenas os elementos de interesse para a análise (transformação T4). A seguir é feito o janelamento (transformação T5), o qual busca as componentes conectadas (estruturas ligadas na imagem), separa-as em janelas para depois serem medidas (transformação T6), gerando um vetor de atributos. Esse último processo é a extração de atributos propriamente dita [39]. Os atributos mais comuns são [4]:

- i. Área: medida pela soma dos *pixels* contidos no interior do espaço demarcado pela borda do objeto, incluindo a mesma, multiplicada pela área calibrada de cada *pixel* [9,24,25,26,36,37]. Também pode ser calculada por um método trapezoidal que primeiro divide as bordas em pequenos triângulos que unem cada ponto da borda amostrado e então aplica o Teorema de Green (que relaciona a integral de linha ao longo de uma curva fechada no plano com a integral dupla sobre a região limitada por essa curva).
- ii. Perímetro: comprimento da borda de um objeto em unidades de medida [7]. É normalmente calculado pela soma dos comprimentos de segmentos de linha que contém o polígono demarcando a imagem segmentada.
- iii. Diâmetro: distância entre duas linhas paralelas desenhadas tangencialmente em lados opostos de uma borda de um objeto.
- iv. Largura: definida como o menor diâmetro perpendicular ao comprimento
- v. Comprimento: o maior diâmetro correspondente ao eixo longo de um objeto.
- vi. Fator de forma: descreve a forma de um núcleo celular e outros objetos.
- vii. Textura: propriedade que expressa a distribuição e inter-relacionamentos espaciais entre vários níveis de cinza de um objeto de interesse em uma imagem.

Apêndice B

Análise Fotomicrométrica

Fotomicrometria é uma poderosa técnica para a quantificação da concentração e distribuição relativa de qualquer substância cromógena em uma imagem microscópica. Esse método envolve a medição da intensidade da pigmentação expressada como densidade óptica [4].

A análise digital de imagens representa uma amostra de imagem como um *array* de *pixels*, normalmente com um intervalo de níveis de cinza de 0 (preto) até 255 (branco) para imagens com 8 bits. O processo de análise fotomicrométrica envolve a análise da matriz da imagem para se obter informação descrevendo a intensidade de pigmentação e distribuição espacial da amostra. Essa informação pode ser usada para determinar a concentração de pigmentos em objetos de interesse, tais como núcleos, e para avaliar características de textura de objetos [4].

A fotomicrometria pode ser baseada em vídeo, ou seja, fazendo uso do vídeo-fotômetro (aparato opto-eletrônico que consiste na junção de um microscópio óptico com uma câmera de vídeo e um sistema computacional) ou feita a partir de citômetros (aparelhos que emitem feixes de luz e medem a potência absorvida em várias partes do espectro visível (vermelho, verde, azul, por exemplo)) [39].

A partir da análise do espectro de saída, ou seja, verificando as relações entre potência absorvida e potência emitida nas referidas partes do espectro visível, obtém-se uma estimativa da presença de determinadas proteínas ou tipos de células e sua quantidade [39].

Apesar da utilização dos citômetros apresentar resultados não muito ricos no que tange aos atributos gerados, tal problema pode ser contornado utilizando-se um maior refinamento da ferramenta de classificação, tal qual o uso de aprendizagem estatística e redes neurais [39].

A utilização da fotomicrometria na patologia pode ser exemplificada nas seguintes aplicações [4]:

- i. Análise de conteúdo do DNA: consiste na quantificação do DNA presente em cada célula por meio da contagem dos *pixels* próximos de 0 contidos na imagem do núcleo celular [39].
- ii. Imuno-histoquímica quantitativa: consiste na detecção de moléculas (antígenos) teciduais [39].
- iii. Análise de textura nuclear: através de análise Markoviana (transforma uma imagem de um domínio espacial em uma matriz de probabilidades de transição de tons de cinza), de Gradiente (baseadas na taxa e na direção da variação dos *pixels* com tons de cinza), Granulométrica (representa texturas como *texels* (*pixels* de textura) ou grânulos de acordo com tamanho, forma, nível de cinza e distribuição espacial) ou Transformação Ortogonal (mapeia imagens do domínio espacial para o domínio de frequência espacial).
- iv. Medição de regiões organizadoras nucleolares: regiões que correspondem a alças do DNA contendo genes responsáveis pela transcrição do RNA ribossômico⁴, de 18S e 28S, situados no nucléolo da célula [21].
- v. Contagem mitótica: contagem de figuras de mitose para a avaliação da atividade proliferativa de neoplasias [29].
- vi. Análise de substâncias teciduais: por meio da utilização de corantes histoquímicos específicos.

⁴ RNA Ribossômicos são os principais componentes dos ribossomos, que são grandes complexos macromoleculares que reúnem aminoácidos para formar a proteína cuja seqüência é codificada em um mRNA (RNA mensageiro) específico [11].

Apêndice C

Solução para Imagens com Zoom

Maior

```
path = "C:\\Resultados\\";
tempTitle = getTitle();
index = indexOf(tempTitle, ".");
title = substring(tempTitle, 0, index);
run("k-means Clustering ...", "number_of_clusters=10
cluster_center_tolerance=0.00010000 enable_randomization_seed
randomization_seed=50 show_clusters_as_centrid_value");
selectWindow("Clusters");
close();
selectWindow(tempTitle);
close();
selectWindow("Cluster centroid values");
saveAs("Bmp", path + title + " - k=10.bmp");
setForegroundColor(0,0,0);
color = getValue("foreground.color");
Dialog.create("Info");
Dialog.addMessage("Clique em uma das áreas que melhor \nrepresenta a região de
interesse.");
Dialog.show();
setTool(13);
while(color==0){
    color = getValue("foreground.color");
}
red = (color>>16)&0xff;
green = (color>>8)&0xff;
blue = color&0xff;
x = getWidth();
```



```
y = getHeight();
for(i=0; i<x ; i++){
    for(j=0; j<y; j++){
        colorPixel = getPixel(i,j);
        redPixel = (colorPixel>>16)&0xff;
        greenPixel = (colorPixel>>8)&0xff;
        bluePixel = colorPixel&0xff;
        if( redPixel==red &&
            greenPixel == green &&
            bluePixel == blue)
            setPixel(i,j,0x000000);
        else
            setPixel(i,j,0xffffffff);
    }
}
run("Make Binary");
saveAs("Bmp", path + title + " - k=10,bin.bmp");
run("Set Measurements...", "area perimeter shape limit redirect=None decimal=3");
run("Analyze Particles...", "size=100-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Outlines
display exclude clear");
selectWindow("Drawing of Cluster centroid values");
saveAs("Bmp", path + title + " - k=10,bin,result.bmp");
close();
saveAs("Measurements", path + title + " - Results, ZoomMaior, k=10.xls");
close();
```

Apêndice D

Solução para Imagens com Zoom

Menor

```
path = "C:\\Resultados\\"
tempTitle = getTitle();
index = indexOf(tempTitle, ".");
title = substring(tempTitle, 0, index);
run("k-means Clustering ...", "number_of_clusters=10
cluster_center_tolerance=0.00010000 enable_randomization_seed
randomization_seed=50 show_clusters_as_centrid_value");
selectWindow("Clusters");
close();
selectWindow(tempTitle);
close();
selectWindow("Cluster centroid values");
saveAs("Bmp", path+title+" - k=10.bmp");
setForegroundColor(0,0,0);
color = getValue("foreground.color");
Dialog.create("Info");
Dialog.addMessage("Clique em uma das áreas que melhor \nrepresenta a região de
interesse.");
Dialog.show();
setTool(13);
while(color==0){
    color = getValue("foreground.color");
}
red = (color>>16)&0xff;
green = (color>>8)&0xff;
blue = color&0xff;
x = getWidth();
```

```
y = getHeight();
for(i=0; i<x ; i++){
    for(j=0; j<y; j++){
        colorPixel = getPixel(i,j);
        redPixel = (colorPixel>>16)&0xff;
        greenPixel = (colorPixel>>8)&0xff;
        bluePixel = colorPixel&0xff;
        if( redPixel==red &&
            greenPixel == green &&
            bluePixel == blue)
            setPixel(i,j,0x000000);
        else
            setPixel(i,j,0xffffffff);
    }
}
run("Make Binary");
saveAs("Bmp", path+title+" - k=10,bin.bmp");
run("Set Measurements...", " limit redirect=None decimal=3");
run("Analyze Particles...", "size=10-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Outlines
exclude clear summarize");
selectWindow("Drawing of Cluster centroid values");
saveAs("Bmp", path+title+" - k=10,bin,result.bmp");
close();
close();
```