Maryana de Carvalho Alegro

**Registro de Imagens de Histologia e Ressonância
Magnética: Aplicação em Imagens do Encéfalo**

Tese apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de
Doutor em Ciências

São Paulo

2014

Maryana de Carvalho Alegro

**Registro de Imagens de Histologia e Ressonância
Magnética: Aplicação em Imagens do Encéfalo**

Tese apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Sistemas Eletrônicos

Orientadora: Profa. Dra. Roseli de Deus Lopes

São Paulo

2014

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, de agosto de 2014.

Assinatura do autor _____

Assinatura do orientador _____

Catálogo-na-publicação

Alegro, Maryana de Carvalho

**Registro de imagens de histologia e ressonância magnética:
aplicação em imagens do encéfalo / M.C. Alegro. -- versão corr.
-- São Paulo, 2014.
98 p.**

**Tese (Doutorado) - Escola Politécnica da Universidade de
São Paulo. Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrô-
nicos.**

**1.Processamento de imagens 2. Ressonância magnética
3.Histologia humana I.Universidade de São Paulo. Escola Poli-
técnica. Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos
II.t.**

*”Dominar-se a si próprio é uma vitória maior do que
vencer a milhares em uma batalha”*

- Sakyamuni -

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Roseli de Deus Lopes, por sua dedicação com a minha formação acadêmica e profissional.

Agradeço aos meus pais, Mary e Ricardo, por toda educação que me deram, pelo amparo em meus estudos e, principalmente, pelo exemplo de vida; e também à minha avó Maria Piedade e à minha tia Maria do Socorro por todo o carinho, incentivo e força.

Agradeço ao Márcio Ribeiro, por toda sua paciência e suporte durante estes últimos meses.

Gostaria também de agradecer à equipe do Athinoula A. Martinos Center Laboratory of Computational Neuroscience pela grande oportunidade de trabalhar ao lado de excelentes pesquisadores. Em especial, gostaria de agradecer à Lilla Zollei, Caroline Magnain, Iman Angaj, Martin Reuter, Malanie Ganz, Allison Stevens, Bruce Fischl e todas as outras pessoas que tive a chance de conhecer.

Gostaria de agradecer ao Dr. Carlos Moreira Filho, pela oportunidade de trabalhar no projeto CINAPCE. Ao Dr. Edson Amaro Jr. pela oportunidade de fazer o doutorado sanduíche no Athinoula A. Martinos Center, e pelas inúmeras discussões e orientações técnicas e científicas; ao Dr. Eduardo Alho por todo o apoio, conselhos, dicas e segmentações manuais. E a todos os amigos e colegas do LSI CITI-USP e da Escola Politécnica, com quem eu sempre pude contar como colaboradores, em todos os momentos do desenvolvimento deste trabalho.

Resumo

Apesar dos avanços recentes na tecnologia dos aparelhos de ressonância magnética (RM) permitirem a aquisição de imagens de alta resolução, ainda não é possível delinear de forma confiável os limites entre regiões de diferentes citoarquitecturas baseando-se somente nesta modalidade. As imagens de histologia são mandatórias quando se necessita saber o limite exato entre diferentes regiões neuroanatômicas. Contudo, o processamento histológico inevitavelmente causa grandes deformações no tecido, o que torna a comparação direta entre as duas modalidades inviável. Os estudos de neuroimagem/neuroanatomia que necessitam de comparação com a histologia devem necessariamente incluir uma etapa de alinhamento entre as duas modalidades; tarefa que muitas vezes acaba sendo realizada manualmente. Entretanto, o registro manual é demorado e pouco acurado, se tornando inviável quando os exames de histologia geram centenas de imagens. Este trabalho propõe um método para registro de imagens de histologia e RM, composto por um conjunto de recomendações para o preparo das imagens cujo objetivo é otimizá-las para o registro; e por uma pipeline computacional capaz de registrar as imagens consideradas. O trabalho aqui descrito foi desenvolvido primeiramente com o intuito de registrar imagens de espécimens de hipocampo provenientes do projeto CINAPCE e, posteriormente, para registro de imagens de cérebro inteiro provenientes do Banco de Cérebros da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. A pipeline computacional foi testada com sucesso em imagens reais de dois cérebros inteiros. A avaliação quantitativa dos registros realizados foi feita comparando segmentações manuais do hipocampo direito, núcleo caudado esquerdo e ventrículos laterais superiores, realizadas no volume de RM e da histologia registrada. A quantificação do resultado foi feita através do cálculo das métricas coeficiente de Dice (CSD) e distância espectral ponderada (DEP) sobre as segmentações. A pipeline obteve um CSD médio de aproximadamente 0,77 e um DEP médio de aproximadamente 0,003. Os resultados mostraram que o método foi capaz de registrar as imagens de histologia nas respectivas imagens de RM exigindo interação mínima com o usuário.

Palavras-chave: processamento digital de imagens, registro de imagens, histologia, ressonância magnética

Abstract

Although latest advances in MRI technology have allowed the acquisition of higher resolution images, reliable delineation of cytoarchitectural boundaries is not yet possible based solely on that modality. Histological images are regularly required to locate the exact limits between neuroanatomical structures. Histological processing is nevertheless prone to cause a high amount of tissue distortion, which prevents direct comparison between the two modalities. Neuroimage/neuroanatomy studies that require direct comparison between histology and MRI must include a registration step. Such task is usually manually performed, but that becomes infeasible for large histology volumes. Moreover, manual registration is time consuming and inaccurate. This thesis proposes a set of tissue processing recommendations aiming at optimizing the registration process, together with a computational pipeline for registering histology to MRI. The herein described work was initially designed to process hippocampi specimens from the CINAPCE project and posteriorly improved to process full brain images from the Brain Bank of the Brazilian Aging Brain Study Group. The pipeline was tested on two full brain histology volumes from the Brain Bank of the Brazilian Aging Brain Study Group. Results were assessed by comparison of manual segmentations of the left caudate nucleus, right hippocampus and superior lateral ventricles, performed on both MRIs and registered histology volumes. Quantitative evaluation was performed by computing the Dice coefficient (DC) and normalized weighted spectral distance (WESD) on the segmentations. The pipeline preprocessing yielded mean DC of 0.77 and mean WESD of 0.0033. The described method was able to successfully register histology to their corresponding MRI volumes with minimal user interaction.

Key-words: digital image processing, image registration, histology, MRI

Lista de Figuras

1	Esquema básico de um registro (modificado de (OLIVEIRA; TAVARES, 2014))	23
2	Pipeline proposta	46
3	Imagens de blockface	48
4	Imagens de histologia	50
5	Exemplo de uma variedade. Fonte: (NIETHAMMER, 2008)	53
6	Exemplo de mapeamento de uma variedade (Fonte: (YANG, 2009))	54
7	Volume de histologia sem correção de intensidades	56
8	Reamostragem de uma imagem	58
9	Volume de histologia sobreposto a RM, antes do registro 3D	62
10	Exemplo de segmentação do blockface e histologia. a) exemplo de imagem blockface, e b) respectiva imagem de histologia. c) blockface segmentado pelo método descrito, c) histologia segmentada pelo método descrito.	65
11	Registro da histologia com blockface. a) fatia de histologia, b) respectiva imagem blockface, c) resultado do registro da histologia na imagem blockface (a imagem de histologia pode ser vista nos blocos mais escuros).	66
12	Visão coronal (a), axial (b) e sagital (c) de um volume de histologia 3D (após registro com blockface)	67
13	Correção de intensidades. Esquerda: imagem original. Direita: resultado da correção.	67
14	Correção de heterogeneidade de campo na RM. a) imagem original, b) imagem corrigida, c) diferenças entre as imagens.	68
15	Segmentação do cérebro. Esquerda: imagem original. Direita: cérebro segmentado.	69

16	Reconstruções 3D do volume de histologia do caso #1. Coluna a) visão frontal (superior) e lateral (inferior) do volume antes do registro. Coluna b) visão frontal (superior) e lateral (superior) do volume após o registro. Coluna c) sobreposição do volume registrada na RM original.	70
17	Duas visões da reconstruções 3D do volume de histologia colorido.	71
18	Mosaico com exemplo de resultados do registro. a) plano coronal, b) plano axial e c) plano sagital de fatias da histologia registrada com MR para o caso #1. d) plano coronal, e) plano axial e c) plano sagital do registro do caso #2.	73
19	Exemplo de máscaras segmentadas pelos médico #1 (azul) e médico #2 (vermelho) para o caso #1. Coluna a) núcleo caudado da histologia registrada (superior) e RM (inferior). Coluna b) hipocampo da histologia registrada (superior) e RM (inferior). Coluna c) ventrículos laterais superiores da histologia registrada (superior) e RM (inferior).	74
20	Reconstrução 3D das máscaras binárias do caso #2, segmentadas pelo médico #1. a) ventrículos laterais superiores (vermelho), hipocampo direito (amarelo) e núcleo caudado esquerdo (azul) sobre a histologia; b) ventrículos laterais superiores (vermelho), hipocampo direito (amarelo) e núcleo caudado esquerdo (azul) sobre a RM; c) regiões segmentadas na histologia (amarelo) sobrepostas nas regiões segmentadas na RM (azul)	75
21	Valores de CSD e DEP 2D para o caso #1. a) CSD da segmentação do médico #1; b) CSD da segmentação do médico #2; c) DEP da segmentação do médico #1; d) DEP da segmentação do médico #2.	80
22	Valores de CSD e DEP 2D para o caso #2. a) CSD da segmentação do médico #1; b) CSD da segmentação do médico #2; c) DEP da segmentação do médico #1; d) DEP da segmentação do médico #2.	81
23	Jacobianos calculados para o caso #1 e caso #2. a) visão axial, b) visão coronal e c) visão sagital dos valores do Jacobiano do caso #1. a) visão axial, b) visão coronal e c) visão sagital dos valores do Jacobiano do caso #2.	82

Lista de Tabelas

1	Tabela comparativa dos trabalhos de registro de histologia encontrados na literatura.	38
2	Coeficientes CSD e DEP 3D para hipocampo direito (HD), núcleo caudado esquerdo (CE) e ventrículos laterais superiores (VS)	76
3	Coeficientes CSD 3D e DEP 3D do cérebro inteiro	76
4	Tabela comparativa dos trabalhos de registro de histologia encontrados na literatura, incluindo o método proposto (última linha)	83

Acrônimos Frequentes

BET *brain extraction tool*

CE núcleo caudado esquerdo

CI cérebro inteiro

CINAPCE cooperação interinstitucional de apoio à pesquisa sobre o cérebro

CSD coeficiente de similaridade de Dice

DEP distância espectral ponderada

EAR erro angular relativo

EEA erro de *endpoint* absoluto

EI erro de interpolação

EIN erro de interpolação normalizado

ELTM epilepsia do lobo temporal mesial

EM *expectation maximization*

EQM erro quadrático médio

FAPESP fundação do amparo à pesquisa do estado de São Paulo

HD hipocampo direito

RF rádio-frequência

RM ressonância magnética

Sumário

1	Introdução	16
1.1	Contexto dentro do programa CINAPCE e a necessidade de uma ferramenta para registro	17
1.2	Objetivo	19
1.2.1	Objetivos Específicos	19
1.3	Materiais e Métodos	19
1.4	Estrutura do Texto	20
2	Registro de Imagens	21
2.1	Conceitos Básicos	23
2.1.1	Modelos de Deformação	24
2.1.1.1	Rígidos e Afins	25
2.1.1.2	Não-rígidos	26
2.1.2	Função Objetivo e Medidas de Similaridade	28
2.1.2.1	Registro mono-modal	29
2.1.2.2	Registro multi-modal	30
2.1.3	Métodos de Otimização	30
2.1.4	Validação do Registro	32
2.2	Métodos de Registro de Histologia	33
2.3	Conclusão	39
3	Proposta de Método de Registro	40

3.1	Recomendações no Preparo das Imagens para Registro entre Histologia e RM	40
3.1.1	Processamento do Blockface	41
3.1.2	Processamento da Histologia	42
3.1.3	Processamento da Ressonância Magnética	44
3.2	Pipeline Computacional	45
3.3	Processamento da Histologia	47
3.3.1	Segmentação do Blockface	47
3.3.2	Segmentação da histologia	50
3.3.3	Registro da Histologia com Blockface	51
3.3.3.1	Registro Rígido	51
3.3.3.2	Registro Não-rígido	53
3.3.4	Construção do Volume 3D	56
3.3.5	Correção de Intensidades	56
3.3.6	Reamostragem	58
3.4	Processamento da RM	60
3.4.1	Correção de Heterogeneidades	60
3.4.2	Segmentação do Crânio	61
3.4.3	Reamostragem	61
3.5	Registro 3D da Histologia com RM	61
3.6	Construção do Volume 3D Colorido	62
3.7	Conclusão	63
4	Implementação e Resultados	64
4.1	Implementação do Processamento da Histologia	64
4.1.1	Segmentação das Imagens Blockface e de Histologia	64
4.1.2	Registro da Histologia com Blockface	65

4.1.3	Construção do Volume 3D	66
4.1.4	Correção de Intensidades	67
4.2	Processamento da Ressonância Magnética	68
4.2.1	Correção de Heterogeneidade do Campo	68
4.2.2	Segmentação do Crânio	68
4.3	Registro 3D e Construção do Volume Colorido	68
4.4	Resultados	69
4.5	Conclusão	84
5	Discussão e Conclusões	85
5.1	Considerações Finais	85
5.2	Contribuições	86
5.2.1	Trabalhos publicados	86
5.2.1.1	Artigos completos	86
5.2.1.2	Resumos publicados em anais de congresso	86
5.3	Trabalhos futuros	87
	Apêndice A – Execução da Pipeline	89
	Apêndice B – Parâmetros Utilizados	91
	Referências	93

1 *Introdução*

As técnicas de imageamento por ressonância magnética (RM) se baseiam no fenômeno da ressonância nuclear magnética, descoberto na década de 40, independentemente, por Felix Bloch e Edward Purcell. Tal fenômeno foi inicialmente aplicado ao estudo físico e químico de moléculas; sendo que as primeiras técnicas para obtenção de imagens surgiram apenas na década de 70. Desde então, a ressonância magnética rapidamente se tornou popular nos meios clínicos e científicos por apresentar características vantajosas em relação a outros exames: maior resolução e contraste, imageamento de secções em ângulos oblíquos e uso de radiação não-ionizante; além de não ser invasiva.

O desenvolvimento tecnológico dos *scanners*, nos últimos anos, permitiu o uso de exames de RM estrutural e funcional para investigar, de forma não invasiva, diversas características do cérebro humano como composição química, distribuição de neurotransmissores, metabolismo, entre outras. Entretanto, o sinal de ressonância magnética é intrinsecamente ligado às características físicas e químicas do tecido imageado, sendo na realidade um mecanismo para o imageamento indireto do mesmo (MORI; ZHANG, 2006). Apesar de ser possível delimitar as principais estruturas do encéfalo em imagens de RM, muitas regiões subcorticais não são identificáveis, mesmo utilizando-se scanners de alto campo. Ademais, a localização de limites entre estruturas cerebrais não é confiável em imagens de RM, uma vez que as bordas presentes nessas imagens podem refletir diferenças na constituição química dos tecidos e não necessariamente em sua citoarquitetura (AOKI et al., 1989; REESE et al., 2012). Portanto, as imagens de histologia ainda são o padrão ouro quando se necessita conhecer a localização exata dos limites entre regiões neuroanatômicas.

Estudos de neuroimagem/neuropatologia buscam relacionar o sinal de RM com as características do tecido imageado de forma a se conseguir um entendimento mais profundo sobre o sistema nervoso (ANNESE, 2012). A associação de histologia com a RM é um importante passo em diversos estudos de neuroimagem estrutural, como a investigação das características do sinal de RM in-vivo e ex-vivo (EICKHOFF et al., 2005), estimação

mais precisa das bordas de estruturas neuroanatômicas (AMUNTS et al., 2013), estudo dos mecanismos de doenças neurodegenerativas (GRINBERG et al., 2009) e auxílio na construção de atlas histológicos do cérebro (ADDLER et al., 2014). A associação da histologia com a RM é mandatória para que tais estudos sejam histologicamente/anatomicamente validados e possam ser aplicados de forma segura na prática clínica (GRINBERG et al., 2008).

Apesar de sua importância, o processamento histológico causa deformações e outros danos severos ao material processado, devido à manipulação mecânica (remoção cirúrgica, corte, montagem na lâmina) e tratamento químico (fixação, desidratação, coloração). Imagens de histologia frequentemente apresentam rasgos e buracos, cisalhamento, dobras, encolhimentos e deformações não-lineares. Tais artefatos impedem que uma relação direta ponto-a-ponto (ou região-a-região) seja realizada entre as imagens de histologia e de RM. Sendo assim, é necessário que haja uma etapa de alinhamento de ambas as modalidades, de forma a permitir a realização de correspondências entre as estruturas de interesse. Diversos estudos na literatura optam por realizar o alinhamento manual da histologia com a RM (ALHO et al., 2014; KILIMANN et al., 2014; THEOFILAS et al., 2014), ou por utilizar métodos que exigem muita interação com o usuário. Isso não é prático uma vez que é comum que exames de histologia tenham centenas de imagens, o que aponta para a necessidade de ferramentas que automatizem essas tarefas.

1.1 Contexto dentro do programa CINAPCE e a necessidade de uma ferramenta para registro

O programa de Cooperação Interinstitucional de Apoio a Pesquisas sobre o Cérebro (CINAPCE) é uma iniciativa, apoiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), que reúne diversos centros de pesquisa do estado de São Paulo, com o objetivo de formar uma forte rede de cooperação para a pesquisa de Epilepsia do Lobo Temporal Mesial (ELTM).

A epilepsia do lobo temporal mesial refratária acomete as estruturas do sistema límbico, principalmente o hipocampo e a amígdala, os quais participam dos processos de memória e aprendizado. Um dos danos cerebrais mais comuns nesta doença é a esclerose hipocampal, causada pela morte maciça de neurônios e proliferação de células da glia nesta região. O tratamento padrão para essa epilepsia é a administração crônica e continuada de fármacos anti-epiléticos, que inibem a ocorrência de crises, mas não modificam a circuitaria neuronal responsável pelo surgimento destas. Porém, apenas 20% a 30% dos

pacientes tratados ficam completamente livres de crises, sendo que a maioria incorre em algum grau de refratariedade ao tratamento, apresentando convulsões com maior ou menor frequência. O diagnóstico de ELTM associado à esclerose do hipocampo é a principal causa dessa refratariedade. Em alguns casos, a única forma de reduzir a ocorrência das crises é a extração cirúrgica das regiões afetadas. O impacto pessoal e social da epilepsia somado à alta taxa de resistência ao tratamento medicamentoso motiva uma grande quantidade de pesquisas que buscam um melhor entendimento dessa doença (SÁNCHEZ-ÁLVAREZ; SERRANO-CASTRO; CAÑADILLAS-HIDALGO, 2002; SILVA; CAVALHEIRO, 2004).

O programa CINAPCE visa promover a investigação interdisciplinar dessa doença, de forma que a pesquisa possa ser conduzida a partir de diferentes ângulos, como por estudos clínicos, de genômica, neuroimagem, patologia, análise computacional, entre outros.

Nosso objetivo, dentro do programa CINAPCE, foi a investigação de técnicas computacionais aplicadas ao estudo da ELTM. Para tanto, foram realizadas aquisições de RM de alta resolução nos hipocampos escleróticos, extraídos dos pacientes refratários e aplicadas algumas técnicas de análise (como algoritmos para análise de texturas e reconhecimento de padrões).

O estudo realizado em Bando et al. (BANDO et al., 2011), do qual a autora participou, mostrou que as ELTM febril e não-febril são entidades genomicamente distintas e que, por sua vez, tais diferenças estão correlacionadas com achados histológicos comuns em tecido de hipocampos escleróticos (SILVA et al., 2011), tais como dispersão e bilaminação. A partir daí, partindo da premissa de que as informações de textura de imagens de RM carregam informações relacionadas com a constituição do tecido imageado (YU et al., 2001), Alegro et al. (ALEGRO et al., 2012), outro estudo do qual a autora participou, utilizou um método de classificação para verificar a possibilidade de se distinguir entre ELTM febril e não-febril. Tal trabalho obteve resultados promissores, apontando que o sinal de RM de alta resolução de fato carrega informações relevantes sobre a constituição celular do tecido. Entretanto, não foi possível fazer uma correlação entre as características do tecido e os achados histológicos. Também não foi possível aprofundar o estudo somente baseando-se nas características de textura da RM e nas imagens de histologia. Uma das principais dificuldades encontradas foi a impossibilidade de criar qualquer tipo de correspondência direta entre as estruturas biológicas presentes na RM e na histologia. Percebeu-se então a necessidade da utilização de métodos de registro para a realização de comparações confiáveis entre lâminas de histologia e imagens de RM. Nesse momento, este passou a ser o foco da pesquisa de doutorado.

1.2 Objetivo

O objetivo deste trabalho foi investigar a possibilidade de criar um método de processamento de imagens capaz de registrar imagens de histologia e de RM, e de lidar tanto com os artefatos presentes nas imagens de RM quanto com os artefatos presentes nas imagens de histologia.

1.2.1 Objetivos Específicos

Para atingir o objetivo central deste trabalho, foi necessário atingir os seguintes objetivos específicos:

- realizar um amplo estudo dos algoritmos para registro de imagens;
- realizar um levantamento do estado-da-arte em registro de histologia com RM;
- investigar a viabilidade do uso de algoritmos de registro nas imagens obtidas no âmbito do projeto CINAPCE;
- elaborar, implementar, testar e aplicar um método de registro de imagens de histologia e RM;
- avaliar o uso do método proposto em imagens do encéfalo inteiro.

1.3 Materiais e Métodos

Para atingir o objetivo aqui estabelecido, foi necessário elaborar e implementar uma pipeline para registro de imagens de histologia e RM com base em estudos realizados sobre o estado-da-arte na área. Tais estudos levaram em conta artigos publicados recentemente, livros para conceitos básicos sobre o assunto e informações obtidas por meio de entrevistas e discussões com profissionais da área.

A implementação da pipeline foi realizada utilizando-se o ambiente de desenvolvimento Matlab (MATHWORKS, 2013), juntamente com o software Freesurfer (FREESURFER, 2013) e as ferramentas de visualização Amira (AMIRA, 2013).

A pipeline foi testada utilizando-se as imagens de histologia e MR adquiridas no projeto CINAPCE e também imagens histológicas e de RM do projetos Banco de Cérebros do Hospital das Clínicas de FMUSP (GRINBERG et al., 2007);

Os resultados obtidos foram avaliados e quantificados conforme métricas encontrados na literatura.

1.4 Estrutura do Texto

O texto desta tese está organizado em cinco capítulos. O segundo capítulo apresenta os conceitos relevantes e necessários ao entendimento do trabalho aqui descrito, bem como traz um levantamento da literatura sobre registro de imagens de histologia e RM.

O terceiro capítulo traz a proposta de um método para registro de histologia e RM, que inclui uma série de recomendações para o melhor preparo do material que se destina a estudos com registro.

O quarto capítulo descreve os detalhes da implementação da parte computacional do método proposto, resultados parciais do processamento de cada etapa e uma avaliação quantitativa da qualidade dos registros obtidos com a aplicação do método proposto.

O quinto capítulo traz a discussão e conclusões sobre o trabalho realizado, bem como sugestões de trabalhos futuros.

2 *Registro de Imagens*

O registro (ou co-registro) de duas ou mais imagens busca alinhá-las de forma a permitir o estabelecimento de correspondências entre suas partes. É comumente utilizado em atividades onde se trabalha com imagens adquiridas em diferentes momentos, a partir de diferentes pontos de vista, ou por diferentes sensores. Apesar de parecer trivial, o registro de imagens apresenta diversas peculiares e desafios, pois é impossível criar um método de registro universal, dada a grande diversidade de sensores, tipo de imagens existentes e tipo de artefatos que podem afetá-las (ZITOVÁ; FLUSSER, 2003). Tal fato motivou a criação de diversos métodos de registro, ao longo dos últimos anos.

A expressão "registro", referindo-se ao alinhamento de imagens, surgiu no início do século XX com a patente de um dispositivo que utilizava espelhos para refletir duas imagens, de forma que estas fossem sobrepostas no campo visual do observador (BECKER, 1916). Em 1956, foi patenteado um dispositivo eletrônico capaz de medir o grau de sobreposição entre duas imagens também alinhadas utilizando espelhos (DRESSLER, 1956). O primeiro estudo que utiliza digitalização de imagens e técnicas primitivas de registro foi realizado no MIT, em 1963, por Lawrence Roberts¹ em sua tese de doutorado (ROBERTS, 1963) que trabalhava com imagens de sólidos simples, escaneadas por um equipamento de *facsimile*. Os primeiros métodos de registro de imagens digitais, na acepção atual da palavra, surgiram no início da década de 1970 em trabalhos de sensoriamento remoto. Os estudos sobre registro de imagens realizados durante a década de 1970 e 1980 foram voltados principalmente para o processamento de imagens de satélite. Somente no início da década de 1990 começaram a surgir as primeiras aplicações de registro em imagens médicas, motivadas pelo surgimento dos *scanners* digitais e impulsionadas pela crescente popularização do uso de exames por imagem na prática clínica (GOSHTASBY, 2012). Atualmente, o registro de imagens é uma área de pesquisa madura que conta com mais de 30 anos de atividades e inúmeros trabalhos publicados. Seus métodos continuam sendo amplamente utilizados em sensoriamento remoto e imagens médicas, bem como em outras

¹curiosamente Lawrence Roberts foi um dos criadores da ARPANET, precursora da Internet moderna

áreas como robótica, astronomia, visão computacional, entre outros.

A grande diversidade de exames por imagem, tanto estruturais (por exemplo, raios-x, tomografia computadorizada, ressonância magnética, histologia, etc) como funcionais (por exemplo PET, SPECT, ressonância magnética funcional, etc) motiva o uso de métodos de registro em estudos e em aplicações clínicas. Cada modalidade fornece informações sobre aspectos específicos do corpo do paciente e em conjunto funcionam como canais complementares e sinérgicos de informação, dando aos médicos uma visão mais ampla e completa do quadro do paciente (MAINTZ; VIERGEVER, 1998). Entretanto, esse exames normalmente são feitos com o paciente em diferentes posições e em diferentes momentos, exigindo o emprego de métodos que permitam a realização de comparações diretas entre as estruturas das imagens.

Especificamente, o registro de imagens de histologia constitui uma tarefa desafiadora, a qual exige métodos capazes de lidar com grandes diferenças entre as imagens de origem e de destino; e com muitos artefatos como rasgos, furos, dobras e etc. Apesar dos desafios, o registro de histologia é mandatório em trabalhos que necessitam de informação sobre citoarquitetura. Através do levantamento da bibliografia recente sobre o tema, pode-se notar que os trabalhos de registro de histologia caem em dois grupos principais: aqueles que buscam reconstruir o volume da histologia a partir das fatias bidimensionais; e aqueles que buscam realizar o registro da histologia com outras modalidades de imagens. No primeiro grupo, os autores necessitam recuperar a conformação geométrica do material, mas não possuem imagens auxiliares como RM ou *blockface*². Normalmente esses trabalhos caem em um problema conhecido como efeito banana ou efeito-z³, no qual ocorre a rotação das fatias de histologia em torno do eixo z, cujo acúmulo do erro resulta em um volume retorcido. No segundo grupo, busca-se alinhar a histologia com imagens de outras modalidades, como RM, seja simplesmente para recuperar a conformação geométrica original da histologia, ou seja para realizar comparações entre características histológicas e características da modalidade considerada.

A seguir, são apresentados os conceitos básicos utilizados na área de registro de imagens e empregados neste trabalho, sem a pretensão de esgotar o assunto; seguido pelo levantamento da literatura atual referente ao registro de imagens de histologia.

²Imagens *blockface* são fotografias do tecido emblocado, feitas imediatamente antes de ser cortado para processamento histológico.

³O efeito-z é causado pela propagação de pequenos erros de registro, que ocorrem durante o processo de alinhamento fatias adjacentes. Causa o aspecto retorcido do volume reconstruído.

2.1 Conceitos Básicos

A grosso modo, o objetivo de um método de registro é encontrar a transformação que minimiza uma função objetivo do tipo (SOTIRAS; DAVATZIKOS; PARAGIOS, 2013):

$$M(B, A \circ T) + R(T) \quad (2.1)$$

onde A e B são imagens pertencentes ao domínio Ω , onde A é a imagem móvel que se quer registrar e B é a imagem referência (fixa) na qual A será registrada. T é a transformação que mapeia A em B , M é uma função que quantifica a similaridade entre A e B e R é um termo de regularização. A equação 2.1 é a função objetivo que deve ser minimizada/maximizada para se resolver o problema de registro entre A e B . A transformação T pode ser elaborada como $T(x) = x + v(x)$ onde x são coordenadas no domínio Ω e v um vetor de deslocamento. A transformação T é computada, utilizando-se métodos de otimização.

Figura 1: Esquema básico de um registro (modificado de (OLIVEIRA; TAVARES, 2014))

A figura 1 resume o funcionamento básico de um algoritmo de registro. Basicamente, a medida de similaridade entre as imagens fixa e móvel é computada e usada como critério de parada do otimizador. Caso o otimizador não tenha encontrado um ponto de mínimo, novos parâmetro do modelo (transformação) são calculados e a imagem móvel é transformada (aqui, interpolação é utilizada para a geração de uma nova imagem) e uma nova iteração começa. Observando a figura 1 pode-se notar a existência de um passo opcional de pré-registro. O pré-registro é, em geral, adotado para aumentar a área de sobreposi-

ção entre as imagens e aumentar a probabilidade de um registro correto. É interessante enfatizar que aqui a transformação e a interpolação fazem parte da etapa de deformação.

Um algoritmo de registro sempre envolve três partes principais:

1. modelo de deformação: É o tipo de modelagem matemática usada para gerar as transformações aplicadas à imagem. Está diretamente relacionado com a transformação T que é utilizada na função objetivo.
2. função objetivo: É a função que mede o desalinhamento de duas imagens com base em alguma medida de similaridade e numa transformada T aplicada à imagem.
3. método de otimização: É responsável por calcular os parâmetros da transformação T .

2.1.1 Modelos de Deformação

O modelo de deformação dita quais transformações podem ou não ser aplicadas nas imagens. Sua complexidade pode variar desde a transformação mais simples, com 6 graus de liberdade (no caso de registro rígido), até transformações muito complexas com milhares de graus de liberdade (no caso de registro não-rígido). Aqui, denomina-se grau de liberdade o número de variáveis do modelo, as quais são computadas pelo método de otimização utilizado. A escolha do grau de liberdade da deformação é um compromisso entre complexidade computacional e acurácia do modelo. Modelos mais complexos serão capazes de realizar registros mais fidedignos, porém exigirão mais tempo de processamento.

Durante o processo de escolha do modelo de deformação a ser utilizando, é interessante notar que existem quatro propriedades desejáveis, porém não obrigatórias, para os algoritmos de registro:

Simetria é a propriedade de um algoritmo de ser capaz de produzir uma transformação T tal que, tendo-se $T_1(A) = B$ a transformada que mapeia a imagem A em B , e $T_2(B) = A$ a transformada que mapeia a imagem B em A . $T_2 = T_1^{-1}$, ou seja, a transformada computada mapeando B para A é a inversa da transformada computada mapeando A para B .

A maioria dos algoritmos de registro presentes na literatura são assimétricos, o que significa que a transformada calculada registrando-se uma imagem A em uma imagem B , e a transformada calculada invertendo-se B e A não necessariamente são um

par direta/inversa. Isso, em geral, ocorre devido a mínimos locais presentes na função objetivo, que faz com que as transformações finais sejam sensíveis às condições iniciais (OLIVEIRA; TAVARES, 2014). O uso de algoritmos assimétricos causa o surgimento de viés em estudos que realizam análises estatísticas nas imagens registradas, portanto, a simetria é uma propriedade muitas vezes desejada. Duas estratégias comumente usadas para se atingir a simetria no registro: 1) uso de transformadas cuja inversa é conhecida analiticamente; ou 2) otimizar duas transformações, de A para B e de B para A em um espaço intermediário e, no final, fazer a composição de uma com a inversa da outra.

Preservação da Topologia é a propriedade que um modelo de deformação tem de ser capaz de produzir um mapeamento contínuo (sem quebras da grade da imagem), um-para-um e inversível entre a imagem móvel e fixa. Nem todos os modelos de deformação preservam a topologia, podendo gerar dobras, desaparecimento de informação e quebras na imagem. A preservação da topologia pode ser garantida utilizando-se informação do determinante jacobiano, que deve ser positivo.

Consistência da Inversa é a propriedade de um algoritmo de registro de garantir que as transformações direta e inversa sejam aproximadamente iguais. Nesses métodos, as transformações direta e inversa são computadas simultaneamente através de uma função objetivo que force a primeira a ser similar à inversa da segunda, entretanto, não necessariamente será uma simetria verdadeira. A consistência da inversa também garante a preservação da topologia.

2.1.1.1 Rígidos e Afins

O registro rígido é a forma mais simples de se alinhar duas imagens. É feito utilizando transformações de similaridade que permitem rotação, translação e redimensionamento uniforme; ou transformações afins, que permitem também cisalhamento. A transformada 3D afim (que engloba as transformações rígidas) é dada por (MAINTZ; VIERGEVER, 1998):

$$\begin{pmatrix} b_1 \\ b_2 \\ b_3 \\ 1 \end{pmatrix} = \left(\begin{array}{ccc|c} & & & t \\ & r & & \\ \hline 0 & 0 & 0 & 1 \end{array} \right) \begin{pmatrix} a_1 \\ a_2 \\ a_3 \\ 1 \end{pmatrix}$$

onde r é uma matriz 3x3 que representa a rotação, escala e cisalhamento; enquanto t é um vetor que representa translação. (a_1, a_2, a_3) e (b_1, b_2, b_3) são coordenadas das imagens fixa e móvel, respectivamente.

É interessante notar que muitos trabalhos da literatura denominam o registro afim de registro linear, entretanto uma transformação afim com translação não é linear, matematicamente falando. O registro rígido é utilizado no alinhamento de estruturas rígidas, como ossos; ou mais frequentemente como pré-alinhamento para registro não-rígido.

2.1.1.2 Não-rígidos

Aqui, entende-se por registro não-rígido, mapeamentos que permitem deformações globais e locais e também mapeamento de retas para curvas. Os métodos de registro não-rígido podem ser classificados em dois tipos (HOLDEN, 2008): baseados em modelos físicos e baseados em teoria de interpolação e aproximação. No primeiro caso, os modelos são feitos usando conceitos de mecânica contínua, enquanto, no segundo caso, os modelos utilizam funções com bases diversas para modelar a deformação.

Baseados em Modelos Físicos

Os modelos de registro não-rígido baseado em princípios mecânicos podem ser divididos em quatro principais tipos (HOLDEN, 2008; SOTIRAS; DAVATZIKOS; PARAGIOS, 2013):

- **Corpo elástico.** A transformação modelada como corpo elástico é descrita pela equação diferencial parcial de Navier-Cauchy:

$$\mu \nabla^2 u + (\mu + \lambda) \nabla(\nabla \cdot u) + F = 0$$

onde ∇^2 é o laplaciano, F é um campo de força que dirige o registro, e que será modificado tendo como base alguma medida de similaridade, μ é um coeficiente de rigidez do material, λ é um coeficiente de Lamés e u é o vetor de deslocamento.

- **Fluido viscoso.** Quando o registro é modelado como um fluido viscoso, a transformação é descrita pela equação de Navier-Stokes:

$$\mu_f \nabla^2 v + (\mu_f + \lambda_f) \nabla(\nabla \cdot v) + F = 0$$

onde ∇^2 é o laplaciano, F é um campo de força que dirige o registro, v é um campo de velocidade, μ_f e λ_f são coeficientes de viscosidade. Nesse modelo, é possível calcular um campo de deslocamentos a partir do campo de velocidades.

- **Difusão.** Aqui a transformação da imagem é modelada como um problema de difu-

são:

$$\nabla^2 u + F = 0$$

onde ∇^2 é o laplaciano, u o vetor de deslocamento e F o campo de força que dirige o registro.

É interessante notar que o trabalho de Thirion et al. (THIRION, 1998) modelava o problema de registro como um problema de difusão do calor, usando a analogia do demônio de Maxell. Esse trabalho se tornou muito popular na área de registro de imagens médicas e deu origem a muitos outros métodos dentro dessa família.

- Difeomorfismos: nessa abordagem a transformação da imagem é modelada considerando-se um campo de velocidade v que coordena a deformação. Esse campo é dado pela equação:

$$R = \int_0^1 \|v_t\|_V^2 dt$$

e é utilizado como termo de regularização R da função objetivo. Aqui $\|\cdot\|_V$ é a norma L_2 do espaço das velocidades.

Nessa família estão incluídos os algoritmos do tipo *large deformation diffeomorphic metric mapping* - LDDMM que também são muito populares na área de registro de imagens médicas. A maior parte dos métodos dessa família é inspirado pelos métodos LDDMM.

Baseados em Teoria de Interpolação

Nesses modelos, os conceitos de interpolação são utilizados para propagar pela imagem as deformações que são conhecidas somente numa pequena região (por exemplo, através do uso de pontos de controle/pontos de referência). A vantagem desses modelos é que são capazes de representar transformações complexas utilizando poucos parâmetros (poucos graus de liberdade), o que facilita o processo de otimização. Em contra-partida, muitos destes não preservam a simetria nem garantem a preservação da topologia. A seguir, os tipos mais comuns de modelos baseados em interpolação:

- Função de base radial: Essa é a abordagem de registro não-rígido baseado em interpolação mais popular. Aqui o problema de interpolação é tratado como uma combinação linear de uma função de base radial θ :

$$u(x) = \sum_{i=1}^N \omega_i \theta(\|x - p_i\|)$$

onde ω_i é um peso desconhecido, p_i um ponto de controle e x a coordenada em que se quer saber o valor de interpolação, θ é uma função radial (cujo valor depende apenas da distância entre o ponto de origem x e o ponto de controle p). Algumas funções utilizadas aqui são a Gaussiana, multiquadrática e *thin plate splines* - *TPS*.

- Deformações *free-form*: Nessa abordagem, uma grade de pontos é sobreposta à imagem que se quer deformar, e a transformação ocorre através de pontos de controle localizados nessa grade. A deformação é comumente modelada usando bases do tipo B-splines.
- Funções usadas em processamento de sinais: Nessa abordagem, em vez de splines, a modelagem da transformação é feita utilizando bases vindas da área de análise de sinais, como Fourier ou wavelets.
- Modelos afins por partes: Nessa abordagem, a imagem é dividida em blocos por um *mesh* de triângulos (ou tetraedros, no caso tridimensional) onde cada vértice é um ponto de controle que parametriza o registro. Dentro desses blocos, a deformação ocorre usando uma transformada afim. Cabe à função objetivo fazer com que transformações vizinhas sejam semelhantes.

2.1.2 Função Objetivo e Medidas de Similaridade

As medidas de similaridade são responsáveis por dirigir o processo de registro, indicando quando a imagem móvel está melhor ou pior alinhada com a imagem de referência. As medidas de similaridade se dividem em dois grupos principais: baseadas em pontos de referência e baseadas em intensidades.

Nas medidas baseadas em pontos de referência, o erro de alinhamento é calculado medindo-se a distância entre pontos selecionados na imagem de referência (fixa) e na imagem móvel. Essa seleção pode ser feita manualmente pelo usuário, ou por um algoritmo de detecção automática de "características salientes", como o SIFT (LOWE, 1999) ou MOPS (BROWN; SZELISKI; WINDER, 2005). As medidas baseadas em pontos de referência têm a vantagem de ser mais resistentes a condições adversas iniciais como grandes deformações, e ser computacionalmente mais eficientes; entretanto, a localização automática confiável de pontos de referência é um problema em aberto que não possui uma solução definitiva. A seleção manual de pontos requer muito tempo do usuário e pode levar a incorridades (pontos mal localizados) que deterioram o resultado do registro (SOTIRAS; DAVATZIKOS;

PARAGIOS, 2013). Por esses motivos, o registro baseado em pontos de referência não é utilizado nesse trabalho.

Enquanto as medidas baseadas em pontos de referência trabalham com pequenos conjuntos de pontos, as medidas baseadas em intensidade trabalham com todos os pontos da imagem, o que resulta em registros mais acurados, porém são computacionalmente mais complexos. Outra desvantagem deste grupo é a maior influência das condições iniciais, como grandes deformações, que podem levar a piores resultados. Ao contrário das medidas baseadas em pontos de referência, as medidas baseadas em intensidade não trabalham com distâncias entre localidades, mas com métricas que levam em consideração as intensidades de voxels. Estas podem ser classificadas em dois subgrupos principais: registro mono-modal e registro multi-modal (HILL et al., 2001; SOTIRAS; DAVATZIKOS; PARAGIOS, 2013).

2.1.2.1 Registro mono-modal

Por registro mono-modal (também chamado de intra-modalidade) entende-se o registro de diferentes imagens feitas utilizando o mesmo tipo de aquisição, como por exemplo RM-RM ou PET-PET. As medidas mais comuns para o registro mono-modal são (HILL et al., 2001; MYRONENKO, 2010):

- Soma dos quadrados das diferenças (SQD):

$$SSD(B, J) = \sum_{i=1}^N (B_i - J_i)^2 \quad (2.2)$$

- Soma do absoluto das diferenças (SAD):

$$SAD(B, J) = \sum_{i=1}^N |B_i - J_i| \quad (2.3)$$

- Coeficiente de correlação (CC):

$$CC(A, B) = \frac{(\sum_{i=1}^N (B_i - \hat{B})(A_i - \hat{J}))^2}{\sum_{i=1}^N (B_i - \hat{B})^2 \sum_{i=1}^N (A_i - \hat{J})^2} \quad (2.4)$$

Onde A é a imagem móvel e B a imagem de referência, N é o número de pixels nas imagens A e/ou B (aqui se assume que as imagens sejam do mesmo tamanho), $J = T(A)$, $\hat{B}$ e $\hat{J}$ são a média da intensidade de B e J , respectivamente. Em registro mono-modal os valores medidas de similaridade são calculados diretamente dos valores de intensidade.

2.1.2.2 Registro multi-modal

Por registro multi-modal (também chamado registro inter-modalidade) entende-se o registro de imagens realizadas por diferentes métodos de aquisição, como por exemplo PET-RM, CT-RM ou histologia-RM como no caso deste trabalho. O registro multi-modal é considerado um problema mais difícil de tratar pois é comum que o mesmo tecido apareça de formas muito distintas em modalidades diferentes. Um bom exemplo disso são as imagens de RM ponderada em T2 e histologia do cérebro, onde a substância branca aparece escura na primeira modalidade e clara na segunda. Devido a esse fato, as medidas de similaridade aqui utilizadas são mais complexas, normalmente, adotando conceitos da teoria da informação em vez de trabalhar diretamente com o valor dos voxels. Pode-se entender o processo de registro como a minimização da quantidade de informação que existe na diferença entre as imagens móvel e fixa (HILL et al., 2001). As medidas mais comuns para o registro multi-modal são (HILL et al., 2001; MYRONENKO, 2010):

- Entropia conjunta (EC):

$$H(J, B) = - \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N p_{JB}(J_i, B_j) \log p_{JB}(J_i, B_j) \quad (2.5)$$

- Informação mútua (IM):

$$IM(B, J) = H(B) + H(J) - H(J, B) \quad (2.6)$$

- Informação mútua normalizada (IMN):

$$IMN(B, J) = \frac{H(B) + H(J)}{H(J, B)} \quad (2.7)$$

onde $J = T(A)$ é a imagem transformada (mapeada) por $T(\cdot)$, A a imagem a ser registrada; M e N são os pixels das imagens B e J (aqui se assume que ambas as imagens possuem o mesmo tamanho), P_{JB} é o histograma conjunto de J e B ; e $H(\cdot)$ é a entropia, dada por $H = - \sum_{i=1}^N p_i \log p_i$.

2.1.3 Métodos de Otimização

A grande maioria dos algoritmos de registro não-rígido não possui uma solução analítica para a otimização da função objetivo, o que faz com que seja necessário o uso de método de otimização para a solução do problema. Ademais, é comum que esses problemas sejam mal-postos, onde não há uma única solução para o problema de otimização da

função objetivo. Ou seja, a função objetivo acaba apresentando diversos mínimos locais em vez de um mínimo global; daí a necessidade de um termo de regularização, para tornar o problema tratável.

A área de otimização é uma vasta área de estudo e pesquisa per se da qual os métodos de registro emprestam ferramentas e não cabe a esta tese esgotar o assunto. A seguir, serão apresentados alguns métodos básicos que podem ser utilizado para otimização da função objetivo.

A grosso modo, os algoritmos de otimização utilizados em registro podem ser classificados em dois grupos: contínuos e discretos, sendo os algoritmos contínuos mais populares.

Na otimização contínua as variáveis podem assumir valores reais e a função objetivo é diferenciável. A otimização dos parâmetros segue a regra:

$$\theta_{i+1} = \theta_i + \alpha_i g_i(T(\theta_i) + R(\theta_i))$$

onde i é a variável que marca a iteração, θ é o vetor de parâmetros a serem otimizados, α é o tamanho do passo e g a direção da otimização. T é a transformada propriamente dita e R o termo de regularização. Os métodos mais comuns para resolver esse problema são (SOTIRAS; DAVATZIKOS; PARAGIOS, 2013):

- gradiente descendente;
- gradiente conjugado;
- método de Powell;
- quasi-Newton;
- Levenberg-Marquardt;
- gradiente descendente estocástico.

Na otimização discreta as variáveis só podem assumir valores inteiros. Em registro são mais comumente utilizados métodos de dois tipos (SOTIRAS; DAVATZIKOS; PARAGIOS, 2013):

- baseados em teoria dos grafos;
- programação linear.

2.1.4 Validação do Registro

A avaliação quantitativa da qualidade do registro de uma imagem é sempre uma tarefa difícil pois requer ciência da transformação "real" entre as imagens; e/ou existência de um padrão ouro confiável. Nenhuma dessas situações ocorre na prática, tornando a avaliação dos resultados suscetível a erros e vies. Segundo Crum et al. (CRUM et al., 2003) a validação rigorosa do registro deveria levar em consideração o modelo da formação da imagem considerada, o modelo estatístico da variabilidade anatômica da estrutura biológica registrada, além dos modelos biomecânico e estatístico da deformação considerada. Realizando-se um levantamento da literatura, pode-se verificar que tais modelos raramente estão disponíveis pois, além da dificuldade de criá-los, estes mudam conforme a modalidade da imagem, o tecido imageado e o tipo da deformação considerada. Ainda assim, muitos estudos na área de neuroimagem utilizam registro em suas análises. A validação do registro é então realizada utilizando-se métodos alternativos menos rigorosos (ROHLFING, 2012).

A avaliação do resultado dos registros acaba sendo realizada normalmente por inspeção visual; medindo-se a distância entre pontos marcados manualmente nas imagens registrada e fixa; quantificando-se certas propriedades matemáticas da transformada final (por ex. determinando jacobiano); ou medindo diferenças nas segmentações manuais realizadas na imagem registrada e fixa, sendo essa última abordagem a mais utilizada (KLEIN et al., 2009).

Na quantificação dos resultados por segmentação, comparam-se segmentações, geralmente feitas manualmente, de regiões específicas das imagens registradas e de referência. A quantificação da diferença é feita através de métricas, que podem ser paramétricas ou não. No primeiro caso, além das segmentações alguns parâmetros de modelo deve ser inicializados antes que se possa usá-las. No segundo caso não há necessidade de ajuste de parâmetros. Estas últimas são as mais utilizadas pois são muito simples de implementar e intuitivas. As métricas não paramétricas mais comuns são:

- coeficiente de similaridade de Dice (CSD);
- distância média simétrica de superfícies (DMSS);
- EQM simétrico da distância de superfícies (ESDS);
- distância de Hausdorff (DH);
- similaridade de volumes (SV).

A grande desvantagem do uso dessas métricas é que são capazes apenas de medir erros de localização, causados por mal alinhamento, não sendo capazes de fazer nenhuma inferência a respeito de erros na geometria do objeto segmentado. Para sanar esse problema, são propostas na literatura métricas, como o coeficiente de distância espectral ponderada normalizada (DEP) (KONUKOGLU et al., 2012), que utiliza conceitos da área de análise de formas para medir a diferença no formato geométrico geral de dois objetos.

2.2 Métodos de Registro de Histologia

Em 1996, Guest et al. (GUEST; BALDOCK, 1996) publicou um trabalho cujo objetivo foi realizar a reconstrução 3D de fatias de histologia de embriões de camundongo, sem utilizar nenhuma referência externa, como imagens blockface. O problema foi modelado como um conjunto de molas que interligavam fatias adjacentes. As molas foram colocadas em pontos de interesse escolhidos automaticamente e o registro rígido foi realizado utilizando-se um método de elementos finitos para calcular o estado de maior estabilidade do sistema. Os autores criaram uma medida de qualidade chamada CAM que mede a "suavidade" da reconstrução 3D do volume e a utilizam, juntamente com correlação calculada entre imagens adjacentes, para quantificar a qualidade dos resultados.

Em 2006 Yushkevich et al. (YUSHKEVISH et al., 2006) tratou de um problema similar, dessa vez utilizando um volume de RM para guiar o registro e corrigir eventuais erros do tipo efeito-z. Nesse trabalho, os autores utilizaram um algoritmo baseado em grafos para encontrar o melhor registro rígido entre todas as fatias do volume. Um algoritmo de registro não rígido difeomórfico foi utilizado para registrar o volume resultante com a RM. Esse trabalho não apresenta avaliação quantitativa dos resultados.

Em Singh et al. (SINGH et al., 2006) os autores trataram do problema de registrar fotografias pos-mortem de partes de cérebro com RM in-vivo e, subsequentemente, registrar as lâminas de histologia com as respectivas fotografias. O registro foi realizado utilizando um método polinomial. A avaliação do método foi feita calculando-se a distância euclidiana entre o centróide das regiões de lesão, marcadas manualmente na RM e nas fotografias do tecido.

Em Dauguet et al. (DAUGUET et al., 2007) os autores propuseram um método para fazer o registro de imagens de histologia de cérebro inteiro de babuínos, com as respectivas RMs. Nesse trabalho, as imagens de histologia foram registradas com imagens de blockface para reduzir o impacto da deformação causada pelo processamento histo-

lógico. Entretanto, os autores não propuseram uma pipeline completa, uma vez que o pré-processamento das imagens foi feito manualmente. O registro com blockface foi feito por um algoritmo de registro rígido proposto pelos autores, enquanto o registro com a RM foi feito por um algoritmo não-rígido. Uma avaliação quantitativa foi feita, comparando-se o volume estimado para o cérebro inteiro nas imagens de RM, e o volume estimado para as imagens registradas.

Em Cifor et al. (CIFOR; PRINDMORE; PITIOT, 2009) tratou do problema de recriar um volume 3D a partir de fatias de histologia de cérebros de camundongo, sem ajuda de nenhuma referência externa. Para tanto, as imagens foram registradas aos pares utilizando um método rígido. Para corrigir o efeito-z empregaram um critério de suavidade, o qual parte do pressuposto que as superfícies do volume são naturalmente suaves, ou seja, sem degraus. Para tanto, as superfícies do volume foram suavizadas gerando um campo de deformação não-rígido, o qual foi aplicado no registro final. O trabalho não forneceu nenhuma avaliação quantitativa dos resultados.

Em Cifor et al. (CIFOR; BAI; PITIOT, 2011) o mesmo grupo retomou esse estudo, publicando novos resultados sobre o tema. Nesse trabalho, imagens de cérebro de rato foram registradas usando o método anteriormente descrito, dessa vez apresentando uma quantificação dos resultados. A "suavidade" dos volumes foi medida utilizando características de textura (entropia, contraste, correlação, entre outras). Para a avaliação quantitativa os autores geraram volumes deformados artificialmente, aplicaram o método descrito e mediram os valores do coeficiente de similaridade de Dice (CSD) e o erro quadrático médio (EQM).

Em Grinberg et al. (GRINBERG et al., 2009) os autores apresentaram um método para comparar imagens de histologia de fragmentos de regiões do cérebro humano com RM ex-vivo, porém in-situ. O objetivo desse trabalho foi realizar a caracterização histológica de regiões de hiperintensidade de imagens de RM. Nesse trabalho, as imagens de RM e histologia foram pré-processadas manualmente. As fatias de RM referentes às lesões investigadas foram registradas às imagens de histologia utilizando-se um algoritmo rígido. O estudo não forneceu avaliação quantitativa da qualidade do registro.

No estudo de Alic et al. (ALIC et al., 2010) os autores trataram do registro de imagens de histologia de tumores com RM in-vivo, em ratos. Aqui as imagens de histologia foram registradas (registro rígido) aos pares e empilhadas para formar um volume 3D. Este foi registrado (utilizando registro rígido seguido de registro elástico com B-splines) com o volume RM ex-vivo, que havia sido previamente registrado com o volume de RM

in-vivo (também utilizando registro rígido, seguido de registro elástico com B-Splines). A avaliação quantitativa do método foi feita calculando o determinante do Jacobiano das transformadas utilizadas no registro da RM ex-vivo com in-vivo; e no registro da histológica com RM ex-vivo. Isso forneceu a quantidade de mudança ocorrida no volume de regiões de interesse, segmentadas manualmente.

Osechinskiy et al. (OSENCHINSKIY; KRUGGEL, 2011) investigou o registro de fatias de histologia de um hemisfério de cérebro humano, cortadas de forma esparsa (com lacunas entre si) e RM ex-vivo, ex-situ. Os autores testaram diferentes métodos, tendo maior sucesso utilizando *thin-plate splines - TPS*, com correlação como medida de similaridade, e um método otimização sugerido pelos autores. A avaliação quantitativa dos resultados foi feita, calculando-se a medida de similaridade cumulativa, energia de deformação e tempo de execução do método.

Em Feuerstein et al. (FEUERSTEIN et al., 2011) os autores propuseram um método não-rígido baseado em campos aleatórios de Markov, no qual o registro foi feito ao mesmo tempo com referência à imagem de blockface e às imagens adjacentes. O método foi testado em imagens de rins de rato. A análise quantitativa dos resultados foi feita calculando-se quatro medidas: erro de *endpoint*, erro angular, erro de interpolação e erro de interpolação normalizado.

Goubran et al. (GOUBRAN et al., 2012) tratou do mesmo problema que originalmente motivou o trabalho proposto nessa tese, o registro de imagens de histologia de hipocampo humano com suas respectivas imagens de RM. Nesse estudo, hipocampus de pacientes com epilepsia refratária foram removidos cirurgicamente e imageados em um scanner de RM. Os autores utilizaram um esquema de registro que alterna entre registro rígido afim das imagens de histologia com imagens adjacentes, e registro não-rígido (com B-splines) de histologia com a MR. A avaliação quantitativa dos resultados foi feita calculando-se a distância entre pontos fiduciais marcados manualmente na histologia e na RM.

No trabalho de Adler et al. (ADLER et al., 2012) os autores também trataram o problema de registro de imagens histológicas de hipocampus humanos, com o intuito de criar um atlas histológico com todas as regiões hipocampais anotadas. Nesse trabalho os autores realizaram o registro das fatias histológicas entre si utilizando um algoritmo de registro rígido baseado em teoria dos grafos. O resultado foi refinado para corrigir o efeito-z e outras imperfeições, através de registro não rígido difeomórfico com um volume de RM ex-vivo do mesmo material. A avaliação quantitativa dos resultados foi feita medindo-se o deslocamento (medida baseada na distância euclidiana) entre bordas marcadas manualmente

na MR e na histologia.

O trabalho apresentado em Saalfeld et al. (SAALFELD et al., 2012) tratou do problema de reconstruir o volume 3D da histologia a partir das fatias, sem que houvesse nenhum volume auxiliar. Aqui os autores modelaram o problema como registro elástico, utilizando um conjunto de molas que ligam as imagens adjacentes. Os pontos de ligação das molas foram identificados utilizando um método de identificação de pontos de referência especialmente desenvolvido para esse problema. Ademais, as imagens foram modeladas como *meshes* de triângulos deformáveis. O método foi testado em imagens de embrião de *C. elegans* e *Drosófilas*. O trabalho não apresentou uma avaliação quantitativa dos resultados.

O trabalho de Amunts et al. (AMUNTS et al., 2013) criou um modelo 3D de referência da histologia de um cérebro humano de alta resolução. Nesse trabalho, os autores utilizaram blockface e RM ex-vivo como gabaritos para o registro da histologia. As imagens de blockface foram registradas entre si (registro não-linear 2D) e então o volume de RM foi registrado com o volume resultante (registro não-linear 3D). Finalmente, as imagens de histologia foram registradas, fatia-a-fatia, com as imagens de RM. Os autores não apresentaram uma análise quantitativa dos resultados.

Seguindo a mesma linha de trabalho. Yang et al. (YANG et al., 2013) apresentou uma proposta de pipeline para registro de histologia de cérebro humano com RM. Nela, os autores utilizaram registro rígido para criar um volume 3D das fatias de histologia; e, posteriormente, o registro rígido foi utilizado também para registrar o volume de RM ex-vivo no espaço da histologia. Por fim, cada fatia de histologia foi registrada (registro não rígido 2D) em sua respectiva fatia de RM. O trabalho não forneceu uma avaliação quantitativa dos resultados obtidos.

O grupo de Magnain et al. (MAGNAIN et al., 2014) apresentou uma comparação entre técnicas de OCT (*optical coherence tomography*) e histologia para o estudo de citoarquitetura do cérebro. Nesse trabalho, as imagens de histologia, de partes do lobo temporal, foram registradas com imagens de blockface utilizando uma técnica de registro rígido baseada em estatística robusta. Não foi realizada uma análise quantitativa da qualidade do registro.

Em Adler et al. (ADDLER et al., 2014) os autores revisitaram o tema de registro de histologia do hipocampo, com o intuito de montar um atlas de RM com a identificação das subáreas dessa região. Áreas estas que muitas vezes não são discrimináveis na imagem de RM, mas que podem ser identificadas com a histologia. Nesse trabalho, os autores

realizaram a reconstrução 3D do volume de histologia através de um algoritmo de registro rígido baseado em teoria dos grafos, que alinha as fatias de par em par. A correção do efeito-z foi feita através de registro não rígido com um volume de RM do mesmo material. A avaliação da qualidade do registro foi feita calculado-se o erro de deslocamento das bordas de regiões específicas do hipocampo, que foram marcadas manualmente na RM e na histologia.

A tabela 1 resume o estado da arte em registro de imagens histológicas. Esta foi organizada de forma a mostrar as informações mais relevantes sobre os trabalhos investigados. O objetivo pode ser a somente a reconstrução 3D do volume de histologia ou registro com RM com objetivo de realizar comparações entre ambas as modalidades. Imagens são os tipos de imagem utilizadas; espécie se refere à espécie cujo tecido foi utilizado, como por exemplo ratos. Na coluna de cérebro inteiro indica-se o uso de imagens do cérebro todo ou somente de partes do cérebro. Tipo de registro se refere aos modelos de deformação adotados no trabalho e validação se refere ao tipo de validação apresentada, podendo ser quantitativa ou somente qualitativa.

A partir do levantamento da literatura realizado, pode-se notar que existem poucos trabalhos que lidam com o registro de histologia do cérebro humano, sendo a maioria aplicados a imagens de camundongos e alguns aplicados a imagens de macacos. Dentre os estudos que trabalham com material humano, grande parte utiliza apenas pedaços específicos do cérebro; sendo raro o uso de imagens de cérebro inteiro. Pode-se notar também um amplo espectro de técnicas utilizadas; entretanto, poucos trabalhos propõem uma pipeline de processamento completa, sendo que a maioria se foca apenas em relatar o processo de alinhamento, não se preocupando com pré e pós processamento. Por fim, pode-se notar que os trabalhos na área não se preocupam com a informação de cor do material de histologia, apesar da importância que esta tem na interpretação das imagens de histologia.

Artigo	Objetivo				Imagem				Espécie				Tipo de registro	Validação
	reconstrução 3D	criar atlas	registro com RM	registro intermodalidades	blockface	histologia	RM	OCT	humana	macaco	rato	inseto		
(GUEST; BALDOCK, 1996)	◆					◆					◆			---
(YUSHKEVISH et al., 2006)	◆					◆	◆				◆		◆	visual
(SINGH et al., 2006)			◆		◆	◆	◆				◆		◆	distância euclidiana
(DAUGUET et al., 2007)			◆		◆	◆	◆			◆		◆	◆	diferença de volumes
(CIFOR; PRINDMORE; PITIOT, 2009)	◆					◆					◆	◆	◆	---
(GRINBERG et al., 2009)			◆			◆	◆		◆					---
(ALIC et al., 2010)			◆			◆	◆				◆		◆	determinante do Jacobiano
(CIFOR; BAI; PITIOT, 2011)	◆					◆	◆				◆	◆	◆	CSD, EQM
(OSENCHINSKIY; KRUGGEL, 2011)			◆			◆	◆		◆				◆	similaridade cumulativa
(FEUERSTEIN et al., 2011)	◆				◆	◆					◆		◆	EAR, EEA, EI, EIN
(GOUBRAN et al., 2012)			◆		◆	◆			◆				◆	distância euclidiana
(ADLER et al., 2012)		◆				◆	◆		◆				◆	distância entre bordas
(SAALFELD et al., 2012)	◆					◆						◆	◆	---
(AMUNTS et al., 2013)	◆				◆	◆	◆		◆			◆	◆	---
(YANG et al., 2013)			◆		◆	◆	◆		◆			◆	◆	---
(MAGNAIN et al., 2014)				◆	◆	◆		◆	◆				◆	---
(ADDLER et al., 2014)		◆				◆	◆						◆	distância entre bordas

Tabela 1: Tabela comparativa dos trabalhos de registro de histologia encontrados na literatura.

2.3 Conclusão

Neste capítulo, foi resumido o estado-da-arte em registro de imagens de histologia, bem como os conceitos básicos da área necessário para que o trabalho aqui proposto seja compreendido. No próximo capítulo, será exposta a proposta para a criação de um método para registro de histologia e RM do encéfalo que requeira mínima interação com o usuário, ou seja, método semi-automático.

3 *Proposta de Método de Registro*

O objetivo desse trabalho é a proposta de um método semi-automático de registro de imagens de histologia e de imagens de RM. Este deve ser capaz de lidar tanto com artefatos inerentes às imagens de RM como os artefatos inerentes ao processamento histológico. O método aqui proposto trabalha com três tipos de imagens: RM estrutural, imagens de histologia e imagens de blockface.

Na primeira parte deste capítulo são apresentadas algumas diretrizes para se obter o melhor resultado no registro entre imagens de histologia e RM. Estas foram formuladas a partir da experiência de se registrar as imagens de histologia dos espécimens de hipocampo, coletados dentro do programa CINAPCE, com suas respectivas imagens de RM. Os inúmeros insucessos ocorridos nessa tarefa foram importantes para mostrar o que deve ou não ser feito com o material para que este possa ser utilizado em estudos que envolver registro; bem como para mostrar o mínimo de qualidade necessária para que métodos de registro funcionem eficientemente.

A segunda parte deste capítulo traz uma proposta completa e detalhada de uma pipeline computacional para o registro de imagens de histologia com RM. Essa proposta foi feita baseando-se no processamento de imagens de histologia do cérebro inteiro.

3.1 **Recomendações no Preparo das Imagens para Registro entre Histologia e RM**

O objetivo destas recomendações é guiar a coleta de material, para que bons resultados no processamento computacional sejam obtidos desde as primeiras tentativas. Assim, evitando o desperdício de materiais coletados, reagentes, corantes, tempo de máquina da ressonância; e também o desperdício de tempo computacional.

3.1.1 Processamento do Blockface

A seguir, apresenta-se uma lista de recomendações que foram elaboradas durante o processamento das imagens de blockface:

- Utilizar câmera que opere em modo totalmente manual: O preparo das imagens de blockface exige o uso de configurações manuais fixas na câmera, o que muitas vezes não pode ser feito em câmeras do tipo “point and shoot”. Recomenda-se o uso de câmeras DSLR.
- Fixar a câmera adequadamente: A câmera deve ser fixada sobre o micrótomo da forma mais firme possível. Pode-se usar por exemplo um tripé robusto ou braço de metal preso à bancada por uma morsa.
- Manter a distância entre a câmera e o material fixa: Mesmo a menor variação nessa distância causa um efeito de “escala” que deixa a imagem maior/menor que as imagens adjacentes e que não poderá ser corrigido de forma confiável (a correção desse implicaria no uso de mais um passo de registro, para alinhar as imagens de blockface, introduzindo mais erros). Isso prejudica o uso do blockface como “gabarito” na construção do volume 3D da histologia, pois seu tamanho seria inconsistente com o de outras fatias.
- Evitar movimentos da câmera no plano paralelo ao tecido (para os lados): O blockface deve estar alinhado para a correta reconstrução do volume 3D de histologia. Apesar do desalinhamento causado por esse movimento poder ser corrigido, uma etapa a mais de registro será necessária, adicionando mais complexidade a pipeline.
- Evitar a variação da iluminação do ambiente: A sessão de fotos do blockface pode levar algumas horas e a variação da iluminação natural influencia nas cores da foto. Tal variação pode dificultar o uso de canais de cor na segmentação das fatias. É interessante que se evite essa variação sempre que possível, por exemplo, bloqueando as janelas com cartolina.
- Utilizar balanço de branco manual: A maioria das câmeras utiliza balanço de branco automático, porém esse pode causar variações abruptas nas cores entre uma foto e outra, já que entre cada fotografia a câmera pode mudar a configuração livremente. O ideal é escolher uma configuração de balanço de branco adequada e mantê-la toda a sessão.

- Utilizar foco manual: É comum que a câmera utilizando foco automático mude seu ponto de foco entre uma imagem e outra, fazendo com que algumas imagens saiam fora de foco. Portanto é necessário o uso do foco manual. A câmera deve ser focada tomando-se o cuidado para que o tecido fique com o foco mais nítido possível, mesmo que os elementos ao redor fiquem desfocados.
- Verificar o foco a cada imagem: Um simples esbarrão na lente pode tirá-la do foco. Portanto, recomenda-se verificar o foco a cada fotografia para evitar que as imagens fiquem desfocadas. Falta de foco não pode ser corrigida por técnicas de pré-processamento e a imagem ficara inutilizada.
- Fotografar em alta resolução: As imagens devem conter o máximo de detalhes possível, pois os algoritmos de registro dependem de detalhes estruturais (como arestas, pontos, texturas, etc) para o correto alinhamento das imagens. Recomenda-se o uso da resolução máxima da câmera. A resolução deve ser configurada no início da sessão, não podendo ser alterada até o final da mesma. A alteração da resolução causa mudanças no volume dos voxels, podendo introduzir erros no registro.
- Utilizar escala nas fotos: Uma escala (tipo “régua”) deve ser incluída em pelo menos uma foto. Esta é utilizada para calcular a resolução *in-plane* de cada pixel e, posteriormente, seu volume. Tal informação é necessária para os algoritmos de registro realizarem a correta interpolação das imagens.
- Enquadrar corretamente o tecido: É importante que todo o tecido esteja dentro da área da fotografia. Partes do tecido que ficarem de fora do quadro não poderão ser recuperadas e causarão artefatos na reconstrução, como “amassados”.
- Utilizar formatos sem perda: As imagens devem ser salvas em um formato que não gere perda de qualidade. Formatos como o JPEG devem ser evitados, pois compactam a imagem, deteriorando sua qualidade e, muitas vezes, adicionando artefatos (como “quadriculados”). Utilizar o formato RAW da câmera sempre que possível, ou formatos sem perda como TIFF ou BMP. Se o uso de compactação for inevitável, sugere-se então salvar o arquivo com o máximo de qualidade.

3.1.2 Processamento da Histologia

A seguir, apresenta-se uma lista de recomendações que foram elaboradas durante o processamento das imagens de histologia:

- Preservar a integridade das fatias: Estas devem ser coradas por inteiro (evitando que essas quebrem ou se despedacem), assim como estavam durante o corte do bloco. Essa medida tem por objetivo permitir o correto registro da mesma com a respectiva imagem de blockface.
- Não pular fatias: A prática de descartar fatias de tecido é comum na patologia clínica, mas prejudicial para estudos que necessitem de registro. Um registro bem feito depende da variação suave das estruturas entre fatias adjacentes de tecido. A omissão de fatias induz grandes diferenças entre as estruturas, o que acentua os erros e pode até impossibilitar o registro. Esse problema é especialmente ruim em estruturas pequenas e rebuscadas como, por exemplo, o hipocampo.
- Evitar fatias extremamente finas: O uso de fatias extremamente finas, além de gerar excesso de material, causa perda de informação celular que seria preservada em fatias mais grossas.
- Evitar cortar o material em blocos: O corte em blocos, antes de fatiar o material, é uma prática também comum na patologia clínica. Entretanto, isso causa perda do material das extremidades dos blocos e dificulta a reconstrução tridimensional do volume histológico.
- Evitar rasgões e furos: Esse tipo de artefato pode confundir o algoritmo de registro e causar erros.
- Evitar excesso de luz de fundo: O excesso de luz causa perda de contraste e detalhes da imagem.
- Evitar coloração excessiva: Assim como o item anterior, causa perda de contraste e detalhes da imagem.
- Evitar a introdução de artefatos: evitar adicionar elementos que não pertencem a histologia, como por exemplo escrever sobre as laminas (deixando que a tinta alcance a área do tecido) ou colar adesivos. Estes artefatos por vezes são muito difíceis de corrigir, dificultando uso destas imagens no registro.
- Colocar o material na lâmina na mesma orientação da imagem de blockface: É interessante que as fatias de histologia sejam colocadas nas lâminas numa orientação próxima a do blockface. Muitos algoritmos de registro têm dificuldades de lidar com rotações de 180 graus.

- Evitar “flip” do material: É muito comum que algumas fatias de tecido sejam invertidas durante a preparação da lâmina, causando um efeito de “espelho” entre esta e sua respectiva imagem blockface. Os algoritmos de registro, em geral, têm dificuldades de corrigir tal problema, que acaba sendo corrigido manualmente. Simples cuidados durante a montagem das lâminas podem evitar esse problema, tornando o processamento das imagens mais rápido.
- Evitar colocar o material nas bordas da lamínula: Causa perda de material e, consequentemente, deformações errôneas durante o registro.
- Utilizar escala nas fotos: Uma escala (tipo “régua”) deve ser incluída em pelo menos uma foto. Esta é utilizada para se calcular a resolução ‘in-plane’ de cada pixel e, posteriormente, seu volume. Tal informação é necessária para os algoritmos de registro realizarem a correta interpolação das imagens.
- Uma fatia por fotografia: Tal prática facilita a segmentação inicial.
- Enquadrar corretamente o tecido: É importante que todo o tecido esteja dentro da área da fotografia. Partes do tecido que ficarem de fora do quadro não poderão ser recuperadas e causarão artefatos na reconstrução, como “amassados”.
- Utilizar formato sem perdas: As imagens devem ser salvas em um formato que não gere perda de qualidade. Formatos como o JPEG devem ser evitados, pois compactam a imagem, deteriorando sua qualidade e, muitas vezes, adicionam artefatos (como “quadriculados”). Utilizar o formato RAW da câmera sempre que possível, ou formatos sem perda como TIFF ou BMP. Se o uso de compactação for inevitável, sugere-se então salvar o arquivo com o máximo de qualidade possível.

3.1.3 Processamento da Ressonância Magnética

A seguir, apresenta-se uma lista de recomendações que foram elaboradas durante o processamento das imagens de RM:

- Utilizar voxels isotrópicos: Voxels isotrópicos são necessários para a correta reconstrução tridimensional de um volume e são especialmente importantes durante o processo de registro 3D.
- Utilizar fatias finas: A aquisição ideal deve conter um maior número de fatias com pouca espessura. Isso garante uma melhor reconstrução tridimensional pois melhora

a resolução da conformação tridimensional do tecido. Também reduz a quantidade de artefatos causados pela interpolação.

- Aquisição in-situ: A realização de aquisições in-situ, sempre que possível, é importante para preservar a informação sobre a forma original do tecido. A simples extração do tecido causa deformações que não podem ser corrigidas.
- Utilizar protocolos de alta resolução: Apesar de mais longas, essas aquisições possuem mais detalhes, o que é vantajoso para fazer registro.
- Evitar mudanças no protocolo de aquisição: Diferentes protocolos podem causar diferenças nos tons de cinza, deformações devido aos gradientes, variações na qualidade geral da imagem. Todos esses fatores impactam no resultado geral do registro, além de ser uma falha na metodologia.
- Utilizar formato padronizado: Formatos padronizados como DICOM, Analyze ou Nifti são amplamente utilizados na área de processamento de imagens médicas, sendo facilmente lidos pela maioria dos softwares, como FSL, Matlab, Freesurfer, etc. Arquivar as imagens de RM em um desses formatos facilita o uso das mesmas, evitando conversões desnecessárias que podem alterar os dados. Recomendamos utilizar o formato DICOM por ser o padrão da indústria de equipamentos médicos e ser suportado pela grande maioria dos softwares de processamento de imagens.
- Preservar o cabeçalho do volume: Dados contidos nos cabeçalhos dos exames de RM, que não sejam pessoais dos pacientes, devem ser preservados. Muitos dos dados do cabeçalho são utilizados pelos softwares para ajudar a orientação das imagens, calcular volume dos voxels, janela da intensidade, etc.

3.2 Pipeline Computacional

A pipeline foi elaborada visando o processamento de imagens de RM estrutural, como ponderadas em T1 e/ou T2, uma vez que são bastante comuns na prática clínica. Tal decisão foi tomada pois a grande maioria dos estudos com RM incluem aquisições T1,T2 ou similar.

O processamento das imagens histológicas foi pensado visando o tratamento de imagens coradas com galocianina, que é um corante utilizado na coloração de corpos celulares e muito usado em estudos de histologia (HEINSEN; ARZBERGER; SCHMIT, 2000). A

especificação do corante é importante, pois diferentes substâncias resultam em diferentes colorações, o que afeta processamentos que utilizem informação de cor.

O terceiro tipo considerado são as imagens de blockface. Estas nada mais são que fotografias do tecido fixado realizadas durante o processo de corte, antes de ser cortado e processado histologicamente. O blockface é muito importante para que se possa recuperar a configuração tri-dimensional (3D) original do tecido. Este é usado como gabarito para o registro 2D das imagens de histologia, como será explicado à seguir.

Figura 2: Pipeline proposta

Num sistema complexo, onde algumas sub-tarefas são pipelines de processamento em si (como, por exemplo, a tarefa de segmentação das imagens de blockface), as fronteiras entre os módulos de pré-processamento, registro e pós-processamento ficam muito tênues. Optou-se, então, por organizar a pipeline aqui proposta em quatro blocos principais, como ilustrado na figura 2: processamento da histologia, processamento da RM, registro 3D da histologia e construção do volume 3D colorido. A seguir cada tarefa será descrita detalhadamente.

3.3 Processamento da Histologia

O trabalho aqui descrito considera especificamente tecidos neurológicos, que são especialmente sujeitos a deformações mecânicas, dada sua consistência frágil. O processamento de material histológico, em geral, é uma tarefa complexa e longa, que submete o tecido a diversas etapas de tratamento com diferentes produtos químicos, e que invariavelmente causa deformações nos mesmos. Além disso, o processamento histológico resulta em imagens 2D cuja conformação espacial tridimensional é perdida.

O processamento de tecidos neurológicos envolve a remoção cirúrgica; fixação em formaldeído por vários dias; imersão em ágar, parafina, celoidina ou material equivalente; corte em um criostato ou micrótomo; montagem em placas de vidro e coloração (HEINSEN; ARZBERGER; SCHMIT, 2000; GRINBERG et al., 2007). Cada etapa dessa é potencialmente geradora de artefatos. O cérebro perde seu formato original após a remoção cirúrgica, devido à sua consistência mole. A fixação causa inchaços irreversíveis nos tecidos (GRINBERG et al., 2007) e o corte causa rasgos, buracos, dobras, etc. A montagem em vidro, coloração e secagem causa encolhimento não uniforme do tecido. Ao final de todo o processo, tem-se um material cuja conformação geométrica está muito diferente da original, tendo diversas deformações lineares e não-lineares (SCHORMANN; ZILLES, 1998).

O objetivo do processamento da histologia é criar um volume tridimensional, a partir das lâminas de histologia, que tenha a conformação espacial mais próxima possível da original.

3.3.1 Segmentação do Blockface

Imagens de blockface nada mais são que fotografias tiradas do tecido durante o processo de corte. Cada fotografia é feita imediatamente antes do corte do tecido (e cada fatia cortada se tornará uma lâmina de histologia). Sendo assim, se o processo for feito de

forma consistente, cada lâmina possui sua respectiva imagem de block face. Nesse estágio o tecido estudado já passou pela remoção cirúrgica e fixação, portanto já apresentando algumas deformações, mas ainda guardando boa parte de sua configuração geométrica original.

Figura 3: Imagens de blockface

As imagens de blockface carregam muita informação de fundo desnecessária, as quais causam erros no registro. Sendo assim, é preciso segmentar o tecido do restante da imagem. A segmentação também tem o benefício de reduzir o número de pixels que devem ser processados, reduzindo o tempo computacional da pipeline. Na figura 3 tem-se alguns exemplos de imagens de block face: na esquerda tem-se um tronco encefálico montado em celoidina corada; e na direita tem-se uma fatia de cérebro inteiro montado em celoidina pura. Pode-se ver a diversidade dos elementos nessas imagens.

Em geral, o tecido cerebral apresenta coloração e textura aproximadamente homogêneas, em contraste com os elementos de fundo que possuem as mais diversas cores, padrões e formas. Obviamente, a informação de cor é importante para a segmentação do tecido dessas fotos. Porém, é comum que existam diferenças no balanceamento de branco, o que causa modificação global das cores da imagem; reflexos em regiões úmidas e superfícies metálicas; e também variações na iluminação do ambiente. O método de segmentação utilizado deve ser capaz de lidar com a complexidade das imagens, além de ser computacionalmente eficiente, uma vez que o número de imagens em um estudo histológico facilmente chega nas centenas.

Os algoritmos de segmentação de pele humana, em visão computacional, já lidam com um problema similar há alguns anos. Nesses estudos, notou-se que a cor da pele humana tende a se aglomerar em uma região restrita de alguns espaços de cor; e que a variação de cor está na realidade mais relacionada a variação do brilho do que variação do

tom propriamente dito (YANG; LU; WAIBEL, 1997). Sendo assim, é comum em algoritmos de segmentação de pele que as imagens sejam transformadas para algum espaço que separe a luminância das componentes de cor (KAKUMANU; MAKROGIANNIS; BOURBAKI, 2007). O método de segmentação de blockfaces aqui proposto foi inspirado nos estudos de segmentação pele, uma vez que se observou que o tecido cerebral apresenta cor e textura homogêneas, que lembram a cor e textura da pele humana.

O primeiro passo é a transformação das imagens de histologia coloridas para o espaço de cor YIQ. Esse espaço pertence à categoria dos espaços de cor ortogonais, onde as cores são representadas por componentes estatisticamente independentes. O YIQ separa a cor em uma componente de luminância (Y) e duas componentes de cor (I e Q) (KAKUMANU; MAKROGIANNIS; BOURBAKI, 2007). Nesse espaço de cor, os pixels relativos ao tecido se aglomeram em uma região restrita do espaço gerado pelos canais I e Q, enquanto que os pixels de fundo encontram-se mais espalhados por este espaço. A vantagem de se utilizar esse esquema é a maior robustez às variações de brilho, uma vez que as informações do canal Y são descartadas.

Para a segmentação, optou-se por utilizar um método de *clusterização*, que é uma técnica de aprendizado não-supervisionado. Não havendo a necessidade de treinamento de um classificador a partir de dados classificados manualmente; atividade que pode tornar-se laboriosa e onerar a eficiência do método. Para a segmentação, modela-se a distribuição dos pixels no espaço I-Q como uma mistura de gaussianas. Este modelo é a combinação linear de K gaussianas, que pode ser expressa pela seguinte equação (BISHOP, 2007):

$$p(\mathbf{x}) = \sum_{k=1}^K \pi_k \mathcal{N}(\mathbf{x} | \mu_k, \Sigma_k) \quad (3.1)$$

Onde μ_k e Σ_k são a média e a covariância, respectivamente. π_k é chamado de coeficiente de mistura e $\mathbf{x}$ é a variável aleatória. Nesse trabalho, utiliza-se um modelo com 2 gaussianas (2 classes: tecido e fundo). Para que o modelo seja efetivo, deve-se estimar os parâmetros π_k , μ_k e Σ_k a partir dos valores de I e Q da imagem. Tal estimativa é feita utilizando-se o algoritmo de maximização de expectativas (expectation maximization - EM).

A maximização de expectativas é um método iterativo usado para otimizar variáveis desconhecidas em modelos probabilísticos (DUDA; HART; STORK, 2001). No caso da estimativa de mistura de gaussianas, o algoritmo otimiza a função log da verossimilhança, dada pela fórmula:

$$\ln(p(\mathbf{X} | \boldsymbol{\pi}, \boldsymbol{\mu}, \boldsymbol{\Sigma})) = \ln\left(\sum_{n=1}^N \left(\sum_{k=1}^K \pi_k \mathcal{N}(\mathbf{x}_n | \boldsymbol{\mu}_k, \boldsymbol{\Sigma}_k)\right)\right) \quad (3.2)$$

Onde $\mathbf{X}$ é uma matriz de observações onde cada linha é dada por $\mathbf{x}_n^T$ (aqui, $\mathbf{X}$ são os pixels da imagem que se quer segmentar). Derivando-se essa função em relação a $\boldsymbol{\mu}_k$ e igualando-a a zero, é possível obter as fórmulas para $\boldsymbol{\mu}_k$, π_k e $\boldsymbol{\Sigma}_k$ (BISHOP, 2007). O algoritmo atribui valores aleatórios iniciais para estas variáveis e inicia um processo iterativo de otimização e ajuste desses valores. O processo termina quando o valor da verossimilhança fica acima de um certo limiar. Ao final do processo, tem-se os pixels classificados em K clusters, resultando em uma máscara inicial da região de tecido.

Para corrigir pequenas imperfeições da máscara inicial e suavizar seus contornos, utiliza-se um algoritmo de contornos ativos (CHAN; VESE, 2001). Este é inicializado, tendo a máscara previamente gerada como condição inicial e executado.

Ao final desse estágio, tem-se a imagem de histologia devidamente segmentada e convertida para tons de cinza. A partir desse momento todos os passos da pipeline são executados em imagens de tons de cinza.

3.3.2 Segmentação da histologia

Figura 4: Imagens de histologia

Optou-se por utilizar o método descrito acima para realizar também a segmentação das imagens de histologia. Como pode-se ver na figura 4, estes são bem menos complexas que as imagens de blockface. Apesar serem muito distintas das imagens de blockface, o fundo homogêneo e a coloração que a galocianina cria tornam a tarefa de segmentação dessas imagens muito mais simples. Além disso, os pixels de tecido aqui também se aglomeram em regiões bem definidas do espaço I-Q, permitindo o uso do modelo de mistura de gaussianas. Após a segmentação essas imagens também são convertidas para tons de cinza.

3.3.3 Registro da Histologia com Blockface

Como as imagens de histologia podem apresentar distorções locais e globais, em qualquer região e com diferentes graus de severidade; optou-se por utilizar um algoritmo de registro rígido seguido de uma fase opcional de registro não-rígido.

O algoritmo rígido tem por responsabilidade corrigir a maior parte do desalinhamento entre as imagens de histologia e blockface. Entretanto, este é um método global, não sendo capaz de corrigir eventuais distorções locais que possam existir nas lâminas. Para sanar esse problema, incorporou-se o uso de um algoritmo não rígido posterior ao registro rígido. O uso deste não é mandatório, só sendo utilizado quando o registro rígido não é suficiente. Nesse caso, o algoritmo rígido serve para inicializar o registro não-rígido.

3.3.3.1 Registro Rígido

Para o registro rígido, optou-se por um algoritmo que trabalha com estatística robusta (REUTER; ROSAS; FISCHL, 2010) associado com uma métrica de similaridade mais apropriada para o registro multi-modal (WACHINGER; NAVAB, 2012; WACHINGER et al., 2013).

A estatística robusta é composta por métodos de estimação de parâmetros (estimadores de máxima verossimilhança) menos sensíveis ao ruído e valores atípicos (*outliers*), ao contrário dos estimadores da estatística padrão que geram resultados errôneos na presença de amostras inconsistentes com o modelo estatística considerado. Os estimadores robustos são chamados estimadores-M (STEWART, 1999) e têm a forma de geral:

$$\hat{\theta} = \underset{\theta}{argmin} \left(\sum_{i=1}^n \rho(x_i, \theta) \right) \quad (3.3)$$

Onde ρ é uma uma função geral e θ seus parâmetros.

Outliers são comuns em regiões de imagens que apresentam muita discrepância com relação à imagem de referência, e podem confundir métodos de registro que se baseiam em medidas da estatística comum, como, por exemplo, o erro quadrático médio (EQM). O trabalho de Reuter et al. (REUTER; ROSAS; FISCHL, 2010) elabora um algoritmo de registro rígido utilizando EQM como critério de similaridade, entretanto adota um estimador-M com função ρ biquadrática de Tukey, que é bastante utilizada em trabalhos com estatística

robusta:

$$\rho(x) = \begin{cases} \frac{c^2}{2}(1 - (1 - \frac{x^2}{c^2})^3) & \text{se } |x| \leq c \\ \frac{c^2}{2} & \text{caso contrario} \end{cases} \quad (3.4)$$

onde c é um limiar previamente escolhido.

O erro de alinhamento das imagens é dado pela equação:

$$r(\mathbf{p}) = I'(\mathbf{x} - \frac{1}{2}\mathbf{d}(\mathbf{p})) - I^s(\mathbf{x} + \frac{1}{2}\mathbf{d}(\mathbf{p})) \quad (3.5)$$

onde I' e I^s são as imagens móvel e referência, respectivamente. $\mathbf{x}$ é uma localização dentro da imagem e $\mathbf{d} = (d_1, d_2, d_3)$ é o deslocamento, que depende do vetor $\mathbf{p}$, como pode ser visto na equação. Pode-se adicionar pequenas perturbações a $\mathbf{p}$ através da soma de um vetor $\mathbf{q}$. Através de alguma manipulação matemática (ver (REUTER; ROSAS; FISCHL, 2010) para o desenvolvimento matemático completo), pode-se escrever a equação no formato matricial de uma regressão linear:

$$A\mathbf{q} - r(\mathbf{p} + \mathbf{q}) = r(\mathbf{p}) \quad (3.6)$$

Onde A é uma matriz de delineamento, onde cada elemento é o erro, para cada pixel da imagem, com relação a $\mathbf{p}$. O objetivo do algoritmo é achar o vetor $\mathbf{q}$ que minimiza o erro quadrático r . Aqui os parâmetros do estimador-M da equação 3.4 são calculados utilizando o algoritmo de Método Iterativo de Mínimos Quadrados Ponderados. A vantagem de utilizar a função de Tukey, é que esta evita o crescimento exacerbado do erro. Como o algoritmo é rígido, o modelo de transformação ($\mathbf{d}$) é uma matriz de transformação linear.

Apesar do arcabouço da estatística robusta ser atrativo para o uso em registro de imagens, sua proposta original não é apropriada para lidar com registro multi-modal de imagens, uma vez que seus cálculos são realizados diretamente sobre a intensidade dos pixels; tendo sido recentemente estendido para o uso de uma medida de diferença entre imagens de permite o registro multi-modal eficiente (WACHINGER et al., 2013).

No trabalho de Wachinger et al. (WACHINGER; NAVAB, 2012) é proposto o uso de entropia na criação de "mapas" que capturem a informação estrutural da imagem, ao invés do uso habitual dentro da métrica de informação mútua, que é calculada tendo como entrada direta a imagem móvel e a de referência. Nesse trabalho primeiro é criada uma imagem de entropia:

$$H(Y) = - \sum_{i \in I} p(Y = i) \log p(Y = i) \quad (3.7)$$

onde Y é uma variável aleatória e I é o conjunto de todos os tons de cinza possíveis nas

imagens. Para a criação do mapa de entropias, H é calculada sobre uma janela móvel de 11×11 pixels, que é posicionada sobre cada um dos pixels das imagens. Nesse esquema, é calculado um mapa para a imagem móvel e um para a imagem de referência.

O trabalho de Wachinger et al. (WACHINGER et al., 2013) estende o algoritmo de Reuter et al. (REUTER; ROSAS; FISCHL, 2010) para utilizar o mapa de entropias no cálculo de similaridade, tornando-o apto à trabalhar com imagens multi-modais.

3.3.3.2 Registro Não-rígido

Optou-se por utilizar um método de registro não-rígido difeomórfico, uma vez que este permite o registro simétrico, o qual possui algumas características desejáveis, como visto no capítulo 2, seção 2.1.1.2.

De forma resumida, uma função difeomórfica é uma função bijetora suave (diferenciável em todos os pontos) com uma inversa também suave. Em registro de imagens médicas, é comum a modelagem da transformação como um difeomorfismo em conjunto com uma variedade de dimensão infinita, o que permite o registro elástico simétrico. A seguir, algumas definições simples que ajudaram a elucidar esse conceito.

Homeomorfismo: Uma função $f : M \mapsto N$ é um homeomorfismo se f é bijetora e tanto f como f^{-1} são contínuas.

Função de classe C^k : Uma função é dita de classe C^k se esta é k vezes continuamente diferencial. Uma função é dita da classe C^∞ se possuir derivadas de todas as ordens.

Variedade: Uma variedade é um espaço que funciona como um espaço real $\mathbb{R}^n$ em pequenas escalas (localmente), mas que globalmente pode se comportar de forma muito diferente (LIMA, 2007). Um exemplo é o globo terrestre na figura 5. Enquanto que

Figura 5: Exemplo de uma variedade. Fonte: (NIETHAMMER, 2008)

localmente o espaço pode ser visto como um plano euclidiano, o mesmo não vale quando se olha o espaço de forma global. As coordenadas locais são dadas por uma *carta local* e o conjunto de todas as cartas locais da variedade forma um *atlas*. Se a mudança de coordenadas de uma carta local para outra é feita por funções C^∞ , então esta é chamada de variedade C^∞ .

Figura 6: Exemplo de mapeamento de uma variedade (Fonte: (YANG, 2009))

Na figura 6, x e y são cartas locais do círculo e a função ϕ_{top} mapeia um ponto a da variedade (no caso o círculo) até x . A inversa ϕ_{top}^{-1} faz o mapeamento inverso, do círculo até x . ϕ_{right} mapeia um ponto a do círculo até o espaço y . A função composta $\phi_{right}(\phi_{top}^{-1}(a))$ leva um ponto qualquer a da carta local x para a carta local y e é chamada de *mapa de transição*. A função ϕ pode ser uma curva entre dois pontos. É chamada de geodésica da menor curva entre dois pontos da variedade.

Difeomorfismo: Finalmente, a função $f : M \mapsto N$, com M e N sendo variedades da classe C^∞ será um difeomorfismo se f for homeomórfica e f^{-1} for da classe C^∞ .

O interesse dos difeomorfismos para registro de imagens está no fato de serem suaves e inversíveis, o que garante a preservação da topologia da anatomia que se quer registrar (ou seja, não há surgimento de dobras ou desaparecimento de estruturas após o registro) e a existência de mapeamento um-para-um entre os pontos da imagem móvel e deformada (AVANTS; SCHOENEMANN; GEE, 2005).

Optou-se por utilizar o algoritmo SyN (AVANTS et al., 2008) para esta pipeline. Nesse trabalho, os autores elaboram a formulação analítica de uma função objetivo difeomórfica,

simétrica, que utiliza correlação cruzada como medida de similaridade entre as imagens. Apesar de existirem diversos algoritmos de registro difeomórficos, um estudo comparativo realizado em 2009 (KLEIN et al., 2009) mostrou que o algoritmo SyN foi aquele cujo uso resultou em registros mais acurados, fato que também incentivou a adoção nessa pipeline.

No SyN a função de deformação é modelada como uma geodésica ϕ no espaço das transformações difeomórficas, que conecta (mapeia) duas imagens I e J . Uma imagem transformada por ϕ pode ser expressa como $\phi I = I(\phi(x, t = 1))$, o que expressa que I foi transformada por $\phi(x, 1)$ de forma direta. A forma inversa seria realizada aplicando a transformada inversa $\phi_{-1}(x, 1)$ em I . A distância

O SyN trabalha com a seguinte função objetivo:

$$E_{cc}(\bar{I}, \bar{J}) = \overbrace{\inf_{\phi_1} \inf_{\phi_2} \int_{t=0}^{0.5} \{ \underbrace{\|v_1(\mathbf{x}, t)\|_L^2}_{\phi_1} + \underbrace{\|v_2(\mathbf{x}, t)\|_L^2}_{\phi_2} \} dt}_{\text{deformação}} + \overbrace{\int_{\Omega} CC(\bar{I}, \bar{J}, \mathbf{x}) d\Omega}_{\text{similaridade}} \quad (3.8)$$

Esta é dividida em duas partes principais, a deformação e a medida de similaridade. A função de deformação é modelada como uma geodésica, que é a menor curva que conecta (mapeia) as imagens I e J , dentro do espaço das transformações difeomórficas. A geodésica é dada pelo termo $\inf_{\phi_1} \inf_{\phi_2} \int_{t=0}^{0.5} \{ \|v_1(\mathbf{x}, t)\|_L^2 + \|v_2(\mathbf{x}, t)\|_L^2 \} dt$ da equação 3.8. A geodésica é na realidade dividida em duas partes, ϕ_1 e ϕ_2 . Onde v_1 e v_2 são os campos de velocidade que regem o movimento dos pixels das imagens e $\|\cdot\|_L$ é um termo de regularização, ou seja, que suaviza o campo das velocidades garantindo que este seja diferenciável. Durante o processo de registro, os termos ϕ_1 e ϕ_2 são calculados até o espaço intermediário (dado por $t = 0,5$ na integral). Ou seja, o primeiro termo deforma a imagem I até o "meio do caminho", enquanto o segundo termo deforma a imagem J até o mesmo espaço intermediário.

Nesse formulação a medida de similaridade usada é a correlação cruzada CC , definida por:

$$CC(\bar{I}, \bar{J}, \mathbf{x}) = \frac{\langle \bar{I}, \bar{J} \rangle^2}{\langle \bar{I} \rangle \langle \bar{J} \rangle} \quad (3.9)$$

Onde $\bar{I} = I(\phi_1(\mathbf{x}, 0.5)) - \mu(\mathbf{x})$ e $\bar{J} = J(\phi_2(\mathbf{x}, 0.5)) - \mu(\mathbf{x})$, com I e J as imagens móvel e referência, respectivamente. Aqui ϕ_1 e ϕ_2 são funções de mapeamento (geodésicas, no caso), assim como visto no parágrafo sobre variedades, e $\mu(\mathbf{x})$ é a média calcula sobre uma janela quadrada em $\mathbf{x}$. Apesar da função objetivo ser elaborada usando correlação cruzada como medida de similaridade, esse arcabouço matemático permite que outras medidas possam ser utilizadas em seu lugar (AVANTS et al., 2008). A otimização propriamente dita é realizada utilizando as equações de gradiente dadas pela formulação de Euler-Lagrange.

3.3.4 Construção do Volume 3D

A construção do volume tridimensional da histologia nada mais é do que a concatenação das fatias registradas, na ordem correta do corte e armazenado em algum formato de arquivo capaz de lidar com dados tridimensionais. Aqui, especial atenção deve ser dada ao valor da dimensão dos voxels, que deve ser calculada a partir de alguma referência, como alguma escala fotografada junto com as lâminas.

3.3.5 Correção de Intensidades

Um artefato muito comum em histologia é a diferença de intensidades entre as lâminas. Isso acontece por fatores como diferença na absorção do corante, diferença no tempo de coloração, variações na espessura do corte, variação na iluminação ambiente, entre outros. O resultado é um efeito de "listras" que pode ser visto no plano perpendicular ao plano de corte do tecido, como pode ser visto na figura 7. Além de dificultar a visualização, tal artefato pode comprometer o registro 3D, uma vez que as listras criam bordas inexistentes no tecido.

Figura 7: Volume de histologia sem correção de intensidades

Para a correção de tal artefato optou-se por utilizar o método descrito em Malandain et al. (MALANDAIN; BARDINET, 2003). Nesse trabalho, a intensidade das imagens é normalizada através do casamento do histograma de uma imagem com relação à imagem adjacente. Tal método é global (afeta todas as partes da imagem da mesma forma), e é adequado para o uso em imagens coradas somente com um tipo de corante. Imagens cujos

diferentes tecido recebam diferentes colorações podem necessitar de métodos mais sofisticados, já que os histogramas para cada tecido se comportariam de forma independente e não poderiam ser ajustados por um método global.

A ideia desse algoritmo é realizar a transformação do histograma de uma imagem tendo como base o histograma de uma imagem adjacente, uma vez que fatias adjacente possuem anatomia parecida e consequentemente histogramas parecidos. O mesmo não pode ser dito de fatias muito separadas. A transformação do histograma é feita utilizando-se uma função afim. O diferencial desse método é a transformação do histograma em uma função contínua antes do processamento, o que evita problemas de quantização e garante um resultado mais consistente (MALANDAIN; BARDINET, 2003).

O problema recai basicamente em um problema de otimização, onde se deve encontrar os parâmetros de uma função afim $f(x) = ax + b$ que mapeará as intensidades do histograma original para o histograma ajustado:

$$\hat{f} = \underset{f}{\operatorname{argmax}} S(p(x_i), f \circ q(y_j)) \quad (3.10)$$

onde $S(\cdot)$ é uma função de similaridade e $p(\cdot)$ e $f \circ q(\cdot)$ funções densidade probabilidade (histogramas) relativas, respectivamente, à imagem que se quer ajustar e à imagem de referência. Como os histogramas p e q não são diretamente comparáveis, a ideia é criar versões contínuas destes através da reconstrução com uma Gaussiana (problema semelhante ao de reconstrução de imagens visto na seção 3.3.6). O problema pode ser escrito então como:

$$\hat{f} = \underset{f}{\operatorname{argmax}} S(p_s(x_i), f \circ q_s(y_j)) \quad (3.11)$$

Onde p_s e $f \circ q_s$ são os histogramas (fdp) contínuos:

$$p_s(x_j) = \sum_{i=0}^I p(x_i) \int_{x_{j\min}-x_i}^{x_{j\max}-x_i} K_s(x) dx \quad (3.12)$$

$$f \circ q(x_i) = \sum_{j=0}^J q(y_j) \int_{f(x_{i\min})-x_i}^{f(x_{i\max})-x_i} K_s(y) dy \quad (3.13)$$

onde $K(\cdot)$ é a função de reconstrução; no caso, uma Gaussiana. I e J os valores de tons de cinza que a imagem pode ter. Ao final do processo, tem-se os parâmetros a e b da função afim que será utilizada para fazer a transformação do histograma.

3.3.6 Reamostragem

A necessidade de se reamostrar as imagens surgiu de uma observação prática, onde se notou que os voxels das imagens de histologia possuem volumes submilimétricos, muito menores que a resolução das imagens RM padrão, que gira em torno de 1mm^3 . Tal discrepância faz com que as imagens de histologia, durante o processo de registro, sejam reamostradas para que tenham a mesma resolução das imagens de RM; o que causa perda de inúmeros detalhes nas imagens de histologia, principalmente com relação à pequenas estruturas. As informações de borda também acabam muitas vezes sumindo, como foi constatado por radiologistas em comunicação pessoal. Para tentar reduzir esse problema, optou-se por realizar uma reamostragem pré-registro tanto do volume de histologia quanto do volume de RM (ver seção 3.4.3 para detalhes), de forma a trazer ambas para uma "resolução intermediária" onde não há tanta perda nos detalhes do tecido, mas de forma que também não se gere uma demanda computacional exagerada.

Figura 8: Reamostragem de uma imagem

Uma imagem digital é formada por uma grade discreta de coordenadas de pixels; e o processo de reamostragem requer o mapeamento desta em uma nova grade, cujas coordenadas raramente possuem correspondência exata com a grade original. Então, é necessário primeiro construir uma versão contínua da imagem para que esta depois possa ser reamostrada em coordenadas arbitrárias. O processo de reamostragem ocorre basicamente em duas etapas: interpolação (reconstrução de sinal contínuo) e amostragem deste por uma nova grade de coordenadas, utilizando-se uma função de mapeamento. A

figura 8 apresenta um esquema simplificado do processo de reamostragem.

A interpolação do sinal é basicamente a convolução do sinal com uma função de interpolação (também chamada de kernel ou janela):

$$f_c(x) = \sum_{n=0}^{N-1} f(x_n)k(x-x_n) \quad (3.14)$$

Onde $k(\cdot)$ é a função de interpolação, $f(\cdot)$ o sinal discreto; e N é o número de pontos ao qual se quer aplicar a convolução. Essa operação equivale a realizar uma multiplicação do espectro do sinal com o espectro da janela. A função de interpolação ideal é a função *sinc*, uma vez que seu espectro de Fourier é uma função quadrada, o que permitiria o janelamento perfeito do sinal no domínio da frequência. Entretanto, essa função tem suporte infinito no domínio do tempo, não sendo viável utilizá-la em sistemas computacionais reais (OPPENHEIM, 1989). Utilizam-se então funções que possam aproximar uma janela quadrada. Uma função com um suporte espacial (no tempo) muito longo é mais dispendiosa computacionalmente, mas resulta numa melhor aproximação; enquanto uma função de suporte menor será mais rápida mas resultará em um resultado pior. Existem diversas funções de interpolação como vizinho mais próximo, linear, cubica, baseada em Fourier, *splines*, splines cubicas, entre outras (DEVILLARD, 2000). A escolha da função é um compromisso entre eficiência computacional e acurácia da reconstrução. Optou-se por utilizar a reconstrução por *splines* cúbicas nessa pipeline; as quais apesar de exigirem mais tempo computacional, geram um resultado muito mais próximo da imagem original.

Para a amostragem, é comum utilizar o esquema de mapeamento inverso, onde uma nova grade uniforme de coordenadas é estimada a partir da antiga (por exemplo, numa imagem que terá o dobro do tamanho da antiga, sabe-se que os voxels da nova grade serão 1/4 do tamanho dos voxels da imagem original) e então uma função de mapeamento $m^{-1}(\cdot)$ é calculada. O esquema inverso é popular, pois evita o surgimento de furos e amostras esparsas no resultado final, já que esse foi definido como uniforme desde o início. O mapeamento direto poderia gerar tais artefatos e ser mais dispendioso computacionalmente (HECKBERT, 1989). Um cuidado que deve ser tomado no mapeamento, é garantir que a frequência de amostragem respeite a frequência de Nyquist, onde a amostragem deve ser feita a uma frequência pelo menos duas vezes maior que a maior frequência presente no sinal (OPPENHEIM, 1989), de forma a evitar alias. Uma forma pratica de fazer isso é usar um filtro de passa baixo, na imagem/sinal, de forma que frequências muito altas sejam excluídas antes da reamostragem (HECKBERT, 1989).

3.4 Processamento da RM

3.4.1 Correção de Heterogeneidades

A heterogeneidade de intensidade, ou heterogeneidade de campo, é caracterizado como uma variação de intensidades de baixa frequência, não relacionada a variações anatômicas, que ocorre ao longo de regiões homogêneas da imagem. Pode ser causada por diferentes fatores como não-uniformidade do campo estático do equipamento, não-uniformidade na radiofrequência, movimentos do paciente, correntes induzidas, entre outros. Sua presença pode não causar impacto na avaliação visual das imagens, mas acarreta considerável queda de desempenho nos métodos de segmentação computadorizados.

O algoritmo escolhido para a pipeline é conhecido como N3 (SLED; ZIJDENBOS; EVANS, 1998). Este foi escolhido por ser um algoritmo já bem maduro e muito utilizado em diversos estudo com ressonância magnética. Nele a formação de uma imagem de RM ($i(.)$) é modelada como:

$$i(x) = u(x)e(x) + r(x) \quad (3.15)$$

Onde $u(.)$ é o sinal real, $r(.)$ o ruído e $e(.)$ o campo multiplicativo de não-uniformidade. É interessante notar que uma modelagem detalhada do ruído ($r(.)$) da RM é feita com uma distribuição de Rice para o caso médio, sendo que a distribuição de $r(.)$ tende a se comportar como uma gaussiana nas regiões de maior sinal (mais claras) e como uma distribuição de Rayleigh nas regiões de menor sinal (mais escuras) (NOWAK, 1999). Sled et al. (SLED; ZIJDENBOS; EVANS, 1998) faz uma modelagem mais simples, considerando r apenas como ruído gaussiano independente do sinal de RM.

A estimação de $u(.)$ é uma tarefa difícil devido à existência de diversos fatores, que somados originam o artefato, sendo alguns controláveis através da calibragem do equipamento, e outros variáveis dependentes do indivíduo a ser imageado. Portanto, o controle do campo de não-uniformidade durante a realização de uma aquisição é limitado, sendo necessária a aplicação de algoritmos de pré-processamento para que tal artefato seja reduzido (SLED; ZIJDENBOS; EVANS, 1998). A maior vantagem do N3 é ser capaz de estimar o campo multiplicativo $e(.)$ a partir apenas dos valores do pixels da imagem, sendo independente do protocolo de aquisição ou de qualquer modelagem dos tecidos contidos na imagem.

3.4.2 Segmentação do Crânio

Todas as regiões das imagens de RM que não pertencem ao encéfalo (cérebro e cerebelo) devem ser removidas. Isso reduz o número de pixels que devem ser processados e remove partes de imagem não importantes, as quais causariam erros durante o processo de registro.

O método adotado nessa *pipeline* é conhecido como BET (Brain Extraction Tool) (SMITH, 2002). Este foi escolhido por ser um método já maduro, eficiente e com bons resultados. Nesse método, uma segmentação grosseira entre cabeça e fundo da ressonância é feito, através de limiarização do histograma. Uma malha de triângulos em forma de esfera é inicializada no centro de massa geométrico da cabeça e então expandida e deformada. A expansão é feita de forma iterativa, onde cada vértice é deslocado seguindo um conjunto de equações que modelam as forças que agem sobre os vértices da malha. Ao final de todo o processo, tem-se uma máscara para a região do encéfalo.

3.4.3 Reamostragem

Optou-se por reamostrar o volume de ressonância para uma resolução "intermediária" entre esta e a histologia, cuja resolução normalmente é muito mais alta. Assim, como na reamostragem da histologia, optou-se por utilizar interpolação com *splines* cúbicas. Uma melhor explicação sobre o processo pode ser encontrada na seção 3.3.6. Um outro benefício, colateral, da reamostragem foi a redução do ruído da RM. Optou-se então por não incorporar um passo de redução de ruído explícita na pipeline e tirar vantagem do efeito secundário da reamostragem. Suavizar o ruído é importante pois sua presença corrompe as estruturas da imagem podendo dificultar a tarefa de registro ou induzir a erros.

3.5 Registro 3D da Histologia com RM

O resultado final do processamento da histologia é um volume tridimensional cuja geometria original foi recuperada através do registro com as imagens de blockface. Entretanto, não é possível corrigir as deformações causadas pela remoção do tecido do paciente.

Na figura 9, tem-se um exemplo de um volume de histologia (em vermelho) antes do registro 3D da histologia com RM. Pode-se notar o "achatamento" do cérebro, bem como um deslocamento global.

Figura 9: Volume de histologia sobreposto a RM, antes do registro 3D

Em geral, tais deformações causam uma grande discrepância entre o volume de RM e a histologia, exigindo um método de registro robusto. Aqui, novamente é adotado o algoritmo SyN, já que métodos difeomórficos são capazes de lidar com grandes deformações; ou seja, grandes diferenças entre o volume móvel e de referência (AVANTS; SCHOENEMANN; GEE, 2005). Uma melhor explicação sobre esse método pode ser encontrada na seção 3.3.3.2.

3.6 Construção do Volume 3D Colorido

Apesar de, na literatura, a grande maioria dos trabalhos não lidar com a informação de cor, esta é importante para destacar diferentes estruturas biológicas do tecido; e sem esta informação a identificação de estruturas de interesse pode ficar prejudicada. Em comunicação pessoal com especialistas em patologia e neurologia foi requisitado que a informação de cor fosse recuperada após o registro, pois agregaria mais utilidade ao método proposto.

Para tanto, cada imagem de histologia original é separada em arquivos distintos para os canais RGB. Todas as imagens, são deformadas utilizando os campos de deformação 2D que foram gerados na etapa de registro da histologia com a blockface (seção 3.3.3) e, a seguir, concatenadas para formar volumes tridimensionais temporários para cada canal de cor. Cada um desses volumes é então deformado, utilizando-se o campo de deformação calculado na etapa de registro 3D (seção 3.5). O volume final é criado, concatenando-se os canais RGB de cada fatia dos volumes temporários, em imagens coloridas.

3.7 Conclusão

Neste capítulo, foram apresentados os componentes que fazem parte do método aqui proposto, o qual possui quatro etapas principais: processamento da histologia, processamento da RM, registro 3D e construção do volume 3D colorido. Tal método foi formulado tendo como base as pesquisas realizadas no estado-da-arte da literatura, buscando reunir diversos métodos de forma a possibilitar o registro acurado das imagens de histologia com a RM.

4 *Implementação e Resultados*

Nos capítulos 2 e 3, foram apresentados os principais conceitos relacionados a registro de imagens, tendo como ênfase o registro de imagens de histologia; alguns trabalhos relacionados, e a descrição detalhada de uma proposta de método. Na primeira parte deste capítulo são apresentados os detalhes da implementação realizada, juntamente com os resultados obtidos ao final de cada etapa da execução da pipeline. Na segunda parte do capítulo, são apresentadas avaliações quantitativas do resultado final de registros da histologia com RM.

4.1 Implementação do Processamento da Histologia

4.1.1 Segmentação das Imagens Blockface e de Histologia

A implementação das etapas de segmentação de blockface e histologia é semelhante, uma vez que a estratégia de segmentação para *blockface* é robusta o suficiente para ser aplicada às imagens histológicas. A implementação é realizada, utilizando-se os métodos descritos nas seções 3.3.1 e 3.3.2 respectivamente. A inicialização padrão do algoritmo EM é através da atribuição automática, aleatória, de pixels às classes de fundo e tecido, estratégia que funciona bem para a maioria dos casos. Entretanto, no caso de algumas imagens mais complicadas (por exemplo, imagens com muitas regiões com transparência) a inicialização do EM pode ser feita com conjuntos de pixels pré-classificados pelo usuário, o que resulta em segmentações mais acuradas. Aqui as imagens originais, bem como as imagens segmentadas são armazenadas em formato TIFF para evitar artefatos de compactação.

Após a segmentação, as imagens de histologia e blockface são transformadas para tons de cinza, através da equação (que é a formula de conversão usada no padrão NTSC):

$$G(x) = 0.2989R(x) + 0.5870G(x) + 0.1140B(x)$$

Figura 10: Exemplo de segmentação do blockface e histologia. a) exemplo de imagem blockface, e b) respectiva imagem de histologia. c) blockface segmentado pelo método descrito, c) histologia segmentada pelo método descrito.

onde R,G e B são os valores de vermelho, verde e azul no pixel x .

Na figura 10, na coluna da esquerda tem-se um exemplo de imagem blockface e sua segmentação, já convertida para tons de cinza. Na coluna da direita tem-se a respectiva fatia de histologia, antes e após a segmentação.

4.1.2 Registro da Histologia com Blockface

A implementação da etapa de registro da histologia com o blockface foi feita em Matlab, encapsulando as funções de registro robusto e registro 2D, presentes nas suítes Freesurfer e ANTS, respectivamente. O registro inicial é feito utilizando-se o algoritmo de registro rígido robusto e, em seguida, é refinado pelo registro não-rígido. Verificou-se que em algumas poucas fatias, quando o registro rígido já apresentava uma boa qualidade, o registro não-rígido acabava por introduzir novas distorções na histologia. Para evitar esse problema, na implementação prática, mede-se a correlação cruzada da imagem de histologia antes e depois do registro. Se a qualidade do registro não-rígido não for maior, este é descartado.

Na figura 11 pode-se ver o efeito do registro da histologia com o blockface. Em 11 a)

Figura 11: Registro da histologia com blockface. a) fatia de histologia, b) respectiva imagem blockface, c) resultado do registro da histologia na imagem blockface (a imagem de histologia pode ser vista nos blocos mais escuros).

tem-se uma imagem de histologia enquanto em b) tem-se a respectiva imagem blockface. Pode-se notar também a grande diferença de escala entre as duas fatias. Na figura c) tem-se um mosaico mostrando o resultado do registro da histologia com o blockface.

4.1.3 Construção do Volume 3D

A criação do volume de histologia 3D é feita através da concatenação das imagens previamente registradas. O volume 3D é então armazenado em formato NIFTI. Deve-se tomar o cuidado para atribuir os valores reais para as dimensões dos voxels. Atualmente, essa tarefa é feita manualmente, pois a única forma confiável de se obter esse valores é através de comparação com fotografias de régua que são dispostas ao lado das lâminas imageadas. Na figura 12 tem a visão sagital, axial e coronal de um volume de histologia após o registro 2D. Pode-se notar uma grande quantidade de distorção (fig. 12 (a) e (b)) que se apresenta em forma de "achatamento". As diferenças entre as intensidades das

Figura 12: Visão coronal (a), axial (b) e sagital (c) de um volume de histologia 3D (após registro com blockface)

fatias também são bem visíveis nesse volume.

4.1.4 Correção de Intensidades

A etapa de correção de intensidades é implementada como explicado na seção 3.3.5. A correção das intensidades ocorre a partir do meio em direção às extremidades do volume.

Figura 13: Correção de intensidades. Esquerda: imagem original. Direita: resultado da correção.

Na figura 13, tem-se um exemplo de volume antes e após essa etapa. "Faixas" de diferentes intensidades são bem visíveis, nesse exemplo, na imagem original (esquerda).

4.2 Processamento da Ressonância Magnética

4.2.1 Correção de Heterogeneidade do Campo

Figura 14: Correção de heterogeneidade de campo na RM. a) imagem original, b) imagem corrigida, c) diferenças entre as imagens.

Essa etapa é realizada utilizando-se o algoritmo N3. Aqui, utiliza-se a implementação fornecida pela suíte FreeSurfer. O N3 é um algoritmo paramétrico, onde o número de iterações e a distância de suavização devem ser dadas pelo usuário. Aqui, utilizou-se 1000 iterações e distância de 50 pixels. Na figura 14, pode-se ver o resultado da correção de campo. Em 14 a) tem-se uma fatia de RM antes da correção; b) após a correção e c) a diferença entre as duas imagens. O artefato visto em 14 c) é conhecido como "artefato de brilho central" (*central brightening artifact*) e é comum em imagens realizadas em equipamentos de RM 3T (COLLINS et al., 2005).

4.2.2 Segmentação do Crânio

A etapa de segmentação do crânio/encéfalo foi realizada utilizando-se a implementação do método BET fornecido pela suíte FSL. Na figura 15, tem-se um exemplo de antes (esquerda) e depois (direita) da segmentação do crânio.

4.3 Registro 3D e Construção do Volume Colorido

A etapa de registro 3D é implementada como uma função do Matlab que encapsula o método de registro 3D SyN fornecido pela suíte ANTS. Antes do registro 3D efetivo, é realizada uma etapa de pré-alinhamento rígido que visa reduzir grandes diferenças entre o volume de histologia e a RM. Esta foi feita manualmente (manipulando todo o volume 3D

Figura 15: Segmentação do cérebro. Esquerda: imagem original. Direita: cérebro segmentado.

da histologia) usando o aplicativo Freeview, pertencente à suite Freesurfer (FREESURFER, 2013) e será automatizada no futuro. Verificou-se a necessidade dessa intervenção pois a discrepância de escala entre o volume de histologia 3D e a RM era tamanha que não era possível ser tratada pelo registro rígido do ANTS ou do Matlab. O registro 3D propriamente dito é realizado utilizando-se a medida de informação mútua (IM) de Mattes (MATTE et al., 2003), que é uma modificação da IM original para registro multi-modal. Na figura 16, tem-se um exemplo de reconstrução 3D do resultado do registro da histologia. Comparando-se a coluna a) com a coluna b) pode-se perceber que o efeito de "amassado" que o volume original possuía foi corrigido pelo registro. Pode-se notar que a o registro realçou um corte lateral, resultado da serra usada para abrir o crânio durante a autópsia.

A reconstrução do volume de histologia colorido é feita como descrito na seção 3.6. Ao final da aplicação dos campos de deformação 2D que foram previamente calculados, as imagens coloridas são empilhadas criando um volume 3D. Este é então deformado aplicando-se o campo de deformação 3D que foi computado previamente. Na figura 17 mostra duas perspectivas da reconstrução 3D, feita se utilizando o software Amira (AMIRA, 2013). Pode-se notar que a melhor visualização das diferentes regiões do córtex.

4.4 Resultados

A pipeline aqui proposta foi testada utilizando-se imagens de dois cérebro inteiros (aqui denominados caso #1 e caso #2) provenientes do Banco de Cérebros do Grupo de Estudos de Envelhecimento da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Figura 16: Reconstruções 3D do volume de histologia do caso #1. Coluna a) visão frontal (superior) e lateral (inferior) do volume antes do registro. Coluna b) visão frontal (superior) e lateral (superior) do volume após o registro. Coluna c) sobreposição do volume registrada na RM original.

(GRINBERG et al., 2007). Diversas aquisições de RM foram realizadas em ambos os casos, tais como Axial FLAIR (TR = 8613ms; TI = 2800ms; TE = 130ms; 0,65mm x 0,87mm; 1 NEX; 3 mm/0,3mm; FOV 230mm x 183mm, 2D), T1 (TR = 6,3ms; TE = 2,9ms; TI = 791ms; 240 x 240; 3D) and DTI (b = 3000; TE = 65ms; TR 23650ms; 1/0,0mm; FOV 256mm x 256mm; 1,0mm x 1,0mm; 2 NEX. 32 directions, SENSE = 2). Todas as aquisições foram realizadas em um *scanner* Philips Achieva 3T com bobinas de crânio multi-canal. Em ambos os casos, os exames foram realizado pós-mortem, porém in-situ (com o cérebro ainda no crânio do paciente). Para os testes aqui realizados foram utilizadas somente as imagens T1 em formato DICOM. Após remoção cirúrgica, os cérebros inteiros foram submetidos ao processamento histológico, como descrito em (HEINSEN; ARZBERGER; SCHMIT, 2000). De forma resumida, os espécimens foram fixados em formalina (processo que pode durar várias semanas) e, posteriormente, desidratados em soluções de etanol de diferentes concentrações. Foram então embebidos em solução de celoidina 8%, que é endurecida utilizando-se vapor de clorofórmio e imersão em álcool. Finalmente, os blocos endurecidos foram fatiados em um micrótomo (Polycut, UK). Durante o processo de corte, cada fatia foi fotografada imediatamente antes de ser separada do bloco, utilizando-se uma câmera DSLR com lente de macro (Canon EOS 5D Mark II e lente Olympus AutoMakro 50mm), criando assim o conjunto de imagens blockface utilizado pela pipeline. Cada fatia de tecido foi submetida ao processo modificado de coloração com galocianina, como

Figura 17: Duas visões da reconstruções 3D do volume de histologia colorido.

descrito em (HEINSEN; ARZBERGER; SCHMIT, 2000), gerando o conjunto de imagens de histologia a ser registrado. Todas as imagens foram submetidas ao processamento da pipeline aqui proposta. A figura 18 tem um exemplo do resultado final do registro. Através da sobreposição em padrão xadrez (quadrados mais escuros correspondem a imagens da histologia e mais claros a imagens de RM) pode-se fazer uma avaliação visual da qualidade do registro. É interessante notar que o caso #1 foi cortado no plano axial, enquanto o caso #2 foi cortado no plano sagital.

A avaliação quantitativa da qualidade do registro de uma imagem não é uma tarefa trivial pois requer o conhecimento da deformação real ocorrida, informação que geralmente não está disponível. Para avaliação desse tipo de trabalho, normalmente os autores utilizam de segmentações de regiões específicas das imagens, que são comparadas com um padrão ouro.

Para a avaliação dos resultados aqui obtidos, optou-se por comparar regiões específicas do cérebro, segmentadas manualmente por dois especialistas, no volume final da histologia e da RM. O objetivo foi avaliar a diferença, através de métricas apropriadas, entre essas regiões no volume registrado e na RM, que é considerada o padrão ouro uma vez que não possui as deformações causadas pelo tratamento histológico. Foram selecionadas as seguintes regiões: hipocampo direito (HD), núcleo caudado esquerdo (CE), ventrículos laterais superiores (VS) e formato do cérebro inteiro (CI). É importante notar que o ideal seria a comparação de todas as regiões anatômicas do cérebro, porém isso tornaria a tarefa inviável devido ao longo tempo necessário para a segmentação manual das mesmas. O

critério de escolha dessas regiões foi o fato de possuírem bordas bem definidas tanto na histologia como na RM, reduzindo a ambiguidade no momento da segmentação. A escolha de regiões no hemisfério esquerdo e direito teve o objetivo de medir a qualidade do registro nos diferentes hemisférios.

As segmentações do hipocampo direito, núcleo caudado esquerdo e ventrículos laterais superiores foi realizada por um neurocirurgião e um neuro-radiologista (aqui denominados médico #1 e médico #2), independentemente, fada-a-fatia, no volume de histologia registrada e na RM pré-processada. Para tal atividade utilizou-se o programa FreeView, que faz parte da suíte FreeSurfer, e uma mesa digitalizadora para desenho (Wacom, USA). A primeira segmentação do hipocampo foi realizada utilizando a opção de desenho por *splines* através da colocação de pontos de controle, porém observou-se que esse método era muito mais demorado do que o desenho a mão livre (1 hora para segmentação com *splines* contra 20 minutos para segmentação a mão livre), então optou-se por realizar as segmentações subsequentes a mão livre. A comparação visual entre as duas formas de segmentação não revelou grandes diferenças. A partir destas segmentações geraram-se as máscaras binárias usadas na comparação. As máscaras para cérebro inteiro foram criadas automaticamente através de limiarização (como fundo das imagens é preto, bastou utilizar um limiar rígido onde todos os pixels com valores abaixo de 5 foram descartados). As execução da pipeline, segmentação manual das regiões de interesse, bem como computação das métricas de avaliação do registro foram efetuadas em uma máquina Mac Pro com processador Intel 6 cores de 3.33GHz e 16Gb de memória RAM.

Na figura 19, tem-se exemplos das segmentações manuais criadas nos volumes de histologia registrada e de RM. As máscaras são criadas em tons de cinza, porém aqui utiliza-se cor para facilitar a visualização. Em azul, tem-se máscaras criadas pelo médico #1, e em vermelho pelo médico #2.

Já na figura 20, tem-se a reconstrução 3D dos volumes gerados empilhando-se as máscaras binárias. A direita pode-se ver as segmentações (na histologia) dos ventrículos laterais (vermelho), hipocampo esquerdo (amarelo) e núcleo caudado direito (azul). Na imagem do centro tem-se a segmentação das mesmas regiões para a RM. Na figura da esquerda tem-se as regiões segmentadas na histologia (amarelo) sobrepostas nas regiões segmentadas na RM (azul).

A avaliação dos resultados propriamente dita é realizada através de duas métricas: coeficiente de similaridade de Dice (CSD) (DICE, 1945) e o coeficiente de distância espectral ponderada normalizada (DEP) (KONUKOGLU et al., 2012, 2013).

Figura 18: Mosaico com exemplo de resultados do registro. a) plano coronal, b) plano axial e c) plano sagital de fatias da histologia registrada com MR para o caso #1. d) plano coronal, e) plano axial e c) plano sagital do registro do caso #2.

- Coeficiente de Similaridade de Dice (CSD) (DICE, 1945): É um método de validação estatístico que mede o grau de sobreposição entre duas amostras. O CSD é calculado pela fórmula:

$$d = \frac{2|A \cap B|}{|A| + |B|}$$

onde A e B são dois conjuntos distintos e $|\cdot|$ indica a cardinalidade do conjunto. O CSD pode assumir valores no intervalo $[0,1]$, onde 1 indica sobreposição perfeita dos objetos. Por sua simplicidade e eficácia, o CSD é muito popular na validação de estudos de segmentação e registro. Porém apresenta o inconveniente de não ser capaz de avaliar diferenças na forma global das regiões comparadas, o que pode levar a falsos bons resultados. Ou seja, dois objetos podem apresentar formas bem diferentes e ainda assim ter um alto coeficiente de Dice, pois apresentam uma boa sobreposição. Essa métrica pode ser calculada para objetos 2D e 3D.

- Coeficiente de distância espectral ponderada (DEP) (KONUKOGLU et al., 2012, 2013): Esse coeficiente utiliza conceitos de análise de formas para quantificar a diferença na geometria de dois objetos, indiferente do grau de sobreposição entre os mesmos.

Figura 19: Exemplo de máscaras segmentadas pelos médico #1 (azul) e médico #2 (vermelho) para o caso #1. Coluna a) núcleo caudado da histologia registrada (superior) e RM (inferior). Coluna b) hipocampo da histologia registrada (superior) e RM (inferior). Coluna c) ventrículos laterais superiores da histologia registrada (superior) e RM (inferior).

O DEP funciona como complemento para o CSD, uma vez que é capaz de detectar diferenças no formato dos objetos, habilidade que o CSD não possui. Essa métrica se utiliza das propriedades do espectro do laplaciano, que contém informações intrínsecas à geometria de um objeto (KAC, 1966). Tal fato pode ser explicado, de forma intuitiva, pensando em um objeto qualquer como se fosse um tambor. O autovalores do operador laplaciano desse objeto/tambor seriam as frequências fundamentais que a membrana deste é capaz de produzir. Já as autofunções do laplaciano seriam os padrões de vibração que o tambor é capaz de produzir. Os autovalores e autofunções estão intrinsecamente ligados ao formato desse tambor e por isso são utilizado na análise de formas.

Seja Ω uma forma geométrica com bordas contínuas (por exemplo uma máscara binária), o laplaciano ∇_{Ω} é dado por:

$$\nabla_{\Omega}^2 f(x) = \sum_i^d \frac{\partial^2}{\partial x_i^2} f(x)$$

Figura 20: Reconstrução 3D das máscaras binárias do caso #2, segmentadas pelo médico #1. a) ventrículos laterais superiores (vermelho), hipocampo direito (amarelo) e núcleo caudado esquerdo (azul) sobre a histologia; b) ventrículos laterais superiores (vermelho), hipocampo direito (amarelo) e núcleo caudado esquerdo (azul) sobre a RM; c) regiões segmentadas na histologia (amarelo) sobrepostas nas regiões segmentadas na RM (azul)

onde $f : \Omega \rightarrow \mathbb{R}, \forall x \in \Omega$. Aqui $f(x)$ é o objeto que se quer analisar. Os autovalores e autofunções do laplaciano podem ser calculadas por:

$$\nabla_{\Omega} f(x) + \lambda f(x) = 0$$

com $\forall x \in \Omega$. Existem infinitos pares $\{(\lambda_n, f_n(x))\}_{n=1}^{\infty}$ que satisfazem essa equação, os quais formam o conjunto dos autovalores e autofunções de ∇_{Ω} . Denomina-se espectro do laplaciano a sequência positiva, divergente, formada pelos autovalores do operador ∇_{Ω} :

$$0 < \lambda_1 < \lambda_2 < \lambda_n < \dots$$

A DEP não normalizada é definida por:

$$\rho^N(\Omega_{\lambda}, \Omega_{\xi}) \triangleq \left[\sum_{n=1}^N \left(\frac{|\lambda_n - \xi_n|}{\lambda_n \xi_n} \right)^p \right]^{1/p}$$

Com $\Omega_{\lambda}, \Omega_{\xi} \subset \mathbb{R}^d$, $p \in \mathbb{R}, p > d/2$. O parâmetro p controla a sensibilidade da métrica com relação à escala dos detalhes geométricos. Mais especificamente, para valores de p maiores, a DEP é menos sensível a diferenças geométricas em pequenas estruturas, como pequenas protusões ou pequenos amassados. É interessante notar que ρ^N é na realidade definida sobre o conjunto de infinitos autovetores do laplaciano, mas devido ao limite computacional existente, apenas os N primeiros autovalores são considerados.

A DEP normalizada definida por:

$$\bar{\rho}^N(\Omega_\lambda, \Omega_\xi) = \frac{\rho^N(\Omega_\lambda, \Omega_\xi)}{W(\Omega_\lambda, \Omega_\xi)} \in [0, 1)$$

$W(\Omega_\lambda, \Omega_\xi)$ é uma função de normalização que mapeia $\rho^N(\Omega_\lambda, \Omega_\xi)$ para o intervalo $[0, 1)$ (ver (KONUKOGLU et al., 2013) para a definição matemática e detalhes sobre a função de normalização). Ao contrário do CSD, aqui 0 significa a maior semelhança entre 2 formas enquanto 1 significar formas completamente diferentes.

A quantificação dos resultados foi feita computando-se os coeficientes de CSD e DEP 2D (d=2 e N=50), fatia-a-fatia; e 3D (d=3 e N=25, utilizou-se um N menor por limitação de memória), para o volume gerado pelas máscaras binárias. Enquanto a avaliação fatia-a-fatia fornece uma ideia da localização das maiores e menores discrepâncias entre histologia e RM, a avaliação 3D fornece uma ideia global da discrepância entre as estruturas. Os valores de CSD e DEP, referentes às comparações das segmentações do médico #1 médico #2, 3D podem ser vistos na tabela 3, bem como a média das discrepâncias.

		médico #1		médico #2		média	
caso	área	CSD	DEP	CSD	DEP	CSD	DEP
#1	HD	0,8	0,0009	0,7630	0,0006	0,7815	0,0008
	CE	0,81	0,0007	0,7088	0,0037	0,7594	0,0022
	VS	0,77	0,0062	0,7846	0,0055	0,7773	0,0058
média						0,7727	0,0029
#2	HD	0,771	0,0016	0,7488	0,0026	0,7599	0,0021
	CE	0,8	0,0014	0,7048	0,0028	0,7524	0,0021
	VS	0,7833	0,0061	0,7652	0,0078	0,7742	0,0070
média						0,7622	0,0037
média total						0,7674 ± 0,01	0,0033 ± 0,002

Tabela 2: Coeficientes CSD e DEP 3D para hipocampo direito (HD), núcleo caudado esquerdo (CE) e ventrículos laterais superiores (VS)

Como as máscaras de cérebro inteiro não foram criadas por médicos, os coeficientes referentes a este estão expostos na tabela 3.

caso	CSD	DEP
#1	0,9502	0,0114
#2	0,9675	0,0054
média	0,9588	0,0084

Tabela 3: Coeficientes CSD 3D e DEP 3D do cérebro inteiro

A avaliação quantitativa apresentada na tabela 3 revela que, em geral, os registros foram bem sucedidos para os dois casos testados. Fato indicado pelos baixos coeficientes

CSD, que revelam boa localização no registro das estruturas; e pelos baixos coeficientes DEP, que revelam que as estruturas comparadas tinham formatos muito próximos do respectivo padrão ouro. A tabela 3 também revela que o registro do caso #1 foi mais acurado que o registro do caso #2. Pode-se notar isso comparando os valores dos coeficientes para ambos os casos. Tal fato corrobora avaliações visuais, que mostravam mais erros de registro no caso #2. Um fato interessante sobre as imagens do caso #2, é que estas estavam em piores condições que as do caso #1, apresentando mais artefatos como rasgos e furos. O caso #2 também apresentou mais problemas durante o pré-processamento, principalmente na segmentação das imagens blockface. Dada a anatomia do cérebro no plano sagital, haviam muitas regiões de transparência (a celoidina é transparente em poucas quantidades) que tornaram a segmentação das imagens blockface mais complicada. Piores segmentações levaram a piores registros 2D, fato que refletiu no resultado geral do registro final.

Os resultados do registro do cérebro inteiro (vide tabela 3) foram satisfatórios para ambos os casos. Os altos coeficientes CSD revelam boa localização no registro das estruturas, enquanto os baixos coeficientes DEP revelam que as estruturas comparadas tinham formato muito próximo do padrão ouro.

Nas figuras 21 e 22 se tem os gráficos dos valores de CSD e DEP, fatia-a-fatia, para as segmentações do médico #1 e médico #2, dispostos próximos para melhor comparação. O objetivo de avaliar o registro fatia-a-fatia foi verificar a eficiência desse ao longo dos volumes. É importante ressaltar que, nesse gráficos, o deslocamento no eixo das fatias não implica em um deslocamento dentro do volume do encéfalo. Esse índice indica somente a localização da fatia dentro do volume segmentado.

É interessante notar a ocorrência de maior erro nas extremidades dos volumes. Isso se deve ao fato de as extremidades dos volumes em geral serem regiões muito reduzidas, sendo mais difícil realizar uma segmentação precisa. Aqui uma avaliação se torna ambígua, pois tal erro tanto pode ser causado por imperfeições no registro, como por imperfeições na segmentação manual, ou uma combinação de ambas.

Outro fato que chama a atenção é que na avaliação do registro dos ventrículos laterais, sempre no meio do encéfalo há um erro acentuado. Em inspeção visual pode-se constatar que as imagens nessa região sempre possuem muitos artefatos, pois há cavidades e vestígios de meninges. Nessa região, é mais provável a ocorrência de artefatos na histologia, o que causa pior registro das imagens. Esse problema é acentuado no caso #2 onde o corte do tecido foi feito no plano sagital, o que gerou mais artefatos do que o corte axial no caso

#1. A tabela 2 corrobora esse achado. Nela pode-se notar que a acurácia do registro dos ventrículos laterais do caso #2, é um pouco menor que para o caso #1.

Ademais, observando os gráficos pode-se notar que o registro da maioria das fatias é bom, tendo valores de CSD altos e valores de DEP bem baixos.

A tabela 4 traz a comparação dos métodos pesquisados na literatura, já apresentados no capítulo 2, juntamente com o método proposto (que pode ser visto na última linha). Os trabalhos mais parecido com o trabalho realizado nessa tese são o de Amunts et al. (AMUNTS et al., 2013) e Yang et al. (YANG et al., 2013). Entretanto, é difícil fazer uma relação direta com estes trabalhos, pois em nenhum dos casos os autores fornecem avaliações quantitativas do resultados, e nem disponibilizam as imagens utilizadas. Ademais, ambos os trabalhos utilizam RM ex-situ, ou seja, que foi realizada com o cérebro fora da cabeça do paciente. Tais imagens já apresentam distorções causadas pela extração cirúrgica e não permitem a recuperação da geometria original.

Por fim, além das métricas DEP e CSD, também calculou-se o determinante Jacobiano (aqui chamado somente de Jacobiano) da transformação. Este fornece informações importantes sobre a natureza local do campo de deformação, e seu uso é comum em estudos de registro para avaliar as características do registro obtido. A partir do Jacobiano pode-se verificar a ocorrência de expansão, compressão ou dobras na imagem registrado, sendo este último caso indesejável pois indicaria o desaparecimento de tecido. Do cálculo diferencial integral, temos que:

$J(T(x)) = 1$: nenhuma mudança

$J(T(x)) > 1$: expansão

$J(T(x)) < 1$: compressão

$J(T(x)) \leq 0$: dobra

onde $T(x)$ é a deformação em x e J é o determinante Jacobiano. O valor absoluto de J indica a magnitude da deformação.

O Jacobiano foi calculado sobre as deformações 3D utilizadas no registro final do caso #1 e caso #2. Os intervalos de valor encontrados foram, respectivamente, $[0; 3,39]$ e $[0; 3,17]$. A figura 23 mostra os mapas, em pseudo-cor, da distribuição dos Jacobianos. Como foi dito anteriormente, a presença de Jacobianos iguais a zero indicaria a ocorrência de dobras e desaparecimento de tecido, o que é potencialmente problemático pois indicaria potencial perda de informações da histologia. Porém, é importante ressaltar que a

ferramenta ANTs, utilizada nessa pipeline, calcula o Jacobiano utilizando o método de diferenças finitas, que pode sofrer de imprecisões numéricas quando trabalha com difeomorfismos (DUPUIS; GRENDER; MILLER, 1998). Nesse caso, o Jacobiano zero indicaria na realidade regiões onde houve muita compressão e portanto valores muito muito baixo que não puderam ser capturados pelo método das diferenças finitas (AVANTS; TUSTISON; SONG, 2011).

Figura 21: Valores de CSD e DEP 2D para o caso #1. a) CSD da segmentação do médico #1; b) CSD da segmentação do médico #2; c) DEP da segmentação do médico #1; d) DEP da segmentação do médico #2.

Figura 22: Valores de CSD e DEP 2D para o caso #2. a) CSD da segmentação do médico #1; b) CSD da segmentação do médico #2; c) DEP da segmentação do médico #1; d) DEP da segmentação do médico #2.

Figura 23: Jacobianos calculados para o caso #1 e caso #2. a) visão axial, b) visão coronal e c) visão sagital dos valores do Jacobiano do caso #1. a) visão axial, b) visão coronal e c) visão sagital dos valores do Jacobiano do caso #2.

Artigo	Objetivo				Imagem				Espécie				Tipo de registro	Validação
	reconstrução 3D	criar atlas	registro com RM	registro intermodalidades	blockface	histologia	RM	OCT	humana	macaco	rato	inseto		
(GUEST; BALDOCK, 1996)	◆					◆					◆			---
(YUSHKEVISH et al., 2006)	◆					◆	◆				◆		◆	visual
(SINGH et al., 2006)			◆		◆	◆	◆				◆		◆	distância euclidiana
(DAUGUET et al., 2007)			◆		◆	◆	◆			◆			◆	diferença de volumes
(CIFOR; PRINDMORE; PITIOT, 2009)	◆					◆				◆			◆	---
(GRINBERG et al., 2009)			◆			◆	◆		◆					---
(ALIC et al., 2010)			◆			◆	◆				◆		◆	determinante do Jacobiano
(CIFOR; BAI; PITIOT, 2011)	◆					◆	◆				◆		◆	CSD, EQM
(OSENCHINSKIY; KRUGGEL, 2011)			◆			◆	◆		◆				◆	similaridade cumulativa
(FEUERSTEIN et al., 2011)	◆				◆	◆					◆		◆	EAR, EEA, EI, EIN
(GOUBRAN et al., 2012)			◆		◆	◆			◆				◆	distância euclidiana
(ADLER et al., 2012)		◆				◆	◆		◆				◆	distância entre bordas
(SAALFELD et al., 2012)	◆					◆						◆		---
(AMUNTS et al., 2013)	◆					◆	◆		◆				◆	---
(YANG et al., 2013)			◆			◆	◆		◆				◆	---
(MAGNAIN et al., 2014)				◆	◆	◆		◆	◆				◆	---
(ADDLER et al., 2014)		◆				◆	◆						◆	distância entre bordas
Método proposto			◆		◆	◆	◆		◆				◆	DEP, CSD

Tabela 4: Tabela comparativa dos trabalhos de registro de histologia encontrados na literatura, incluindo o método proposto (última linha)

Na tabela 4 se tem a comparação do levantamento dos metodos de registro encontrado na literatura. A partir deste, pode-se notar que existem poucos trabalhos que lidam com o registro de histologia do cérebro humano, sendo a maioria aplicados a imagens de camundongos e alguns aplicados a imagens de macacos. Dentre os estudos que trabalham com material humano, grande parte utiliza apenas pedaços específicos do cérebro; sendo raro o uso de imagens de cérebro inteiro. Além disso, poucos trabalhos propõem uma pipeline de processamento completa, sendo que a maioria se foca apenas em relatar o processo de alinhamento, não se preocupando com pré e pós processamento. Pode-se notar também que os trabalhos na área não se preocupam com a informação de cor do material de histologia, apesar da importância que esta tem na interpretação das imagens de histologia. Em contraste, o método aqui descrito foi concebido para trabalhar com imagem de cérebro humano inteiro e registrá-las às suas respectivas imagens de RM intra crânio, recuperando assim a conformação espacial original do órgão. A informação de cor da histologia é preservada nesse método, podendo ser visualizada pelos médicos posteriormente. Ademais, o trabalho aqui realizado fez uma descrição detalhada de cada passo da pipeline.

4.5 Conclusão

Na primeira parte deste capítulo, foram apresentados os detalhes de implementação da pipeline proposta, juntamente com resultados parciais de cada etapa desta, de forma a ilustrar seus funcionamento. Na segunda parte do capítulo foi apresentada uma avaliação quantitativa do resultado do registro final, utilizando comparação com segmentações manuais realizadas por médicos experientes na área, e métricas apropriadas.

5 *Discussão e Conclusões*

5.1 **Considerações Finais**

Este trabalho teve como objetivo conceber, implementar e avaliar um método para registrar imagens de histologia e RM, com ênfase no registro de imagens de cérebro inteiro processadas pelo método histológico da celoidina (ver seção 4), tendo como base para o registro somente informações presentes nas imagens. Para tanto, foi proposta uma formulação composta de etapas e processos, capaz de lidar com a complexidade inerente a estes tipos de imagens. Esse trabalho representa a culminação de anos de pesquisa e trabalho que originaram os diversos métodos de processamento de imagens aqui utilizados, que foram reunidos em uma única pipeline, que acreditamos que será de interesse da comunidade neurocientífica que necessita de tais métodos para realizar seus estudos.

A maior dificuldade encontrada durante a realização deste trabalho foi a falta de bases de dados de exames de RM e histologia que pudessem ser utilizadas na validação do trabalho. Durante o levantamento do estado-da-arte não foram encontradas bases de dados padronizadas que possuísem RM e histologia com as respectivas segmentações; e/ou bases que possuísem RM e histologia e respectivos campos de deformação. A verificação dos resultados foi feita adotando-se como “padrão ouro” as segmentações manuais realizadas por dois médicos experientes e o cálculo de métricas que medem a suas diferença. Não foi possível comparar com outros trabalhos da literatura, pois a maior parte dos trabalhos encontrados não fornece quantificação dos resultados, apresentando somente análises visuais.

Os resultados apresentaram-se satisfatórios, sendo que a comparação das regiões segmentadas manualmente teve coeficiente de Dice (CSD) 3D médio de 0,77 e coeficiente de distância espectral ponderada (DEP) 3D de 0,003. No caso do CSD, quanto mais próximo de 1, maior similaridade existe entre as amostras. Já no caso do DEP, quanto mais próximo de zero o resultado, maior a similaridade geométrica entre os objetos comparados.

5.2 Contribuições

Uma das principais contribuições deste trabalho foi reunir e implementar métodos dispersos na literatura, voltados para diferentes problemas em imagens por RM do encéfalo, imagens de histologia e de registro, em um método completo capaz de pré-processar ambas as modalidades e realizar o registro da histologia com RM, com necessidade mínima de interação com o usuário.

Esse trabalho também originou um código fonte aberto, que está disponível em <https://github.com>

5.2.1 Trabalhos publicados

A seguir, apresenta-se uma lista dos artigos e resumos publicados dentro do contexto desse doutorado.

5.2.1.1 Artigos completos

ALEGRO, M. C.; ALHO, E.; ZOLLEI, L.; AMARO-JR, E.; LOPES, R. D.: A Computational Pipeline for Full Brain Histology to MRI Registration. MICCAI 2014 (submetido).

ALEGRO, M. C.; HUNG-TSU, W. ; SILVA, A. V.; AMARO-JR, E.; LOPES, R. D.; BANDO, S. Y.; MOREIRA-FILHO, C. A.; CASTRO, L. H. M. Texture analysis of high resolution MRI allows discrimination between febrile and afebrile initial precipitating injury in mesial temporal sclerosis. *Magnetic Resonance in Medicine*, v. 68, p. n/a-n/a, 2012.

BANDO, S. Y.; ALEGRO, M. C.; AMARO-JR, E.; SILVA, A. V.; CASTRO, L. H. M.; HUNG-TZU, W.; LIMA, L. A.; BRENTANI, H.; MOREIRA-FILHO, C. A. Hippocampal CA3 Transcriptome Signature Correlates with Initial Precipitating Injury in Refractory Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *Plos One*, v. 6, p. e26268, 2011.

5.2.1.2 Resumos publicados em anais de congresso

MOREIRA-FILHO, C. A.; BANDO, S. Y.; IAMASHITA, P.; ALEGRO, M. C.; SILVA, A. V.; SILVA, L. R. P.; CASTRO, L. H. M.; HUNG-TZU, W.; AMARO-JR, E. . Genomic and interactome analyses differentiate early an late onset febrile refractory mesial temporal lobe epilepsy.. In: 13th International Conference on Systems Biology,

2012, Toronto.

SILVA, A. V.; SILVA, L. R. P.; BANDO, S. Y.; ALEGRO, M. C.; AMARO-JR, E.; CASTRO, L. H. M.; WEN, H.; MOREIRA FILHO, C. A. . Cytoarchitectural Abnormalities of the Dentate Gyrus in Refractory Medial Temporal Lobe Epilepsy.. In: 29th International Epilepsy Congress, 2011, Roma.

SILVA, L. R. P.; BANDO, S. Y.; ALEGRO, M. C.; AMARO JR, E.; CASTRO, L. H. M.; WEN, H.; MOREIRA FILHO, C. A ; SILVA, A. V. . Morphometric parameters and clinical data in temporal lobe epilepsy associated with hippocampal sclerosis a comparative study. In: 29th International Epilepsy Congress, 2011, Roma.

ALEGRO, M. C.; AMARO-JR, E.; SILVA, A. V.; BANDO, S. Y.; LOPES, R. D.; MOREIRA-FILHO, C. A. . High Resolution MRI Texture Analysis of Hippocampal Tissue: Histopathological Correlations in Mesial Temporal Lobe Epilepsy. In: 29th International Epilepsy Congress, 2011, Roma.

BANDO, S. Y.; ALEGRO, M. C.; AMARO JR, E.; SILVA, A. V.; CASTRO, L. H. M.; WEN, H.; BRENTANI, H.; MOREIRA FILHO, C. A. Hippocampal CA3 Transcriptome Signature and Dentate Gyrus MRI Features Correlate with Initial Precipitating Injury in Refractory Temporal Lobe Epilepsy. In: 29th International Epilepsy Congress, 2011, Roma.

5.3 **Trabalhos futuros**

A implementação computacional do método proposto encontra-se em estágio de protótipo. Diversas melhorias são sugeridas, como por exemplo:

- Teste com novos volumes: O ideal é testar o método com mais volumes de cérebro inteiro, de forma a garantir uma melhor avaliação do desempenho do mesmo. O teste com novos volumes também permitirá verificar o desempenho em situações adversas, de forma a identificar falhas que devem ser corrigidas.
- Teste com volumes de outras regiões: Apesar de ter sido desenvolvida em grande parte visando o processamento de imagens de cérebro inteiro, a proposta não exige nenhum conhecimento à priori a respeito da anatomia contida nas imagens. Ou seja, imagens de blocos de tecido também poderiam ser processados, desde que sigam os mesmos protocolos de histologia e RM contemplados pelo método.

- Segmentação: A segmentação das imagens de blockface mostrou-se desafiadora, principalmente em regiões que continham transparência da celoidina. Nessas imagens, a segmentação por GMM não apresentou bons resultados, o que impacta no resultado geral do registro. Métodos de segmentação mais elaborados poderia ser desenvolvidos para lidar com esse problema.
- Implementação em linguagem dedicada: A maior parte da implementação computacional atual foi feita em Matlab, o qual é uma excelente ferramenta para estudo e prototipagem, porém apresenta alguns problemas de eficiência. Seria desejável a implementação em uma linguagem de uso geral, como C++ ou Java, que apresenta melhor eficiência e tornaria o processamento mais rápido.
- Visualizador de histologia: Uma das dificuldades encontradas durante a realização deste trabalho foi a falta de um visualizador de volumes, como por exemplo o Freeview, que fosse capaz de mostrar as imagens em cor da histologia. Acabou-se utilizando o Amira para este fim, mas esta é uma ferramenta de visualização geral, não sendo muito prática para a visualização de histologia; e com a desvantagem de ser proprietária. Seria interessante o desenvolvimento de uma ferramenta adequada para a visualização 3D das imagens coloridas de histologia.
- Uso de métodos mais robustos para a segmentação do blockface pode reduzir a necessidade de inicialização manual do GMM, no caso de imagens mais complexas.
- Implementação de uma estratégia de pré-registro entre o volume de RM e a histologia pré registro 3D para redução de interação com o usuário para corrigir a distância entre os volumes.

APÊNDICE A -- Execução da Pipeline

Para a execução da pipeline deve-se ter os seguintes aplicativos instalados:

- Matlab: Versão 2012b ou superior;
- FreeSurfer: Versão de desenvolvimento mais recente.
Pode ser baixando em <https://surfer.nmr.mgh.harvard.edu/> ;
- FSL: Versão mais recente.
Pode ser baixado em <http://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki/> ;
- Amira: Esse item é opcional e só é necessário para a reconstrução do volume de histologia colorido. Como o Amira é um aplicativo proprietário, deve ser adquirido em <http://www.vsg3d.com/amira/overview>.

O código fonte da pipeline pode ser baixado em <https://github.com/malegro/registration>.

A execução da pipeline é feita executando-se os seguinte comandos:

Histologia

Segmentação de blockface: **preprocess_seg_block.m**

Segmentação da histologia: **preprocess_seg_histo.m**

Registro 2D da histologia com blockface: **register_histo2block.m**

Correção da intensidade da histologia: **preprocess_intnorm_histo.m**

Reamostragem: **mri_convert** (linha de comando)

RM

Correção de heterogeneidade de campo: **nu_correct** (linha de comando)

Segmentação do cérebro: **BET** usando a interface gráfica do FSL (parâmetros padrão)

Reamostragem: **mri_convert** (linha de comando)

Registro 3D

Registro da histologia com a RM: **run_ants_histo2mri.sh** (linha de comando)

Volume colorido

Aplica transformações 2D aos canais R, G e B das imagens de histologia: **posprocess_histo_color_2D.m**

Aplica a transformação 3D aos canais R, G e B do volume de histologia: **posprocess_histo_color_3D.m**

A seguinte estrutura de diretório deve ser utilizada para a organização das imagens (os scripts de Matlab assumem essa estrutura de diretório na hora de processar as imagens):

```
Case/
Case/mri/<sequence> MRI images
Case/histology/orig      Histology original images
                        /seg      Segmented TIFF images
                        /seg/mgz   Segmented images converted to MGZ
                        /reg1     2D histology to blockface registration temporary files
                        /regblock  2D histology to blockface registered files
                        /intnormreg 2D registered histology with intensity correction
                        /intnormreg/volume 3D volume from stacked histology slices (this is
the volume that gets registered to the MRI)
                        /final/2d   2D registered color images
                        /final/3d/RGB 2D registered color 3d volume
```

APÊNDICE B -- Parâmetros Utilizados

A seguir tem-se a relação de parâmetros padrão utilizados nos algoritmos adotados dentro da pipeline. As etapas da pipeline onde não há uso de algoritmo paramétricos foram omitidas. Para mais detalhes sobre os métodos adotados, ver capítulo 3.

Processamento da Histologia

1. Segmentação do blockface.
 - Número de amostras (para o caso de inicialização manual do algoritmo de *clustering*) : 12 pontos para cada classe considerada (fundo e tecido).
 - Número de iterações do EM: Variável conforme a image. Limite de iterações configurado para 100.
 - Número de iterações do contono ativo: 10.
2. Segmentação da histologia.
 - Número de amostras (para o caso de inicialização manual do algoritmo de *clustering*) : 12 pontos para cada classe considerada (fundo e tecido).
 - Número de iterações do EM: Variável conforme a image. Limite de iterações configurado para 100.
 - Número de iterações do contono ativo: 10.
3. Registro da histologia com blockface.
 - Medida de similaridade do registro não-rígido 2D: informação mútua de Mattes.
 - Número de resoluções: 3.
 - Número de iterações por resolução: 30; 30 e 10.
4. Correção de intensidades da histologia.

- Ponto inicial da otimização: 1,0; -2,0
5. Reamostragem da histologia.
 - Volume do voxel final: 0,33mm
 - Função de interpolação: B-spline cubica.
 6. Registro da Histologia com RM
 - Medida de similaridade do registro não-rígido 3D: informação mútua de Mattes.
 - Número de resoluções: 3.
 - Número de iterações por resolução: 30; 30 e 10.

Processamento da RM

1. Correção de heterogeneidade.
 - Distância da variação do campo: 50mm.
 - Número máximo de iterações: 1000.
2. Segmentação do encéfalo.
 - Limiar de intensidade fracional: 0,3.
3. Reamostragem da RM.
 - Volume do voxel final: 0,33mm
 - Função de interpolação: B-spline cubica.

Referências

- ADDLER, D. H. et al. Histology-derived volumetric annotation of the human hippocampal subfields in postmortem mri. *NeuroImage*, v. 84, 2014.
- ADLER, D. H. et al. Reconstruction of the human hippocampus in 3d from histology and high-resolution ex-vivo mri. *IEEE International Symposium on Biomedical Imaging*, 2012.
- ALEGRO, M. C. et al. Texture analysis of high resolution mri allows discrimination between febrile and afebrile initial precipitating injury in mesial temporal sclerosis. *Magnetic Resonance in Medicine*, p. 1522–2594, 2012.
- ALHO, E. J. L. et al. A novel histological approach to delineate the 3d cytoarchitecture of the human thalamus with registration of microscopical anatomy and mri information. *submetido ao Journal of Neurosurgery*, 2014.
- ALIC, L. et al. Multi-modal image registration: matching mri with histology. *SPIE*, v. 7626, 2010.
- AMIRA. 2013. [Http://www.vsg3d.com/amira/overview](http://www.vsg3d.com/amira/overview) (acesso em 05/02/2013).
- AMUNTS, K. et al. Bigbrain: An ultrahigh-resolution 3d human brain model. *Science*, v. 340, 2013.
- ANNESE, J. The importance of combining mri and large-scale digital histology in neuroimaging studies of brain connectivity and disease. *Frontiers in Neuroinformatics*, v. 6, 2012.
- AOKI, S. et al. Normal deposition of brain iron in childhood and adolescence: Mr imaging at 1.5t. *Radiology*, v. 172, 1989.
- AVANTS, B. B. et al. Symmetric diffeomorphic image registration with cross-correlation: Evaluating automated labeling of elderly and neurodegenerative brain. *Medical Image Analysis*, v. 12, 2008.
- AVANTS, B. B.; SCHOENEMANN, P. T.; GEE, J. C. Lagrangian frame diffeomorphic image registration: Morphometric comparison of human and chimpanzee cortex. *Medical Image Analysis*, 2005.
- AVANTS, B. B.; TUSTISON, N.; SONG, G. *Advanced Normalization Tools (ANTS)*. [S.l.], March 2011.
- BANDO, S. Y. et al. Hippocampal ca3 transcriptome signature correlates with initial precipitating injury in refractory mesial temporal lobe epilepsy. *PLoS ONE*, v. 6, n. 10, 2011.

- BECKER, J. *Focusing Camera*. 1916. US Patent 1,178,474, Filed 11 Aug. 1900; Patented 4 Apr. 1916.
- BISHOP, C. M. *Pattern Recognition and Machine Learning*. [S.l.]: Springer, 2007.
- BROWN, M.; SZELISKI, R.; WINDER, S. Multi-image matching using multi-scale oriented patches. *International Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*, 2005.
- CHAN, T.; VESE, L. A. Active contours without edges. *IEEE Transactions on Image Processing*, v. 10, n. 2, 2001.
- CIFOR, A.; BAI, L.; PITIOT, A. Smoothness-guided 3d reconstruction of 2d histological images. *NeuroImage*, v. 56, 2011.
- CIFOR, A.; PRINDMORE, T.; PITIOT, A. Smooth 3d reconstruction for 2d histological images. *Information Processing in Medical Imaging (IPMI)*, 2009.
- COLLINS, C. et al. Central brightening due to constructive interference with, without, and despite dielectric resonance. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, v. 21, n. 2, 2005.
- CRUM, W. R. et al. Zen and the art of medical image registration: correspondence, homology, and quality. *NeuroImage*, v. 20, 2003.
- DAUGUET, J. et al. Three-dimensional reconstructions of stained histological slices and 3d non-linear registration with in-vivo mri for whole baboon brain. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 164, 2007.
- DEVILLARD, N. Astronomical image resampling. *The Messenger ESO*, v. 100, 2000.
- DICE, L. R. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, v. 26, n. 3, 1945.
- DRESSLER, R. *Image Matching Apparatus*. 1956. US Patent 2,989,890, Filed 13 Nov. 1956; Patented 27 June 1961.
- DUDA, R. O.; HART, P. E.; STORK, D. G. *Pattern Classification*. [S.l.]: Wiley, 2001.
- DUPUIS, P.; GRENDER, U.; MILLER, M. I. Variational problems on flows of diffeomorphisms for image matching. *Quarterly of Applied Mathematics*, LVI, n. 3, p. 587–600, September 1998.
- EICKHOFF, S. et al. High-resolution mri reflects myeloarchitecture and cytoarchitecture of human cerebral cortex. *Human Brain Mapping*, v. 24, n. 3, 2005.
- FEUERSTEIN, M. et al. Reconstruction of 3d histology images by simultaneous deformable registration. *MICCAI*, 2011.
- FREESURFER. *Freesurfer*. 2013. <https://surfer.nmr.mgh.harvard.edu/> (acesso em 05/02/2013).
- GOSHTASBY, A. A. *Image Registration Principles, Tools and Methods*. [S.l.]: Springer, 2012.

- GOUBRAN, M. et al. Robust registration of sparsely sectioned histology to ex-vivo mri of temporal lobe resections. *SPIE Medical Imaging*, v. 8314, 2012.
- GRINBERG, L. T. et al. Improved detection of incipient vascular changes by a biotechnological platform combining port mortem mri in situ with neuropathology. *Journal of Neurological Sciences*, v. 283, 2009.
- GRINBERG, L. T. et al. Assessment of factors that confound mri and neuropathological correlation of human postmortem brain tissue. *Cell Tissue Banking*, v. 9, 2008.
- GRINBERG, L. T. et al. Brain bank of the brazilian aging brain study group - a milestone reached ad more than 1600 collected brains. *Cell Tissue Banking*, v. 8, n. 151, 2007.
- GUEST, E.; BALDOCK, R. Automatic reconstructions of serial sections using the finite element method. *Bioimaging*, 1996.
- HECKBERT, P. S. *Fundamentals of Texture Mapping and Image Warping*. Tese (Doutorado) — University of California Berkeley, 1989.
- HEINSEN, H.; ARZBERGER, T.; SCHMIT, C. Celloidin mounting (embedding without infiltration) - a new, simple and reliable method for producing serial sections of high thickness through complete human brains and its application to stereological and immunohistochemical investigations. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, v. 20, n. 49, 2000.
- HILL, D. L. G. et al. Medical image registration. *Physics in Medicine and Biology*, v. 46, p. R1–R45, 2001.
- HOLDEN, M. A review of geometric transformations for nonrigid body registration. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, v. 27, n. 1, 2008.
- KAC, M. Can we hear the shape of a drum? *American Mathematical Monthly*, v. 73, n. 4, 1966.
- KAKUMANU, P.; MAKROGIANNIS, S.; BOURBAKI, N. A survey of skin-color modeling and detection methods. *Pattern Recognition*, v. 40, p. 1106–1122, 2007.
- KILIMANN, I. et al. Subregional basal forebrain atrophy in alzheimer's disease: A multicenter study. *Journal of Alzheimer Disease*, 2014.
- KLEIN, A. et al. Evaluation of 14 nonlinear deformation algorithms applied to human brain mri registration. evaluation of 14 nonlinear deformation algorithms applied to human brain mri registration. evaluation of 14 nonlinear deformation algorithms applied to human brain mri registration. *NeuroImage*, v. 1, n. 46, 2009.
- KONUKOGLU, E. et al. Wesd - weighted spectral distance for measuring shape dissimilarity. *IEEE Transactions on Patterns Analysis and Machine Intelligence*, v. 35, n. 9, p. 2284–2297, September 2013.
- KONUKOGLU, E. et al. Discriminative segmentation-based evaluation through shape dissimilarity. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, v. 31, n. 12, 2012.

- LIMA, E. L. *Variedades Diferenciáveis*. [S.l.]: IMPA, 2007.
- LOWE, D. G. Object recognition from local scale-invariant features. *7th IEEE International Conference on Computer Vision*, 1999.
- MAGNAIN, C. et al. Blockface histology with optical coherence tomography: A comparison with nissl staining. *NeuroImage*, v. 84, 2014.
- MAINTZ, J. B. A.; VIERGEVER, M. A. A survey of medical image registration. *Medical Image Analysis*, v. 2, n. 1, p. 1–36, 1998.
- MALANDAIN, G.; BARDINET, E. Intensity compensation within series of images. In: *MICCAI 2003*. [S.l.: s.n.], 2003. (LNCS).
- MATHWORKS. *Matlab Inc.* 2013. [Www.mathworks.com](http://www.mathworks.com) (acessado em 05/02/2013).
- MATTES, D. et al. Pet-ct image registration in the chest using free-form deformations. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, v. 22, n. 1, 2003.
- MORI, S.; ZHANG, J. Principles of diffusion tensor imaging and its applications to basic neuroscience research. *Neuro*, v. 51, 2006.
- MYRONENKO, A. *Non-rigid Image Registration: Regularization, Algorithms and Applications*. Tese (Doutorado) — Oregon Health and Science University, 2010.
- NIETHAMMER, M. *Diffeomorphisms*. 2008. Notas de aula.
- NOWAK, R. D. Wavelet-based rician noise removal for magnetic resonance imaging. *IEEE Transactions on Image Processing*, v. 8, n. 10, october 1999.
- OLIVEIRA, F. P. M.; TAVARES, J. R. M. N. Medical image registration: a review. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*, v. 17, n. 2, 2014.
- OPPENHEIM, A. V. *Discrete-time Signal Processing*. [S.l.]: Prentice Hall, 1989.
- OSENCHINSKIY, S.; KRUGGEL, F. Slice-to-volume nonrigid registration of histological sections to mr images of the human brain. *Anatomy Research International*, v. 2011, 2011.
- REESE, R. et al. The atypical subthalamic nucleus - an anatomical variant relevant for stereotactic targeting. *Movement Disorders*, v. 27, n. 4, 2012.
- REUTER, M.; ROSAS, H. D.; FISCHL, B. Highly accurate inverse consistent registration: A robust approach. *NeuroImage*, 2010.
- ROBERTS, L. G. *Machine Perception of 3-D Solids*. Tese (Doutorado) — MIT, 1963.
- ROHLFING, T. Image similarity and tissue overlaps as surrogates for image registration accuracy: widely used but unreliable. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, v. 31, n. 2, 2012.
- SAALFELD, S. et al. Elastic volume reconstruction from series of ultra-thin microscopy sections. *Nature Methods*, 2012.

- SÁNCHEZ-ÁLVAREZ, J.; SERRANO-CASTRO, P.; CAÑADILLAS-HIDALGO, F. Epilepsia refractaria del adulto. *Revista de Neurología*, v. 35, n. 10, 2002.
- SCHORMANN, T.; ZILLES, K. Three-dimensional linear and nonlinear transformations: An integration of light microscopical and mri data. *Human Brain Mapping*, v. 6, n. 5-6, 1998.
- SILVA, A.; CAVALHEIRO, E. Epilepsia: uma janela para o cérebro. *MultiCiência*, v. 3, 2004. ISSN 1806-2946.
- SILVA, A. V. et al. Cytoarchitectural abnormalities of the dentate gyrus in refractory medial temporal lobe epilepsy. *29th International Epilepsy Congress*, 2011.
- SINGH, M. et al. From human mri to microscopy: co-registration of human brain images to postmortem histological sections. *IEEE Medical Imaging Conference*, 2006.
- SLED, J. G.; ZIJDENBOS, A. P.; EVANS, A. C. A non-parametric method for automatic correction of intensity non-uniformity in mri data. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, v. 18, 1998.
- SMITH, S. M. Fast robust automated brain extraction. *Human Brain Mapping*, 2002.
- SOTIRAS, A.; DAVATZIKOS, C.; PARAGIOS, N. Deformable medical image registration: A survey. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, v. 32, n. 7, p. 1153–1190, 2013.
- STEWART, C. V. Robust parameter estimation in computer vision. *SIAM Review*, v. 41, p. 513–537, 1999.
- THEOFILAS, P. et al. A novel approach for integrative studies on neurodegenerative diseases in human brains. *Journal of Neuroscience Methods*, 2014.
- THIRION, J. P. Image matching as a diffusion process: an analogy with maxell's demons. *Medical Image Analysis*, v. 2, n. 3, 1998.
- WACHINGER, C. et al. Robust registration of multi-modal images. *Human Brain Mapping*, 2013.
- WACHINGER, C.; NAVAB, N. Entropy and laplacian images: Structural representations for multi-modal registration. *Medical Image Analysis*, v. 16, p. 1–17, 2012.
- YANG, J.; LU, W.; WAIBEL, A. Skin color modeling and adaptation. In: *Computer Vision — ACCV'98*. [S.l.: s.n.], 1997. v. 1352, p. 687–694.
- YANG, S. et al. Integration on ultra-high field mri and histology for connectome based research of brain disorders. *Frontiers in Neuroanatomy*, v. 7, 2013.
- YANG, W. *A Brief Introduction to Manifold Learning*. 2009. Notas de aula.
- YU, O. et al. Existence of contralateral abnormalities revealed by texture analysis in unilateral intractable hippocampal epilepsy. *Magnetic Resonance in Medicine*, 2001.
- YUSHKEVISH, P. A. et al. 3d mouse brain reconstruction from histology using o coarse-to-fine approach. *WBIR*, 2006.

ZITOVÁ, B.; FLUSSER, J. Image registration methods: A survey. *Image and Vision Computing*, v. 21, p. 977–1000, 2003.