UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FFCLRP - DEPARTAMENTO DE COMPUTAÇÃO E MATEMÁTICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM COMPUTAÇÃO APLICADA

Rogério Adriano de Sousa

Processamento Automático de Imagens Histológicas para Auxílio ao Diagnóstico do Remodelamento Cardíaco

Ribeirão Preto - SP

2021

Sousa, Rogério Adriano de
Processamento Automático de Imagens Histológicas para Auxílio ao Diagnóstico do Remodelamento Cardíaco.
Ribeirão Preto, 2021.
82 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Computação Aplicada.
Orientador: Joaquim Cezar Felipe.

1. Morfometria do tecido cardíaco. 2. Processamento de Imagens Médicas. 3. Diagnóstico auxiliado por computador.

Rogério Adriano de Sousa

Processamento Automático de Imagens Histológicas para Auxílio ao Diagnóstico do Remodelamento Cardíaco

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Computação Aplicada.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Joaquim Cezar Felipe
Professor Associado do Departamento de Computação e Matemática desta faculdade.
Orientador

Prof(a). Dr(a). Rubens Fazan Júnior
Professor Associado do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP
Convidado 1

Prof(a). Dr(a). Ivan Torres Pisa
Professor Adjunto da Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Informática Em Saúde.
Convidado 2

Ribeirão Preto - SP
2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me guiado e ajudado a superar os obstáculos durante essa caminhada, colocando diante de mim pessoas e oportunidades maravilhosas.

Sou eternamente grato a minha esposa Karina, que ao longo desse projeto, sempre foi compreensiva, incentivadora e paciente, obrigado pelo amor e dedicação.

Agradeço aos meus pais Luís e Marina, pessoas admiráveis em que me inspiro e busco ser uma pessoa melhor a cada dia.

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Joaquim Cezar Felipe, meu orientador, a quem tive o privilégio de conhecer, um grande orientador e incentivador, alguém que admiro e considero como amigo. Uma pessoa que me inspira como professor e sempre vou me espelhar como profissional.

Agradeço ao professor Rubens Fazan Júnior e as pesquisadoras Ana Carolina Mieko Omoto, Beatriz da Cunha Nascimento e Fernanda Sacardo Merli, por terem contribuído com o desenvolvimento desse projeto.

Meus agradecimentos vão também para pessoas e amigos que trabalham comigo e sempre estiveram presentes durante essa trajetória, Ana Carla, Fábio, Daniel, Diego e Lucas, obrigado pelo entusiasmo e ajuda.

Existe uma coisa que uma longa existência me ensinou: toda a nossa ciência, comparada a realidade, é primitiva e inocente; e, portanto, é o que temos de mais valioso.

Albert Einstein

RESUMO

Apesar do crescente nível de desenvolvimento das pesquisas na área médica sobre temas que envolvem envelhecimento e qualidade de vida, os problemas cardíacos, tais como o infarto do miocárdio, mostram-se ainda preponderantes e recorrentes, independentemente do grau de desenvolvimento econômico e social das diferentes populações e culturas. A ausência do aporte de oxigênio e nutrientes provoca morte das células cardíacas, que são substituídas por tecido fibrótico não funcional, levando a um acúmulo de proteínas na matriz extracelular, normalmente reposto por colágeno. Além do infarto do miocárdio, outras condições fisiopatológicas, incluindo hipertensão, diabetes e obesidade, estão associadas às alterações conhecidas como remodelamento fibrótico cardíaco. Na avaliação do remodelamento cardíaco a partir da análise microscópica de fragmentos de tecido, os especialistas observam, dentre outras, duas alterações relevantes: o acúmulo de colágeno intersticial nas fibras miocárdicas e as alterações do diâmetro das células (cardiomiócitos). Este projeto tem por objetivo principal modelar, implementar e avaliar dois métodos. O primeiro consiste em processar automaticamente imagens microscópicas do tecido cardíaco para extrair as medidas do diâmetro dos cardiomiócitos. O segundo analisa automaticamente imagens microscópicas, visando quantificar a presença de colágeno intersticial nas fibras miocárdicas. O método proposto utilizou diversas técnicas de processamento de imagens baseadas em morfologia matemática, assim como técnicas de extração de características.

Para avaliação dos métodos, foi utilizado um conjunto de imagens que possibilitou a comparação entre os resultados obtidos pelos algoritmos e o procedimento manual realizado por um especialista. Como resultados, verificou-se que o método proposto para morfometria das células possibilitou a segmentação das fibras com um valor médio de similaridade de área igual a 81% e com erro médio de medida do diâmetro igual a 5,9%. O método para quantificação do colágeno apresentou acurácia igual a 86,8%, precisão de 92,4% e sensibilidade igual a 92,9%. Além de tornar a análise mais rápida, acelerando o processo que leva ao diagnóstico de remodelamento cardíaco, a quantificação automática dos principais parâmetros envolvidos deve gerar uma redução substancial dos níveis de subjetividade, aumentando, assim, a precisão do processo.

Palavras-chave: Morfometria do tecido cardíaco, processamento de imagens médicas, diagnóstico auxiliado por computador.

ABSTRACT

Despite the growing level of development of research in the medical field on topics involving aging and quality of life, heart problems, such as myocardial infarction, are still prevalent and recurrent, regardless of the degree of economic and social development of the different populations and cultures. The absence of oxygen and nutrients contributes to the death of cardiac cells, which are replaced by non-functional fibrotic tissue, leading to an accumulation of proteins in the extracellular matrix, normally replaced by collagen. In addition to myocardial infarction, other pathophysiological conditions, including hypertension, diabetes and obesity, are associated with changes known as fibrotic cardiac remodeling. In assessing cardiac remodeling based on microscopic analysis of tissue fragments, experts observe, among others, two relevant changes: the accumulation of interstitial collagen in the myocardial fibers and changes in the diameter of the cells (cardiomyocytes).

The main objective of this project is to model, implement and evaluate two methods. The first is to automatically process microscopic images of the cardiac tissue to extract the measurements of the diameter of the cardiomyocytes. The second automatically analyzes microscopic images, in order to quantify the presence of interstitial collagen in the myocardial fibers. The proposed methodology used several image processing techniques based on mathematical morphology, as well as techniques for extracting characteristics.

To evaluate the methods, a set of images was used that made it possible to compare the results obtained by the algorithms and the manual procedure performed by a specialist. As a result, it was found that the proposed method for cell morphometry allowed the segmentation of fibers with an average area similarity value equal to 81% and with an average diameter measurement error equal to 5,9%. The collagen quantification method showed accuracy equal to 86.8%, precision 92.4% and sensitivity equal to 92.9%. In addition to making the analysis faster, accelerating the process that leads to the diagnosis of cardiac remodeling, the automatic quantification of the main parameters involved should generate a substantial reduction in the levels of subjectivity, thus increasing the accuracy of the process.

Keywords: Cardiac tissue morphometry, medical image processing, computer aided diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem de biópsia do tecido cardíaco corada com picrosirius..... 15

Figura 2 - Imagem de biópsia coradas com HE..... 16

Figura 3 - Diagrama geral do PDI 25

Figura 4 - Cubo representativo do modelo de cores RGB. 26

Figura 5 - Exemplos de elementos estruturantes 28

Figura 6 - Resultado da dilatação. (a) Original. (b) Resultado 29

Figura 7 – Resultado da erosão. (a) Original. (b) Resultado 30

Figura 8 – Resultado do fechamento. (a) Original. (b) Resultado..... 31

Figura 9 – Resultado da abertura. (a) Original. (b) Resultado..... 32

Figura 10 – Resultado da top-hat. (a) Original. (b) Resultado..... 33

Figura 11 – Exemplo de segmentação. (a) Imagem Original. (b) Imagem segmentada. 34

Figura 12 - Representação da Segmentação Watershed. 35

Figura 13 – Resultado do processo de limiarização. (a) Imagem original. (b) Imagem resultante. 36

Figura 14 - Exemplo de Retângulo que envolve a fronteira, baseado no seu eixo maior (D) e no seu eixo menor (d). 38

Figura 15 - Exemplos da base de imagens utilizadas para teste dos algoritmos. (a) septo saudável, (b) septo com reperfusão, (c) parede livre com reperfusão, (d) parede livre saudável, (d) corte transversal corada com hematoxilina & eosina..... 42

Figura 16 – Sequência de Operações do método proposto para automatização do processo de morfometria dos cardiomiócitos em imagens de biópsia do tecido cardíaco. ... 44

Figura 17 - Sequência de operações do método proposto para automatização do processo de quantificação de colágenos em imagens do tecido cardíaco. 51

Figura 18 – Identificação de hemácias presente nas imagens histológicas. (a) imagem original com marcação de uma área com hemácias. (b) Detalhe ampliado da marcação de hemácias. 57

Figura 19 – Imagem do processo de remoção das hemácias. (a) Imagem original. (b) imagem com as hemácias removidas. 57

Figura 20 – Extração dos canais RGB. (a) Imagem original. (b) Imagem do canal R. (c) Imagem do canal G. (d) Imagem do canal B. 58

Figura 21 – Imagem com núcleos e artefatos destacados. (a) Imagem do canal vermelho. (b) Imagem com aplicação da limiarização . (c) Imagem resultante, contendo núcleos e artefatos. 58

Figura 22 – Imagem remoção de artefatos. (a) Imagem com núcleos e artefatos. (b) Imagem com artefatos removidos 59

Figura 23 – Fluxo de operações da remoção dos núcleos com função *INPAINT*. (a) Imagem de entrada. (b) Imagem da máscara. (c) Resultado do processo de remoção dos núcleos. 60

Figura 24 – Fluxo do processo de segmentação. (a) Imagem com *threshold*. (b) Imagem com a remoção de falhas do processo de *threshold*. (c) Resultado da transformada de distância. (d) Marcadores de primeiro plano. (e) Marcadores de segundo plano (f) resultado da segmentação. 61

Figura 25 - Imagem resultante do processo de segmentação *wathershed.* 63

Figura 26 – Exemplo do processo de remoção de objetos não circulares. (a) região da imagem original segmentada. (b) região do processo final de remoção de objetos não circulares. 64

Figura 27 – Remoção de objetos pequenos. (a) Imagem segmentada. (b) Imagem resultante do processo de remoção dos objetos menores que 250 pixels..... 65

Figura 28 – Exemplo extração e filtragem por área do fecho convexo. a) Imagem original segmentada. (b) Imagem resultante do processo de filtragem. 66

Figura 29 - Exemplo de cálculo do menor diâmetro das células. (a) imagem original. (b) resultado da aplicação da função implementada para o cálculo dos diâmetros mínimos. (c) região ampliada da imagem do resultado da função implementada, no qual é representado cada elemento. Centroide da célula ponto branco; maior diâmetro eixo vermelho; menor diâmetro eixo magenta..... 67

Figura 30 - Resultado do processo de identificação das fibras contendo colágeno. (a) Imagem Original. (b) Imagem resultante do processo..... 69

Figura 31 - Imagens segmentadas. (a) automática. (b) manual..... 70

Figura 32 - Distribuição de frequências para os valores de diâmetro (em pixels) obtidos pelo processo automático e pelo processo manual. As faixas foram definidas com intervalos de 10 em 10. 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores obtidos de SIA e ESA para as imagens segmentadas automaticamente em relação ao padrão-ouro 71

Tabela 2 – Valores médio do diâmetro obtido para as imagens segmentadas automaticamente e imagens segmentadas manualmente, com respectivos erros. 72

Tabela 3 - Resultado da análise de quantificação de colágeno. 74

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO 13

1.1 Considerações iniciais 13

1.2 Motivação 18

1.3 Objetivos 19

1.4 Organização desse trabalho 20

CAPÍTULO 2 - TRABALHOS CORRELATOS 21

CAPÍTULO 3 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 24

3.1 Processamento Digital de Imagens 24

3.2 Modelo de Cor RGB 26

3.3 Morfologia Matemática 27

3.3.1 Dilatação 28

3.3.2 Erosão 29

3.3.3 Fechamento 30

3.3.4 Abertura 31

3.3.5 Top-Hat 32

3.4 Segmentação 33

3.4.1 Watershed 34

3.4.2 Limiarização (Thresholding) 35

3.4.3 Descritores de fronteira 36

3.5 Descritores geométricos 36

3.5.1 Centroide 37

3.5.2 Diâmetro da fronteira 37

CAPÍTULO 4 - MÉTODO PROPOSTO 39

4.1 Proposta 39

4.2 Materiais 41

4.3 Ambiente 42

4.4 Métodos 43

4.4.1 Procedimento 1: Morfometria dos cardiomiócitos 43

4.4.1.1 Pré-processamento 45
4.4.1.2 Segmentação 46
4.4.1.3 Morfometria 48
4.4.2 Procedimento 2: Quantificação de colágeno 50
4.4.3 Medidas de avaliação 52
CAPÍTULO 5 - RESULTADOS 55
5.1 Procedimento 1: morfometria dos cardiomiócitos 56
5.1.1 Pré-Processamento 56
5.1.2 Segmentação 60
5.1.3 Morfometria 63
5.2 Procedimento 2: quantificação de colágeno 67
5.3 Validação dos Métodos 69
5.3.1 Validação do Procedimento 1 70
5.3.2 Validação do Procedimento 2 74
CAPÍTULO 6 - CONCLUSÕES 76
REFERÊNCIA 78

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

Neste capítulo serão apresentados contexto, desafios e motivações para o desenvolvimento do presente projeto de mestrado. Nele iremos discutir os objetivos e destacar as principais contribuições, além de apresentar a organização desta dissertação.

1.1 Considerações iniciais

Segundo a Organização Mundial da Saúde[1] (revisão de fevereiro de 2021), o infarto agudo do miocárdio é responsável por mais de 17,9 milhões de mortes ao ano no mundo e grande parte dessas ocorrências têm como causa o aumento da expectativa de vida da população e a prevalência de morbidades como a obesidade e a síndrome metabólica. No Brasil esse número chega a 70 mil. A região Sudeste é a região com maior percentual de óbitos (47,9%), a Nordeste vem em seguida (20,2%), a região Sul com 14,8%, Centro-Oeste 9,1% e a Norte com 8% (MEDEIROS *et al.*, 2018).

O processo que leva ao infarto do miocárdio decorre da ausência do aporte de oxigênio e nutrientes, a qual provoca morte das células cardíacas, que são substituídas por tecido fibrótico não funcional, levando à disfunção ventricular e a marcantes alterações no balanço autonômico cardíaco (WEBB, ADGEY E PANTRIDGE, 1972). A fibrose caracteriza-se por um acúmulo de proteínas da matriz extracelular, em particular, o colágeno. O processo de remodelamento ocorre na morte celular cardíaca para garantir a integridade do coração sem perda de células, e em resposta ao estiramento (fibrose reativa). Outras condições fisiopatológicas estão associadas

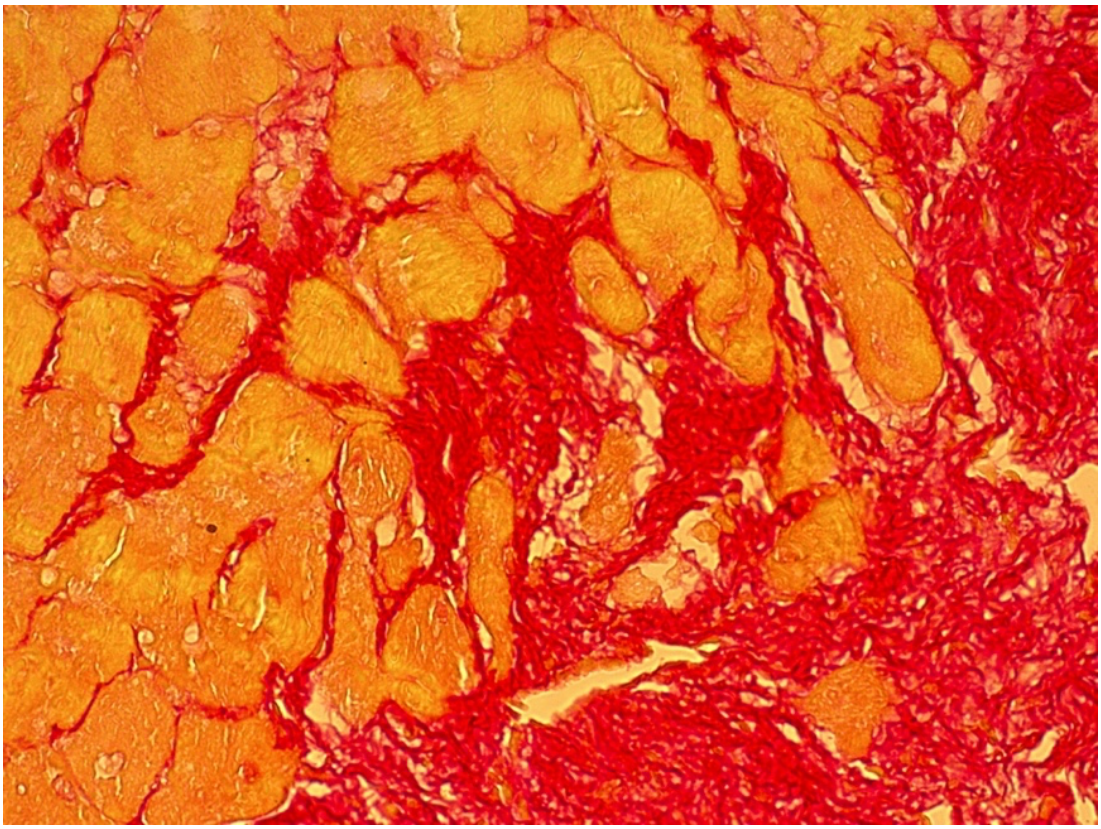
1 https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=839

ao remodelamento fibrótico cardíaco, incluindo hipertensão (DÍEZ, 2007), diabetes tipo 1 e tipo 2 (RUSSO E FRANGOGIANNIS, 2016) ou obesidade (CAVALERA, WANG E FRANGOGIANNIS, 2014), que, assim como o infarto do miocárdio, levam à formação de cicatrizes fibrosas densas (TALMAN E RUSKOAHO, 2016).

As principais intervenções terapêuticas utilizadas para minimizar os danos causados pelo infarto agudo do miocárdio são a restauração da perfusão miocárdica e a injúria de isquemia/reperfusão (IR) do miocárdio, a qual consiste no restabelecimento do fluxo coronariano que, embora traga benefícios, traz consequências danosas ao coração, pois o procedimento resulta em corrente complexa de lesões adicionais. (BRAUNWALD E KLONER, 1985; PIPER, GARCÍA-DORADO E OVIZE, 1998; YELLON E HAUSENLOY, 2007).

A análise histológica do tecido cardíaco é um método comum que fornece não apenas a oportunidade de quantificação, mas também para a diferenciação entre padrões morfológicos e acumulação fibrótica em espaços perivasculares (fibrose perivascular) ou fibrose intersticial (acumulações fibróticas no interstício entre cardiomiócitos). A Figura 1 apresenta uma imagem típica do tecido cárdico, com a resolução de 2048 x 1536 pixels, coradas com picrosirius vermelho e adquiridas por meio de um microscópio com ampliação de 40x.

Figura 1 – Imagem de biópsia do tecido cardíaco corada com picrosirius

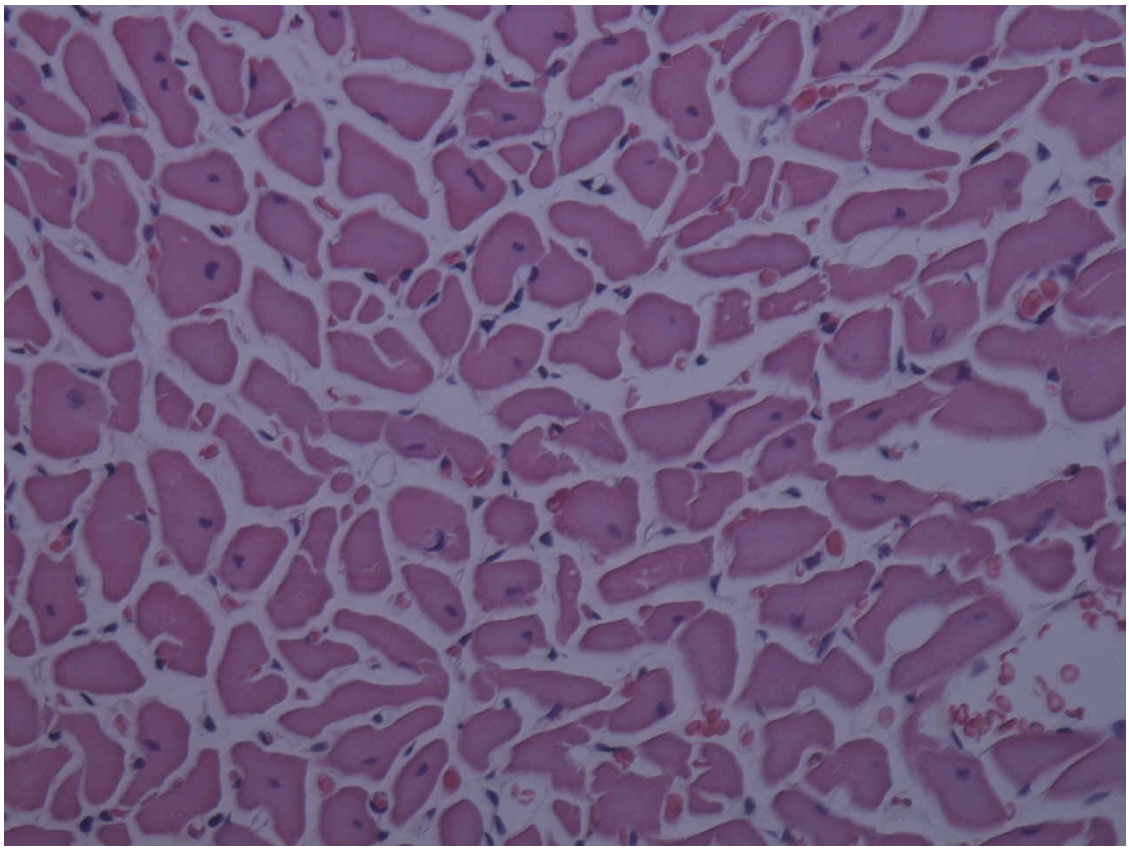


Fonte: Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Uma das características cardíacas que pode ser evidenciada a partir da análise microscópica do tecido é a alteração do diâmetro das células (dos cardiomiócitos), que evidencia a hipertrofia cardíaca. Para isto, são utilizadas imagens de exames de biópsia coradas com Eusina/Hematoxilina (HE).

A Figura 2 apresenta uma imagem com a resolução de 2048 x 1536 pixels, adquiridas por meio de microscópio com a ampliação de tamanho 40x. Podemos ver uma imagem de células cuja maioria possui o corte na direção transversal.

Figura 2 - Imagem de biópsia coradas com HE.



Fonte: Departamento de Fisiologia e Biofísica da University of Mississippi Medical Center (Jackson - MS, EUA)

É importante ressaltar que a análise vai além do remodelamento/infarto. Podemos evidenciar outras alterações cardíacas causadas por diversos fatores ou intervenções.

A Visão Computacional, subárea da Computação, trabalha com conceitos e técnicas clássicas de processamento de imagens e de reconhecimento de padrões, tais como técnicas baseadas em realce de contraste, detecção de bordas, morfologia matemáticas, teoria de grafos, redes neurais e transformadas de domínios (GIGER, KARSSEMEIJER E ARMATO, 2001).

Há diversas modalidades de imagens médicas usadas pelos especialistas para estabelecer o diagnóstico, como, por exemplo, exames de radiografia, ressonância magnética, tomografia computadorizada e cintilografia. A biópsia, por sua vez, é uma técnica cirúrgica utilizada para observar fragmentos de células e tecidos do corpo. Com a preparação e o processamento de cortes histológicos e o auxílio de microscópios, a imagem digital da lâmina pode ser obtida e processada por um método computacional, a fim de auxiliar o patologista na obtenção do resultado do exame histológico (Junqueira e Carneiro, 2013). Esse trabalho tem o processamento digital de imagens histológicas de tecido cardíaco como foco principal de

interesse de segmentação, cujo objetivo central é identificar objetos de interesses de uma imagem, automatizando tarefas manualmente feitas por algum especialista para aumentar as chances de sucesso na execução.

A construção de Sistemas de Apoio ao Diagnostico (SAD) muitas vezes baseia-se nas técnicas relacionadas à Informática de Bioimagens, que consiste na recuperação, extração, comparação e gerenciamento do conhecimento biomédicos. A Informática de Bioimagens utiliza métodos de processamento de imagens, banco de dados, mineração e visualização de dados, baseada no processamento e análise de imagens médicas (GIGER, KARSSEMEIJER E ARMATO, 2001)

Esses sistemas computacionais (SAD) são utilizados por especialistas para identificação de padrões anormais (anomalias, alterações estruturais de tecidos, detecção de lesões, entre outros) e posterior diagnóstico do profissional médico, aumentando a sua precisão no processo de observação.

Quando direcionados à análise de imagens, os SAD podem apresentar funcionalidades tais como a realização automática de avaliação morfométrica, classificação de padrões a partir da varredura da imagem, recuperação de imagens baseadas em seu conteúdo (características de textura, cor, forma, tamanho etc.) ou algoritmos baseados em métodos estatísticos e heurísticos (MULLER et al., 2004). Isto tem sido viabilizado pela evolução nas tecnologias de aquisição de imagens médicas, como, por exemplo as imagens radiológicas, de medicina nuclear, de ressonância magnética, as endoscópicas e as microscópicas (FELIPE, 2005; RAO *et al.*, 2009).

O objetivo do presente estudo é fornecer suporte ao procedimento de análise histológica do tecido cardíaco na verificação dos danos causados pelo infarto agudo do miocárdio e outras morbidades, por meio do desenvolvimento de métodos que processam as imagens microscópicas e geram resultados de morfometria e quantificação, dando apoio ao profissional nas suas tomadas de decisões quanto ao diagnóstico correto relacionado com o remodelamento cardíaco (ZHENG, 2009). O sistema deverá oferecer aos especialistas uma forma de realizar, de maneira automatizada, a análise histológica do tecido cardíaco, fornecendo a quantificação de colágeno, a diferenciação entre padrões morfológicos e a acumulação fibrótica em espaços perivasculares. Além disso, o sistema auxiliará na análise morfométrica, que consiste na extração de medidas do diâmetro mínimo das células do tecido cardíaco em corte transversal, a qual permite avaliar possíveis variações de medida fora dos padrões normais.

1.2 Motivação

A estereologia é considerada muito importante na avaliação de informações quantitativas de seções microscópicas, fornecendo métodos para avaliar diferentes formas morfométricas, incluindo a quantidade de colágeno de forma precisa e reprodutível (MÜHLFELD, NYENGAARD E MAYHEW, 2010), podendo assim ser usado para a quantificação da fibrose.

Uma questão importante para a quantificação da fibrose histológica é o encolhimento de tecido durante o procedimento de fixação, particularmente colágeno porque a extensão do encolhimento pode ser diferente entre os grupos experimentais (MENDIS-HANDAGAMA E EWING, 1990; DORPH-PETERSEN, NYENGAARD E GUNDERSEN, 2001). Existe uma porcentagem aumentada de colágeno por área total em pacientes no qual ocorre a fibrose, ou para uma redução biológica ou artificial do tecido cardíaco em torno do mesmo. A análise de secções usando o microscópio eletrônico tem sido utilizada, pois tem a vantagem adicional de diferenciar a distinção morfológica de fibras de colágeno de outras.

Além da quantificação de colágeno, a medida dos cardiomiócitos é um parâmetro importante na análise comparativa das imagens. É possível comparar a medida média dos diâmetros das células do tecido cardíaco nas imagens analisadas e com isso identificar as alterações sofridas pelo coração.

Especialistas têm feito uso de ferramentas computacionais genéricas de processamento de imagens, que oferecem algoritmos para quantificação baseados em pontuação visual, no qual é feito um pré-processamento na imagem a partir da marcação de pontos visuais de forma estratégica para possível análise semiautomatizada ou estereologia. Estes procedimentos variam consideravelmente e são fortemente dependentes de parâmetros subjetivos, limitando, assim, a comparabilidade entre os estudos (EIRIN *et al.*, 2015). A análise de apenas algumas seções é feita rapidamente, mas implica no risco de obliquidade. A quantificação por pontuação visual depende do analista e, portanto, é bastante subjetivo e dificilmente reprodutível.

O suporte à tomada de decisões médicas por meio de SADs especificamente projetados para estudos e análises de casos particulares tem trazido grandes benefícios para a área médica, uma vez que o SAD adiciona uma rica camada de padronização e concentração de diagnósticos em um único ponto de consulta. SADs podem fazer uso

de procedimentos automáticos ou semiautomáticos. Os procedimentos semiautomáticos necessitam da intervenção humana para indicar alguns parâmetros ou auxiliar no pré-processamento da imagem, de forma que esta intervenção muitas vezes gera restrições significativas ao processo, além da subjetividade inerente.

Diante do exposto, é possível vislumbrar a utilidade do desenvolvimento de uma ferramenta para análise automática de imagens do tecido do miocárdio, que possa com precisão dar apoio ao diagnóstico e a pesquisas médicas.

1.3 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é propor, implementar e avaliar métodos que permitam analisar imagens de biópsia de tecido do miocárdio de animais (ratos Wistar) de maneira automática para caracterizar alterações estruturais decorrentes de morbidades, que levam ao aparecimento de tecido fibrótico não funcional.

Para se alcançar o proposto, foram definidos objetivos específicos:

- Realizar a morfometria dos cardiomiócitos, como análise histopatológica para identificar as células do tecido cardíaco de diâmetro maior em imagens coradas com HE. Utilizando técnicas de segmentação de imagens, isolar essas células para medir o seu diâmetro, gerando-se um valor médio entre as células medidas para o mesmo caso. Assim é possível sugerir um nível de comprometimento de acordo com essa média.
- Quantificar a porcentagem de colágeno presente no tecido cardíaco em imagens coradas com picrosirius vermelho, possibilitando estabelecer níveis de fibrose. Por meio de técnicas de processamento de imagens é possível separar os canais de cores, isolando áreas no qual há maior concentração de colágeno e assim estabelecer uma medida da porcentagem de colágeno presente no tecido.

1.4 Organização desse trabalho

O conteúdo desta dissertação está estruturado da seguinte forma:

O capítulo 1 apresentou o contexto, desafios, motivação e objetivos que deram origem ao desenvolvimento desse trabalho.

O capítulo 2 descreve os trabalhos correlatos a este projeto, bem como a motivação para o desenvolvimento de uma nova proposta.

O capítulo 3 expõe a fundamentação teórica usada no desenvolvimento desse trabalho.

O capítulo 4 detalha o trabalho dessa pesquisa a nível de mestrado, descrevendo o método proposto para automatização do processo de análise em imagens histológicas.

No capítulo 5 são discutidos os resultados sobre o desenvolvimento desse trabalho.

O capítulo 6 sumariza as principais contribuições e conclusões obtidas com o desenvolvimento desse trabalho, bem como são apresentadas as indicações de linhas de futuras pesquisas.

Por fim, são apresentados as referências bibliográficas e os apêndices.

Capítulo 2

TRABALHOS CORRELATOS

Esta seção descreve trabalhos já realizados e publicados que em algum nível tem relação ou aplicação das técnicas apresentadas por esta pesquisa com outros objetos de estudo.

Em (SOKOLOV *et al.*, 2017), os autores desenvolveram um plugin chamado de FibrilJ de código aberto para o programa ImageJ / FiJi, para aferir a estrutura e a dimensão das proteínas filamentosas e amiloides no intuito de simplificar e automatizar o processamento da imagem de fibras de proteínas. O processo permite calcular a distribuição de fibras em diâmetros médios, comprimentos e comprimentos de persistência. O plugin pode unificar o processo de cálculo de diâmetro e comprimento de persistência e contribui para comparar os resultados obtidos por diferentes grupos de pesquisa. A validação desse trabalho foi realizada por meio de imagens artificialmente criadas de objetos em forma de haste com parâmetros predefinidos e micrografias de fibras de proteína. Como resultado o plugin unificou e automatizou o processo de análise nas imagens calculando a distribuição e comprimento médio das fibras. O trabalho desenvolvido pelo autor tem como objetivo calcular a distribuição média dos diâmetros das fibras. O mesmo motivou o estudo e desenvolvimento de um método que possibilita o cálculo do diâmetro médio das células dos miócitos cardíaco de forma automatizada.

(PASQUALIN *et al.*, 2015), por sua vez, desenvolveram um plugin também para o ImageJ intitulado AutoTT que analisa imagens de microscopia confocal crua e imagens 3D. As opções de análise incluem a imagem inteira, regiões específicas da imagem (cropping) e análise do eixo z da mesma imagem. Também é possível realizar a análise por lotes de uma série de imagens com critérios idênticos. A transformação rápida de Fourier (FFT) é o método de análise principal aplicado para calcular o espectro de frequência espacial, que é usado para representar a regularidade dos sistemas T-tubule. No entanto, essa abordagem é imprecisa porque a

densidade dos túbulos T, bem como os sinais não-T tubulares nas imagens, influenciam a potência do espectro gerada pela FFT. Nesse caso, é preciso realizar o pré-processamento de imagens e a extração de arquitetura topológica para remover o ruído não-T-tubular da análise. Foi incorporada também a análise automatizada que contém o processamento de imagem, extração de características morfológicas e análise FFT de potência do espectro. Para compor todo o processo, um algoritmo subjacente é implementado em MATLAB (The MathWorks, Natick, MA). O programa produz as densidades dos túbulos T orientados transversalmente e os túbulos T orientados longitudinalmente, o espectro de potência dos sistemas globais de túbulos T e o espaçamento médio dos túbulos T.

(JÚNIOR, 2012) utilizou em seu trabalho para realizar as análises histomorfométricas (contagem, volume e quantificação de colágeno) em imagens do tecido cardíaco de ratas tratadas com extrato concentrado de soja, um microscópio de luz e o software AxioVision, e o colágeno foi determinado pelo programa Imagelab 2000. Os dados foram validados e a utilização dos dois softwares cumpriu com o seu papel, porém, foi necessária a intervenção de uma pessoa e a utilização de dois softwares. O autor não detalha quais foram as técnicas utilizadas para quantificar o colágeno e a análise morfológica do tecido.

Atualmente podemos observar que a maioria dos métodos propostos são baseados em técnicas de processamento de imagens tradicionais tais como a segmentação, limiarização de histogramas, transformadas e detecção de bordas, entre outras. Contudo, os métodos propostos utilizam-se de algum processo manual e a automatização se dá por meio de software com licença, que inviabiliza o processo devido ao seu custo.

O diferencial do trabalho proposto em relação aos demais apresentados nesse capítulo é exatamente a questão da automação de processos que, devido a sua delicadeza e natureza de pré-processamento, podem ter seus resultados alterados visto que existe uma forte necessidade de intervenção ou acompanhamento humano. Mesmo que existindo um processo bem definido para o pré-processamento, fatores não controláveis podem ser pontos significativos na tomada de decisão a partir de dados coletados por sistemas. A adição de um processo totalmente ou parcialmente automatizado (desde que essa parte do processo esteja em uma etapa de pouca manipulação ou curva de erro), tem como objetivo aumentar a acurácia de cada diagnóstico com um padrão e auxílio de

processos bem definidos por meio da proposta. Nenhum dos trabalhos anteriores adicionam esse nível de automação.

Capítulo 3

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Nesta seção, apresentaremos as características básicas inerentes ao contexto, bem como conceitos nos quais concentram-se as contribuições desse trabalho. As características e conceitos contemplam técnicas que compõem o processo de segmentação e extração de medidas de imagens.

3.1 Processamento Digital de Imagens

A análise computadorizada de imagens está presente em diversas aplicações do mundo real, inclusive na área médica, por meio do uso de imagens visando o apoio ao diagnóstico. Automatizar o processo de análise das imagens requer a construção de algoritmos capazes de realizar o processamento digital, assim como a extração de características das mesmas (GONZALEZ e WOODS, 2008).

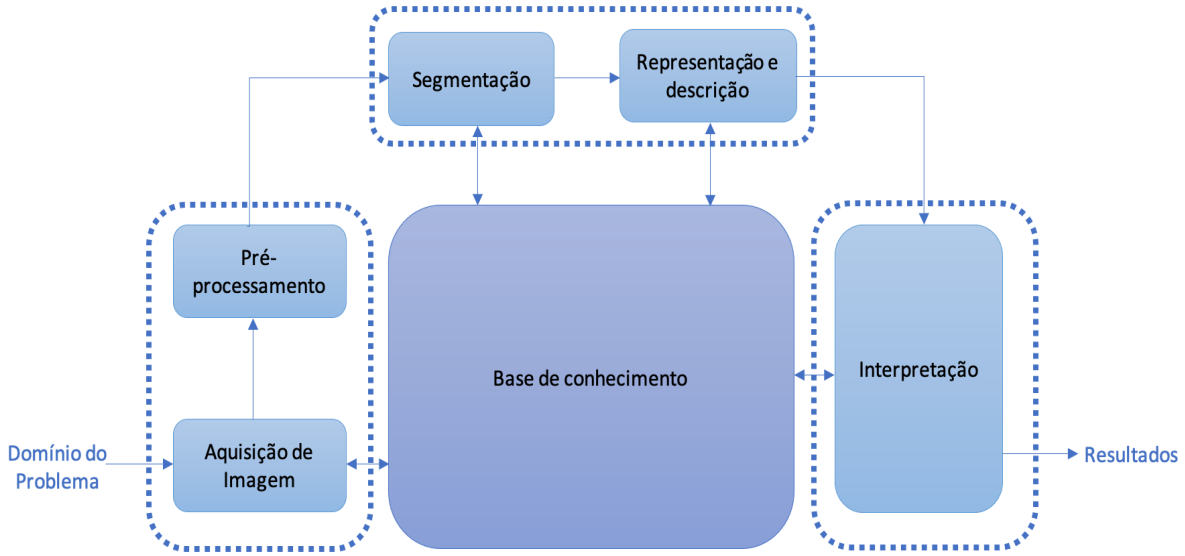
O processamento digital de imagens (PDI) é composto por diversas etapas, sendo as principais: aquisição da imagem, pré-processamento da imagem, segmentação, representação, descrição, reconhecimento e a interpretação (FILHO E NETO, 1999).

A aquisição é o processo de obtenção da imagem por meio de um sensor de imageamento capaz de digitalizar o sinal produzido. O pré-processamento da imagem consiste em melhorar a qualidade dela com o intuito de facilitar a aplicação das etapas subsequentes. O pré-processamento envolve técnicas para o realce de contrastes, remoção de ruídos e isolamento de regiões com textura homogênea (FILHO E NETO, 1999).

A segmentação pode ser entendida como o processo pelo qual a imagem de entrada é dividida em segmentos ou objetos constituintes. A representação e a descrição, também conhecidas como seleção de características, procuram extrair características básicas (descritores) que diferenciem as classes de objetos.

O reconhecimento é o processo que atribui um rótulo a um objeto, de acordo com a informação fornecida pelo respectivo descritor. Finalmente, a interpretação consiste na definição de significado a um conjunto de entidades rotuladas (GONZALEZ e WOODS, 2010).

Figura 3 - Diagrama geral do PDI



Fonte: do autor, adaptado de GONZALES, WOODS, 2010.

Uma imagem digital pode ser definida como sendo uma função bidimensional $f(x,y)$ da luz emitida por uma cena ou da intensidade da mesma refletida, no qual x e y são as coordenadas e a amplitude de f em qualquer coordenada é chamada de intensidade (ou nível de cinza, para imagens não coloridas) da imagem (GONZALEZ; WOODS, 2010). Constituída de um número finito de elementos (pixels) as imagens digitais podem ser representadas por uma matriz bidimensional de M linhas e N colunas.

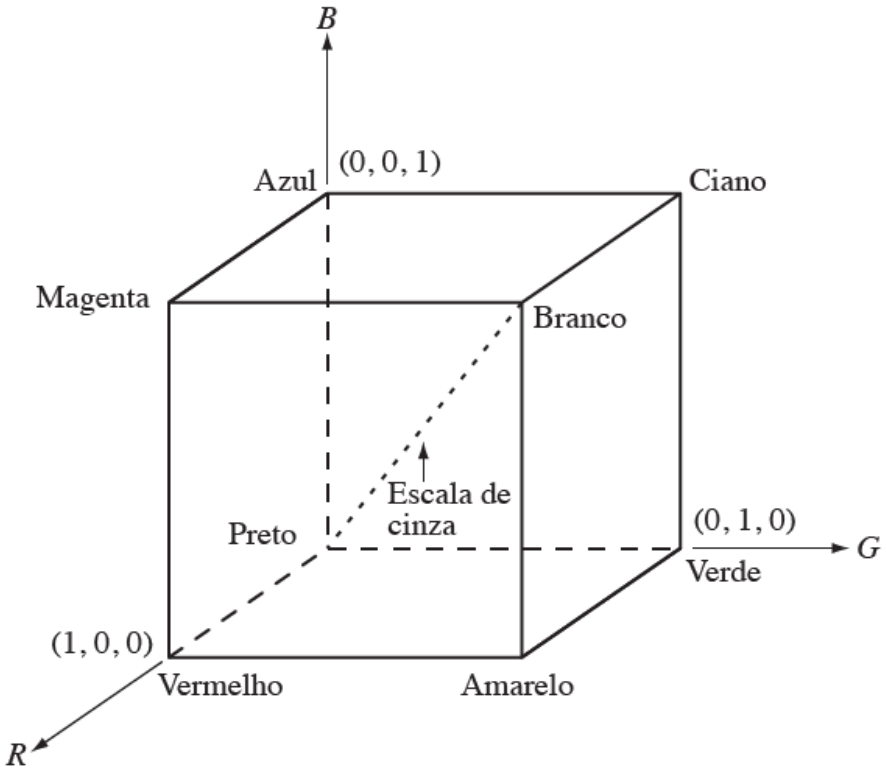
A próxima subseção apresenta o modelo de cores RGB, que foi utilizado neste trabalho para representar os valores relativos às cores dos pixels das imagens. As subseções subsequentes apresentarão técnicas que podem ser usadas para realizar a segmentação das imagens e extrair as características das mesmas para análise.

3.2 Modelo de Cor RGB

A ideia por trás de um modelo de cores é criar um padrão de definição das cores disponíveis para que não haja diferença na especificação de nenhuma cor utilizada pelo sistema ou pelo hardware. Dos diversos modelos de cores disponíveis, este projeto foi baseado no RGB pela facilidade de trabalho com imagens simples e por ser o mais comumente usados nos trabalhos de processamento de imagem.

As imagens RGB são matrizes 3D no qual cada eixo corresponde a um dos três canais de cores: Red (Vermelho), Green (Verde) e Blue (Azul). Todos as cores possíveis trabalhadas no modelo RGB normalmente terão valores entre 0 e 1 como representa a Figura 4.

Figura 4 - Cubo representativo do modelo de cores RGB.



Fonte: do autor.

Sendo assim, ao extrair um canal de uma imagem ou aplicar uma máscara de cor, os valores de padrão RGB e suas combinações (cada um dos valores em cada um dos canais) serão representados por 1 byte, fornecendo um intervalo de 0 a 255 valores diferentes de pixel para cada um dos canais, quando se tem resolução de 8 bits.

Misturando as cores primárias são geradas as diferentes cores de um sistema. Graficamente, as variadas cores formadas no modelo RGB são definidas como pontos do cubo. Dessa forma, cada coordenada do vetor caracteriza a quantidade de cor primária necessária para obter a cor final desejada.

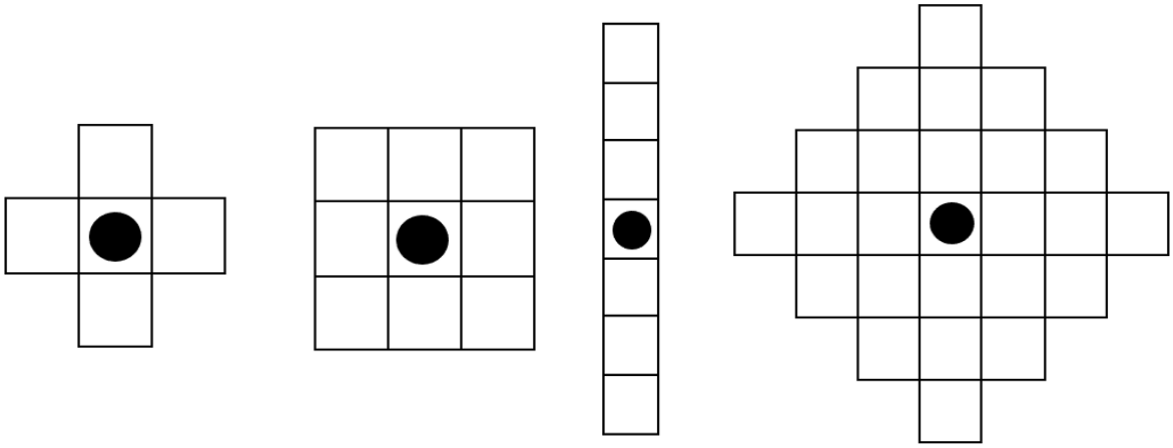
3.3 Morfologia Matemática

Criada na década de 1960 por Georges Matheron, Jean Serra e seus colaboradores da Escola Nacional Superior de Minas de Paris, a morfologia matemática é aplicada para pré-processamento e pós-processamento de imagens servindo como ferramenta para extrair estruturas e formas de uma imagem que posteriormente são utilizadas para descrever e representar as mesmas, o que permite a construção de operadores úteis para a descrição de objetos em imagens (DOUGHERTY, 2009).

As operações morfológicas têm se destacado em diversos domínios de conhecimento, entre eles a medicina, a biologia e a microscopia, com aplicações de processamento de imagens como extração de características, extração de componentes, extração de formas, extração de bordas, delimitação de fecho convexo, entre outras.

Baseadas na teoria dos conjuntos, essas operações são aplicadas em imagens binárias ou em níveis de cinza, considerando diferentes regiões como sendo conjuntos. Nessas operações temos também os subconjuntos chamados de elementos estruturantes Figura 5, de diferentes tamanhos e formas que são utilizados para estabelecer propriedades de interesse em uma imagem. Para alterar uma característica morfológica de um conjunto A, um subconjunto B é utilizado para percorrer a região a ser modificada e assim aplicar a operação necessária para isso, gerando um novo conjunto C. A forma e tamanho desse novo conjunto são ajustadas pelo formato do elemento estruturante utilizado (GONZALES, WOODS, 2010).

Figura 5 - Exemplos de elementos estruturantes



Fonte: do autor.

3.3.1 Dilatação

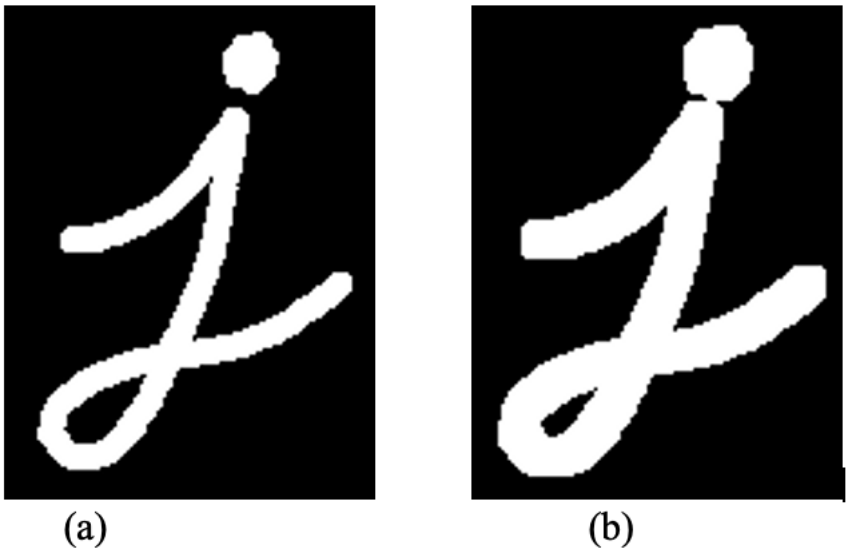
O processo de dilatação acontece em uma imagem binária no qual posiciona-se o pixel central do elemento estruturante em cada pixel preto da imagem. Se qualquer um dos pixels de vizinhança contida sob o elemento estruturante for branco, o pixel preto passará a ser branco. Definimos formalmente a dilatação de uma imagem *A* pelo elemento estruturante *B* (SOLOMON E BRECKON, 2011).

$$A \oplus B = \{Z \mid (\widehat{B})_Z \cap A \neq \emptyset\} \tag{1}$$

As imagens A e B são conjuntos de Z^2, a dilatação de A por B é o conjunto de todos os pontos Z, sendo que B refletido em torno de sua origem e transladado por z e se sobrepõe em pelo menos um elemento de A.

O resultado após a aplicação da operação de dilatação é um aumento ou engrossamento dos elementos de uma imagem, conforme exemplo Figura 6.

Figura 6 - Resultado da dilatação. (a) Original. (b) Resultado



Fonte: Adaptado de OpenCv[2].

3.3.2 Erosão

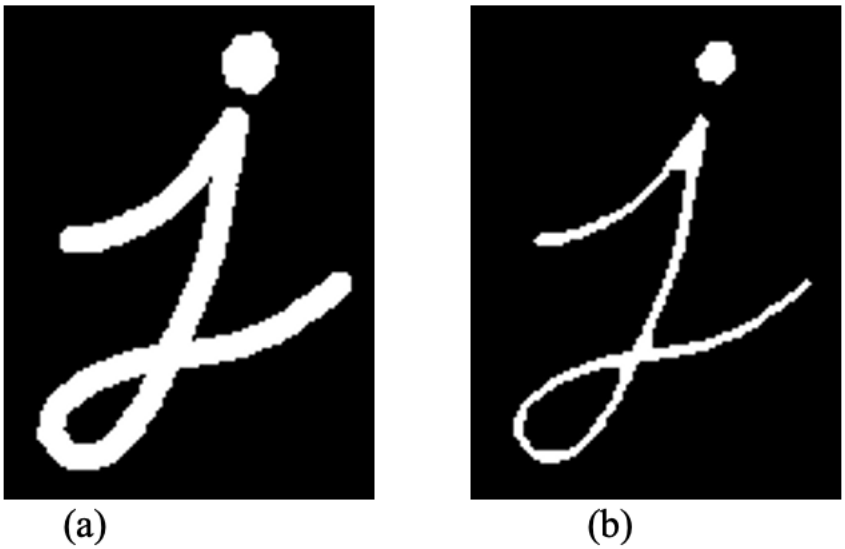
O processo de erosão acontece em imagem binária no qual posiciona-se o pixel central do elemento estruturante em cada pixel branco da imagem. Se qualquer um dos pixels de vizinhança relativa ao elemento estruturante for preto, o pixel branco passará a ser preto. Definimos a erosão sendo A e B conjuntos de Z^2, a erosão de A por B é definida como o conjunto de todos os pontos z, tal que B, transladado por z, está contido em A (SOLOMON E BRECKON, 2011):

$$A \ominus B = \{Z \mid (B)_Z \subseteq A\} \tag{2}$$

O resultado após aplicação da operação de erosão em uma imagem faz com que as áreas em branco fiquem reduzidas, conforme observado na Figura 7.

[2] https://docs.opencv.org/3.4/d3/dbe/tutorial_opening_closing_hats.html

Figura 7 – Resultado da erosão. (a) Original. (b) Resultado



Fonte: Adaptado de OpenCv[3].

3.3.3 Fechamento

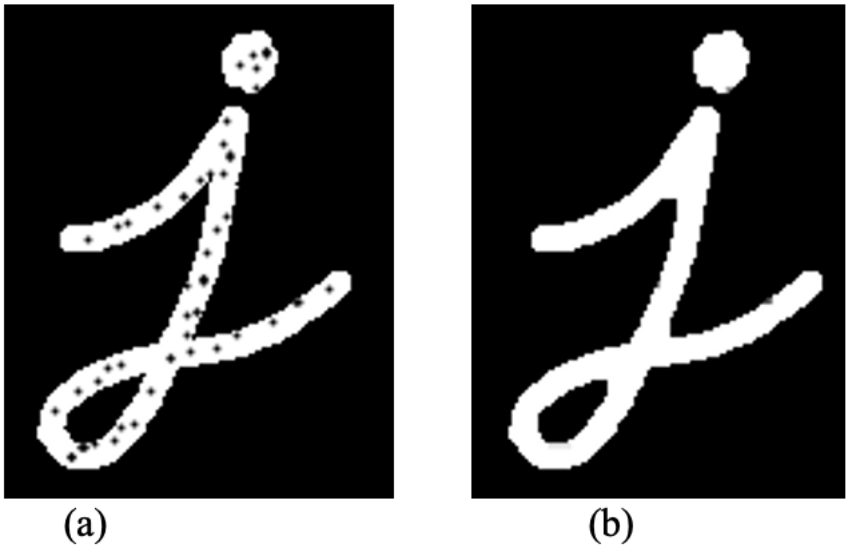
A operação morfológica de dilatação seguida de erosão utiliza o mesmo elemento estrutural e é conhecida como fechamento. Assim sendo A e B conjuntos de Z^2, o fechamento de A por B é a dilatação de A por B, acompanhada pela erosão do resultado por B.

$$\mathrm{A} \,.\, \mathrm{B} = (\mathrm{A} \oplus B) \ominus \mathrm{B} \tag{3}$$

O resultado da aplicação da operação de fechamento morfológica em uma imagem faz com que pequenas áreas em preto, que poderiam ser consideradas como falhas, fossem preenchidas sem alterar bruscamente o formato da área principal, conforme ilustrado na Figura 8.

[3] https://docs.opencv.org/3.4/d3/dbe/tutorial_opening_closing_hats.html

Figura 8 – Resultado do fechamento. (a) Original. (b) Resultado



Fonte: Adaptado de OpenCv[4].

3.3.4 Abertura

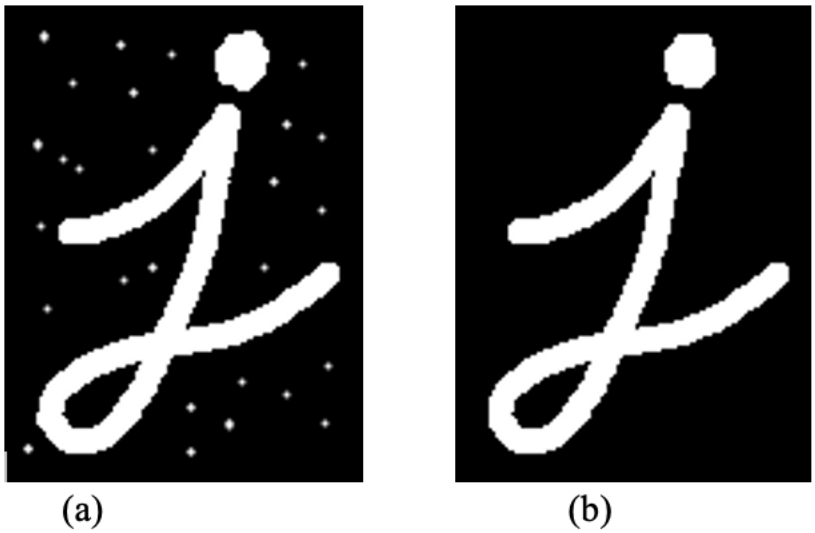
A erosão seguida da operação de dilatação utilizando o mesmo elemento estruturante é conhecida como abertura morfológica de uma imagem A pelo elemento estruturante B conforme equação:

$$\mathrm{A} \circ \mathrm{B} = (\mathrm{A} \ominus \mathrm{B}) \oplus B \tag{4}$$

Visualmente um exemplo da aplicação da abertura morfológica pode ser observado na Figura 9. Nota-se que pequenas áreas em branco, que poderiam ser consideradas como ruídos, fossem reduzidas sem alterar bruscamente o formato da área principal.

[4] https://docs.opencv.org/3.4/d3/dbe/tutorial_opening_closing_hats.html

Figura 9 – Resultado da abertura. (a) Original. (b) Resultado



Fonte: Adaptado de OpenCv[5].

3.3.5 Top-Hat

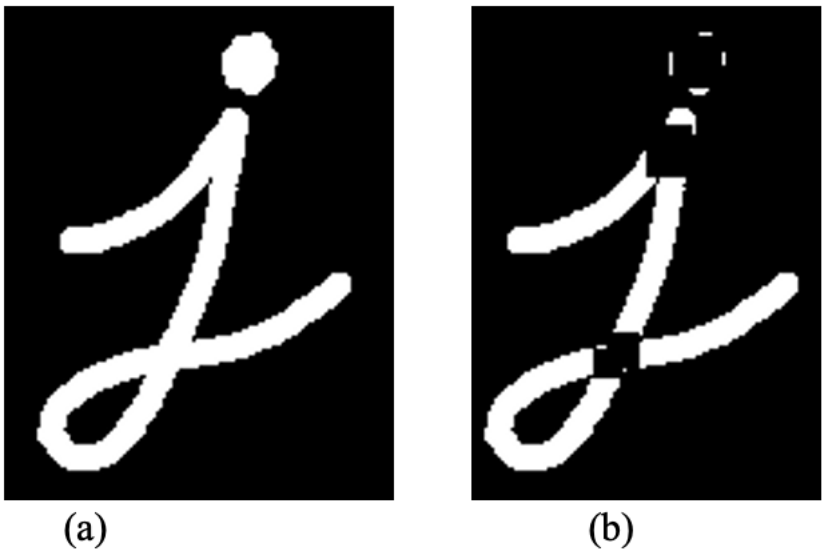
A operação de Top-Hat é caracterizada pela sua vantagem em encontrar pequenos grupos de pixels claros em fundo escuro ou vice-versa, ele é aplicado em imagens binárias. Em uma imagem com pouco ruído é utilizado para encontrar bordas. Definimos esse operador sendo a abertura de uma imagem *A* por um elemento estruturante:

$$A \hat{\circ} B = A - (A \circ B) \tag{5}$$

O resultado após a aplicação da operação Top-Hat é a imagem de diferença entre a original e a operação de abertura, conforme visto na Figura 10.

[5] https://docs.opencv.org/3.4/d3/dbe/tutorial_opening_closing_hats.html

Figura 10 – Resultado da top-hat. (a) Original. (b) Resultado



Fonte: Adaptado de OpenCv[6].

Neste projeto, os operadores morfológicos serão explorados para utilização tanto nas operações de pré-processamento, quanto na etapa de segmentação das imagens.

3.4 Segmentação

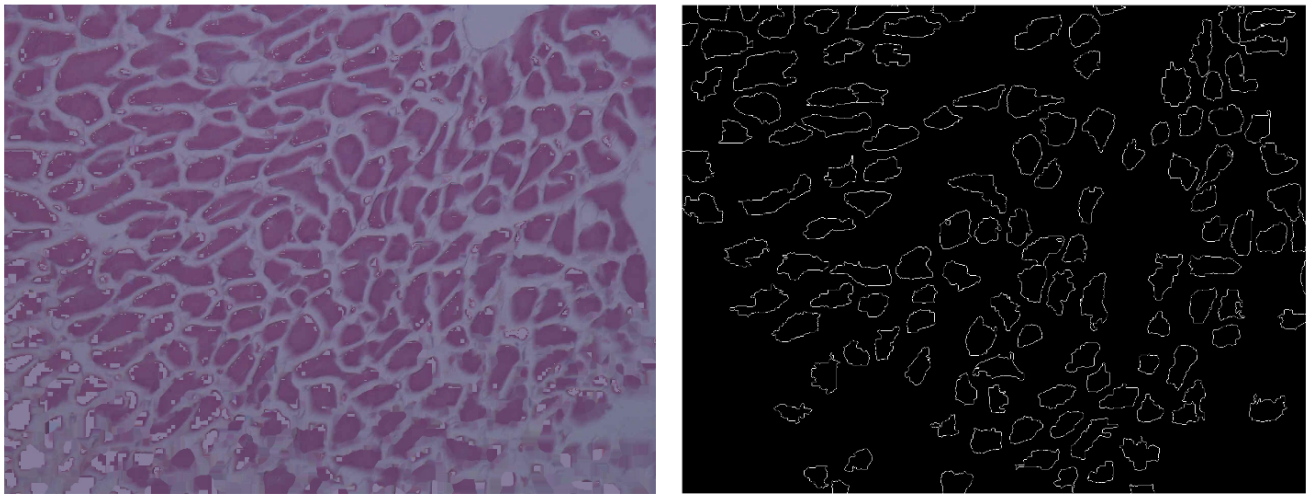
A segmentação consiste em subdividir uma imagem em regiões, muitas vezes delimitando objetos existentes na imagem. O nível de detalhamento em que essa subdivisão é realizada dependerá do problema a ser resolvido. Assim a segmentação para quando os objetos ou regiões de interesse da aplicação são detectados.

A segmentação de imagens é uma das tarefas mais difíceis no PDI, segundo Gonzalez e Woods (2010). Em muitos casos, a precisão da segmentação define o sucesso ou o fracasso dos procedimentos da análise computadorizada de imagens. Para realizar uma segmentação em uma imagem, duas abordagens são possíveis: métodos baseados em regiões e métodos baseados em bordas, detectando similaridades e descontinuidades, respectivamente. A primeira baseia-se na divisão da imagem em regiões similares de acordo com algum critério predefinido. Nessa categoria alguns métodos como a limiarização, o crescimento de região e a divisão e fusão de regiões são utilizados. Segue-se o pressuposto de que existe uma diferenciação entre as

[6] https://docs.opencv.org/3.4/d3/dbe/tutorial_opening_closing_hats.html

fronteiras dos objetos entre si e também entre o fundo da imagem. Então, a imagem é dividida com base nas mudanças bruscas de intensidade, como as que ocorrem nas bordas, conforme podemos observar na Figura 11 (DOUGHERTY, 2009; GONZALES, WOODS, 2010).

Figura 11 – Exemplo de segmentação. (a) Imagem Original. (b) Imagem segmentada.



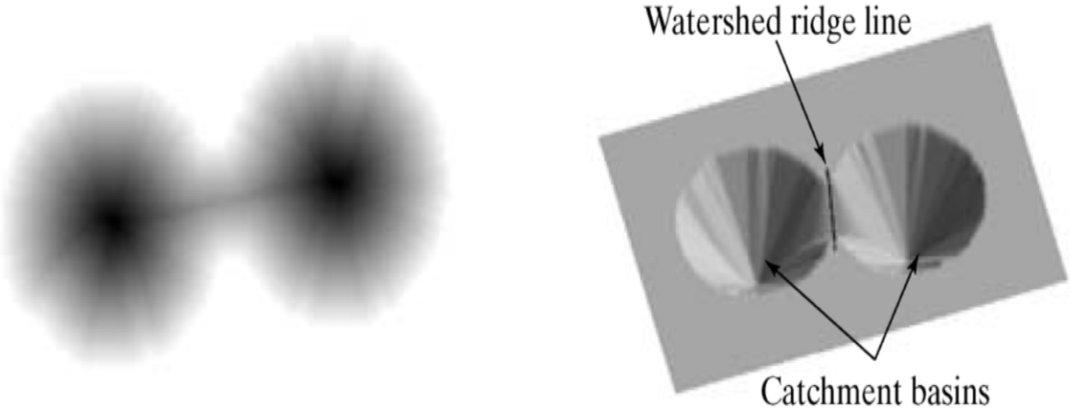
(a) (b)

Fonte: do autor

3.4.1 Watershed

Na geografia, as saliências que dividem as áreas inundadas por diferentes rios são conhecidas por *Watershed* (diques) e as áreas que armazenam as águas são as bacias também conhecidas como *Catchment Basin*. A transformada de watershed utiliza esta ideia para segmentar as imagens em níveis de cinza, no qual a chuva que cai nesta área escorre e ocupa as partes mais baixas do terreno e a água que cair exatamente sobre a linha de divisória (watershed) terá a mesma probabilidade de escorrer para qualquer das bacias por ela dividida conforme ilustrado na Figura 12.

Figura 12 - Representação da Segmentação Watershed.



Fonte: Adaptado de GONZALES, WOODS, 2008.

Considerando as áreas inundadas entre as linhas como as regiões da imagem, a transformada de watershed segmenta as regiões.

Essa segmentação é baseada em morfologia matemática no qual os mínimos regionais da imagem, em níveis de cinza, a ser segmentada são representados como se fossem uma superfície topográfica ou montanha que ao ser inundada formam linhas divisórias (BEUCHER E MEYER, 1993).

De maneira coerente a transformada de watershed utiliza diversas técnicas auxiliares para segmentar a imagem e evitar a super-segmentação.

3.4.2 Limiarização (Thresholding)

A operação de limiarização é descrita como uma técnica de processamento de imagens na qual uma imagem de entrada f (x, y) de N níveis de cinza, produz à saída uma imagem g (x, y), chamada de imagem limiarizada, Figura 13, no qual o número de níveis de cinza é menor que N, (GONZALES, WOODS, 2010).

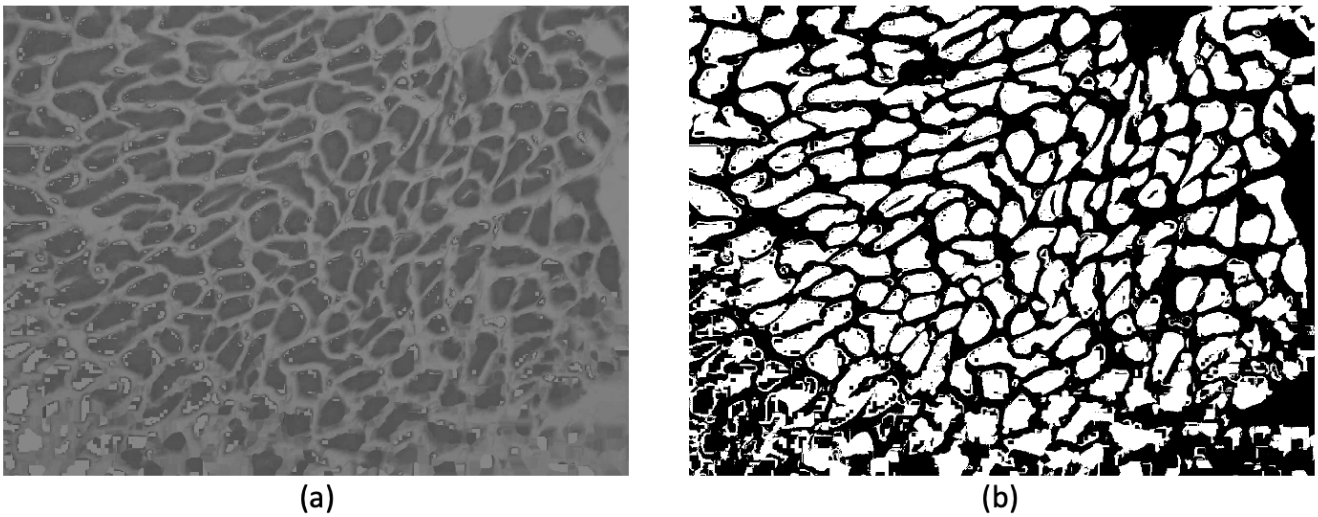
Essa técnica de segmentação altera os valores de pixels de uma imagem, geralmente com a finalidade de separar objetos de interesse do fundo da imagem.

Normalmente, g (x, y) apresenta 2(dois) níveis de cinza, sendo:

$$g(x,y) = \begin{cases} 1, & se \quad f(x,y) \geq T \\ 0, & se \quad f(x,y) < T \end{cases} \tag{6}$$

Os pixels rotulados com 1 correspondem aos objetos e os pixels rotulados com 0 correspondem ao fundo e T é o valor de tom de cinza predefinido, denominado limiar. Neste caso, tem-se a limiarização simples.

Figura 13 – Resultado do processo de limiarização. (a) Imagem original. (b) Imagem resultante.



Fonte: do autor.

3.4.3 Descritores de fronteira

Os descritores de fronteira são úteis quando o foco está nas características das suas formas e, então, a região de interesse de uma imagem é representada por meio das fronteiras dos objetos. Para tanto, é necessário ser feita uma segmentação da imagem em regiões, no qual pixels dos objetos de interesse são descritos para o futuro processamento computacional. A área, o comprimento e o diâmetro do objeto segmentado são descritores dessa categoria (GONZALES, WOODS, 2010).

3.5 Descritores geométricos

A partir da distribuição de pixels de uma imagem, é possível calcular diversos descritores e medidas geométricas relativos aos objetos contidos na mesma.

3.5.1 Centroide

Utilizando os momentos estatísticos e as coordenadas dos pontos do contorno em questão, o centroide ou centro de massa de uma região é calculado. Ponderando, então, uma imagem binária f(x, y), apenas os pixels tais que f(x, y) = 1 na região de interesse R são utilizados para o cálculo do momento geométrico de ordem p, q , conforme equação:

$$m_{pq=} \sum_{(x,y)\in R} x^p y^p \tag{7}$$

Posterior ao momento geométrico de uma região T, é calculado seu centroide pela média aritmética de todas as coordenadas de seus pontos nas direções x e y (Equações 8 e 9) (BURGER, BURGE, 2009).

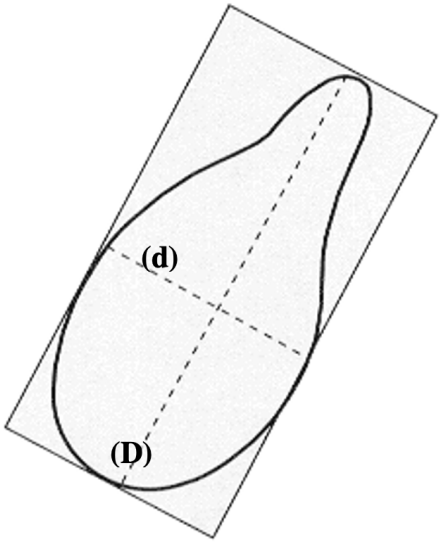
$$\overline{x} = \frac{m_{10}}{m_{00}} \tag{8}$$

$$\overline{y} = \frac{m_{01}}{m_{00}} \tag{9}$$

3.5.2 Diâmetro da fronteira

Para definir o diâmetro de uma região de interesse em uma imagem é necessário verificar a maior distância entre dois pontos presentes em seu contorno. O eixo maior é definido a partir da linha que conecta os pontos extremos da fronteira. Concomitantemente, o eixo menor da fronteira é estabelecido traçando-se uma linha perpendicular ao eixo maior, cujo comprimento é tal que objeto está envolvido por um retângulo em que suas laterais passam pelos quatro pontos exteriores da interseção da fronteira dos eixos maior e menor, conforme representado na Figura 14. (GONZALES, WOODS, 2010).

Figura 14 - Exemplo de Retângulo que envolve a fronteira, baseado no seu eixo maior (D) e no seu eixo menor (d).



Fonte: do autor, adaptado de GONZALES, WOODS, 2010.

Capítulo 4

MÉTODO PROPOSTO

Nesta sessão encontram-se descritos os métodos propostos para a automatização do processo de análise em imagens histológicas e os materiais utilizados para o desenvolvimento dos procedimentos criados.

4.1 Proposta

A remodelagem fibrótica do coração é uma condição frequente, causada por várias morbidades relacionadas à disfunção cardíaca. Um dado importante na avaliação do grau de fibrose cardíaca é a quantificação de colágeno em tecido, sendo que o acúmulo desse elemento no tecido é fundamental para um diagnóstico mais preciso em diversas condições e contextos do paciente.

Os especialistas utilizam a inspeção visual de amostras de biópsia por meio de microscopia eletrônica para identificação desta condição, a fim de revelar um aumento significativo de colágeno entre os cardiomiócitos. Existem também técnicas semiautomáticas de processamento de imagens digitais, baseadas em análise de limiar a partir de marcações manuais. Métodos completamente automáticos são mais desafiadores, porém eliminam a necessidade da participação do usuário do sistema e, consequentemente, a subjetividade inerente ao processo.

Para uma possível detecção e localização de alterações fibróticas, a consideração da localização do colágeno pode ser necessária. Entre os métodos avaliados, a estereologia LM (método de morfologia quantitativa que permite determinar com precisão estas alterações do

miocárdio), combinada com a análise automática de imagens são as mais apropriadas para quantificar as alterações fibróticas justamente pela sensibilidade inerente ao primeiro método e à automação fornecida pelo segundo.

Para possível detecção de hipertrofia do tecido cardíaco, verifica-se o tamanho médio do diâmetro dos miócitos. As células ficam maiores porque elas estão trabalhando muito mais para compensar a parte do tecido que já está morto e que foi substituído por um tecido fibrótico rico em colágeno.

O presente trabalho busca o desenvolvimento de métodos de processamento de imagens aplicados ao tecido cardíaco para quantificação do colágeno intersticial nas fibras do miocárdio e a detecção de células hipertrofiadas, que caracterizam alterações estruturais decorrentes de morbidades, de forma a padronizar a coleta e determinação dos dados.

São propostos dois procedimentos específicos:

- **Procedimento 1: Morfometria dos Cardiomiócitos**: Realizar a morfometria dos cardiomiócitos, como análise histopatológica para estimar o diâmetro em imagens coradas com HE, identificando uma condição de possível hipertrofia.

Foram utilizadas técnicas de processamento de imagens para segmentar os cardiomiócitos e posteriormente a identificação e quantificação do seu diâmetro. As principais técnicas utilizadas são baseadas em morfologia matemática, que possui operações para extrair estruturas e formas de uma imagem. Assim, foi possível determinar um protocolo de operações capazes de extrair as formas e isolar as células do tecido, possibilitando posteriormente, por meio da implementação de algoritmos específicos, extrair a medida em pixels dos miócitos que depois serão convertidas para microns, conforme proposto.

- **Procedimento 2: Quantificação do Colágeno**: Quantificar o colágeno presente no tecido cardíaco em imagens coradas com picrosirius vermelho, classificando os níveis de fibrose.

Algumas técnicas de processamento de imagens foram utilizadas a fim de separar as fibras que possuem uma concentração maior de colágeno. Para obter melhor precisão na segmentação, os parâmetros de limiar foram determinados a partir de uma árvore de decisão gerada e classificada pelo software WEKA. Uma tabela com os valores de pixels positivos para colágeno e não-colágeno foi criada, e após o processamento das imagens pelo software, um parâmetro de classificação foi gerado. Por fim, após a aplicação das técnicas de segmentação é

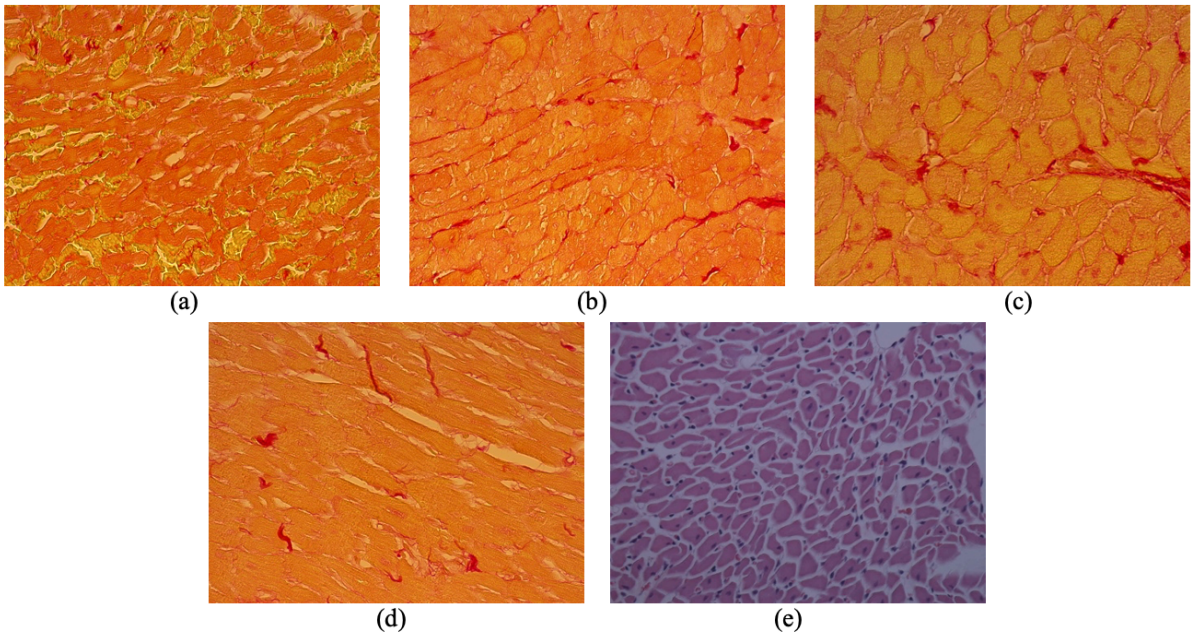
efetuada a contagem dos pixels da imagem que representam o colágeno sobre a área total da imagem.

4.2 Materiais

Para implementação do procedimento de quantificação de colágeno, foram utilizadas 50 imagens de lâminas de diferentes animais (ratos Wistar jovens submetidos ao protocolo de isquemia e reperfusão do coração) coradas com picrosirius red, fornecidas pelo Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Essas imagens possuem resolução de 2048 x 1536 pixels, 8 bits em cinza ou 36 bits em RGB, e foram adquiridas por meio de um microscópio com ampliação de 40x. As imagens são oriundas de animais que passaram por uma cirurgia para indução de infarto seguido de reperfusão e de animais saudáveis. Cada animal tem imagens de duas regiões do coração, da parede livre do ventrículo esquerdo e do septo.

Para implementação do procedimento da morfometria dos cardiomiócitos, foram utilizadas 30 imagens de lâminas de diferentes animais (ratos Wistar jovens submetidos ao protocolo de isquemia e reperfusão do coração) em corte transversal coradas com hematoxilina & eosina, fornecidas pelo Department of Physiology and Biophysics of University of Mississippi Medical Center (Jackson - MS, EUA). Essas imagens possuem resolução de 2048 x 1536 pixels, 8 bits em cinza ou 36 bits em RGB, e foram adquiridas por meio de um microscópio com ampliação de 40x.

Figura 15 - Exemplos da base de imagens utilizadas para teste dos algoritmos. (a) septo saudável, (b) septo com reperfusão, (c) parede livre com reperfusão, (d) parede livre saudável, (d) corte transversal corada com hematoxilina & eosina.



Fonte: Imagens do autor.

4.3 Ambiente

Para o desenvolvimento dos métodos de quantificação de colágeno e morfometria dos cardiomiócitos foi utilizado um microcomputador com processador Intel Core I5 Dual – Core, memória de 8GB 2133 MHz DDR3, gráficos Intel de 1536 MB e 256 GB de armazenamento do tipo SSD.

A linguagem de programação utilizada foi a C++ com funções disponibilizadas pela biblioteca de código aberto OPENCV[7] (Open Source Computer Vision Library) na sua versão 3.4.5. Escrita em C++ essa biblioteca possui mais de 2500 algoritmos implementados voltados para área de visão computacional e aprendizado de máquina, compreendendo operações que facilitam e otimizam o trabalho de desenvolvedores em aplicações de processamento digital de imagens (OPENCV, 2020).

[7] https://opencv.org

Outra ferramenta utilizada para implementação do método de quantificação de colágeno foi a WEKA[8] na sua versão 3.8.5, que é um software de aprendizado de máquina de código aberto que contém várias ferramentas para preparação, classificação, regressão, clustering, mineração de regras de associação e visualização de dados, e é amplamente usado para aplicações de ensino, pesquisa e industriais.

Por fim para implementação dos algoritmos e integração das bibliotecas foi utilizado o software Visual Studio 2019, uma IDE de desenvolvimento que possibilita a escrita de programas e algoritmo em diversas linguagens de programação.

4.4 Métodos

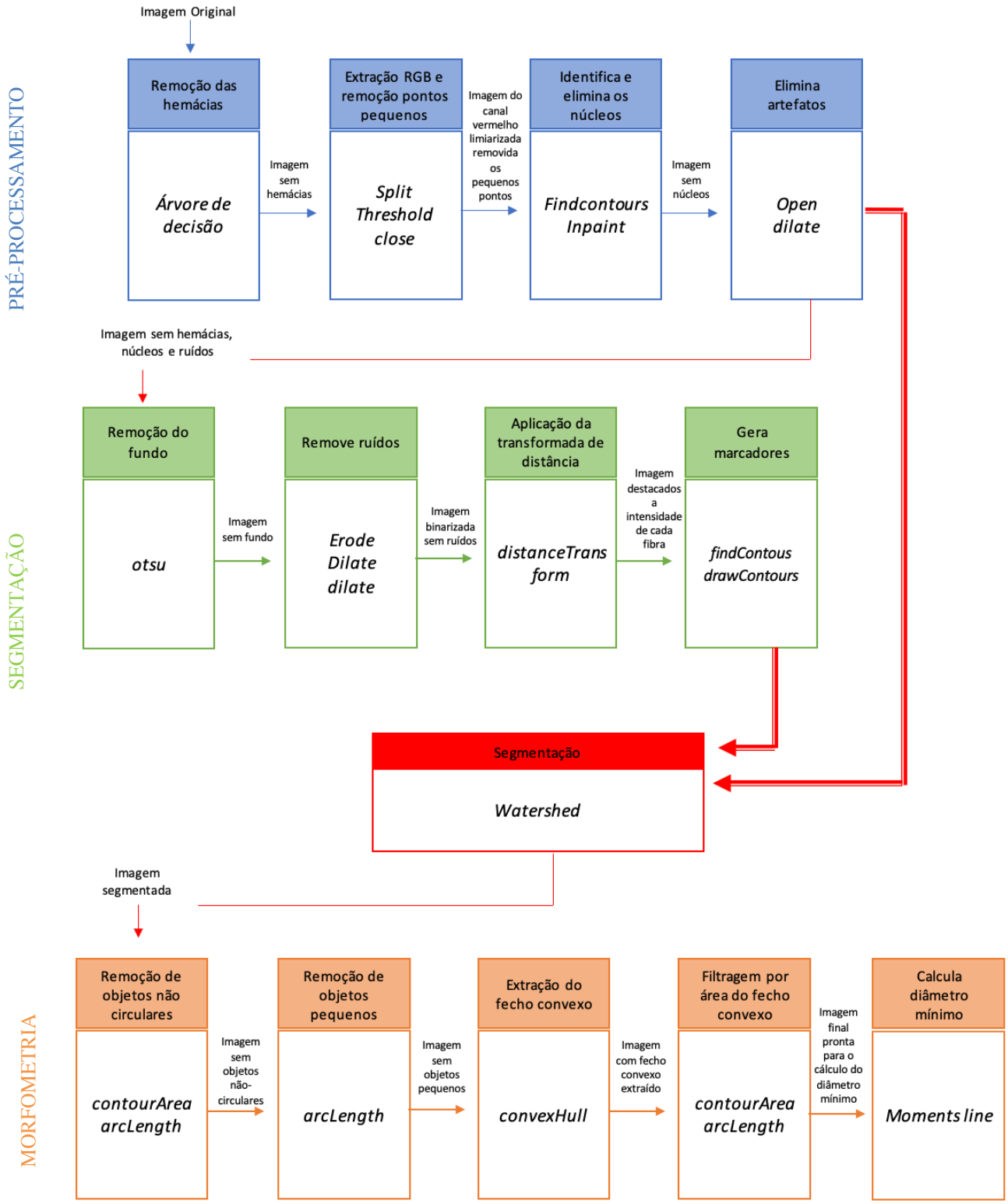
Com a proposta de automatizar o processo de análise da morfometria dos cardiomiócitos e quantificação do colágeno em imagens histopatológicas de tecidos cardíacos que hoje é realizado manualmente pelos especialistas, foi definido um protocolo de operações de processamento de imagens, aplicado no conjunto de imagens da base de dados. Estas imagens, conforme mencionado na seção 4.2, são todas imagens do tecido cardíaco, sendo que cada imagem apresenta variações de intensidade e contraste, fato esse que dificulta a criação de um método padronizado para executar a análise em todas as imagens. Os parâmetros das funções utilizados nas operações iniciais foram definidos após exaustivos testes e assim criado o protocolo de análise para cada processo.

4.4.1 Procedimento 1: Morfometria dos cardiomiócitos

O protocolo de análise foi dividido em pré-processamento, segmentação e morfometria, na etapa de pré-processamento são aplicadas algumas operações com o objetivo de padronizar as imagens removendo ruídos e objetos indesejáveis. Na sequência é realizada a segmentação utilizando o método de watershed. Por fim, é realizada a morfometria dos cardiomiócitos. A Figura 16 representa o diagrama com a sequência de operações utilizadas na criação do método proposto.

[8] https://www.cs.waikato.ac.nz/ml/weka/

Figura 16 – Sequência de Operações do método proposto para automatização do processo de morfometria dos cardiomiócitos em imagens de biópsia do tecido cardíaco.



Fonte: do autor.

4.4.1.1 Pré-processamento

Na primeira etapa do algoritmo é carregada a imagem original f(x,y) colorida, para posteriormente aplicar as operações de processamento de imagens que dará início a automatização de todo processo de análise.

Remoção das Hemácias

Nessa etapa do algoritmo, foram eliminados os pontos vermelhos da imagem que não representam os núcleos, mas sim hemácias, pois quando efetuado o procedimento de coleta do tecido para a extração das lâminas, ele é lavado com uma solução de salina para remover o excesso de sangue que está entre os músculos para que essas hemácias não fiquem visíveis na imagem. Mas, dificilmente se consegue eliminar todas. É importante ressaltar que para o profissional de patologia quando analisado de maneira manual, essas hemácias não interferem no procedimento, porém quando se trata de técnicas de processamento digital de imagens, esses pontos vermelhos se tornam um problema no processo de segmentação, pois esses podem ser segmentados como sendo objetos de interesse e por isso devem ser eliminados.

Para remoção desses pontos, utilizamos o software WEKA para construir uma árvore de decisão. Manualmente foram coletados os valores de RGB da imagem a partir da base de dados para ser processada no WEKA.

Uma varredura pixel a pixel é realizada na imagem, na qual de acordo com a parâmetros de decisão gerados no WEKA. É realizada uma comparação dos valores de RGB e seguindo os critérios de decisão gerado cujo a condição é se o valor de R for menor que 120 ou G menor 105 ou B for maior que 90 e R for maior que G, seus valores são substituídos pela cor de um fragmento mais próximo cujo valores são 135 para R, 156 para G e 124 para B, eliminando os pontos vermelhos das imagens.

Extração RGB e Remoção de Pontos Pequenos

O principal objetivo dessa etapa é separar os três canais de cor RGB da imagem para comparar qual canal possui melhor realce dos objetos de interesse na imagem. Portanto, para extração dos canais foi utilizado a função s*plit* da biblioteca OPENCV, e o canal vermelho foi aquele obteve melhor desempenho no realce das fibras de interesse. Na sequência foi aplicada a função de limiarização com a limiar empírica de valor igual a 100, obtendo uma imagem com o fundo preto e os objetos destacados em branco. Para excluir os pequenos pontos da imagem

que podem interferir no processo seguinte, foi aplicada a operação morfológica de fechamento, com elemento estruturante do tipo elipse de tamanho (5,5), valor empírico.

Identificação e Eliminação dos Núcleos

Essa etapa visa a identificação dos núcleos para posteriormente eliminá-los, pois os núcleos presentes nas células irão atrapalhar o processo de segmentação do contorno externo das mesmas. Para encontrar os núcleos presente nas células foi utilizada a função *findcontours* função da biblioteca OPENCV, essa função basicamente detecta mudanças na cor da imagem e a marca como contorno. Aplicando essa função cria-se um vetor contendo os pixels de cada objeto denominado núcleos na imagem.

Para eliminar o núcleo de cada célula da imagem percorremos o vetor de elementos gerados na etapa de identificação dos núcleos e utilizando a função *inpaint* presente na biblioteca OPENCV, preenchemos o interior de cada objeto com a média dos valores de RGB coletados ao redor de cada objeto. Essa função basicamente substitui os valores dos pixels internos de cada objeto pelos valores dos pixels de seus vizinhos, para que o objeto pareça com sua vizinhança e como resultado final, obtemos uma imagem com apenas células sem núcleos, pois os mesmos foram eliminados com esse procedimento.

Eliminação de artefatos

Assim como o núcleo foi eliminado, também foi preciso eliminar alguns artefatos da imagem, que são partículas das substâncias usadas para fixar o tecido cardíaco na lâmina, resultado do processamento histológico das amostras de coração. Nessa etapa, a remoção foi feita utilizando as operações morfológicas abertura e dilatação, respectivamente. O elemento estruturante foi a elipse de tamanho (14,14). Após concluir essa etapa do processo, temos uma imagem pronta para iniciar o processo de segmentação, uma imagem sem pontos vermelhos e sem ruídos.

4.4.1.2 Segmentação

Remove o fundo da imagem

Nesta etapa inicia-se o processo de segmentação da área de interesse da imagem (cardiomiócitos). Após a realização de vários testes de segmentação, optou-se pela escolha do

método de *watershed* com os marcadores definidos por meio da transformada de distância. O objetivo da técnica é identificar os limites de uma região, consequentemente, as bordas do objeto de interesse. O método de implementação pode variar desde dilatações sequenciais dos pontos de mínima do relevo até o encontro de dois conjuntos que eram desconexos, e mesmo métodos mais complexos, como a utilização de gradiente, pontos de mínima local e marcadores de background. O sucesso dessa técnica se dá pela escolha dos marcadores, pois o erro na escolha pode proporcionar um mau desempenho da técnica, que pode resultar em uma super-segmentação, quando não é encontrado a fronteira (borda) do objeto, ou uma não-segmentação.

Para iniciar o processo o fundo da imagem foi removido para encontrar uma estimativa da proximidade de cada objeto e para realizar esse processo foi aplicado o a técnica de limiarização de *otsu*.

Remove ruídos

Com a imagem binarizada resultante do processo anterior é preciso remover todos os pequenos ruídos da imagem. Para isso foram utilizadas as operações de erosão e dilatação. Essas operações foram aplicadas utilizando as funções *morphologyEx* da biblioteca OPENCV com o elemento estruturante de tamanho (2.9, 2.9).

Concluindo o processo, foi aplicada novamente a função de dilatação na imagem obtida após a erosão e dilatação, utilizando-se como elemento estruturante de tamanho (-1, -1), esse procedimento é executado com o objetivo de delimitar a fronteira de cada objeto que se toca.

Transformada de distância

Nessa etapa aplicamos a transformada de distância. A partir desta função da transformada de distância topográfica entre dois pontos quaisquer, determinam-se quais pontos da imagem pertencem unicamente a cada mínimo, formando as bacias de captação. Aqueles pontos que podem pertencer a mais que uma bacia formam então a linha divisória (watershed). (BEUCHER E MEYER, 1993).

A transformada de distância foi aplicada utilizando a função *distanceTransform* da *opencv*.

Gera marcadores

Para gerar os marcadores dos objetos de interesse, foi percorrido cada objeto da imagem por meio da função *findcontours* e armazenado em um vetor. Na sequência percorre-se o vetor desses objetos e por meio da função *drawcontours,* no qual desenha-se cada objeto da imagem.

Para desenhar esses objetos e eliminando aqueles que tecnicamente não são interessantes, devido seu formato ou tamanho. Após inúmeros testes chegou-se ao resultado de um parâmetro condicional para o desenho dele, no qual cada objeto é percorrido e verificando-se seu tamanho em pixel e só é desenhado caso o objeto for maior que 45 pixels de contorno.

Os marcadores são gerados subtraindo a imagem do processo anterior pela imagem resultante no processo da transformada de distância.

Segmentação

Nessa etapa finaliza o processo de segmentação aplicando a segmentação de watershed tendo como parâmetro de entrada a imagem que foi gerada na etapa final de pré-processamento e a imagem com os marcadores.

O resultado final da segmentação mostrou-se satisfatório no sentido de que os objetos de interesses da imagem foram segmentados, podendo assim passar para a próxima etapa que é a morfometria dos cardiomiócitos.

4.4.1.3 Morfometria

Remove objetos não circulares

Finalizada a etapa de segmentação dos cardiomiócitos, iniciamos o processo de extração do diâmetro mínimo de cada objeto segmentado, nessa etapa utilizou-se como referência (MERLI, 2020). Essa medida se faz necessária para finalizar a etapa de análise.

Os objetos possuem formatos e tamanhos irregulares, ou até mesmo são cortados pela borda da imagem, mas analisando as imagens nota-se um certo nível de circularidade nesses objetos, o que foi utilizado como parâmetro para filtrar os mesmos. Aqueles que não se adequam são excluídos, para tanto, foi utilizada como base a equação da circularidade (equação 1), a qual retorna um valor no intervalo (0,1), tal que 1 indica uma região R perfeitamente circular (BURGER, BURGE, 2009). A área e o perímetro do contorno foram calculados pelas funções *contourArea* e *arcLength* implementadas por meio da biblioteca OPENCV. Dessa forma, o

objeto é desconsiderado caso o seu valor medido for menor que a circularidade mínima estabelecida.

$$\text{Circularidade(R)} = 4\pi \,.\, \frac{Area(R)}{PERIMETRO(R)^2} \tag{10}$$

Remove objetos pequenos

Baseado em sua figura geométrica assim como a remoção dos objetos não circulares a remoção dos objetos pequenos se faz necessária para maior precisão da análise.

Calculada pela função *arcLenth* é gerada a condição de retirada de objetos por meio do perímetro do contorno de cada um deles. Inicialmente nos processos anteriores (Segmentação), já foram eliminados pequenos objetos, porém é essencial para precisão total da análise das imagens que apenas objetos sem ruídos e perda significativa de parte do seu tamanho seja utilizada. O tamanho mínimo estabelecido foi de perímetro de valor igual a 250 pixels.

Extração do fecho convexo

Para recuperar partes das fibras perdidas durante o processo de remoção dos objetos pequenos, consequência do processo anterior, foi aplicada a função *convexHull*. Essa função tem por característica, encontrar o menor polígono convexo que possui todos os contornos da região do objeto em questão (BURGER, BURGE, 2009).

Filtragem por área do fecho convexo

Em algumas áreas das imagens no processo de segmentação, ocorreu um tipo de aglomeração de objetos e a função *convexHull* aplicada no processo anterior, muitas vezes a área do polígono convexo ultrapassava a área da região não convexa. Foi preciso fazer uma filtragem verificando o objeto e caso ele apresente uma área maior ou igual a 1.5 vezes a área do objeto não-convexo, nesse caso se a condição for verdadeira é realizado a filtragem.

Na imagem para cálculo dos diâmetros, foram utilizadas somente as regiões que satisfaziam a condição de filtragem, preservando o tamanho individual de cada objeto.

Cálculo do diâmetro mínimo

Nessa etapa, é realizado todo processo para gerar os dímetros mínimos de cada objeto segmentado e para isso cada objeto foi encontrado seu centroide, o centro da massa da região contornada por meio da função *moments*. Por meio do cálculo da distância euclidiana de todos os pontos do contorno entre si pela equação 2, no qual p e q são pixels com coordenadas (x, y) e (s, t), respectivamente, e D é a distância euclidiana.

$$D(p,q) = [(x-s)^2 + (y-t)^2]^{\frac{1}{2}} \tag{11}$$

Para cada distância calculada é verificado o centroide dessa reta, por meio do princípio da equação geral da reta (equação 3), no qual a, b e c são constantes e x e y são as coordenadas de seus pontos (LEITHOLD, 1994). Dessa forma, é possível traçar uma reta do maior diâmetro pela função *line*, e obter as coordenadas dos dois pontos de intersecção do contorno com o eixo encontrado.

$$ax + by + c = 0 \tag{12}$$

Também foi calculado o vetor ortogonal para definir o menor diâmetro dos objetos, formado pelos pontos de início e fim do eixo do maior diâmetro. Foi traçada uma linha na inclinação do vetor ortogonal com um comprimento para que fossem alcançados os dois pontos de interseção dessa reta com a fronteira de cada objeto. Com a distância euclidiana foi adquirida a medida do menor diâmetro de cada objeto por meio dos dois pontos extremos.

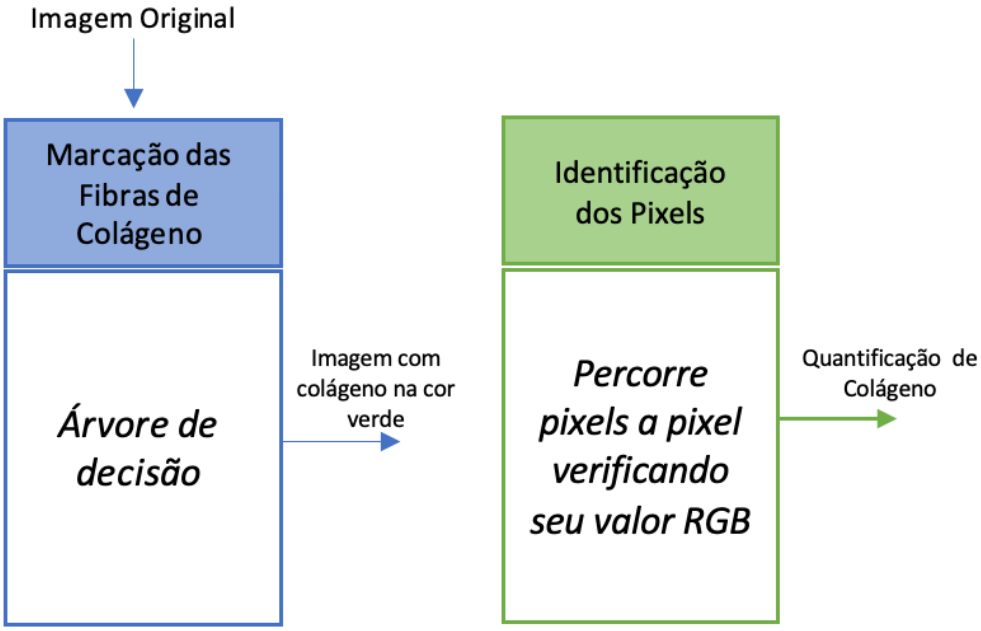
Esses valores foram armazenados em um arquivo .CSV para posterior análise de um especialista.

4.4.2 Procedimento 2: Quantificação de colágeno

O protocolo de análise para quantificar a porcentagem de colágeno presente no tecido cardíaco é definido em duas etapas: pré-processamento e segmentação. Na etapa de pré-processamento é carregada a imagem de entrada na qual se aplicam algumas operações com o objetivo de destacar a área de interesse. Na sequência é aplicada a segmentação utilizando o

método de identificação de pixel comparando seu valor RGB. Por fim, é contabilizado o colágeno. A figura 14 representa o diagrama com a sequência de operações utilizadas na criação do método proposto.

Figura 17 - Sequência de operações do método proposto para automatização do processo de quantificação de colágenos em imagens do tecido cardíaco.



Fonte: do autor.

Imagem Original

Nessa etapa é carregado a imagem de entrada do algoritmo proposto, que dará início ao processo de segmentação automática das fibras com concentração de colágeno. Essas imagens foram coradas com *picrosirius red* para destacar o colágeno presente no tecido cardíaco.

Marcação das fibras de colágeno

Após inúmeros testes, uma ferramenta de aprendizado de máquina foi utilizada para definir os parâmetros de segmentação. A ferramenta WEKA foi utilizada para gerar uma árvore de decisão por meio de um processo de modelagem supervisionada com uma base de dados gerada manualmente com os valores RGB de 30 imagens originais no qual foram marcados valores para área de colágeno e não colágeno.

Tendo como atributos de entrada os valores dos canais RGB de cada pixel, a árvore gerada possuía apenas um nó, cuja condição é o valor do canal G, que deve possuir seu valor menor ou igual a 91 para classificar como positivo para colágeno, e caso contrário, não colágeno, sendo este o valor implementado no algoritmo.

Identificação dos pixels de colágeno

Nessa etapa é realizada a segmentação das fibras que possuem colágeno. Para realizar a segmentação, a imagem foi percorrida pixel a pixel verificando seu valor RGB e de acordo com a árvore de decisão gerada no processo anterior. Essa fibra foi colorida de verde indicando o colágeno presente para posteriormente iniciar o processo de contagem dos pixels para representação da área total da imagem.

Percorrendo a imagem, são verificados os pixels de cor verde e contabilizados como colágeno e outras cores como não colágeno. Por fim, após percorrer o total da imagem verificando seus valores RGB (verde) soma-se a quantidade de pixels classificados como colágeno e divide pelo total de pixels da imagem e obtém a porcentagem de concentração de colágeno na área total da imagem.

A última etapa do processo é a fase dos relatórios no qual é gerado um documento para cada imagem processada mostrando a porcentagem relativa à área total da imagem identificando a área com colágeno e a área não colágeno ficando disponível para análise de um especialista.

4.4.3 Medidas de avaliação

Para avaliar o método de automatização da análise da morfometria dos cardiomiócitos foi utilizada uma abordagem quantitativa entre as características extraídas das imagens segmentadas pelo algoritmo e por meio da segmentação manual realizada por um especialista da área, para verificar a existência das diferentes medidas extraídas das imagens segmentadas manualmente e pelo algoritmo.

Assumindo que a imagem segmentada manualmente é B e A é a imagem segmentada automaticamente pelo algoritmo, as métricas utilizadas para avaliação desse método foram:

Similaridade de Área (SIA) utilizada para quantificar o quão sobreposta as áreas de A e B estão, inicialmente foi utilizada por (WANG *et al.*, 2012), é definida como:

$$SIA = \frac{2(A \cap B)}{A + B}$$

(13)

Erro de Sobreposição de Área (ESA) essa medida é utilizada para quantificar a diferença entre as imagens A e B e mostrar o erro de sobreposição de área, sendo calculada pela diferença entre a área da união e interseção das imagens dividida pela área de B.

$$ESA = \frac{(A \cup B) - (A \cap B)}{B}$$

(14)

Para avaliar o método de quantificação do colágeno, foi utilizada uma abordagem quantitativa em que se compara as taxas de % de colágeno nas imagens obtidas pelo algoritmo e por um especialista.

Utilizamos as seguintes métricas para realizar a avaliação:

- **Precisão (P):** Permite quantificar a proporção de fibras de colágeno positivas classificadas corretamente entre os preditos como positivos. Assumindo que o número de Verdadeiros Positivos (VP) é equivalente ao número de fibras de colágeno que se encontram em A e também em B, e que o número de Falsos Positivos (FP) equivale ao número de fibras de colágeno que se encontram em A e estão ausentes em B, assim temos:

$$P = \frac{VP}{(VP + FP)}$$

(15)

- **Acurácia (A):** Corresponde à taxa de fibras de colágenos positivos e negativos classificados corretamente. Assumindo que o número de Verdadeiros Positivos (VP) é equivalente ao número de fibras de colágeno que se encontram em A e também em B, que o número de Verdadeiros Negativos (VN) equivale ao número de fibras de colágeno que estão ausentes em A e B, que o número de Falsos Positivos (FP) equivale ao número de fibras de colágeno que se encontram em A e estão ausentes em B, e que o número de Falsos Negativos (FN) seja equivalente ao número de fibras de colágeno que estão ausentes em A, porém constam em B, assim temos:

$$A = \frac{(VP + VN)}{(VP + VN + FP + FN)}$$

(16)

- **Sensibilidade (S):** Permite quantificar a capacidade do algoritmo de identificar corretamente as fibras de colágeno. Assumindo que o número de Falsos Negativos (FN) seja equivalente ao número de fibras de colágeno que estão ausentes em A, porém constam em B, e que o número de Verdadeiros Positivos (VP) é equivalente ao número de fibras que se encontram em A e também em B, assim temos:

$$S = \frac{VP}{(VP + FN)}$$

(17)

Capítulo 5

RESULTADOS

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos com a aplicação dos métodos propostos bem como a avaliação dos mesmos.

A proposta desta pesquisa utiliza processamento automático de imagens histológicas com o objetivo de auxiliar a avaliação da remodelagem cardíaca, tornando este procedimento menos subjetivo. Os resultados apresentados nesse capítulo consolidam os esforços de desenvolvimento ao longo da pesquisa. A proposta inicial divide-se em duas abordagens distintas, sendo a primeira voltada ao processo de segmentação e morfometria das células cardíacas, visando a avaliação de hipertrofia do tecido, e a segunda voltada à quantificação de colágeno presente entre as células.

Vale ressaltar que para obter resultados com o grau de precisão esperado do processamento de imagens utilizando a primeira técnica, os tecidos cardíacos a serem analisados são coradas com Hematoxilina e Eusina com o objetivo de realçar as células das lâminas produzidas. Para a segunda técnica, as amostras de tecido são coradas com picrosirius vermelho, que tem como objetivo realçar a quantidade de colágeno no tecido, tomando como base que as regiões contendo colágeno irão adquirir uma coloração vermelha, informação essencial para o trabalho de processamento de imagem posterior com a técnica aqui proposta.

Ambos os algoritmos foram desenvolvidos com o uso da biblioteca OpenCV, que se caracteriza pela diversidade de algoritmos, sendo de grande utilização em pesquisas e implementações da indústria. Além disso, trata-se de um framework de software livre, possibilitando que posteriormente o trabalho seja continuado com garantia de padrão de desenvolvimento e capacidade de adequação a novos métodos devido à comunidade crescente que mantém o framework.

5.1 Procedimento 1: morfometria dos cardiomiócitos

Para o processo de teste dos algoritmos propostos e posterior avaliação dos resultados foram utilizadas as imagens já citadas neste trabalho na seção 4.2, tornando-as, portanto, o objeto de observação dos resultados.

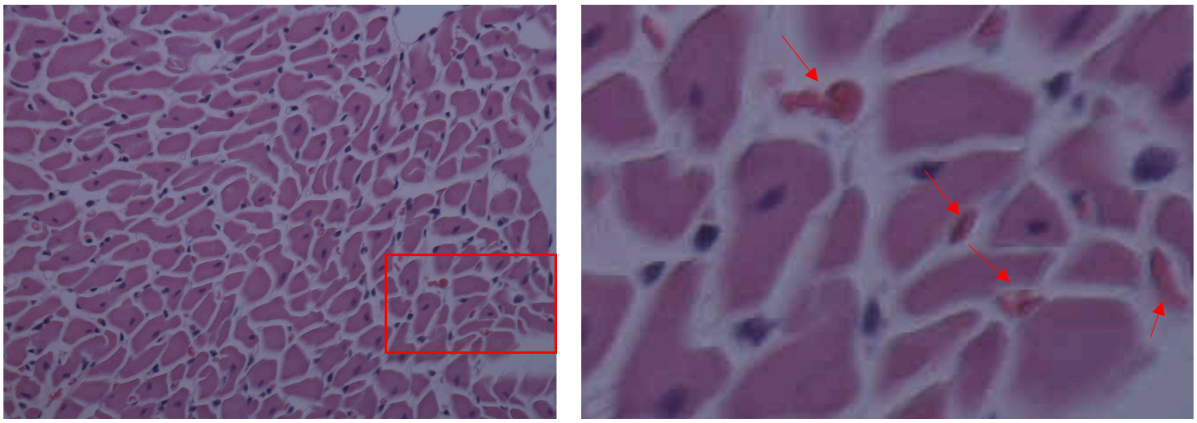
5.1.1 Pré-Processamento

Inicialmente é realizado um pré-processamento na imagem de entrada com o objetivo de padronizar as imagens e aumentar sua qualidade como objeto de pesquisa, além de serem mais elegíveis para uso do algoritmo, visto que ruídos na imagem podem criar resultados demasiadamente alterados ou mesmo impossibilitar a segmentação correta. Para isso são utilizados os métodos descritos na seção 4.4.1. "Morfometria dos Cardiomiócitos", para remoção de ruídos (que são comuns na obtenção de imagens digitais) e remoção de áreas de tecidos conjuntivos que não são de interesse para a análise proposta deste projeto sendo, portanto, uma informação que pode reduzir a precisão final do procedimento.

Remoção de Hemácias

A figura 19 apresenta, como exemplo, um resultado do processamento descrito no tópico "Remoção das Hemácias" para remoção das hemácias (representadas na Figura 18 (a) por regiões avermelhadas) destacadas na imagem histológica Figura 18 (b). Sua remoção tem um alto grau de importância e envolve diretamente a qualidade do trabalho e o resultado final, visto que podem prejudicar o processamento por terem coloração semelhante aos núcleos das células, vindo a ser confundidos com os mesmos. É importante ressaltar que diversos métodos só são eficientes se o objeto a ser processado está sem ruídos.

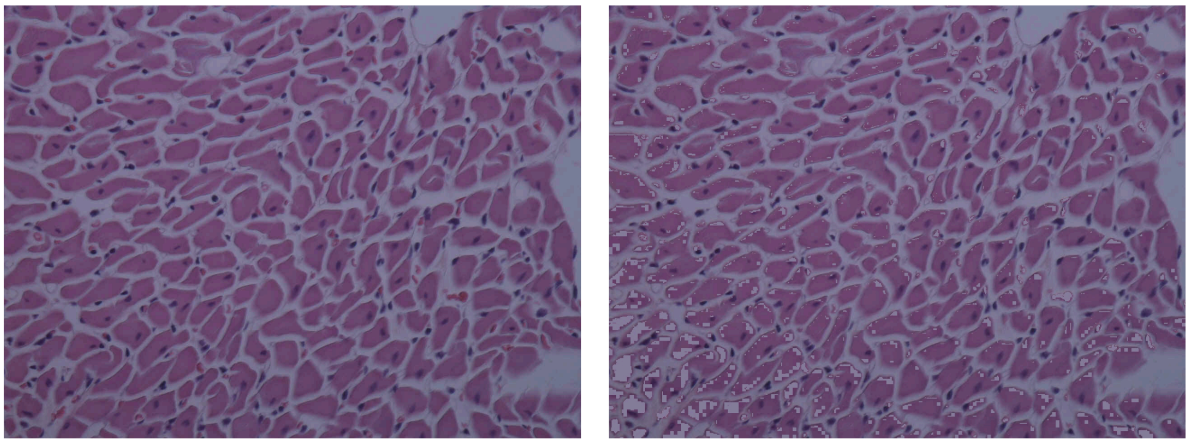
Figura 18 – Identificação de hemácias presente nas imagens histológicas. (a) imagem original com marcação de uma área com hemácias. (b) Detalhe ampliado da marcação de hemácias.



(a) (b)

Fonte: do autor.

Figura 19 – Imagem do processo de remoção das hemácias. (a) Imagem original. (b) imagem com as hemácias removidas.



(a) (b)

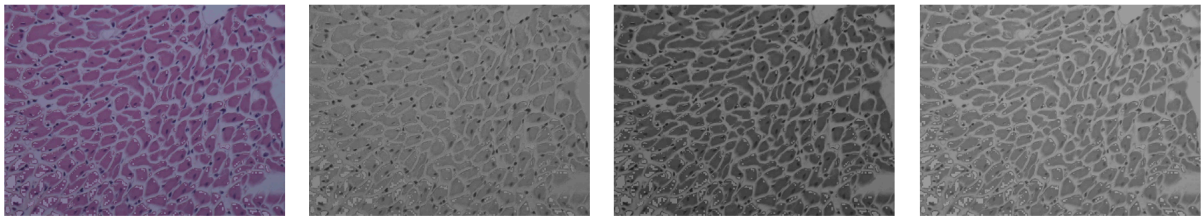
Fonte: do autor.

Extração dos canais RGB

Com a devida remoção das hemácias ainda são necessários métodos que possam filtrar e refinar a imagem. Uma das técnicas utilizadas para tal foi a extração de canais RGB, representados na Figura 20, de acordo com o descrito no tópico "Extração dos canais RGB", que ficaram visivelmente destacados os núcleos de cada célula que necessita posteriormente de exclusão. Dos três canais extraídos (R – *Red,* G – *Green* e B – *Blue*) o canal vermelho (R) foi o que melhor destacou os pontos a serem removidos conforme podemos observar na Figura 20

(b), sendo que esses pontos são os núcleos das células, por se tratar de um elemento que pode interferir na segmentação das células, portanto, adotado como padrão doravante.

Figura 20 – Extração dos canais RGB. (a) Imagem original. (b) Imagem do canal R. (c) Imagem do canal G. (d) Imagem do canal B.



(a) (b) (c) (d)

Fonte: do autor.

Na sequência desse processo foi aplicada a limiarização *threshold* destacando os núcleos e artefatos na cor branca e o restante da imagem em preto Figura 21 (b), o que facilitou o processo. Para complementar esse procedimento foi necessário aplicar a operação de fechamento afim de excluir pequenos pontos que não são núcleos e não são artefatos da imagem Figura 21 (c).

Figura 21 – Imagem com núcleos e artefatos destacados. (a) Imagem do canal vermelho. (b) Imagem com aplicação da limiarização. (c) Imagem resultante, contendo núcleos e artefatos.

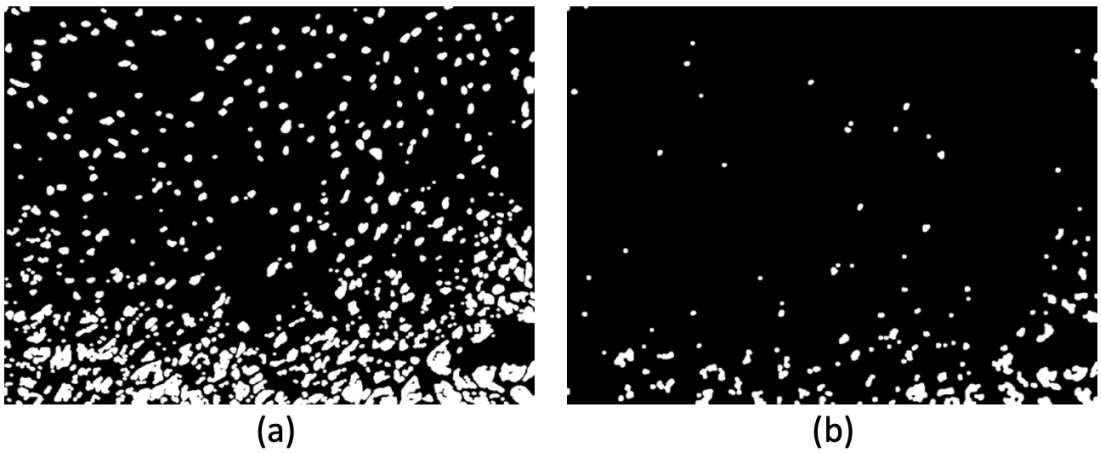
(a) (b) (c)

Fonte: do autor.

Identificação e remoção dos núcleos e artefatos

Inicialmente foram removidos os artefatos da imagem deixando somente os núcleos, por meio das operações de abertura e dilatação conforme descrito no tópico “Eliminação de Artefatos” e o resultado pode ser visto na Figura 22(b).

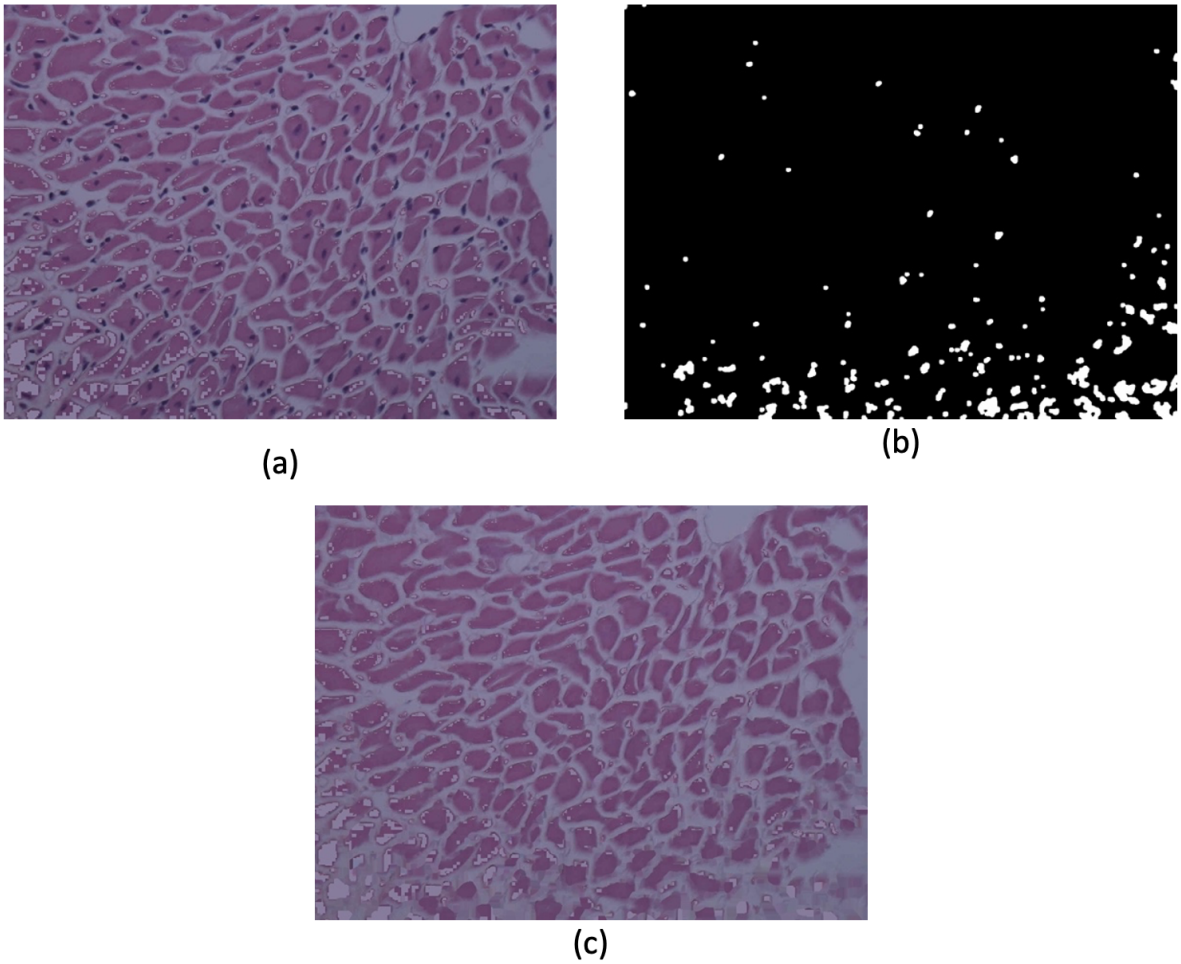
Figura 22 – Imagem remoção de artefatos. (a) Imagem com núcleos e artefatos. (b) Imagem com artefatos removidos



Fonte: do autor.

Na sequência iniciou-se o processo de remoção dos núcleos conforme descrito no tópico "Identificação dos núcleos", com função *findcountours* foi identificado e contado cada núcleos de cada célula destacado no processo anterior. Esse processo foi realizado para possibilitar a exclusão na próxima etapa. A remoção foi realizada por meio da função *INPAINT* do OPENCV, que utilizou a Figura 22 (b) como máscara e a Figura 22(a) colorida como entrada, conforme no tópico "Elimina núcleos" que realiza uma média de pixels vizinhos a partir de um ponto fixo para que haja um preenchimento de todos os pixels vizinhos, ou seja, ocorre a eliminação dos núcleos presentes dentro das células que podem vir a ser um problema na segmentação das células desejadas. Mesmo após todo esse procedimento, foi necessário eliminar pequenos ruídos existentes na imagem por meio das operações de abertura e dilatação. Com este método, as células foram padronizadas dentro da imagem de forma que não haja problema de ruído. A Figura 23 demonstra fluxo das operações utilizadas nesse tópico e a Figura 23 (c) o resultado final do processo de pré-segmentação:

Figura 23 – Fluxo de operações da remoção dos núcleos com função *INPAINT*. (a) Imagem de entrada. (b) Imagem da máscara. (c) Resultado do processo de remoção dos núcleos.



Fonte: do autor.

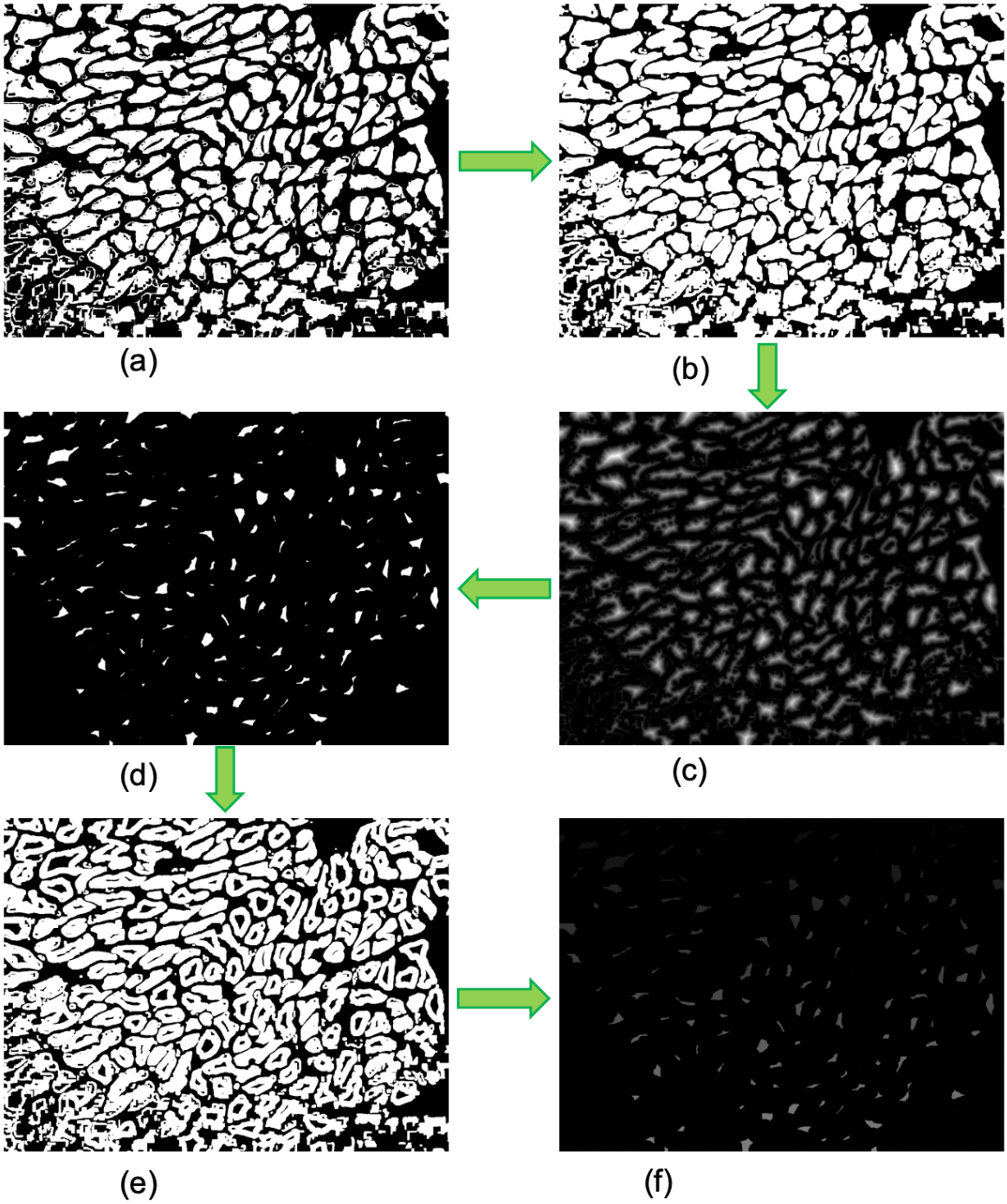
5.1.2 Segmentação

Após exaustivos testes de segmentação, a *watershed* combinada com a transformada de distância foi a que apresentou melhor resultado para segmentar as células do tecido cardíaco. Nesse contexto é importante ressaltar que a técnica de *watershed* adiciona espectros de profundidade da imagem possibilitando uma segmentação mais detalhada dos objetos de interesse. Sendo assim, a técnica possibilitou que houvesse uma precisão maior junto aos algoritmos desenvolvidos. A *watershed* juntamente com a transformada de distância quando combinadas possibilita a segmentação de objetos que tocam mutuamente que é uma característica das imagens a serem trabalhadas. Com a transformada de distância que considera

a distância dos pontos negativos para obter o efeito de relevo (vales) e assim segmentar a área de interesse sem utilizar sementes.

A Figura 24 representa um exemplo dos resultados do fluxo utilizado no processo de segmentação das células utilizando a técnica supracitada:

Figura 24 – Fluxo do processo de segmentação. (a) Imagem com *threshold*. (b) Imagem com a remoção de falhas do processo de *threshold*. (c) Resultado da transformada de distância. (d) Marcadores de primeiro plano. (e) Marcadores de segundo plano (f) Obtenção dos marcadores.

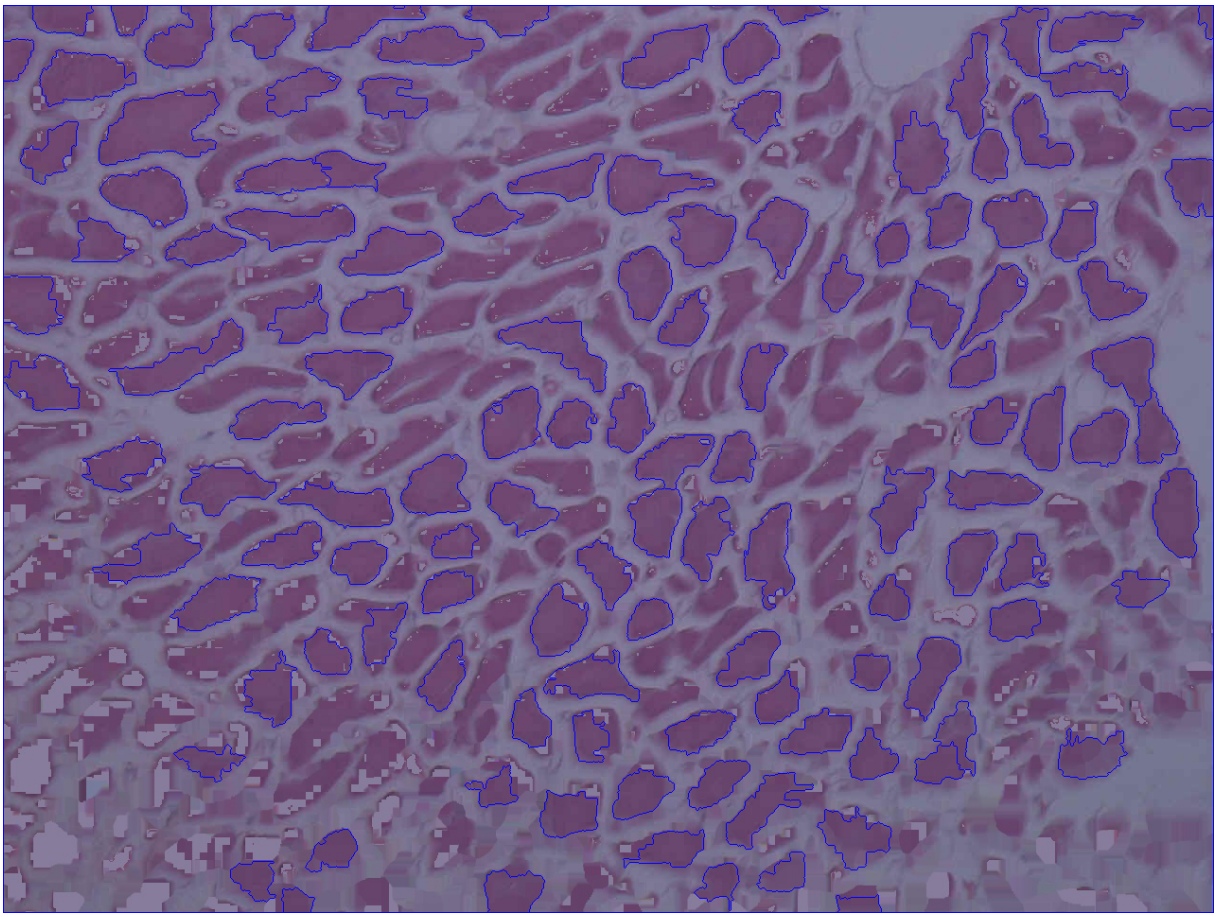


Fonte: do autor.

É possível analisar na Figura 24 que a técnica viabiliza resultados interessantes. Uma vez que por meio da transformada de distância foi possível gerar os marcadores de primeiro plano separando os objetos que se tocam mutuamente e marcadores de segundo plano, criando um ambiente mais confortável para análises posteriores inerentes a esta pesquisa.

Para que fosse possível continuar com o trabalho de segmentação das células foi realizado um *threshold* na imagem resultante do processo de pré-segmentação, separando as células como sendo a região 1 e o fundo como região 2 conforme representado na Figura 24 (a). Esse processo permite um refinamento das informações contidas na imagem de forma que o algoritmo proposto possa realizar sua análise. A imagem 24 (b) é resultado do processo de erosão e dilatação comuns na técnica removendo falhas na imagem resultante do processo da etapa anterior que, posteriormente, pode influenciar nos resultados. A imagem 24 (c) é resultado da transformada de distância no qual é possível observar que as células foram separadas mutuamente. A imagem 24 (d) são os marcadores de primeiro plano gerados a partir da imagem de transformada de distância no qual a mesma técnica de *threshold* foi aplicada a fim de gerar os mesmos. Logo após é realizado uma subtração da imagem 24 (b) pela 24 (d) gerando a imagem 24 (e) com os marcadores de segundo plano. Por fim é aplicado a função *wathershed* presente na biblioteca da OPENCV que tem como imagem de entrada a imagem 23 (c), e as imagem 24 (f) como marcador, resultando na segmentação conforme ilustrado na figura 25.

Figura 25 - Imagem resultante do processo de segmentação *wathershed.*



Fonte: do autor.

É possível observar na Figura 25 que as células de interesse foram segmentadas na cor azul, conforme é descrito no capítulo 4 no tópico "Segmenta os cardiomiócitos", tendo o destaque necessário para os processos seguintes do método proposto.

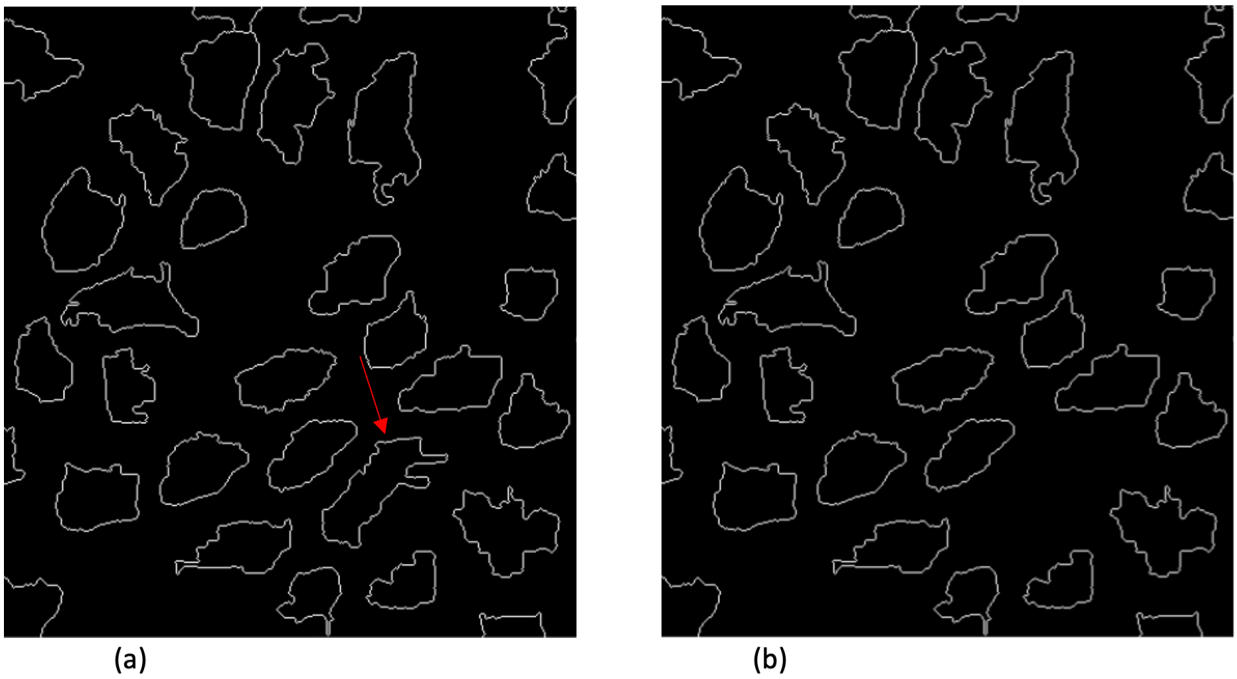
5.1.3 Morfometria

Um ponto importante da pesquisa é o cálculo do diâmetro mínimo de cada célula, essencial para o profissional determinar de forma assertiva o pré-diagnóstico. Para atingir o cálculo do diâmetro mínimo, foi necessária a implementação de alguns procedimentos conforme descrito no capítulo 4 na seção 4.4.1.3.

Remove objetos não circulares

Após a segmentação das células, iniciou-se o processo para remover os objetos não circulares. Sua circularidade foi usada para eliminar os objetos que tinham característica com uma circularidade menor do que a limiar definida. Nesse procedimento para cálculo da área relativa das células na imagem, o valor mínimo de circularidade utilizado foi de 0,5, valor empírico para filtragem. Esse valor utilizado evitou a inclusão de células deformadas. A figura 26 possui um exemplo de uma região da imagem no qual é possível observar que uma célula segmentada representada na imagem 26 (a) foi excluída do processo final conforme ilustrado na imagem 26 (b).

Figura 26 – Exemplo do processo de remoção de objetos não circulares. (a) região da imagem original segmentada. (b) região do processo final de remoção de objetos não circulares.



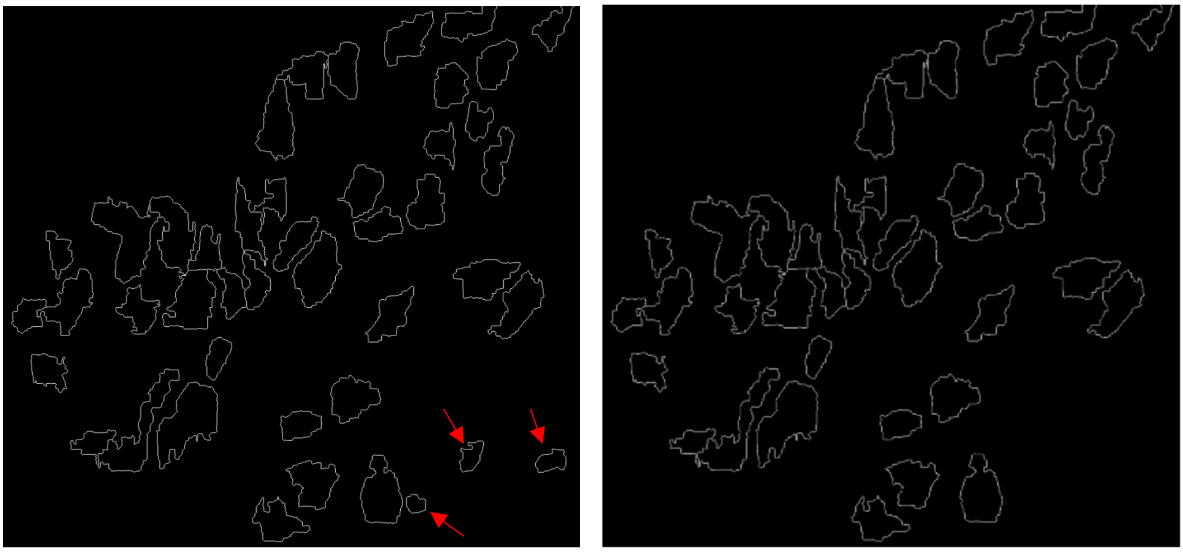
Fonte: do autor.

Remove objetos pequenos

Também faz parte desse processo a remoção de objetos pequenos que não é importante para sua extração de medida do diâmetro mínimo no processo final. Essa remoção baseou-se na característica geométrica de cada objeto segmentado. Para sua exclusão da imagem é utilizado o perímetro do contorno de cada objeto por meio da função *Arclength,* no qual o perímetro mínimo estabelecido para a filtragem foi de 250 pixels.

Podemos observar o funcionamento do processo de remoção desses objetos por meio da Figura 27.

Figura 27 – Remoção de objetos pequenos. (a) Imagem segmentada. (b) Imagem resultante do processo de remoção dos objetos menores que 250 pixels.



(a) (b)

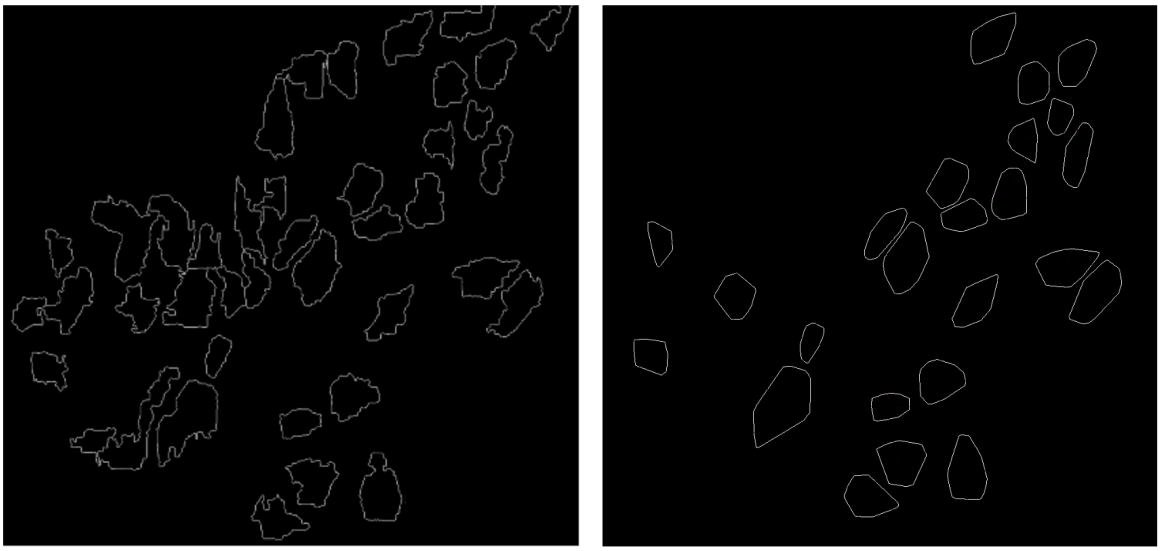
Fonte: do autor.

Extração e filtragem por área do fecho convexo

Durante o processo de segmentação houve algumas imagens que tiveram células unificadas, formando um agrupamento de células, conforme podemos observar na Figura 29 (a), portanto, fez-se necessário uma filtragem desses objetos verificando-se se o objeto convexo apresentava uma área maior ou igual 1.2 vezes a área do objeto não-convexo correspondente, nesse caso, se a condição fosse verdadeira era realizada a filtragem.

A figura 28 possui um exemplo de uma imagem segmentada 28 (a) no qual é possível observar que durante o processo de segmentação houve a uma aglutinação de células e a figura 28 (b) é um exemplo de uma imagem com o resultado do processo final de filtragem das células, deixando a imagem pronta para extração das medidas mínimas de diâmetro das células, no qual é possível identificar a exclusão das mesmas em seu processo final.

Figura 28 – Exemplo extração e filtragem por área do fecho convexo. a) Imagem original segmentada. (b) Imagem resultante do processo de filtragem.



(a) (b)

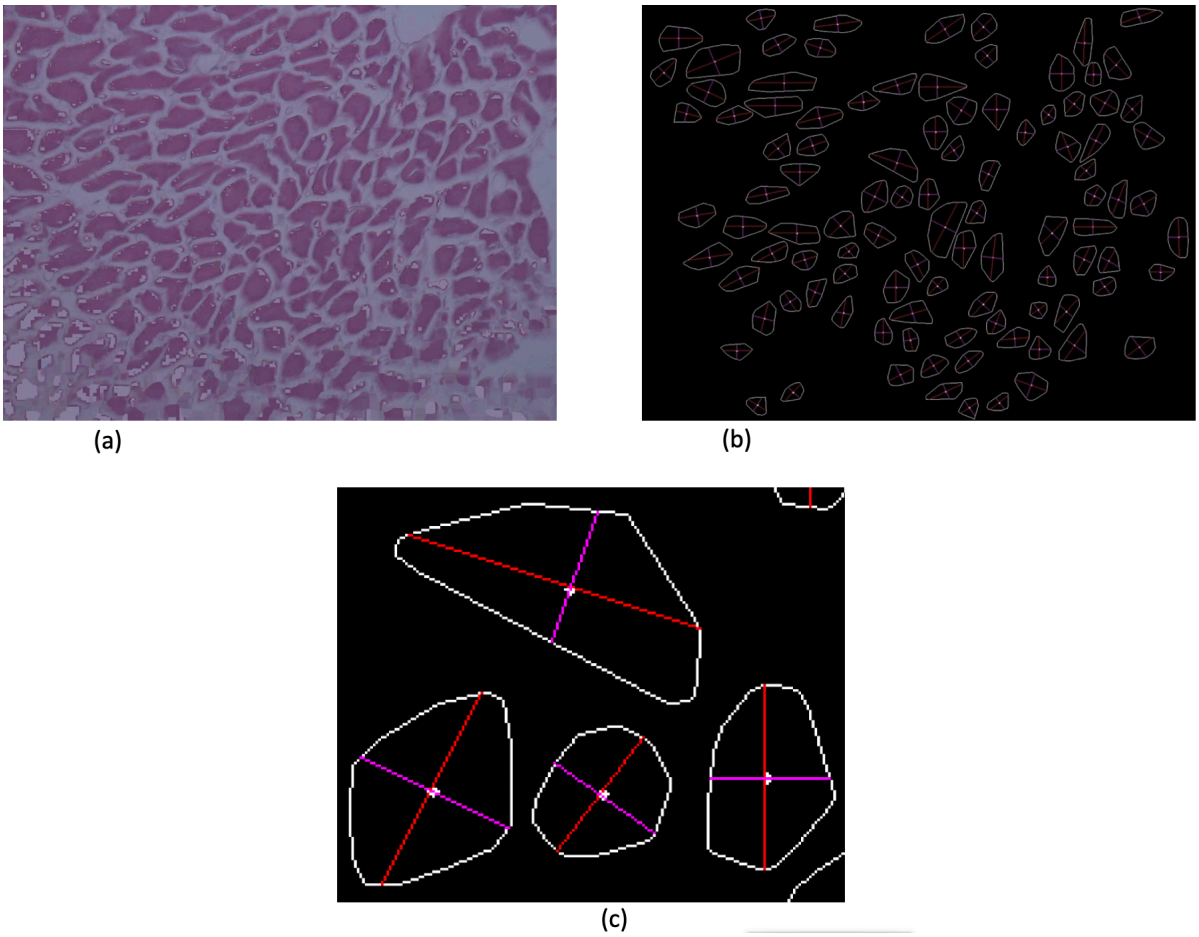
Fonte: do autor.

Cálculo do diâmetro mínimo

Como parte do último processo do algoritmo foi calculado o menor diâmetro de cada célula conforme descrito no capítulo 4 e armazenado esses diâmetros em um arquivo .CSV para posterior análise de um especialista. Esse procedimento contou com o cálculo do vetor ortogonal ao vetor formado pelos pontos de início e fim do eixo do maior diâmetro, a partir das coordenadas do centroide, uma linha na inclinação do vetor ortogonal foi traçada, com o comprimento tal que fosse alcançado os dois pontos de interseção dessa reta com a fronteira. Por meio da distância euclidiana entre os pontos extremos foi adquirida a medida do menor diâmetro das células.

A Figura 29 apresenta um exemplo de uma imagem no qual foi extraído o cálculo do menor diâmetro de cada célula.

Figura 29 - Exemplo de cálculo do menor diâmetro das células. (a) imagem original. (b) resultado da aplicação da função implementada para o cálculo dos diâmetros mínimos. (c) região ampliada da imagem do resultado da função implementada, no qual é representado cada elemento. Centroide da célula ponto branco; maior diâmetro eixo vermelho; menor diâmetro eixo magenta.



Fonte: do autor.

5.2 Procedimento 2: quantificação de colágeno

Para realização da proposta relacionada à quantificação de colágeno presente entre as fibras do tecido cardíaco, foram utilizadas lâminas contendo amostras de tecido coradas com picrosirius vermelho que tem como objetivo base ressaltar a quantidade de colágeno no tecido, tomando como base que as regiões contendo colágeno terão uma coloração avermelhada.

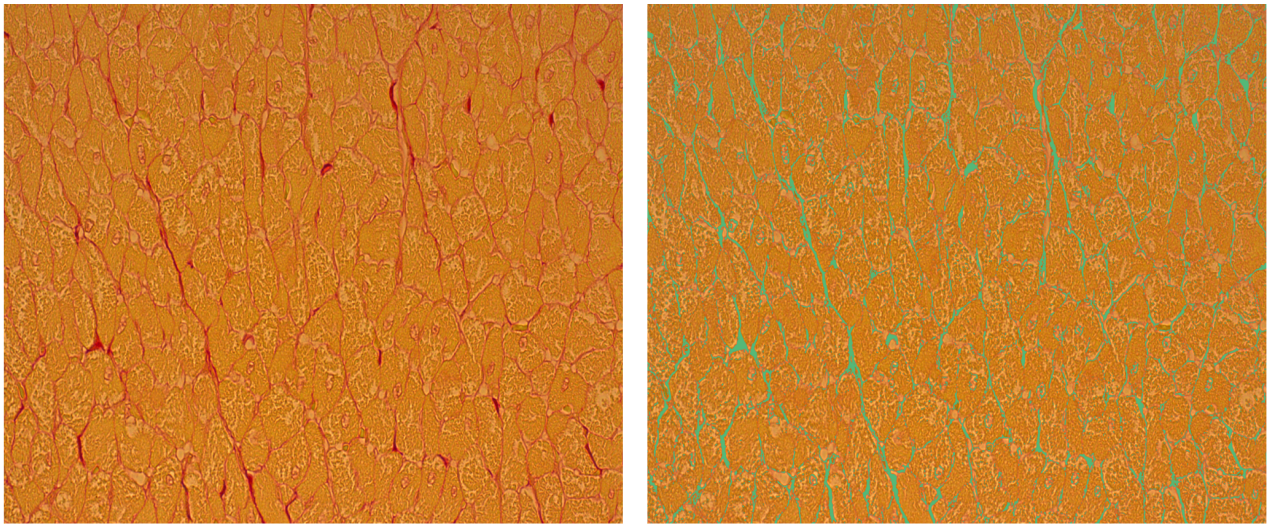
Para a implementação das técnicas, foi desenvolvido um algoritmo em linguagem C++ utilizando a biblioteca OpenCV e parâmetros extraídos de uma análise utilizando WEKA a fim de classificar pixels das imagens com características positivas ou negativas para colágeno.

Os parâmetros utilizados para a aplicação da técnica foram determinados a partir de uma árvore de decisão gerada e classificada pelo WEKA por meio do algoritmo J48. Manualmente foram coletados valores RGB de aproximadamente 20 pixels por imagens contidos nas regiões previamente marcadas como positivos para colágeno, assim como nas regiões marcadas como e negativos para colágenos em uma base de amostra contendo 30 imagens de diferentes animais que possuem resolução de 2048 x 1536 pixels, e foram adquiridas por meio de um microscópio com a ampliação de tamanho 40x, construindo duas classes na base de dados que alimentou o software. As imagens estão subdivididas em: IR (animais que passaram por uma cirurgia para indução de infarto seguido de reperfusão) e Sham (animais controle/saudáveis). Cada animal tem imagens de duas regiões do coração, da parede livre do ventrículo esquerdo e do septo, essas imagens foram fornecidas pelo Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Utilizando o software para processar a base de dados e classificar pixels como colágeno e não colágeno a árvore de decisão gerada possui apenas um nó, no qual o valor do canal G teria que ser menor ou igual a 91 para positivo colágeno e caso contrário não colágeno. Com este resultado, verifica-se que os canais R e B não influenciaram na decisão do classificador.

Assim foi realizada uma varredura pixel a pixel na imagem comparando seus valores e, quando a condição fosse verdadeira, os valores de RGB eram alterados para cor verde. A Figura 30 ilustra um exemplo do resultado obtido após resultado final do processo:

Figura 30 - Resultado do processo de identificação das fibras contendo colágeno. (a) Imagem Original. (b) Imagem resultante do processo.



(a) (b)

Fonte: do autor.

É possível observar que a área na qual é positivo para colágeno, seus pixels foram coloridos de verde, facilitando as próximas etapas de processamento e auxiliando à tomada de decisão. Posteriormente, o algoritmo varre a imagem novamente pixel a pixel e calcula a proporção de pixels verdes sobre o total de pixels da imagem, representando a porcentagem de área da imagem que está ocupada pela concentração de colágeno. Com esse resultado, já é possível determinar a quantidade de colágeno presente no tecido em relação a proporção total da imagem.

Com as etapas bem definidas e com os resultados obtidos, 30 testes com imagens histológicas foram realizados e o algoritmo conseguiu isolar e quantificar o colágeno contido no tecido cardíaco de forma precisa provando, portanto, que a ideia é factível e assertiva na tomada de escolhas.

5.3 Validação dos Métodos

Nesta seção serão apresentados os experimentos realizados com o objetivo de avaliar a precisão dos métodos propostos.

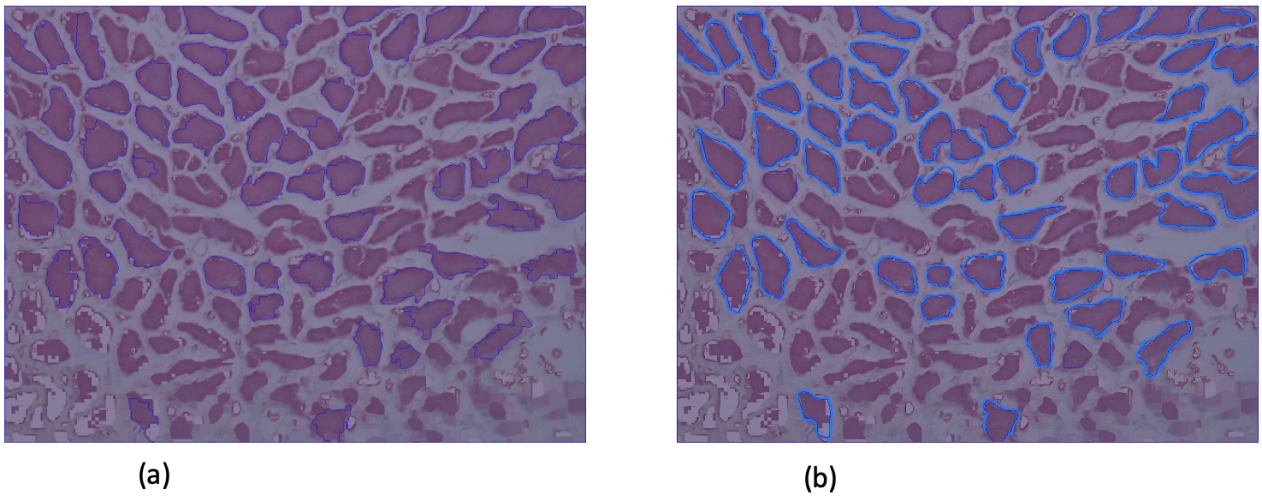
5.3.1 Validação do Procedimento 1

Validação da segmentação

A validação da segmentação contou com a colaboração de um profissional pesquisador na área de patologia. Inicialmente foi executado o algoritmo em oito imagens de H&E pertencentes à base descrita na seção 4.2 “Materiais” e posteriormente as células segmentadas pelo algoritmo foram segmentadas pelo especialista de forma manual utilizando o software Paint, presente no sistema operacional Windows, no qual foi utilizado a ferramenta “lápis” para realizar o processo. É importante ressaltar neste ponto que, a fim de evitar influência, o especialista não teve acesso ao resultado da segmentação automática; a identificação das células a segmentar foi feita apenas com a inserção de um ponto interno às mesmas. Os contornos segmentados manualmente serviram como padrão-ouro para a avaliação da segmentação automática.

A Figura 31 (a) apresenta um exemplo de uma segmentação automática representados na imagem por meio da cor azul escuro que foi resultado do trabalho em questão e respectivamente a Figura 31 (b) representa a segmentação manual também representados na imagem com a cor azul claro.

Figura 31 - Imagens segmentadas. (a) automática. (b) manual.



Fonte: do autor.

Observando-se a Figura 31, é possível avaliar visualmente o nível de compatibilidade entre os resultados obtidos com o algoritmo e o padrão-ouro.

Posteriormente, de posse das imagens segmentadas manualmente, doravante chamadas de B, e das segmentadas automaticamente pelo algoritmo, chamadas de A, foi realizado para cada célula o cálculo de sua área e posteriormente gerado a interseção de cada célula de A pela respectiva em B, além da união de A por B, sendo possível calcular a similaridade entre cada par de células, assim como o seu erro de sobreposição. Como resultado, foi gerado a validação da imagem em um todo com os cálculos de Similaridade de Área (SIA) e Erro de Sobreposição de Área (ESA), de cada célula e da imagem total.

Os valores obtidos são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores obtidos de SIA e ESA para as imagens segmentadas automaticamente em relação ao padrão-ouro

Imagem	SIA	ESA
#1	0,77	0,47
#2	0,82	0,36
#3	0,78	0,40
#4	0,84	0,31
#5	0,81	0,39
#6	0,82	0,35
#7	0,84	0,30
#8	0,80	0,40
Média	**0,81**	**0,37**
Desvio-Padrão	0,03	0,06

Fonte: do autor.

A avaliação dos valores obtidos na análise de segmentação foi realizada a partir do valor de SIA e ESA. O valor de SIA pode variar de 0 a 1, sendo 1 o valor ideal (sobreposição integral), e o valor de ESA pode variar de 0 a 2, sendo 0 o valor ideal (sem erro de sobreposição).

Unicamente a partir dos valores médios obtidos para SIA e ESA é difícil avaliar se a segmentação automática foi suficientemente precisa. Porém, com a avaliação visual realizada posteriormente pelo especialista sobre os resultados obtidos, podemos concluir que os mesmos foram plenamente satisfatórios.

Validação da Morfometria

Para validar o resultado da medição dos diâmetros mínimos – objetivo final deste Procedimento 1 - foram extraídos os valores do diâmetro mínimo de cada célula segmentada pelo processo automático, assim como pelo processo manual, nas 8 imagens utilizadas para esta avaliação. O total de células medidas nas 8 imagens foi 367.

A média do erro do valor do diâmetro foi calculado a partir da comparação entre os valores obtidos pelos dois processos, obtendo-se os valores apresentados na tabela 2.

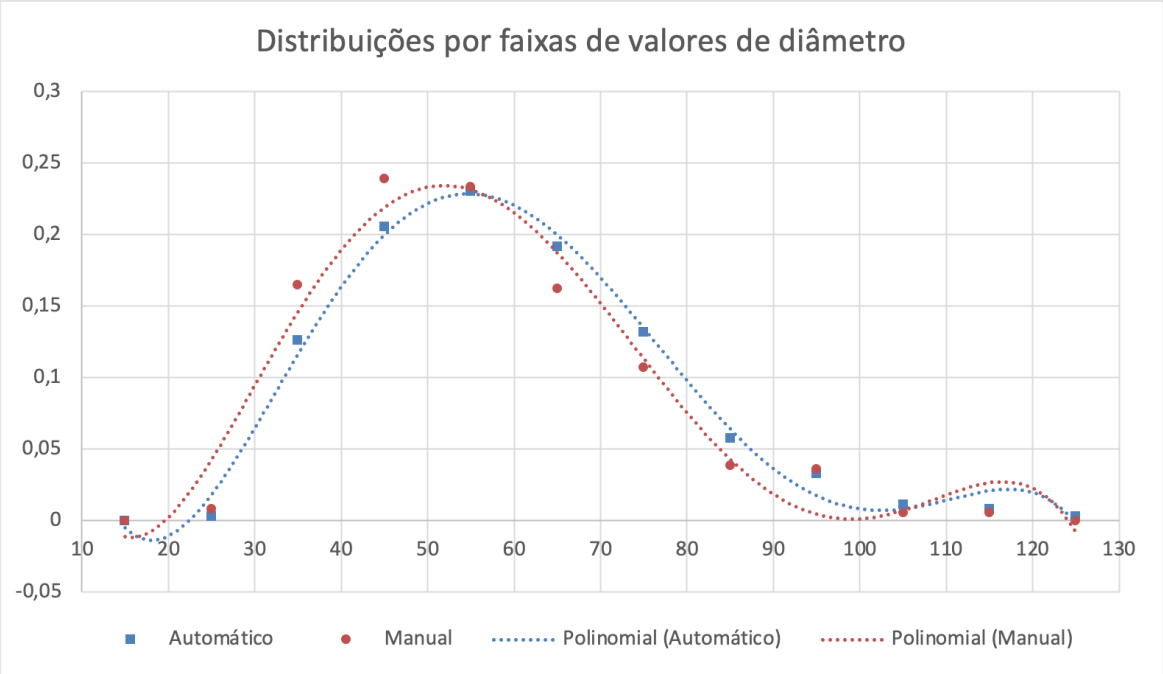
Tabela 2 – Valores médio do diâmetro obtido para as imagens segmentadas automaticamente e imagens segmentadas manualmente, com respectivos erros.

Imagem	Diâmetro médio - Auto	Diâmetro médio - Manual	Erro
#1	56,36	51,00	10,5%
#2	45,09	42,98	4,9%
#3	56,94	55,87	1,9%
#4	79,26	75,23	5,4%
#5	66,76	60,67	10,0%
#6	64,04	60,00	6,7%
#7	72,18	70,43	2,5%
#8	66,00	62,92	4,9%
		Média do Erro	**5,9%**

Fonte: do autor.

A partir dos valores de cada célula obtidos pelos processos automático e manual, foi possível construir as respectivas distribuições de frequência de valores por faixas, apresentadas no gráfico da Figura 32.

Figura 32 - Distribuição de frequências para os valores de diâmetro (em pixels) obtidos pelo processo automático e pelo processo manual. As faixas foram definidas com intervalos de 10 em 10.



Fonte: do autor.

Com as duas relações de medidas de diâmetro obtidas, foi aplicado um test-t de Student considerando-se como hipótese nula que não existe diferença estatisticamente significativa entre os dois conjuntos. O p-valor obtido foi 0,022. Este valor é inferior ao limite usualmente utilizado como padrão, que é de 0,050, o que levaria a refutar a hipótese nula. Porém, conforme apresentado na Tabela 2, o erro no cálculo do diâmetro médio foi de 5,9%, e, segundo o especialista, esse erro não comprometeria a avaliação de hipertrofia das células no processo de remodelamento cardíaco. Além disso, a observação das distribuições de frequência apresentadas no gráfico da Figura 32 mostra que existe uma defasagem relativamente constante entre as duas distribuições, segundo a qual os valores obtidos pelo processo automático, em média, tendem a ser sempre maiores do que os valores obtidos pelo processo manual. Isso pode ser verificado também pela análise da Tabela 2. Assim, a precisão do método automático poderá ser fortemente aumentada se uma calibração for efetuada no algoritmo, levando provavelmente à validação da hipótese nula. Para comprovar a defasagem e estabelecer um valor de calibração, novos experimentos de medições manuais deverão ser realizados em trabalhos futuros, inclusive com a participação de outros especialistas para o estabelecimento do padrão-ouro.

5.3.2 Validação do Procedimento 2

A avaliação desse método foi realizada por meio de dois tipos de abordagem. A primeira se trata de uma análise quantitativa realizada com uma base de 10 imagens de diferentes animais. Uma pesquisadora doutora em fisiologia que possui experiência na área de fisiologia humana de órgãos e sistemas, com ênfase em fisiologia do sistema cardiovascular, realizou a análise utilizando o método manual, com uso do software ImageJ, alterando a limiar do processo de *threshold* até obter visualmente a segmentação das fibras positivo para colágeno e na sequência era realizado a contagem dos pixels, para obter a quantificação (em porcentagem) de colágeno sobre área total do tecido analisado. Posteriormente, essas mesmas imagens foram processadas pelo algoritmo deste projeto e comparadas com o método manual realizado, conforme pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultado da análise de quantificação de colágeno.

Imagem	Resultado da Análise Manual (%)	Resultado da Análise Automática (%)	ERRO
#1	5,31	5,21	1,9%
#2	3,92	4,82	23,1%
#3	3,80	3,71	2,4%
#4	13,73	15,12	10,1%
#5	5,04	5,02	0,4%
#6	4,29	4,10	4,4%
#7	2,26	2,24	0,5%
#8	34,84	35,64	2,3%
#9	2,27	2,18	3,9%
#10	2,84	3,19	12,3%
		MÉDIA DO ERRO	**6,1%**

Fonte: do autor.

A média do erro obtido mostra-se razoável, uma vez que as outras alternativas – o procedimento puramente manual correntemente adotado pelos especialistas para este tipo de análise, assim como o procedimento apoiado pelo *ImageJ* – apresentam alto grau de

subjetividade e de variabilidade inter e intra-usuário, levando a um amento da precisão do processo, quando o mesmo é realizado pelo método automático proposto neste trabalho.

A segunda abordagem também foi realizada em 10 imagens de diferentes animais. Essa análise consiste em avaliar os resultados de desempenho da classificação realizada pelo algoritmo para cada pixel da imagem, classificando-o como “colágeno” ou “não colágeno”, no qual os resultados alcançados foram: Precisão = 92.4%, Acurácia = 86,8% e Sensibilidade = 92,9%.

Com base nos dados supracitados da Tabela 3 e os resultados alcançados na segunda abordagem, temos embasamento para afirmar que a proposta de automatização do processo é relativamente confiável e precisa.

Concluímos, portanto, que o algoritmo desenvolvido é uma ferramenta que poderá auxiliar de forma rápida e precisa o apoio à tomada de decisão para quantificação do colágeno no pré-diagnóstico realizado pelo profissional.

Capítulo 6

CONCLUSÕES

Este projeto apresentou a proposta de métodos para análise de imagens aplicados ao tecido cardíaco para quantificação do colágeno intersticial nas fibras do miocárdio e a medição diametral das células, que caracterizam alterações estruturais decorrentes de morbidades, de maneira automática, tarefa que hoje é realizada manualmente por especialistas. Foram propostas, implementadas e avaliadas duas abordagens.

A primeira consiste de uma abordagem para medição do tamanho médio das células do tecido cardíaco (Morfometria dos Cardiomiócitos). Para implementar esse método, determinou-se um protocolo de operações a serem aplicadas em imagens da base de dados, que foi dividido em três etapas, a saber, pré-processamento, segmentação e morfometria. Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que o método proposto foi satisfatório, uma vez que dois processos de validação foram realizados. O primeiro processo de validação foi realizado sobre capacidade e precisão de segmentação automática das células, com os cálculos de SIA e ESA de cada célula e da imagem total. Para o SIA do conjunto de imagens obteve o valor médio de 0,81 com desvio padrão de 0,03 sendo 1 seu valor ótimo. Para o ESA do conjunto de imagens obteve o valor médio de 0,37 com desvio padrão de 0,06 sendo 0 seu valor ótimo. É difícil afirmar somente por meio dos valores médios de SIA e ESA sobre a precisão do método, mas por meio da avaliação visual realizada pelo especialista, foi possível concluir que os resultados obtidos por esse método foram satisfatórios.

Ainda sobre essa abordagem, foi realizada a validação sobre o resultado da medição dos diâmetros mínimos, calculando o erro médio do valor do diâmetro, que foi calculado a partir da comparação entre os valores obtidos pelos dois processos manual e automático. Seu erro médio obtido foi de 5,9%, o que leva a concluir que foi um resultado satisfatório, que pode futuramente ser aprimorado com a calibração do algoritmo, após a marcação manual de novos especialistas.

Na segunda abordagem, caracterizada pela identificação e contagem de pixels (Quantificação de Colágeno), foram utilizados dois métodos de validação, sendo o primeiro para validar capacidade de quantificar a porcentagem de colágeno. Para essa validação obteve-se um erro médio de 6,1%, o qual mostra-se satisfatório, uma vez que apresenta um amento da precisão do processo, quando o mesmo é realizado pelo método automático. Ainda sobre essa abordagem, os seguintes resultados foram alcançados Precisão = 92.4%, Acurácia = 86,8% e Sensibilidade = 92,9%.

Com os resultados conclui-se que os métodos propostos nesse projeto são satisfatórios, podendo ser otimizadas melhorando o grau de precisão do método com a implementação de um ambiente que permita a calibração e ajustes dos seus parâmetros de acordo com a base de imagens a ser processada.

Além de aprimorar o padrão ouro utilizado com a participação de outros especialistas, como trabalho futuro pretende-se desenvolver um aplicativo que permita ao especialista executar os métodos propostos e ajustar os parâmetros de acordo com sua base de imagens. Os métodos propostos poderão também servir como base para uma ferramenta que estime o grau de remodelamento cardíaco, baseado nos resultados de quantificação de colágeno e de medida das células obtidos a partir do método proposto neste trabalho.

Publicação

de Sousa R.A., Omoto A.C.M., Fazan Junior R., Felipe J.C. (2020) Automatic Processing of Histological Imaging to Aid Diagnosis of Cardiac Remodeling. In: Rocha Á., Ferrás C., Montenegro Marin C., Medina García V. (eds) Information Technology and Systems. ICITS 2020. Advances in Intelligent Systems and Computing, vol 1137. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-40690-5_37.

REFERÊNCIA

Beucher, S. e Meyer, F. (1993) “The morphological approach to segmentation: the watershed transformation. Mathematical morphology in image processing.”, in *Optical Engineering*.

Burger, W; Burge, M.J. "Principles of Digital Image Processing: Core Algorithms". London: Springer, 2009.

Braunwald, E. e Kloner, R. A. (1985) “Myocardial reperfusion: A double-edged sword?”, *Journal of Clinical Investigation*, 76(5). doi: 10.1172/JCI112160.

Cavalera, M., Wang, J. e Frangogiannis, N. G. (2014) “Obesity, metabolic dysfunction, and cardiac fibrosis: Pathophysiological pathways, molecular mechanisms, and therapeutic opportunities”, *Translational Research*, p. 323–335. doi: 10.1016/j.trsl.2014.05.001.

Díez, J. (2007) “Mechanisms of cardiac fibrosis in hypertension.”, *Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn.)*, p. 546–550. doi: 10.1111/j.1524-6175.2007.06626.x.

Dorph-Petersen, K. A., Nyengaard, J. R. e Gundersen, H. J. G. (2001) “Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size”, *Journal of Microscopy*, 204(3), p. 232–246. doi: 10.1046/j.1365-2818.2001.00958.x.

Dougherty, G. (2009) *Digital Image Processing for Medical Applications*, *Digital Image Processing for Medical Applications*. Cambridge University Press. doi: 10.1017/cbo9780511609657.

Eirin, A. *et al.* (2015) “Intra-renal delivery of mesenchymal stem cells attenuates myocardial injury after reversal of hypertension in porcine renovascular disease”, *Stem Cell Research and Therapy*, 6(1). doi: 10.1186/scrt541.

Felipe, J. C. (2005) *Desenvolvimento de métodos para extração, comparação e análise de características intrísecas de imagens médicas, visando à recuperação perceptual por conteúdo*. doi: 10.11606/T.55.2005.tde-12082006-000758.

Filho, O. M. e Neto, H. V. (1999) “Processamento Digital de Imagens”, *Revista Brasileira de Geofísica*, 21/03(1), p. 331. doi: 10.1590/S0102-261X1998000100035.

Gonzalez, R. C. e Woods, R. E. "Digital Image Processing". 2. ed. São Paulo: Edgard Blucher, (2008).

Gonzalez, R.C.; woods, R.E. “Processamento Digital de Imagens”. 3. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2010.

Giger, M., Karssemeijer, N. e Armato, S. (2001) “Computer-aided diagnosis in medical imaging.”, *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 20, p. 1205–1208.

Júnior, J. S. (2012) “Morfologia dos cardiomiócitos e quantificação do colágeno no miocárdio de ratas tratadas com isoflavonas ou estrogênios”, *Cep*, p. 0–5. Available at: http://www.scielo.br/pdf/rbgo/v34n10/a03v34n10.pdf.

Junqueira, L. C. e Carneiro, J. (2013) *Histologia Básica: texto e atlas*, *Histologia*

Básica.

Leithold, L. "*O Cálculo com Geometria Analítica"*. 3. ed. São Paulo: HARBRA, 1994.

Medeiros, T. L. F. de *et al.* (2018) "Mortalidade por infarto agudo do miocárdio", *Revista de Enfermagem UFPE on line*, 12(2), p. 565. doi: 10.5205/1981-8963-v12i2a230729p565-572-2018.

Mendis-Handagama, S. M. L. C. e Ewing, L. L. (1990) "Sources of error in the estimation of Leydig cell numbers in control and atrophied mammalian testes", *Journal of Microscopy*, 159(1), p. 73–82. doi: 10.1111/j.1365-2818.1990.tb03020.x.

Merli, (2020) "*Segmentação e Analise Morfométrica de Tecido Muscular Esquelético em Imagens Histológicas de Pacientes com Distrofia Muscular Progressiva*", Monografia, Bacharel em Informática Biomédica, Ribeirão Preto, 66 p. 2020.

Mühlfeld, C., Nyengaard, J. R. e Mayhew, T. M. (2010) "A review of state-of-the-art stereology for better quantitative 3D morphology in cardiac research", *Cardiovascular Pathology*. doi: 10.1016/j.carpath.2008.10.015.

Pasqualin, C. *et al.* (2015) "Automatic quantitative analysis of t-tubule organization in cardiac myocytes using ImageJ", *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 308(3), p. C237–C245. doi: 10.1152/ajpcell.00259.2014.

Piper, H. M., García-Dorado, D. e Ovize, M. (1998) "A fresh look at reperfusion injury", *Cardiovascular Research*. doi: 10.1016/S0008-6363(98)00033-9.

Rao, R. B. *et al.* (2009) "Mining Medical Images", *Proceedings of the Third Workshop on Data Mining Case Studies and Practice Prize, Fifteenth Annual SIGKDD International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining (KDD 2009).*, 1895(Stanton).

Russo, I. e Frangogiannis, N. G. (2016) "Diabetes-associated cardiac fibrosis: Cellular effectors, molecular mechanisms and therapeutic opportunities", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, p. 84–93. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.12.011.

Sokolov, P. A. *et al.* (2017) "FibrilJ: ImageJ plugin for fibrils' diameter and persistence length determination", *Computer Physics Communications*, 214, p. 199–206. doi: 10.1016/j.cpc.2017.01.011.

Solomon, C. e Breckon, T. (2011) *Fundamentals of Digital Image Processing: A Practical Approach with Examples in Matlab*, *Fundamentals of Digital Image Processing: A Practical Approach with Examples in Matlab*. doi: 10.1002/9780470689776.

Talman, V. e Ruskoaho, H. (2016) "Cardiac fibrosis in myocardial infarction—from repair and remodeling to regeneration", *Cell and Tissue Research*, p. 563–581. doi: 10.1007/s00441-016-2431-9.

Wang, Y. Y. *et al.* (2012) "Segmentation of nerve fibers using multi-level gradient watershed and fuzzy systems", *Artificial Intelligence in Medicine*, 54(3). doi: 10.1016/j.artmed.2011.11.008.

Webb, S. W., Adgey, A. A. J. e Pantridge, J. F. (1972) "Autonomic Disturbance at Onset of Acute Myocardial Infarction", *British Medical Journal*, 3(5818), p. 89–92. doi: 10.1136/bmj.3.5818.89.

Yellon, D. M. e Hausenloy, D. J. (2007) "Myocardial Reperfusion Injury", *New England Journal of Medicine*, 357(11). doi: 10.1056/nejmra071667..

Zheng, B. (2009) "Computer-aided diagnosis in mammography using content-based

image retrieval approaches: Current status and future perspectives", *Algorithms*, 2(2). doi: 10.3390/a2020828.