

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, Área Anatomia Patológica do aluno **Randall Luis Adam**.

Campinas, 20 de fevereiro de 2002.

Prof. Dr. Konradin Metze
Orientador

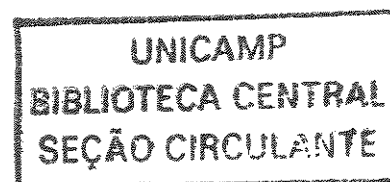


RANDALL LUIS ADAM

**ANÁLISE ESPECTRAL USANDO A
TRANSFORMADA DE FOURIER DISCRETA
PARA O ESTUDO DE NÚCLEOS CELULARES:
ELABORAÇÃO DE PROGRAMA E APLICAÇÃO
NO DESENVOLVIMENTO DO CORAÇÃO**

200305972

Campinas



RANDALL LUIS ADAM

**ANÁLISE ESPECTRAL USANDO A
TRANSFORMADA DE FOURIER DISCRETA
PARA O ESTUDO DE NÚCLEOS CELULARES:
ELABORAÇÃO DE PROGRAMA E APLICAÇÃO
NO DESENVOLVIMENTO DO CORAÇÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada
à Pós-Graduação da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas, para a obtenção
do Título de Mestre em Ciências
Médicas, área de Anatomia Patológica.

Orientador: Prof. Dr. Konradin Metze

Co-orientador: Prof. Dr. Neucimar Jerônimo Leite

Campinas
UNICAMP
2002

UNIDADE	Re
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	Ad14a
V	EX
TOMBO BC/	52328
PROC.	124/03
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	
Nº CPD	

CM001791B5-9

IB ID 279838

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

Adam Randall Luis

A13a

Ad14a

Análise espectral usando a transformada de Fourier discreta para o estudo de núcleos celulares: Elaboração de programa e aplicação no desenvolvimento do coração / Randall Luis Adam. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador: Dr. Konradin Metze, Dr. Neucimar Jerônimo Leite
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Fourier, Análise de. 2. Cromatina. 3. Coração - crescimento. 4. Análise Discriminatória. I. Konradin Metze. II. Neucimar Jerônimo Leite. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca Exalinatora da Tese de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Konradin Metze

Membros:

1. Prof. Dr. Marcos Antônio Rossi -

2. Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal -

3. Prof. Dr. Konradin Metze -

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, área de concentração em
Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas

Data: 20.02.2002

Dedicatória

Ao meu pai Vitor,
e à minha mãe Amélia,
Por tornar tudo isso possível.

Palavras Iniciais

(...)

Where is the Life we have lost in living?

Where is the wisdom we have lost in knowledge?

Where is the knowledge we have lost in information?

(...)

T. S. Elliot

Choruses from "The Rock"

Collected Poems (1909-1935)

in: The Complete Poems and Plays

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Konradin Metze, pelo apoio, entusiasmo e critério científico que tentou transmitir nesses dois anos.

Ao Dr. Neucimar, pela co-orientação e pela contribuição inestimável, possibilitando a formação de um grupo de análise de imagens multidisciplinar.

Ao Dr. Alexandre Falcão, pelo esforço em transmitir conhecimentos atualizados e inéditos sobre processamento de imagens digitais, fruto da sua pesquisa e talento.

Ao Dr. Benedicto de Campos Vidal, pelas suas observações relativas à microscopia óptica, ampliando o âmbito de possibilidades técnicas desse instrumento para mim.

À Dr^a. Irene, pela orientação oportuna, e pela prontidão em que dispensou sua atenção.

À Dr^a. Rosana Monradin, pela experiência que pôde transmitir na execução das atividades experimentais e laboratoriais da minha tese, e pelo seu caráter humano, fazendo-me perceber que os animais de laboratório são tratados com ética, respeito e carinho, em todas as etapas.

À Ane, pela torcida e por ser essa pessoa que estimo muito.

Ao Erlon e à Jorgette, por contar sempre com sua amizade.

À Larissa, por deixar tudo mais simples e alegre.

À Dr^a. Liliana, Dr^a. Letícia, Dr. Athanase, Dr^a. Míriam, Dr. José Vassalo, Dr. Luciano, Dr^a. Ingrid, Dr^a. Cecília e Dr^a. Patrícia, docentes do departamento de Anatomia Patológica e preceptores da residência médica, pela amizade e pela minha formação, pela qual sou eternamente grato.

Ao Sérgio e à Gisele, que executaram com perfeição os procedimentos técnicos no laboratório de anatomia patológica experimental.

À Ana e ao William, que foram companheiros insubstituíveis no treinamento e na realização dos procedimentos cirúrgicos nesta tese.

Ao Bruno, Luciano, Betinho, Eduardo, Michel, Fabiano, João, Ismael, Renato e Gustavo, colegas da república Jerivá.

À CNRS, particularmente Monsieur J. L. Chermant, por ter dado suporte à minha viagem ao congresso de Caen, na França, onde pude apresentar os resultados desta tese.

À Fapesp, que financiou este projeto, através dos processos 99/00322-9 e 99/11947-0.
--

Sumário

1	Resumo	21
2	Introdução	23
2.1	A importância da análise das texturas	23
2.2	A textura de um núcleo celular	24
2.3	A necessidade de critérios objetivos	25
2.4	A imagem como função matemática	26
2.5	Frequências espaciais	27
2.6	Desenvolvimento das tarefas experimentais	30
2.7	O modelo biológico utilizado	30
2.8	O Desenvolvimento dos Cardiomiócitos	30
3	Objetivos	33
3.1	Objetivos	33
3.1.1	Objetivos Gerais	33
3.1.2	Objetivos Específicos	33
3.2	Hipóteses	34
4	Material e Métodos	35
4.1	Animais de laboratório	35
4.2	Preparação	38
4.3	Processamento citológico	41
4.4	Principais alterações metodológicas	41
4.4.1	Retirada da eosina	41
4.4.2	Utilização de hidróxido de amônio	42
4.4.3	O estudo citológico	42
4.5	Microscopia óptica	43
4.6	Aquisição das imagens	43
4.7	Fontes de algoritmos	44
4.8	Processamento das imagens	44
4.9	Análise qualitativa e quantitativa	46
4.10	A contagem das mitoses	47
4.11	Análise estatística	47
4.11.1	Análise univariada	47
4.11.2	Análise multivariada	47

5	A Função Harmônica	49
5.1	A unidade elementar da transformada	49
5.2	Teorema da Mudança da Escala	52
5.3	O Perfil das Imagens Transformadas	54
6	Maior Corda ("Longest Chord")	57
6.1	Obtenção	57
6.2	Análise da orientação das maiores cordas	58
7	A Matriz de Co-ocorrência	61
7.1	Características da Matriz de Co-ocorrência	62
7.1.1	Segundo Momento Angular	63
7.1.2	Inércia	63
7.1.3	Homogeneidade Local	63
7.1.4	Entropia	64
7.1.5	Entropia Normalizada	64
7.1.6	Mx	64
7.1.7	My	64
7.1.8	Contraste	64
7.1.9	Momento Inverso da Diferença	65
7.1.10	Probabilidade do Pico de Transição	65
7.1.11	Momento Diagonal	65
7.1.12	Segundo Momento Diagonal	65
7.1.13	Desvio-Padrão	66
7.1.14	Média	66
7.1.15	Coeficiente de Variação	66
7.1.16	Média das Somas	66
7.1.17	Média das Somas das Linhas	66
7.1.18	Média das Somas das Colunas	67
7.1.19	Tonalidade dos Agrupamentos	67
7.1.20	Proeminência dos Agrupamentos	67
7.1.21	Momento do Produto	67
7.1.22	Soma dos quadrados: Variância	67
8	Resultados	69
8.1	Características físicas dos animais	69
8.2	Variáveis obtidas a partir de características morfométricas	72
8.3	Análise textural da cromatina dos núcleos	77
8.4	Análise textural da transformada de Fourier	89
8.5	Informações gerais das imagens transformadas	98
8.6	A distribuição da informação textural	100
9	Discussão	107
9.1	Sobre as Variáveis Estudadas	107
9.2	O Limite de Resolução e a Amostragem	108
9.2.1	A Discretização da imagem	109

9.3	A análise espectral na biologia e medicina	112
9.4	As descontinuidades das bordas nucleares	113
9.5	O significado de cada variável obtida	114
9.6	Apreciação de outros trabalhos	114
10	Conclusões	117
10.1	Conclusões relativas ao programa	117
10.2	Conclusões relativas ao modelo biológico	118
10.3	Conclusões relativas à revisão da literatura	119
11	Summary	121
12	Apêndices	131

Lista de Figuras

2.1	Obtenção de uma onda quadrada a partir da soma de senos.	28
2.2	Estrutura da imagem transformada.	29
4.1	Núcleo segmentado.	36
4.2	Amaciamento das bordas	37
4.3	Intensidades de cinza através do núcleo	38
4.4	Momento de inércia	39
4.5	Janela principal do software elaborado	42
4.6	Diagrama da disposição dos anéis e setores	48
5.1	Função Harmônica	51
5.2	Soma de Funções Harmônicas	52
5.3	Imagem de um Núcleo de Cardiomiócito	53
5.4	Momento de Inércia da transformada de Fourier	53
5.5	Perfil do Espectro de Fourier	54
5.6	Perfil do Momento de Inércia	54
7.1	Matriz de Co-ocorrência	61
7.2	Exemplo de Imagem e sua Matriz de Co-ocorrência	63
8.1	Correlação entre peso corporal e a vida total dos filhotes de ratos.	70
8.2	Correlação entre o logaritmo do peso corporal e a idade dos ratos.	70
8.3	Correlação entre peso cardíaco e a idade total dos filhotes de ratos.	71
8.4	Correlação entre o logaritmo do peso corporal e a idade dos ratos.	71
8.5	Número de Mitoses dos Cardiomiócitos.	75
8.6	Área dos Núcleos.	75
8.7	Candidatos à Maior Corda.	76
8.8	Comprimento da Maior Corda.	76
8.9	Luminância Máxima dos Núcleos.	77
8.10	Coefficiente de Variação (CV) da Matriz de Co-ocorrência dos Núcleos.	78
8.11	Momento Diagonal da Imagem dos Núcleos.	79
8.12	Segundo Momento Diagonal da Imagem dos Núcleos.	79
8.13	Contraste da Imagem dos Núcleos.	80
8.14	Momento do Produto da Imagem dos Núcleos.	80
8.15	Soma dos Quadrados (Variância) da Imagem dos Núcleos.	81
8.16	Momento Inverso da Diferença da Imagem dos Núcleos.	81
8.17	Média das Somas da Imagem dos Núcleos.	82

8.18	Inércia da Imagem dos Núcleos.	83
8.19	Homogeneidade Local da Imagem dos Núcleos.	83
8.20	Proeminência dos Agrupamentos da Imagem dos Núcleos.	84
8.21	Efeito das Texturas na Proeminência dos Agrupamentos da Imagem dos Núcleos.	84
8.22	Desvio-Padrão da Matriz de Co-ocorrência.	85
8.23	Tonalidade dos Agrupamentos da Imagem dos Núcleos.	86
8.24	Efeito das Texturas na Tonalidade dos Agrupamentos da Imagem dos Núcleos.	86
8.25	Entropia da Imagem dos Núcleos.	87
8.26	Efeito das Texturas na Entropia da Matriz de Co-ocorrência da Imagem dos Núcleos.	87
8.27	Segundo Momento Angular da Imagem dos Núcleos.	88
8.28	Probabilidade do pico de transição da Imagem dos Núcleos.	89
8.29	Proeminência dos Agrupamentos da Imagem Transformada.	90
8.30	Proeminência dos Agrupamentos da Imagem Transformada sem Amaciamento das Bordas dos Núcleos.	90
8.31	Efeito das Texturas na Proeminência dos Agrupamentos da Imagem Transformada.	91
8.32	Tonalidade dos Agrupamentos da Imagem Transformada.	91
8.33	Segundo Momento Diagonal da Imagem Transformada.	92
8.34	Contraste da Imagem Transformada.	93
8.35	Variância da Matriz de Co-ocorrência da Imagem Transformada.	93
8.36	Momento da Diferença Inverso da Imagem Transformada.	94
8.37	Média das Somas da Imagem Transformada.	94
8.38	Inércia da Matriz de Co-ocorrência da Imagem Transformada.	95
8.39	Homogeneidade local da Imagem Transformada.	96
8.40	Momento do Produto da Imagem Transformada.	96
8.41	Momento Horizontal (Mx) da Imagem Transformada.	97
8.42	Momento Vertical (My) da Imagem Transformada.	97
8.43	Entropia Normalizada da Matriz de Co-ocorrência da Imagem Transformada.	98
8.44	Luminância Máxima da Imagem Transformada.	99
8.45	Luminância Máxima da Imagem Transformada sem Amaciamento das Bordas dos Núcleos.	99
8.46	Efeito das Texturas na Luminância Máxima da Imagem Transformada.	100
8.47	Energia Total da Imagem Transformada.	101
8.48	Momento de Inércia Total da Imagem Transformada.	101
8.49	Energia média do setor 16 da imagem transformada.	102
8.50	Energia Média do Setor 16 da Imagem Transformada sem Amaciamento das Bordas dos Núcleos.	102
8.51	Energia do Setor 4 da Imagem Transformada.	103
8.52	Momento de inércia médio do anel 2.	104
8.53	Momento de Inércia Médio do Anel 2 da Imagem Transformada sem Amaciamento das Bordas dos Núcleos.	104
8.54	Energia do Setor 7 da Imagem Transformada.	105

Lista de Tabelas

8.1	Peso corporal dos ratos em gramas segundo tempo de desenvolvimento	69
8.2	Peso do miocárdio dos ratos em miligramas segundo tempo de desenvolvimento .	72
8.3	Variáveis derivadas da matriz de co-ocorrência	73
8.4	Variáveis com melhor desempenho	74
12.1	Características dos animais examinados	131
12.1	Características dos animais examinados (Continuação)	132
12.1	Características dos animais examinados (Continuação)	133
12.1	Características dos animais examinados (Continuação)	134
12.1	Características dos animais examinados (Continuação)	135
12.1	Características dos animais examinados (Continuação)	136
12.2	Áreas dos setores e hemi-anéis	137
12.3	Linhas divisórias dos anéis	138

Capítulo 1

Resumo

A textura nuclear pode ser avaliada por muitas abordagens. A imagem pode ser considerada como uma função matemática, e as variações da luminância entre cada ponto da imagem pode ser interpretada como frequências espaciais.

A transformada rápida de Fourier (FFT) foi utilizada para a análise da textura da cromatina em patologia. A análise de Fourier detecta eventos periódicos. Em processamento de imagens, a frequência espacial expressa o ritmo das alterações de brilho que ocorrem numa sequência de pontos. Em imagens, a distribuição das frequências avalia sua periodicidade e a sua anisotropia ou predominância direcional. Padrões regulares de textura acumulam informação textural em regiões correspondentes à frequência e direção.

O modelo biológico utilizado permitiu a análise das alterações da cromatina de cardiomiócitos durante o desenvolvimento de ratos da linhagem Wistar, entre 19 dias de vida fetal e 60 dias de vida pós-parto. O tecido micárdico foi fixado em formalina tamponada durante 24 horas a 4°C. A fim de se obter preparações citológicas, as amostras foram hidrolisadas numa solução de hidróxido de potássio por 18 horas.

Os núcleos foram corados com hematoxilina. As imagens foram adquiridas utilizando o sistema KS-300, com a resolução de 10 pixels por micrômetro. A imagem transformada de um nucleo segmentado pela FFT é o resultado da (1) textura da cromatina, e (2) do efeito das bordas do contorno nuclear. Esta última pode dificultar o estudo do espectro da cromatina. Por isso este efeito foi eliminado através do amaciamento das bordas, selecionadas por 3 erosões e

12 dilatações morfológicas. Como fundo, foi utilizado a luminância média do núcleo.

As concentrações da informação textural da imagem da cromatina nuclear corada com hematoxilina foram quantificadas. Esses parâmetros foram comparados com características biológicas (idade e atividade mitótica), avaliando-se o desempenho em discriminar os grupos de diferentes graus de desenvolvimento histológico do miocárdio.

Foi calculado para cada núcleo, a área, a maior corda, parâmetros derivados da matriz de co-ocorrência, as distribuições angulares e anulares da energia e do momento de inércia. Parâmetros derivados da matriz de co-ocorrência e da imagem transformada puderam discriminar bem os grupos etários. As imagens espacial e espectral, intimamente relacionadas entre si, forneceram parâmetros com informação textural distinta, úteis no processo classificatório. A transformada de Fourier pode ser mais uma ferramenta para a avaliação da textura nuclear.

A textura da cromatina tornou-se mais homogênea com o aumento da idade. Especificamente aos períodos espaciais entre 3,6 e 1,8 μm , o momento de inércia diminuiu rapidamente com a idade. As entropias da matriz de co-ocorrência e o perfil das imagens transformadas tornaram-se menores, refletindo então a diferenciação celular progressiva dos cardiomiócitos.

Em resumo, o espectro de Fourier (após o amaciamento das bordas) é capaz de fornecer informações úteis sobre a textura da cromatina, como demonstrado para as alterações nucleares durante o desenvolvimento do coração do rato.

Capítulo 2

Introdução

Foi demonstrado anteriormente, que a análise de sub-estruturas nucleares pode ser muito útil para a caracterização do crescimento fisiológico e patológico (GILBERTI et al., 1995, GROTTTO et al., 1991, GROTTTO et al., 1993, IRAZUSTA et al., 1998, LORAND-METZE & METZE, 1996, LORAND-METZE et al., 1998, CIA et al., 1999, METZE & LORAND-METZE, 1991, METZE & LORAND-METZE, 1992, METZE & LORAND-METZE, 1993, METZE & LORAND-METZE, 1999, METZE & TREVISAN, 1999). Como as alterações fisiológicas e fisiopatológicas do metabolismo celular influem diretamente a organização da cromatina, o estudo da textura nuclear tornou-se cada vez mais importante para a histopatologia e citologia (DIAZ et al., 1997). A gradação nuclear clássica é ainda considerada como um dos principais critérios diagnósticos de muitos tipos de tumores (GIMENEZ-MAS et al., 1995). Tradicionalmente analisam-se as características geométricas da imagem nuclear, tais como diâmetro, área nuclear e nucleolar, e eventualmente AgNORs.

2.1 A importância da análise das texturas

Trabalhos recentes porém, demonstraram a extrema complexidade e variabilidade da textura nuclear ou nucleolar (ou dos seus subcomponentes) (EINSTEIN et al., 1998), o que leva a uma reflexão sobre a questão, se os meios tradicionais de análise morfológica quantitativa, acima citados, ainda seriam adequados e suficientes para o estudo de estruturas de alta com-

plexidade. Pode-se chegar à conclusão, que os meios tradicionais da morfometria deveriam ser complementados por novas maneiras de análise quantitativa, baseada em morfologia matemática. Por isso foi necessário procurar de maneira interdisciplinar (em conjunto com o grupo do Prof. Dr. Neucimar J. Leite, Instituto de Computação da UNICAMP) parâmetros baseados na imagem nuclear com o intuito de aplicá-los em modelos biológicos conhecidos, como por exemplo no modelo das modificações das estruturas do núcleo durante o desenvolvimento do miocárdio.

Os parâmetros da análise de imagem podem ser usados com a vantagem de se estimar pequenas mudanças na substância celular que não são óbvias ao olho humano, ou são invisíveis, ou são difíceis de incluir numa descrição qualitativa. Há estruturas vistas na microscopia óptica e eletrônica que não poderiam ser rapidamente classificadas pelo uso de parâmetros simples como comprimento, área e circunferência, especialmente se sua aparência geral puder ser descrita através de características texturais. Os recursos disponíveis em programas comerciais (por exemplo, KS-300) restringem-se a parâmetros morfométricos elementares, tais como diâmetro, área, perímetro, que por se ajudam objetivar , porém, não conseguem “medir” conjuntos morfológicos mais complexos, como, por exemplo, a textura de núcleos.

2.2 A textura de um núcleo celular

Considerando que uma imagem digital de um núcleo é composta por pixels com graus de cinza formando um padrão, a textura nuclear depende da relação espacial de cada pixel com os pixels vizinhos (THUNNISSEN & DIEGENBACH, 1986). Assim, as medidas de textura são propriedades estatísticas locais de uma imagem.

A textura é uma característica que descreve a aparência genérica de parte de uma imagem, e é freqüentemente expressa como aparência macia, arenosa, regular, lineada, grossa, granular, etc. Matematicamente, a textura pode ser descrita em termos da ocorrência de regularidades pequenas e locais (HARALICK et al., 1973). O conjunto de parâmetros descritores destas regularidades são usadas na análise de textura de imagens, cada uma com sua vantagem própria (THUNNISSEN & DIEGENBACH, 1986). A textura é uma proprie-

dade que expressa a distribuição e a inter-relação espacial entre os vários graus de cinza que compõem um objeto (STEPHENSON, 1992, CASTLEMAN, 1979). Muitos descritores de textura foram usados em estudos citológicos para a análise da distribuição nuclear da cromatina (MARCHEVSKY & BARTELS, 1994).

Características texturais são, portanto, parâmetros que podem ser calculados a partir da textura de uma imagem armazenada na memória de um computador. Essas ferramentas já foram comprovadas como úteis na quantificação de substâncias celulares e conteúdo de DNA nuclear (THUNNISSEN & DIEGENBACH, 1986). Com o advento da análise de imagem digital, novos caminhos foram abertos para abordar esse assunto (SPINA et al., 1992). Como a textura da cromatina dos núcleos está relacionada com a função celular, vários parâmetros foram usados com sucesso em núcleos fixados e corados para distinguir células entre si (ROZYCKA et al., 1988). Pode-se citar, por exemplo, as técnicas para se calcular heterogeneidade, *run-lengths*, condensação, marginação, contraste, *coarseness* e índice de gradiente de contraste (SPINA et al., 1992). O tamanho, a forma e a textura dos núcleos são de fundamental importância na avaliação citológica de malignidade.

2.3 A necessidade de critérios objetivos

Contudo, a interpretação destas características é propensa a considerável variação subjetiva entre os patologistas (MARCHEVSKY & BARTELS, 1994). As características nucleares favorecendo malignidade incluem cromatina hipercromática, irregularmente distribuída, grosseira, com marginação da cromatina e clareamento da paracromatina, com membrana nuclear irregular e angulada, e nucléolos grandes, múltiplos e irregulares. Numerosos estudos demonstraram a habilidade das análises da imagem nuclear para discriminar acuradamente entre células benignas e malignas (MARCHEVSKY & BARTELS, 1994). A avaliação da distribuição da cromatina ou textura do núcleo se impõe como um desafio para o patologista. Em geral, alguém pode referir-se à cromatina nuclear descrevendo se ela é uniformemente dispersa ou agrupada de maneira fina ou grosseira (MARCHEVSKY & BARTELS, 1994).

Alguns simplificam o conceito de textura nuclear, denominando as áreas escuras como cromatina e as áreas claras como paracromatina. Na realidade, existem sutis variações na estrutura nuclear correspondendo a alterações graduais na distribuição espacial da cromatina, incluindo o aparecimento de cromocentros densos focalmente, e de um ou mais nucléolos. Muitas abordagens foram desenvolvidas para quantificar a textura em imagens digitais, incluindo estatística simples, estatística markoviana (PRESSMAN, 1976), análise de gradientes, análise granulométrica, transformada de Fourier e análise fractal (THUNNISSEN & DIEGENBACH, 1986). Perante esta problemática foram procurados e implantados parâmetros novos, tais como entropia, parâmetros de simetria (do contorno e da superfície) e a aplicação da teoria dos grafos (Wanderley, tese de mestrado UNICAMP 2000).

2.4 A imagem como função matemática

Uma alternativa elegante para avaliar texturas é aquela em que se examina a composição da imagem como somas de senos e cossenos. Uma das primeiras tentativas nesse sentido foi a utilização da transformada de Fourier. Em 1808, Joseph Fourier propôs à academia de ciências de Paris que toda curva irregular poderia ser considerada como uma soma de funções periódicas. Já em 1809, Gauss, estudando as propriedades desta transformação, criou um algoritmo capaz de calculá-la exatamente e com maior desempenho, numa época em que não havia sequer calculadoras. Este algoritmo foi utilizado num computador pela primeira vez por Cooley (PRESS et al., 1992) apenas em 1969, em um programa escrito em FORTRAN. Assim, a análise espectral tornou-se prática com o uso da transformada rápida de Fourier (FFT). Análises no padrão de difração produzidos por sistemas ópticos coerentes, utilizando laser, podem agora ser feitas pelo computador com alta acurácia e flexibilidade (GONZALEZ & WINTZ, 1987).

As transformadas de Fourier já foram usadas em diversas áreas tais como cristalografia e teoria da comunicação, realizando, respectivamente, análise de estruturas tridimensionais e compressão de dados. Mais recentemente, as transformadas de Fourier foram empregadas para a identificação e classificação de pinturas, baseado na observação de que características particulares

de uma pintura podem ser mais facilmente retiradas se o espectro bidimensional for examinado, melhor que a pintura original (MILES & JAGGARD, 1981).

2.5 Freqüências espaciais

A análise de Fourier transforma imagens do domínio espacial para o domínio de freqüência (ROZYCKA et al., 1988). Geralmente se supõe que a freqüência é a medida da repetição de algum evento periódico. Em processamento de imagem, a freqüência espacial é a medida que expressa o ritmo das alterações de brilho (graus de cinza, geralmente entre 0 a 255) que ocorrem numa seqüência de pontos (JAMES, 1987). Altas freqüências espaciais correspondem a detalhes de brilho que variam rapidamente. Baixas freqüências espaciais representam variações lentas do brilho. A distribuição das freqüências representa a periodicidade da imagem e as interferências direcionais. As características de textura de Fourier podem ser calculadas a partir das distribuições das freqüências em diferentes regiões do espaço transformado (MARCHEVSKY & BARTELS, 1994).

Pode-se representar qualquer função em termos de uma soma de ondas senóides. Por exemplo, uma onda quadrada (figura 2.1) pode ser considerada como sendo constituída por ondas senóides de freqüência ímpar: $1f+3f+5f+\dots$ (onde f é a freqüência da onda quadrada).

Observando-se como se estrutura a imagem transformada (figura 2.2), notamos quatro quadrantes. Cada quadrante é idêntico ao seu oposto, isto é, há uma simetria em relação ao centro. Isso significa que metade da imagem é redundante. À medida em que um ponto no domínio espectral se distancia da origem, ele passa a representar freqüências cada vez maiores, de acordo com o tamanho da matriz:

Freqüência espacial:

$$f = d/L \quad (2.1)$$

Período espacial:

$$T = L/d \quad (2.2)$$

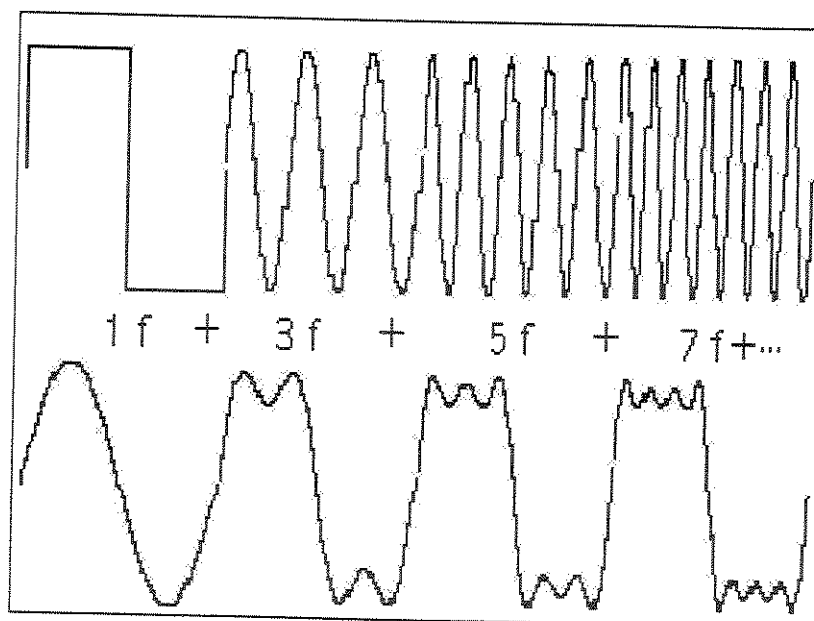


Figura 2.1: Obtenção de uma onda quadrada a partir da soma de senos.

sendo L = tamanho do lado da matriz quadrada, $d^2 = u^2 + v^2$.

Embora haja exceções, parece haver uma tácita impressão de que muitos objetos biológicos são insuficientemente regulares para fornecer parâmetros úteis através da transformada de Fourier. Isto é devido talvez pela regularidade exibida por certos objetos, tais como cristais, que têm sido rotineiramente classificados através da análise espectral. No interesse de mudar essa impressão e de sugerir um uso de maior valor diagnóstico, queremos propor novas técnicas de se examinar o domínio espectral, aplicadas à identificação do grau de desenvolvimento de cardiomiócitos de ratos.

Já foram relatados estudos diagnósticos utilizando transformadas de Fourier por vários grupos (GONZALEZ & WINTZ, 1987, MILES & JAGGARD, 1981, ROZYCKA et al., 1988, KUO et al., 1988, KOPP et al., 1976, GUERIN et al., 1986, OSTROWSKI et al., 1983, DZIEDZIC-GOCLAWSKA et al., 1982, MILES & JAGGARD, 1980, PERNICK et al., 1978b, WOHLERS et al., 1978, PERNICK et al., 1978b, TUERKE et al., 1978). Foram examinados parâmetros do domínio espectral de células benignas e malignas nos trabalhos em esfregaços do colo de útero tipicamente corados pela técnica de Papanicolaou, e células de cultura de tecidos corados pela técnica

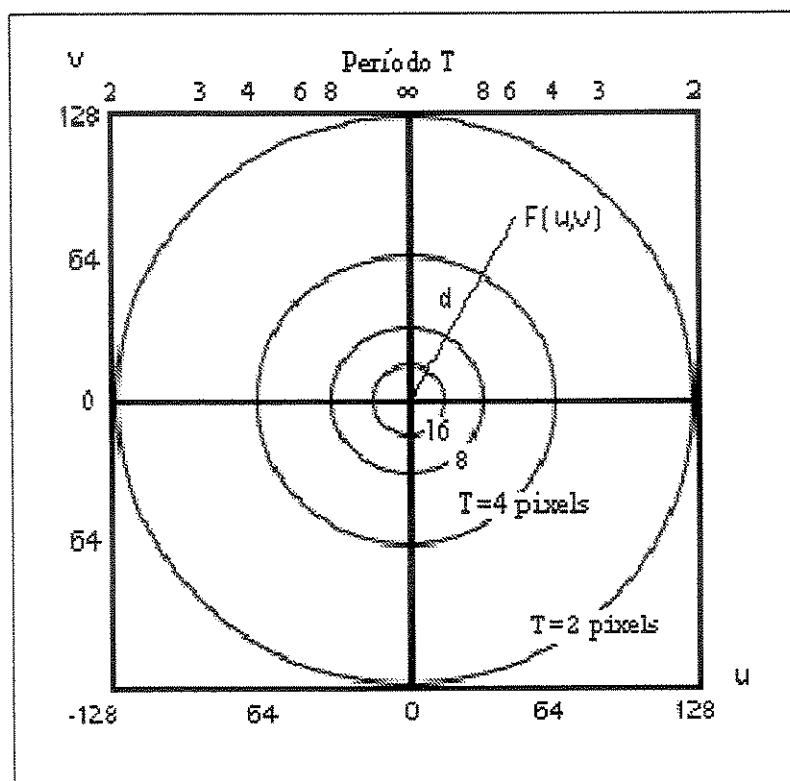


Figura 2.2: Estrutura da imagem transformada.

de Feulgen. Contudo, os parâmetros pertinentes retirados da transformada bidimensional para a avaliação do pleomorfismo, tamanho e condensação da cromatina já foram estudados, com resultados encorajadores (GONZALEZ & WINTZ, 1987, KUO et al., 1988).

Há ainda falta de padronização dos parâmetros retirados das transformadas de Fourier, e até mesmo controvérsia no modo de definir e calcular certos parâmetros, tais como o momento de inércia, a energia e a entropia relativa (VEENLAND et al., 1998). Pode-se observar que não houve a preocupação de se realizar estudos detalhados da imagem transformada. Dois trabalhos publicados, que utilizaram a análise de Fourier em imagens de células, utilizaram parâmetros pouco expressivos. Houve categorizações grosseiras para se estudar a distribuição da energia da imagem (entenda-se energia (PERNICK et al., 1978b) como o quadrado do módulo de cada ponto do espaço espectral, ou $|F(u,v)|^2$), dividindo-se a imagem em setores e anéis. Padrões regulares de textura produzem concentrações de energia em regiões correspondentes à frequência e direção. A distribuição da energia pode ser estudada com algoritmos que estudam

a forma e tamanho de picos. Propõe-se aqui, classificar e quantificar as regiões que concentram informação da textura da imagem, com o propósito de se utilizar a análise de Fourier como mais uma ferramenta objetiva para auxílio do patologista.

2.6 Desenvolvimento das tarefas experimentais

Neste relatório constam as avaliações de muitas variáveis que foram calculadas para cada uma das imagens adquiridas. É a parte mais emocionante do estudo, devido à geração de grande quantidade de variáveis e de dados, com avaliação dos métodos empregados. A exploração das imagens transformadas está empregando três terminais da rede do Laboratório de Sistemas de Informação do Instituto de Computação da UNICAMP, a maioria das vezes operando *overnight*.

2.7 O modelo biológico utilizado

As alterações fisiológicas e patológicas do metabolismo celular provocam alterações na estrutura e composição da cromatina nuclear. Além disso, a textura da imagem nuclear apresenta uma extrema complexidade, cuja quantificação por parâmetros morfológicos tradicionais vem ajudando a discriminar esses processos com pouca vantagem. A transformação da imagem nuclear pelo algoritmo FFT (*Fast Fourier Transform*) pode fornecer informações adicionais da textura nuclear.

2.8 O Desenvolvimento dos Cardiomiócitos

O estudo da textura nuclear a partir de cardiomiócitos é um modelo bem conhecido e aplicado (BAI et al., 1990, BAKER et al., 1993, BRODSKY et al., 1985, CLUBB & BISHOP, 1984, HIRAKOV et al., 1980, STOTSEMBURG, 1915, KNAAPEN et al., 1996, LI et al., 1996, BARR, 1973, MATTFELDT & MALL, 1987, PISSAIA et al., 1980). Através da metodologia aplicada, obtém-se a idade gestacional dos ratos com um erro máximo de 6 horas. O momento exato da fertilização das fêmeas ocorreu

entre 19 horas do dia anterior e 7 horas do mesmo dia da verificação da fertilização. Isto fornece um horário médio em torno da 1 hora da manhã, tendo em vista a atividade noturna predominante desses animais (DONELLY, 1987). Portanto, por meio dessa abordagem pode-se construir um gráfico, tendo-se como ordenada o tempo de desenvolvimento, e como abscissa qualquer um dos parâmetros constitucionais dos animais (vide figuras 8.1, 8.3, 8.2 e 8.4) ou parâmetros morfométricos e texturais obtidos das imagens dos núcleos.

Assim, a variável independente 'idade total', que compreende a duração da gestação e a duração da vida pós-parto (se houver), é um parâmetro de referência para a avaliação de parâmetros morfológicos dos núcleos. Esses mesmos parâmetros poderão ser utilizados na avaliação da anaplasia nuclear de tumores humanos. Entretanto, um estudo exploratório com tumores humanos é muito mais complexo, porque dentro do mesmo grupo de neoplasias histologicamente semelhantes se encontram tumores com diferentes estágios de evolução, com diferentes comportamentos biológicos (por exemplo, diferentes requerimentos nutricionais, diferentes respostas imunes do hospedeiro, diferentes capacidades de metastatização, de invasão tecidual, de produção de fatores de crescimento para vasos, estroma, etc.). Além disso, acrescenta-se a dificuldade de padronização dos procedimentos cirúrgicos e das técnicas de fixação e processamento histológico, com diferentes intervalos entre a retirada do tumor e o início da fixação, e com duração de fixação muito variável, às vezes não informada, só para citar algumas dificuldades. Portanto, um estudo exploratório em condições experimentais controladas pode selecionar parâmetros cujos comportamentos estatísticos sejam mais adequados para descrever os graus de anaplasia nuclear e da atividade transcricional e mitótica dos núcleos. Tais informações, associadas com dados de sobrevida, metastatização e recidiva tumoral, podem ser utilizadas na decisão diagnóstica, influenciando na opção terapêutica.

É importante ressaltar que o tecido miocárdico, por possuir células altamente especializadas para exercer sua função contrátil, sofre dramáticas alterações morfológicas durante o seu desenvolvimento. No período embrionário os cardiomiócitos são pouco diferenciados, muito semelhantes a outras células mesenquimais.

Durante os períodos embrionário e fetal, e mesmo após quatro dias após o nascimento, o crescimento do miocárdio decorre da divisão das células. De 4 a 14 dias de desenvolvimento pós-natal, o crescimento normal do miocárdio se efetua tanto com divisão celular - aumentando o número de células - como aumentando o tamanho de cada célula (CLUBB & BISHOP, 1984, BUGAISKY & ZAK, 1979, BRODSKY et al., 1985). Imediatamente após o nascimento, o índice mitótico cai precipitadamente, e se estima que a perda da capacidade de divisão celular se perca ao redor de 21 dias pós-parto em ratos, mas não irreversivelmente, como foi demonstrado em condições patológicas que produzem hipertrofia miocárdica (BUGAISKY & ZAK, 1979).

Até o nascimento, virtualmente todas as células miocárdicas do rato contêm apenas um núcleo. Ao redor de 21 dias de vida pós-parto, cerca de 55% dos cardiomiócitos são binucleados, chegando a ser 94% no rato adulto (BUGAISKY & ZAK, 1979). Nesta fase do desenvolvimento, os núcleos se tornaram muito alongados, com cromatina homogênea, exibindo dois ou três nucléolos.

Como foi ilustrado nas figura 8.2, é surpreendente observar que o peso corporal sofra duplicações em poucos dias, apresentando um padrão de crescimento exponencial, e o peso cardíaco aumenta aproximadamente em proporção direta à idade, crescimento que persiste ainda com 60 dias de vida pós-parto (vide figura 8.4). Tal ritmo de crescimento ultrapassa até mesmo as neoplasias mais agressivas, como o linfoma de Burkitt, que chega a duplicar a massa tumoral em uma semana (ROBBINS, 1994).

Capítulo 3

Objetivos

3.1 Objetivos

3.1.1 Objetivos Gerais

A) Elaborar um programa para determinar as características da transformada de Fourier de imagens digitalizadas.

B) Escolher parâmetros contínuos derivados do espectro de Fourier caracterizando imagens digitalizadas.

C) Demonstrar a utilidade biológica destes parâmetros no exemplo da textura da cromatina em cardiomiócitos, relacionando a idade com o desenvolvimento.

3.1.2 Objetivos Específicos

A) - Adaptar as técnicas, descritas na literatura, para descrição da textura da cromatina em microscopia óptica.

B) - Levantar os principais parâmetros que descrevem as transformadas de Fourier, citados nas referências bibliográficas.

C) - Avaliar a eficiência das técnicas da análise espectral em estimar o grau de desenvolvimento do miocárdio de ratos.

D) - Demonstrar as diferenças morfológicas em microscopia óptica dos núcleos de cardiomiócitos de ratos de diferentes estágios de desenvolvimento pré e pós-natal, com ênfase no domínio espectral, caracterizando-as, qualitativamente e quantitativamente, através das carac-

terísticas de Fourier.

3.2 Hipóteses

H_0 : A análise espectral da imagem não fornece critérios adicionais que possam estimar o grau de desenvolvimento dos cardiomiócitos de ratos.

H_1 : As características da transformada de Fourier podem ser utilizadas para estimar o grau de desenvolvimento dos cardiomiócitos.

Capítulo 4

Material e Métodos

4.1 Animais de laboratório

Os animais utilizados neste trabalho foram machos e 21 fêmeas de *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, heterogêneos, com idades entre 7 a 13 semanas, com idade no dia da fertilização de $72,67 \pm 10,07$ dias (média $\pm$ desvio padrão). As fêmeas, com peso variando entre 194 a 280g ($246,9 \pm 26,2$ g)e os machos, de 250 a 300g. Os animais foram fornecidos pelo Centro Multi-Institucional de Biotérios (CEMIB), da UNICAMP.

Os ratos foram mantidos no biotério do laboratório do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE) da UNICAMP, em condições ambientais convencionais, com controle de 12 horas-luz e 12 horas-escuro. O tempo de adaptação ao biotério é estabelecido em 30 dias e não há controle de temperatura e umidade do ar.

Os animais foram alimentados com ração para ratos, obtida comercialmente (Labina, Purina) e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados entre os meses de fevereiro a junho de 2000, e para se evitar a influência da variação diária sobre a síntese de DNA (BARR, 1973), todos os animais foram sacrificados entre 15:00 e 19:00 horas.

Para o cruzamento, foi realizada a sincronização dos ciclos estrais das fêmeas de uma mesma gaiola, tratando-as com urina dos machos, dois dias antes do acasalamento. O acasalamento foi feito pelo sistema de harém, com um macho e duas a três fêmeas em cada gaiola. A ovulação, assim como o comportamento da aceitação durante o acasalamento com o macho, ocorrem no período do estro que, normalmente, acontece nos primeiras horas do dia,

coincidindo com o comportamento noturno do animal (DONELLY, 1987).

Os animais foram acasalados uma a duas horas antes do final do período de 12 horas-luz (no final da tarde). Na manhã do dia seguinte (2 a 3 horas após o fim do término do período de 12 horas-escuro), foram realizados os esfregaços vaginais das fêmeas e observada a presença ou não de espermatozóides (BACKER, 1979). Para as fêmeas em que se encontraram espermatozóides, este dia foi, então, considerado o dia zero, para fins de contagem do tempo de gestação e desenvolvimento embrionário (THEILER, 1972).

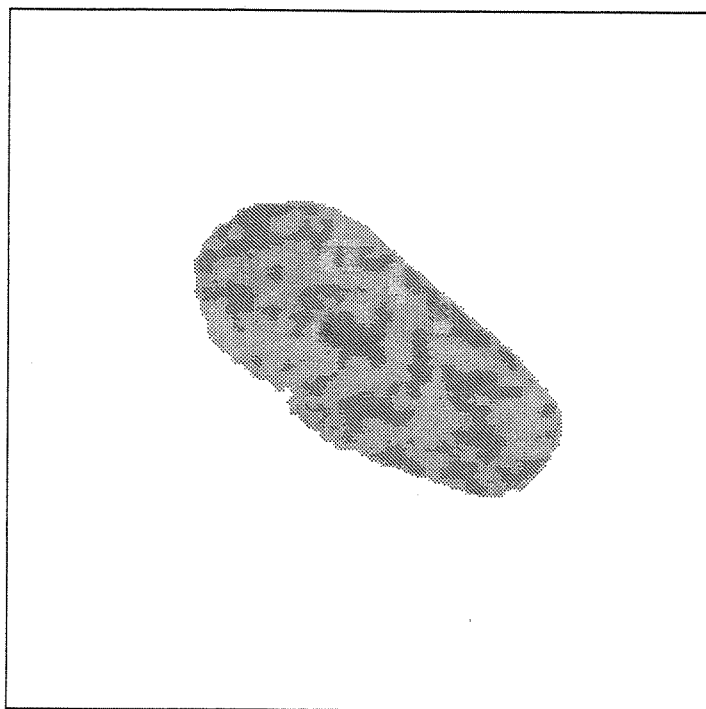


Figura 4.1: Núcleo segmentado.

As ratas grávidas foram, por sua vez, separadas em gaiolas datadas e etiquetadas. Os animais que completaram as idades estipuladas para estudo foram sendo sacrificados, correspondendo aos dias 13, 16, 19 e 21 de vida intra-uterina e nos dias 1, 5, 8, 21 e 60 de vida após o nascimento. Usamos para o experimento pelo menos duas ninhadas para cada estágio de crescimento, perfazendo um total de 176 animais, distribuídos em 21 ninhadas com 6 a 13

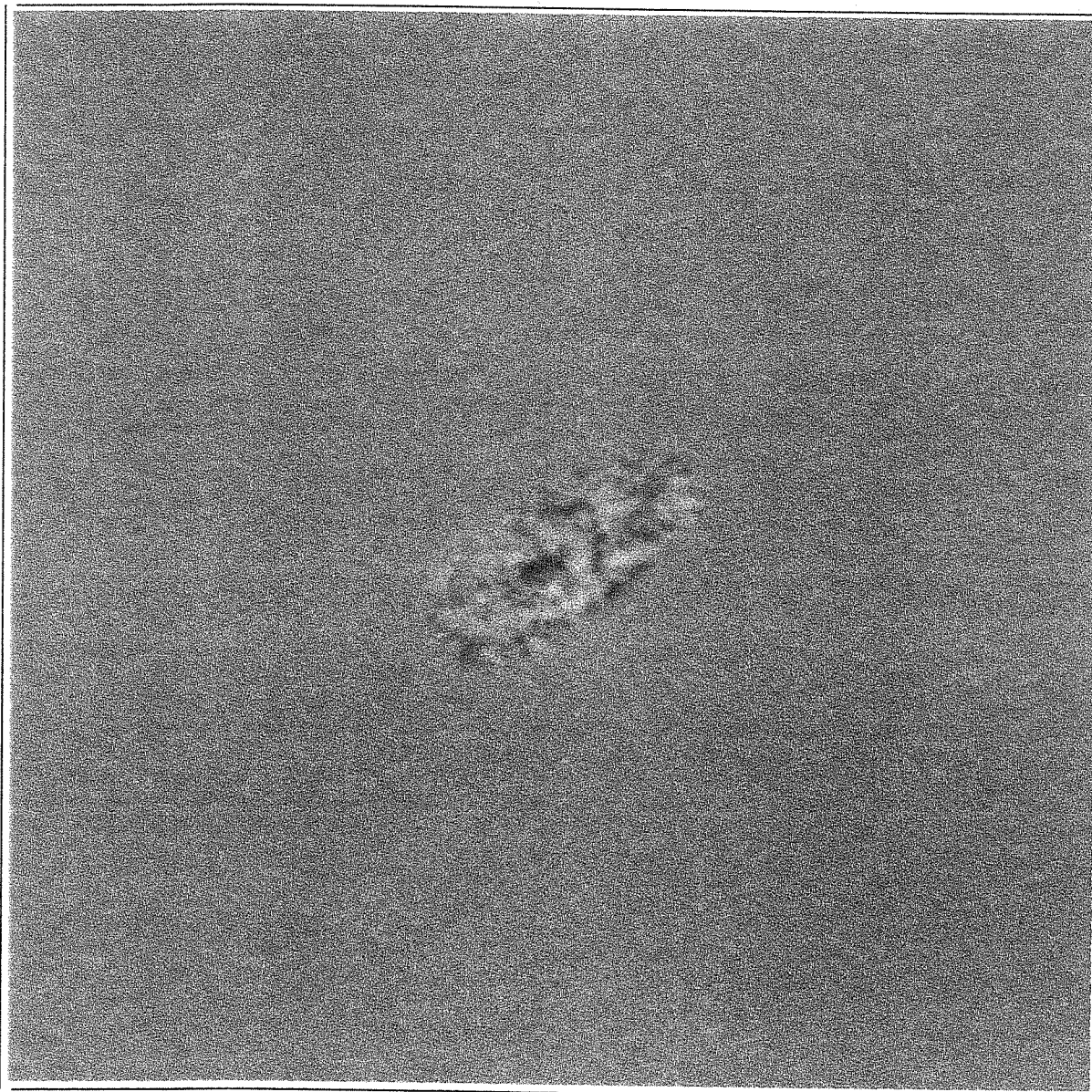


Figura 4.2: Amaciamento das bordas do núcleo e colocação de fundo cinza.

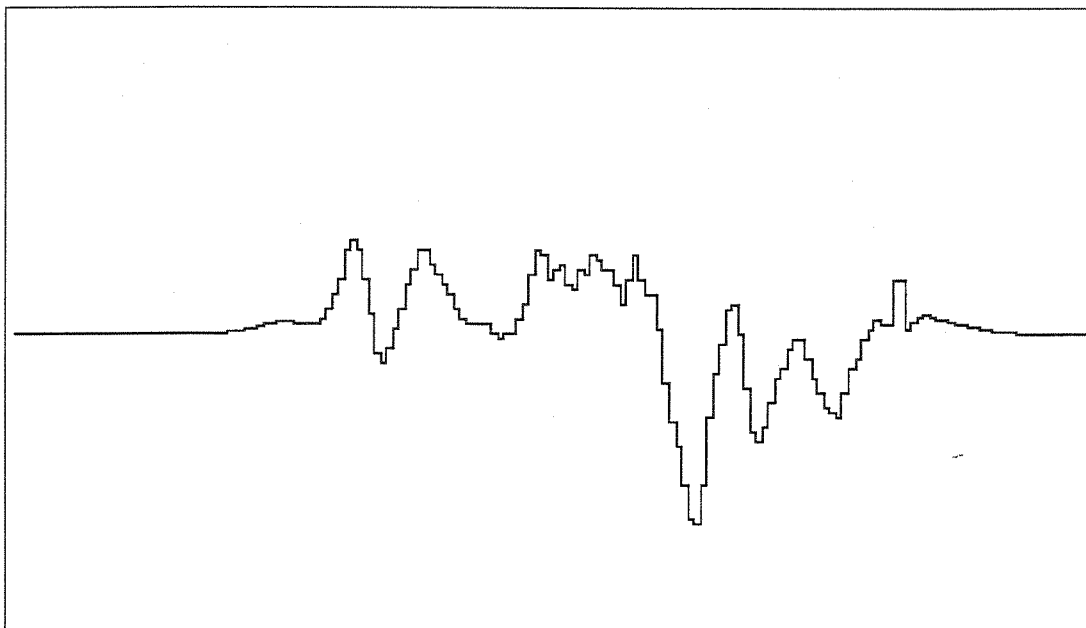


Figura 4.3: Intensidades de cinza através de um núcleo: efeito do amaciamento nas bordas do núcleo.

filhotes cada uma (vide tabelas 8.1, 8.2 e 12.1). As ninhadas com menos de 6 filhotes foram excluídas, devido às alterações demonstradas nas taxas de crescimento e no número total dos cardiomiócitos, causadas possivelmente pela maior quantidade de nutrientes disponíveis para tais filhotes (RAKUSAN et al., 1978).

4.2 Preparação

Os animais que atingiram uma das idades estipuladas foram pesados e anestesiados com uma injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (Hypnol(R)) 50 mg/kg (solução de 5 mg/ml) e xilazina (Rompun(R)) 10mg/kg (solução de 10mg/ml), pesados e sacrificados por perfusão intraventricular esquerda com solução de cloreto de sódio 0,9% durante 2 a 3 minutos, com drenagem sangüínea através de uma incisão na veia cava inferior abaixo da confluência com as veias renais. Imediatamente a seguir, a perfusão continuou com formalina 10% - tampão fosfato 57,6 mM pH 7,2 durante 10 minutos. Somente então é extraído o miocárdio (RAKUSAN et al., 1978) de cada rato e fixado em formalina tamponada a 4°C durante no máximo 24 horas.

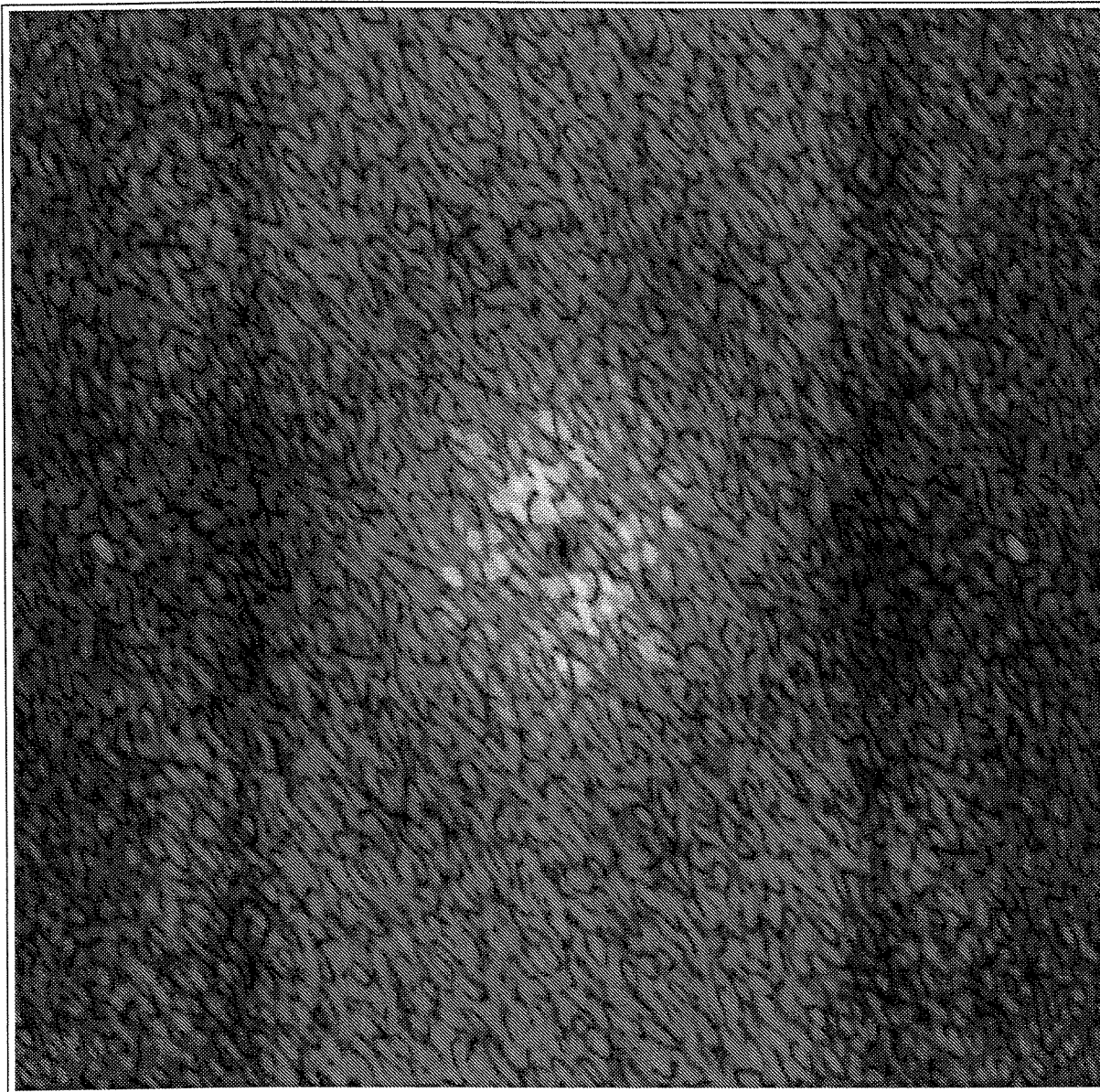


Figura 4.4: Forma logarítmica do momento de inércia do espectro de Fourier. Note a área central (de baixa frequência) com picos de maior energia. As linhas escuras verticais são provavelmente um filtro passa-baixa horizontal que foi realizado pelo sistema de aquisição de imagens.

No caso dos ratos em desenvolvimento fetal, a perfusão acima descrita da circulação sanguínea da mãe não irrigava as circulações dos fetos. Foi necessária a abertura da cavidade peritoneal, pleural e pericárdica dos mesmos para fixação por difusão simples pela formalina tamponada gelada. O miocárdio não foi extraído dos diminutos corações dos embriões de 13 e de 16 dias de gestação, sendo incluído todo o organismo para processamento histológico, a fim de que, nestes estágios de desenvolvimento, além de se obter o estudo *in loco* do coração em desenvolvimento, seja determinado o sexo através do estudo da histologia gonadal.

Foram sacrificadas 21 ninhadas, totalizando 180 filhotes. Duas ninhadas com menos de 6 filhotes foram excluídas a ninhada 5, com 3 filhotes, e a ninhada 8, com 1 filhote. Dos 176 filhotes que restaram, 35 são embriões de 13 ou 16 dias de gestação, que são muito pequenos para a dissecação do coração, sendo portanto processados os organismos inteiros dos embriões.

Os demais 141 filhotes foram dissecados para a obtenção do coração para a pesagem e processamento cito e histológico. Foram confeccionadas 141 lâminas com esfregaços citológicos, dos quais 90 foram submetidas à aquisição de imagens, totalizando 9000 imagens adquiridas e segmentadas.

Os corações foram pesados, e seccionados transversalmente. Pelo menos uma fatia de 1 a 2 mm de espessura foi designada para o processamento histológico, que consistiu em desidratação em uma série de álcoois de concentração crescente (70%, 90% e 3 absolutos) durante 1 hora cada, e diafanização em 2 banhos de 1 hora em xilol, em temperatura de laboratório. Em seguida, foram realizados 2 banhos de parafina a 60°C de 1 hora, e emblocados com identificação. Os cortes de aproximadamente 4 a 5 μ m foram hidratados e corados em hematoxilina durante 60 segundos. Os cortes corados foram passados rapidamente em uma solução de hidróxido de amônio a 1% para a oxidação da hematoxilina em hemateína, a seguir desidratados e cobertos com lamínula.

Foram coradas todas as lâminas de todos os miocárdios no mesmo dia, para se evitar alterações com relação à qualidade dos reagentes e corantes, tentando minimizar a variação da duração da coloração de cada lâmina, o tempo de exposição das lâminas coradas à luz, e a idade

das lâminas.

foram realizados os cortes histológicos dos miocárdios dos 176 filhotes. Os cortes histológicos dos embriões de 13 ou 16 dias de gestação necessitam de cortes seriados ao nível do tórax, a fim de se avaliar o grau de desenvolvimento embriológico e de se obter mais cortes com tecido miocárdico, que é bem mais exíguo que os dos ratos das demais idades. Para os embriões de 13 dias de gestação, os cortes de 5 μm foram espaçados 175 μm entre si, e para embriões de 16 dias de gestação, os cortes de 5 μm foram espaçados 225 μm entre si.

4.3 Processamento citológico

O ápice cardíaco foi submetido à ação de uma solução 10:3 (ml/g) de álcool 50% e hidróxido de potássio a 4°C (com pH em torno de 11,5) durante 15 a 26 horas. Dependendo da quantidade disponível de miocárdio, fragmentos de ventrículo direito e ventrículo esquerdo também foram submetidos a esse processo, separadamente. Os fragmentos foram lavados a seguir com três banhos de 5 minutos com solução 7:3 (v/v) de álcool absoluto e tampão fosfato 192 mM pH 7,2. O material hidrolisado apresenta então aspecto gelatinoso, que é facilmente distribuído numa lâmina com o auxílio de outra, comprimindo o material e deslizando-as entre si. Imediatamente a seguir, com o cuidado de não ocorrer secamento do material, a lâmina é pós-fixada em álcool 70% durante pelo menos 5 minutos, e é submetida à coloração pela hematoxilina da mesma maneira descrita para os cortes de parafina.

4.4 Principais alterações metodológicas

Houve alterações da metodologia que merecem um comentário, principalmente relacionadas à preparação dos tecidos para a microscopia:

4.4.1 Retirada da eosina

Com o objetivo de se estudar exclusivamente a textura nuclear, foi utilizado apenas a hematoxilina como corante, tendo em vista que a eosina cora principalmente as estruturas

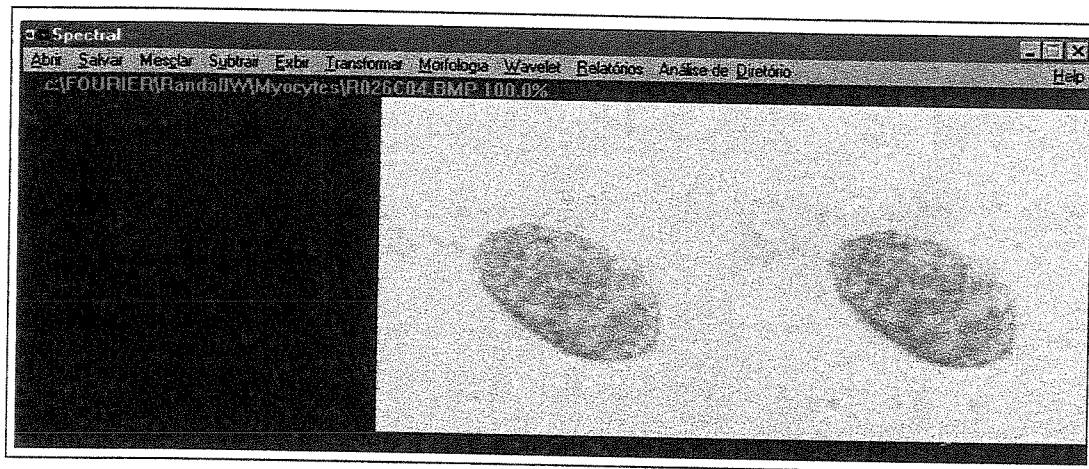


Figura 4.5: Janela principal do software elaborado.

citoplasmáticas, que no caso dos cardiomiócitos, apresentam um bandejamento transversal, característico das miofibrilas. Esta estriação transversal pode se superpor à imagem nuclear, causando uma falsa ritmicidade que é prontamente detectável pela transformada de Fourier. Portanto, a não-utilização da eosina foi recomendada, deixando a hematoxilina descrever apenas as imagens nucleares.

4.4.2 Utilização de hidróxido de amônio

Os cortes corados pela hematoxilina foram rapidamente passados por uma solução de hidróxido de amônio 1%, que provoca a oxidação da hematoxilina em hemateína, que é uma substância insolúvel, e menos propensa à lavagem nas etapas seguintes, bem como maior estabilidade à ação da luz.

4.4.3 O estudo citológico

Com o intuito de se estudar o efeito do corte histológico na textura nuclear, foi sugerido uma correlação cito-histológica. Cortes de 3 a 5 μm retiram grande parte do volume nuclear, visto que em média a espessura dos núcleos mede 8,42 μm , e o comprimento 26,64 μm em seres humanos (OLIVETTI et al., 1996). Uma vantagem do método histológico é a não superposição de outras estruturas sobre a imagem nuclear. A técnica de esfregaço citológico é atraente pelo fato de que se observa cada núcleo por inteiro, mas pode ocorrer a superposição

da imagem nuclear com a do citoplasma, que pode ser minimizada pela seleção dos núcleos no momento da aquisição das imagens.

Assim, é interessante que seja estudado as alterações morfológicas dos núcleos também ao nível citológico, com a finalidade de se correlacionar os achados entre os métodos. Optou-se pela técnica da hidrólise alcalina por hidróxido de potássio devido à facilidade de obtenção e baixo custo, comparado com a técnica utilizando metaloproteinases. A hidrólise com hidróxido de potássio causa a saponificação das miofibrilas, e não interfere no conteúdo de DNA, já demonstrado num estudo com citometria de fluxo (SCHNEIDER & PFITZER, 1973).

4.5 Microscopia óptica

Foram escolhidas 100 núcleos por animal provenientes do esfregaço citológico, visualizadas através de um microscópio Zeiss, com a objetiva de 100 aumentos Achroplan de imersão a óleo, com abertura numérica de 1,25.

4.6 Aquisição das imagens

Foi utilizado o sistema KS-300 para a aquisição interativa das imagens apresentando uma resolução espacial de $0,1\mu\text{m}/\text{pixel}$, dado obtido através da digitalização de uma régua micrométrica de 1 mm. As imagens foram salvas sem compactação no formato bitmap colorido de 24 bits (extensão .BMP), com o tamanho de 256 x 256 pixels. As imagens foram adquiridas pelo mesmo operador, que adotou os seguintes critérios para a seleção dos núcleos:

a) Somente foram adquiridos núcleos com morfologia típica de cardiomiócitos, desprezando-se fibroblastos, linfócitos, mastócitos e quaisquer outras células.

b) Apenas um núcleo por imagem. Havendo outros núcleos próximos, foram deixados incompletos, nas bordas da imagem, para que o programa segmentador possa eliminá-los.

c) Núcleos sem pregas, fendas e dobramentos.

d) Núcleos sem superposição de qualquer estrutura, por exemplo, miofibrilas, fibras, bolhas, precipitação de corante e outros núcleos.

e) Não foram adquiridos células em processo de divisão, exibindo cromossomos ou fuso mitótico. Uma ressalva pode ser feita neste momento, visto que núcleos em fase de duplicação do DNA (fases S e G2) não são facilmente distinguíveis pelo operador, sendo portanto passíveis de serem adquiridos.

Cada imagem nuclear foi adquirida no melhor foco, isto é, no foco em que os contornos se apresentarem nítidos na maior parte do perímetro da carioteca.

Uma macro de comandos para aquisição das imagens do KS-300 foi elaborada para fornecer automaticamente os nomes de cada imagem, eliminando assim a possibilidade de erro nessa tarefa. O nome da imagem identifica a ninhada, o filhote, a técnica utilizada (se histológica ou citológica), e o número da imagem. Todo o processo de preparo das lâminas citológicas e aquisição das imagens foi feita em ordem aleatória, prevenindo vieses sistemáticos.

As imagens dos núcleos foram salvas diretamente em *zip-disks* para transporte, e salvados em CD's. Foram gravados, com o auxílio do Laboratório de Informática da Faculdade de Ciências Médicas (FCM - UNICAMP), e do Laboratório de Sistemas de Informação (LIS - IC - UNICAMP) 3 CD's contendo as imagens sem segmentar, e 3 CD's com imagens segmentadas correspondentes, cada CD contendo 3000 imagens.

4.7 Fontes de algoritmos

Através do site *Numerical recipes in C*: (<http://www.std.com/nr/>) foram obtidos os códigos-fontes em linguagem C do algoritmo FFT (*Fast Fourier Transform*), que realiza a transformada rápida de Fourier discreta, em diversas dimensões.

4.8 Processamento das imagens

Os arquivos assim obtidos foram abertos pelo editor gráfico, e então os núcleos foram isolados em matrizes quadradas com 256 pixels de lado, e convertidos para o formato *bitmap* escala de cinzas, de 8 bits, através do cálculo da luminância. Esta conversão para escala de cinza é descrito como “perceptivelmente uniforme” (WOUVER et al., 2000), tendo a

finalidade de simular o mesmo grau de variação de brilho da percepção visual humana em cores. Cada imagem foi submetida ao isolamento dos núcleos pela técnica de *thresholding* (GONZALEZ & WINTZ, 1987), pintando-se todo o fundo correspondente ao citoplasma e às outras células, sob visão direta do operador. O tom de cinza utilizado nesta operação é a média dos tons de cinza do núcleo estudado.

As imagens foram segmentadas através de um processo semi-interativo de *thresholding*, calculado a partir do histograma de escala de cinzas (vide figura), selecionando o vale entre a imagem do núcleo e o fundo. Foram utilizadas duas técnicas de tratamento da imagem para se realizar a segmentação:

a) A imagem foi convertida em escala de cinzas de 8 bits, através do cálculo da luminância. Esta conversão para escala de cinza é descrito como “perceptivelmente uniforme” (WOUVER et al., 2000), tendo a finalidade de simular o mesmo grau de variação de brilho da percepção visual humana em cores.

b) Uma outra opção foi converter a imagem em escala de cinzas de 8 bits, calculada a partir da soma de duas imagens: a luminância e a distância euclidiana no espaço de cores vermelho-verde-azul entre a cor de cada pixel com uma cor de referência, definível pelo usuário, geralmente uma cor que está presente nos contornos da imagem nuclear.

A primeira técnica é suficiente para segmentar a maioria das imagens nucleares. Em casos mais difíceis, quando a luminância não consegue distinguir os contornos nucleares, é utilizada a segunda técnica, que utiliza a informação de cor, além da luminância. Retoques eventuais foram necessários em algumas imagens.

A seguir, a imagem é convertida numa imagem binária preto-e-branco, e é realizada automaticamente 1) a retirada das imagens nucleares presentes nas bordas da imagem, 2) o fechamento por área dos ‘buracos’ existentes na componente conexa, menores que 1500 pixels, e 3) a abertura por área, retirando as componentes conexas menores que 3500 pixels. O resultado é uma máscara binária que representa a imagem nuclear. As imagens coloridas de 24 bits assim segmentadas, com fundo branco, foram gravadas em outro CD (vide figura 4.1).

Para preparar a imagem para ser transformada pelo FFT, a imagem é convertida em escala de cinzas através do cálculo da luminância, e o fundo branco é substituído pela luminância média do núcleo. A seguir, é realizado a supressão das descontinuidades abruptas das bordas do núcleo utilizando-se a técnica de amaciamento utilizando-se um filtro de média com vizinhança-8. A borda do núcleo, para tanto, foi selecionada através da subtração da máscara binária de 12 dilatações pela de 3 erosões.

Então a imagem está pronta para ser transformada pelo FFT (vide figura 4.2). Como a transformada de Fourier gera uma imagem onde cada pixel apresenta um componente real e um componente imaginário, é necessário que a imagem transformada seja calculada a partir ambos os componentes. Foi utilizado a representação do momento de inércia $\sqrt{u^2 + v^2}|F(u, v)|$ para a geração das imagens transformadas.

A quantidade de detalhes na imagem transformada (resolução) é proporcional ao tamanho da imagem. Assim, imediatamente antes de se realizar o cálculo da transformada, a imagem foi colocada dentro de outra, com 512x512 pixels, com o nível de cinza médio no background. Assim, a imagem do núcleo, que permanece inalterada, é processada numa matriz maior.

4.9 Análise qualitativa e quantitativa

Foram calculadas, para cada núcleo, a área, o comprimento da maior corda, a direção da maior corda, o número de candidatos à maior corda (explicados com maiores detalhes nos capítulos 6 e 7), 22 características da matriz de co-ocorrência das imagens originais e transformadas. A partir das imagens transformadas, foram calculadas ainda a energia total, o momento de inércia total, 18 distribuições angulares da energia (1 para cada setor de 10°), 18 distribuições anulares da energia, 18 distribuições angulares do momento de inércia (1 para cada setor de 10°), e 18 distribuições anulares do momento de inércia.

Para cada animal, representado por 100 imagens, foi calculada a mediana e a diferença entre o percentil 95 e o percentil 5, devido ao fato de que são parâmetros estatísticos pouco

sensíveis a dados extrapolantes (*outliers*).

4.10 A contagem das mitoses

Para cada animal, foram contadas as figuras mitóticas existentes em 400 núcleos de cardiomiócitos, nos cortes histológicos corados com hematoxilina apenas. Foi utilizado um contador de células e um microscópio óptico para a execução manual dessa tarefa. O miocárdio murino é rico em mastócitos, sendo necessário atenção para diferenciá-los de mitoses verdadeiras.

4.11 Análise estatística

4.11.1 Análise univariada

Foi utilizada o teste de Kruskal-Wallis em cada variável para verificar se houve uma diferença significativa entre grupos de amostras. Cada grupo de amostras consiste em preparações citológicas de miocárdio de ratos de mesma idade gestacional ou pós-parto.

4.11.2 Análise multivariada

A análise discriminante linear foi utilizada para selecionar qual combinação de características da imagem transformada de Fourier foi a mais eficiente no sentido de estimar o grau de desenvolvimento dos cardiomiócitos.

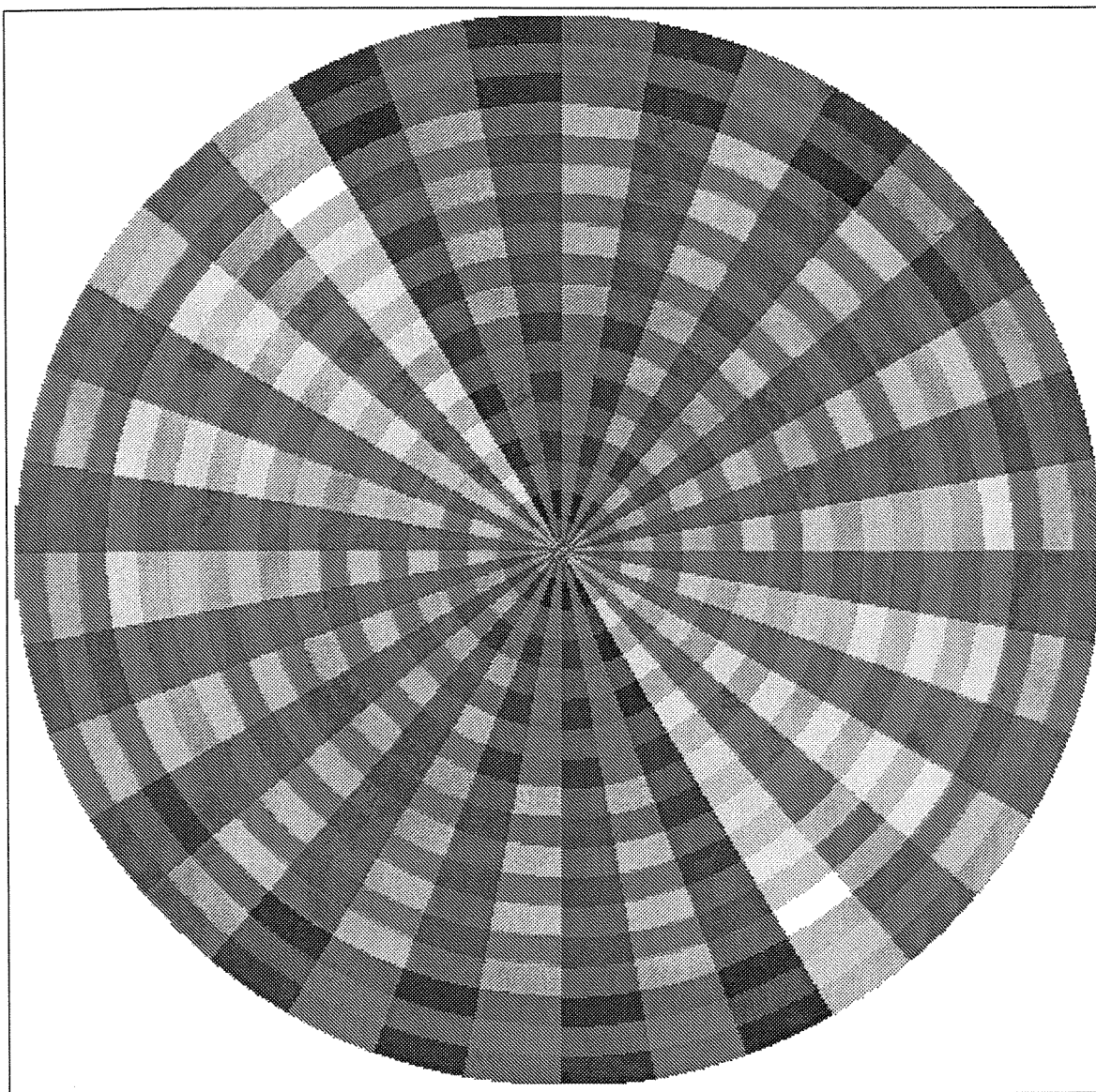


Figura 4.6: Diagrama da disposição dos anéis e setores para o estudo da distribuição das informações texturais nas imagens transformadas.

Capítulo 5

A Função Harmônica

Tentou-se aprofundar o estudo da transformada de Fourier a partir das suas propriedades. Além disso, foi desenvolvido uma argumentação teórica para justificar o uso de uma nova representação da transformada de Fourier, $\sqrt{u^2 + v^2}|F(u, v)|$, que permite facilitar a extração de informações das imagens, avaliando diretamente a amplitude das funções harmônicas da imagem no domínio espectral.

5.1 A unidade elementar da transformada

Nesta altura, é interessante definir o conceito de função harmônica, porque se tornará útil para o entendimento de algumas propriedades da imagem transformada. Neste trabalho, a partir de imagens reais, ou seja, $f(x, y) = \text{Re}\{f(x, y)\}$, foram calculadas as transformadas de Fourier $F(u, v)$, que se caracterizam por apresentarem números complexos conjugados simétricos em relação ao centro da imagem transformada:

$$F(u, v) = F^*(-u, -v) \quad (5.1)$$

ou seja

$$\text{Re}\{F(u, v)\} + \text{Im}\{F(u, v)\} = \text{Re}\{F^*(-u, -v)\} - \text{Im}\{F^*(-u, -v)\} \quad (5.2)$$

A transformada de Fourier discreta inversa de imagem espectral é definida como

$$f(x, y) = \sum_{x=0}^N \sum_{y=0}^N F(u, v) e^{\frac{j2\pi(ux+vy)}{N}} \quad (5.3)$$

Ora, se na imagem transformada existissem apenas dois pontos não nulos $F(u, v)$ e $F(-u, -v)$, então a transformada inversa de Fourier seria

$$f(x, y) = F(u, v)e^{\frac{j2\pi(ux+vy)}{N}} + F(-u, -v)e^{\frac{-j2\pi(ux+vy)}{N}} \quad (5.4)$$

Substituindo-se aqui a equação 5.1 e fazendo

$$\varphi = \frac{2\pi(ux + vy)}{N} \quad (5.5)$$

tem-se

$$f(x, y) = F(u, v)e^{j\varphi} + F^*(u, v)e^{-j\varphi} \quad (5.6)$$

Note que, através do teorema de Euler

$$e^{\pm j\theta} = \cos \theta \pm j \sin \theta \quad (5.7)$$

pode-se representar a equação 5.6 na forma trigonométrica

$$f(x, y) = F(u, v)(\cos \varphi + j \sin \varphi) + F^*(u, v)(\cos \varphi - j \sin \varphi) \quad (5.8)$$

que, se for desenvolvido, é equivalente a

$$\begin{aligned} f(x, y) = & Re\{F(u, v)\} \cos \varphi + j Re\{F(u, v)\} \sin \varphi + Im\{F(u, v)\} \cos \varphi + j Im\{F(u, v)\} \sin \varphi + \\ & + Re\{F(u, v)\} \cos \varphi - j Re\{F(u, v)\} \sin \varphi - Im\{F(u, v)\} \cos \varphi + j Im\{F(u, v)\} \sin \varphi \end{aligned} \quad (5.9)$$

e realizando-se as adições tem-se obtem-se

$$f(x, y) = 2Re\{F(u, v)\} \cos \varphi + 2j Im\{F(u, v)\} \sin \varphi \quad (5.10)$$

Ora, se utilizarmos o conceito da fase do número complexo $F(x, y)$, teremos

$$Im\{F(u, v)\} = j|F(u, v)| \sin \theta \quad (5.11)$$

e

$$Re\{F(u, v)\} = |F(u, v)| \cos \theta \quad (5.12)$$

então, pode-se declarar que

$$\theta = \arctan \left(\frac{\text{Im}F(u, v)}{j\text{Re}F(u, v)} \right) \quad (5.13)$$

que é útil para se substituir na equação 5.10:

$$f(x, y) = 2|F(u, v)| (\cos \theta \cos \varphi + \sin \theta \sin \varphi) \quad (5.14)$$

que é um cosseno de diferença:

$$f(x, y) = 2|F(u, v)| \cos(\theta - \varphi) \quad (5.15)$$

que é uma função real, onde φ representa a direção da função harmônica, e θ representa a fase de $F(u, v)$.

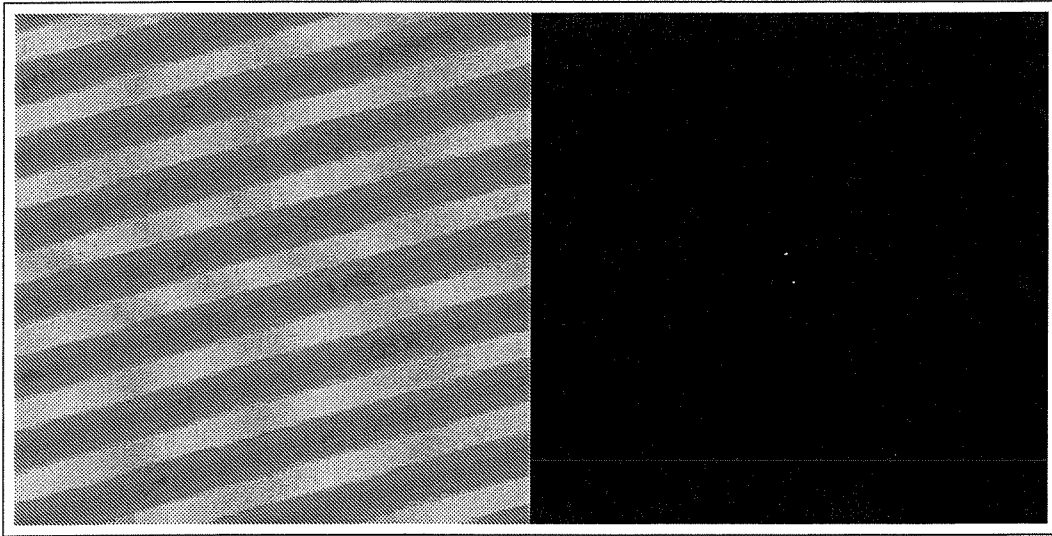


Figura 5.1: Exemplo de função harmônica e sua transformada de Fourier.

A função harmônica, também chamada de componente sinusoidal (CLARK, 2001), é um plano ondulado que oscila com uma determinada frequência espacial, numa determinada direção, com uma determinada amplitude e fase. Cada par de pixels $F(u, v)$ na imagem transformada se associa a uma função harmônica no domínio espacial (figuras 5.1 e 5.2). Outra conclusão surpreendente é que a amplitude da função harmônica é diretamente proporcional ao espectro de Fourier $|F(u, v)|$ e não ao espectro de potência $|F(u, v)|^2$.

5.2 Teorema da Mudança da Escala

Como já foi referido, o quadrado do módulo de cada ponto de uma imagem transformada de Fourier, isto é, $|F(u, v)|^2$, é referido como “espectro de energia de $f(x, y)$ ”. O termo se originou diretamente dos estudos físicos onde é usado (BRACEWELL, 1965), como por exemplo, na óptica e na acústica.

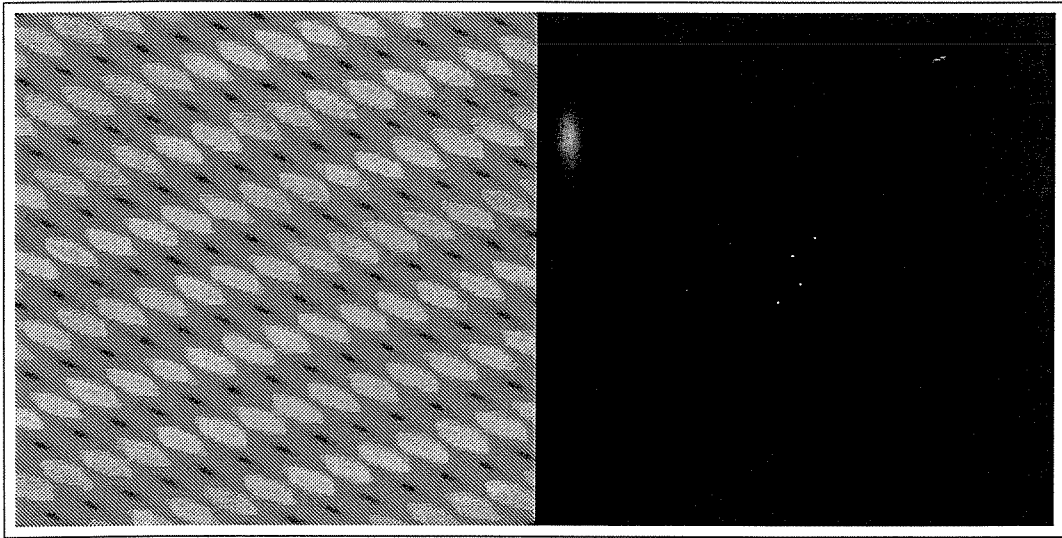


Figura 5.2: Soma de funções harmônicas e a respectiva transformada de Fourier.

Até este ponto ficou claro que cada par de pixels simétricos em relação ao centro de uma imagem transformada se associa a uma determinada frequência espacial e a uma determinada direção na imagem espacial. Contudo, qual a melhor representação que se pode optar para se poder identificar as frequências espaciais predominantes?

Uma abordagem interessante seria imaginar que a intensidade de cada pixel na imagem transformada é proporcional à amplitude da função harmônica (como foi obtido na equação 5.15). Neste trabalho, a amplitude representa a diferença entre a luminância máxima e mínima de uma função harmônica. Para se entender melhor como se pode obter esta representação, é necessário buscar algumas propriedades da imagem transformada que explicam como a frequência espacial se relaciona com a sua amplitude.

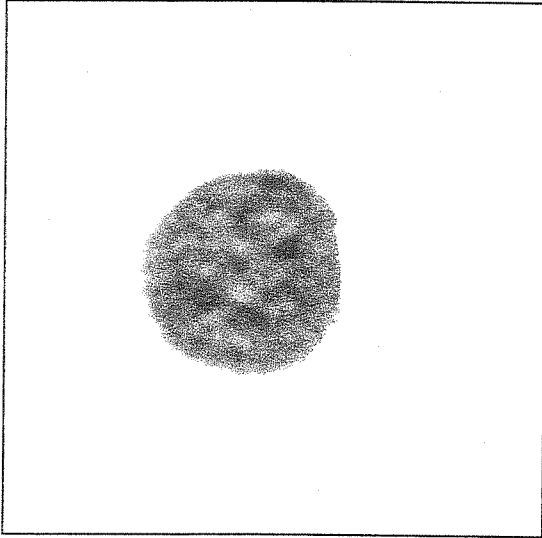


Figura 5.3: Imagem de um núcleo de cardiomiócito de 19 dias de gestação.

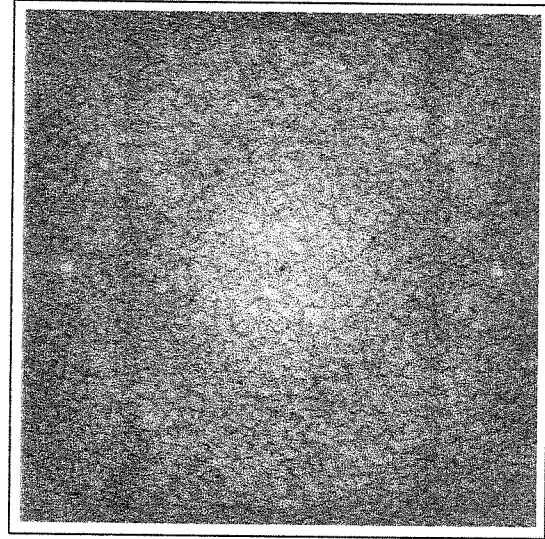


Figura 5.4: Momento de inércia da transformada de Fourier da imagem nuclear.

O teorema da mudança da escala (GONZALEZ & WINTZ, 1987) (também conhecido como *scaling theorem*) enuncia:

Teorema 1 “Se $f(x, y)$ tem uma transformada de Fourier $F(u, v)$, então $f(ax, by)$ tem uma transformada de Fourier $|ab|^{-1}F(u/a, v/b)$.”

Ou de outra forma mais simétrica,

Teorema 2 “Se $f(x, y)$ tem uma transformada de Fourier $F(u, v)$, então $|ab|^{\frac{1}{2}}f(ax, by)$ tem uma transformada de Fourier $|mn|^{\frac{1}{2}}F(mu, nv)$, onde $m = a^{-1}$ e $n = b^{-1}$.”

Ou se realizarmos a mudança de escala do domínio espectral, temos

Teorema 3 “Se $F(u, v)$ tem uma transformada de Fourier inversa $f(x, y)$, então $F(au, bv)$ tem uma transformada de Fourier inversa $|ab|^{-1}f(x/a, y/b)$.”

Analisando com cuidado o teorema 3, se compararmos dois pixels $F_1(u_1, v_1)$ e $F_2(u_2, v_2)$ que possuem a mesma luminância, sendo $a = u_2/u_1$ e $b = v_2/v_1$, as funções harmônicas correspondentes $f_1(x_1, y_1)$ e $f_2(x_2, y_2)$ terão uma variação de amplitude igual a $\frac{u_1 v_1}{u_2 v_2}$.

Por exemplo, se o pixel $F_2(u_2, v_2)$ estiver três vezes mais distante da origem do domínio espectral que o pixel $F(u_1, v_1)$, e se possuírem a mesma luminância, então $a = b = 3$, e portanto, a amplitude da função harmônica $f_2(x_2, y_2)$ será 9 vezes menor que $f_1(x_1, y_1)$. Este fenômeno causa uma distorção na transformada de Fourier: à medida em que aumentamos a frequência de uma função harmônica $f(x, y)$, a sua representação no domínio espectral $F(u, v)$ torna-se mais distante da origem e a sua luminância cada vez menor.

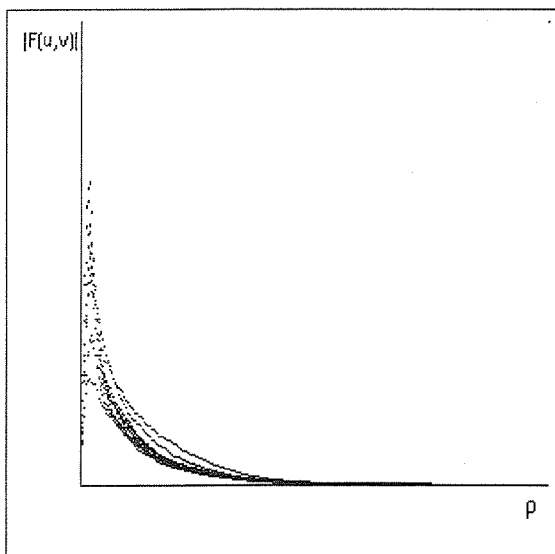


Figura 5.5: Perfil do espectro de Fourier $|F(u, v)|$, onde $\rho = \sqrt{u^2 + v^2}$.

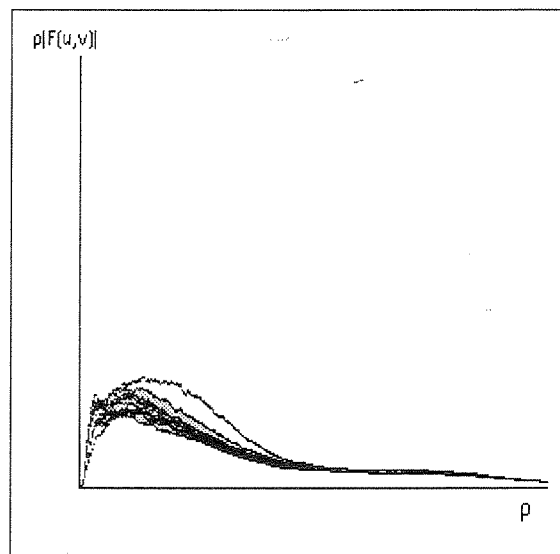


Figura 5.6: Perfil do momento de inércia $\rho|F(u, v)|$, onde $\rho = \sqrt{u^2 + v^2}$.

5.3 O Perfil das Imagens Transformadas

Já foi relatado (CLARK, 2001) uma forma diferente de estudo das transformadas de Fourier, que consiste em se calcular, para cada frequência, intensidades médias de um parâmetro da imagem transformada. O perfil pode ser representado como uma função par (lembrando-se da característica da simetria conjugada da transformada de Fourier), ou apenas um dos seus lados, isto é, as frequências medidas a partir da origem. Preferiu-se neste trabalho esta última forma, visto que não tem sentido falar em frequências espaciais negativas. A frequência espacial pode ser entendida como a distância ao centro da imagem transformada.

Cada linha nas imagens 5.5 e 5.6 representa a média do espectro de Fourier para cada

distância do centro da imagem transformada. Ambas as imagens são representações diferentes dos mesmos perfis. Repara-se que na figura 5.5 existem valores maiores nas baixas frequências, enquanto as altas frequências espaciais estão praticamente anuladas. O perfil momento de inércia, demonstrado na figura 5.6, permite perceber quais frequências espaciais apresentam amplitudes médias maiores.

Capítulo 6

Maior Corda (“Longest Chord”)

Os núcleos dos cardiomiócitos normalmente não apresentam imagens circulares, mas formas ovaladas e até muito alongadas, chegando a medir de 40 a $95,6\mu^2$ (4000 a 9560 pixels no sistema de aquisição de imagens que está sendo utilizado neste trabalho) em núcleos diplóides, e até $500\mu^2$ (50000 pixels) em núcleos octaplóides (SCHNEIDER & PFITZER, 1973). Assim, os diferentes diâmetros podem influenciar a interpretação da imagem transformada de Fourier, visto que diâmetros maiores em uma dada direção podem conter muito mais informação textural que em outras direções.

É possível se identificar a maior corda do núcleo através de técnicas da morfologia matemática. Além disso, conhecendo-se a sua direção (representado neste trabalho pelo ângulo formado com a horizontal) pretendeu-se avaliar na imagem transformada desse mesmo núcleo a ocorrência de uma maior concentração da energia e do momento de inércia nesta direção.

6.1 Obtenção

A maior corda (RUSS, 1995) de uma componente conexa de pixels pode ser obtida mais facilmente encontrando-se os pixels mais prováveis na borda da componente conexa. Há diferentes técnicas de seleção de pares de pixels candidatos à maior corda. As técnicas que foram utilizadas neste trabalho para diminuir ao máximo o número de candidatos foram:

- 1) Seleção de pixels na borda da imagem nuclear através de uma erosão conexa-4.
- 2) Através de um contador de pixels instalado na rotina anterior, é possível medir a

área nuclear (S). Este parâmetro foi utilizado para se obter o raio equivalente(R_{eq}):

$$R_{eq} = \sqrt{\frac{S}{\pi}} \quad (6.1)$$

Na mesma varredura, foi computado o centro de massa (Cmx, Cmy) de todos os pixels da componente conexa da imagem nuclear (RUSS, 1995):

$$Cmx = \frac{\sum_n x_n}{S} \quad (6.2)$$

$$Cmy = \frac{\sum_n y_n}{S} \quad (6.3)$$

Desta maneira, conhecendo-se o raio equivalente e o centro de massa, é possível se eliminar os pixels próximos ao centro de massa, somente aceitando o pixel candidato $P(x_i, y_i)$ se:

$$(x_i - Cmx)^2 + (y_i - Cmy)^2 > R_{eq}^2 \quad (6.4)$$

3) Ainda restaram muitos pixels candidatos à maior corda. Uma técnica interessante é baseada no fato de que pixels que estão situados alinhados com dois de seus vizinhos, formando uma linha reta, jamais podem ser admitidos como candidatos. Este alinhamento pode ocorrer na horizontal, vertical ou na diagonal. De uma forma mais simples, cada pixel candidato é eliminado se houver dois vizinhos na conexidade-8 opostos entre si. Este teste é realizado em quatro direções citadas.

Através dessas técnicas, obtemos N pixels que podem ser associados 2 a 2, perfazendo um total de $N(N - 1)/2$ cordas possíveis, escolhendo-se o par de pixel $P_1(x_1, y_1)$ e $P_2(x_2, y_2)$ com a máxima distância euclidiana entre eles.

6.2 Análise da orientação das maiores cordas

A direção da maior corda é computada através de

$$\alpha = \arctan \left(\frac{y_1 - y_2}{x_1 - x_2} \right) \quad (6.5)$$

Entretanto, é interessante avaliar se as maiores cordas dos núcleos se dispõem em alguma direção predominante. Isto pode ocorrer principalmente nos esfregaços citológicos, onde são os núcleos são espalhados na lâmina de vidro com um movimento horizontal. Se a verificação da orientação dos núcleos não for feita, poderão ser encontradas distorções nos parâmetros retirados das imagens transformadas, tendo em vista que elas fornecem informação direcional das frequências espaciais.

Pode-se se estimar a intensidade do predomínio da orientação das maiores cordas, com base no mesmo raciocínio, obtivermos o módulo do vetor resultante (R):

$$R = \sqrt{\left(\sum_i \sin 2\alpha_i \right)^2 + \left(\sum_i \cos 2\alpha_i \right)^2} \quad (6.6)$$

Para tornar R invariante em relação ao número de núcleos analisados, é necessário dividi-lo pelo número total de núcleos, obtendo assim um resultado entre 0 (baixa orientação) e 1 (alta orientação).

Conforme a equação 6.5, o valor de α pode se situar entre $+90^\circ$ e -90° com a horizontal, podemos encontrar a direção predominante (β) em um grupo de N imagens, se for realizada uma soma de vetores normalizados, cada um representando a direção de um núcleo de cardiomiócito:

$$\beta = \frac{1}{2} \arcsin \left(\frac{\sum_{i=0}^N \sin 2\alpha_i}{R} \right) \quad (6.7)$$

Assim, foi descrita uma análise da direção das maiores cordas utilizando técnicas da morfologia matemática, e pretende-se fazer comparações entre as distribuições das informação textural. Uma abordagem da distribuição direcional pode ser feita através da integração do momento de inércia em 18 setores fixos (vide a figura 4.6). Outra abordagem é medir os mesmos parâmetros, de forma que a divisa entre o nono e o décimo setores esteja na direção da maior corda.

Capítulo 7

A Matriz de Co-ocorrência

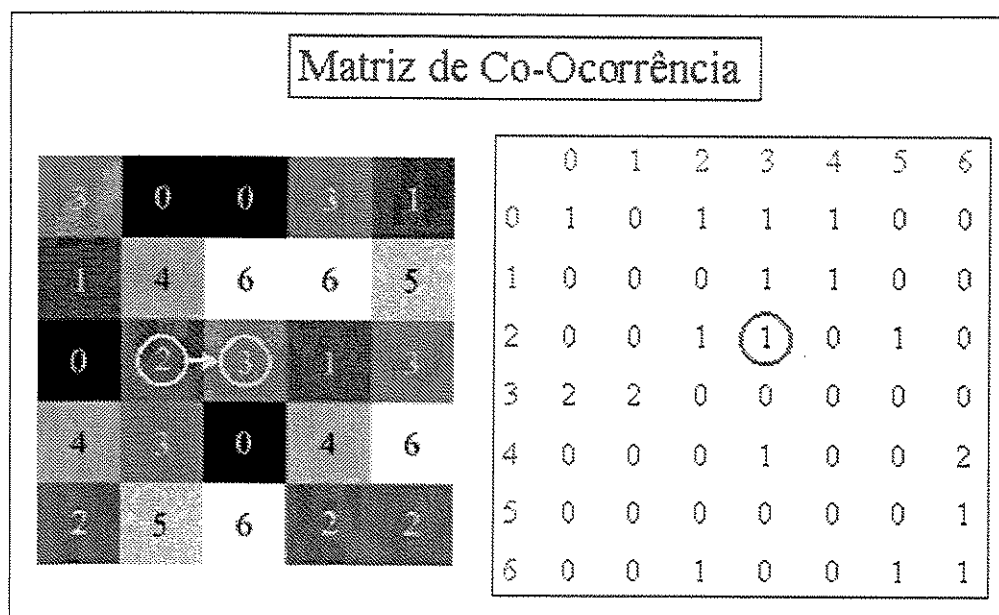


Figura 7.1: Método de construção da matriz de co-ocorrência (à direita), a partir de uma imagem com 7 níveis de cinza (à esquerda).

Um dos métodos disponíveis para a análise de imagens produzidas pela transformada de Fourier é montar uma matriz de dependência espacial dos níveis de cinza, e extrair vários parâmetros descritivos a partir da mesma. Tais parâmetros também são denominados de características de Markov (DIEGENBACH & BAAK, 1978), distribuição estatística de segunda ordem (WOUVER et al., 2000), e até mesmo são referidas simplesmente como características texturais (HE et al., 1988). Em 1973, Haralick et al. (HARALICK et al., 1973) descreveram inici-

almente 14 parâmetros, e mais tarde foram sendo criados novas maneiras de calcular parâmetros (DIEGENBACH & BAAK, 1978), chegando ao total de 20.

A matriz de co-ocorrência é uma matriz simétrica em relação a sua diagonal principal, onde cada elemento na posição i, j indica o número de vezes que um pixel com nível de cinza i tem um vizinho com nível de cinza j (figura 7.1), semelhante a um histograma bidimensional. Imagens suaves, com mudanças pouco abruptas de luminância, geram matrizes de co-ocorrência em que os dados se concentram em torno da diagonal principal. Em contrapartida, Imagens com contornos nítidos, fazem que os eventos se espalhem, distanciando-se da diagonal principal da matriz (figura 7.2).

O uso das características da matriz de co-ocorrência de imagens transformadas já tem sido relatado, até mesmo em outros tipos de transformação não-Fourier (WOUVER et al., 2000). Pretende-se, neste trabalho, comparar o desempenho dos parâmetros calculados a partir da imagem original e das suas respectivas transformadas de Fourier.

7.1 Características da Matriz de Co-ocorrência

Abaixo apresenta-se a relação de características da matriz de co-ocorrência que até o momento do confecção deste relatório foram implementadas. Com o propósito de não confundir, cada característica é listada com os respectivo nome original em inglês. Cada elemento $p(i, j)$ é normalizado, isto é, representa a probabilidade de ocorrer um pixel com nível de cinza i com um pixel vizinho com nível de cinza j .

$$p(i, j) = \frac{P(i, j)}{R} \quad (7.1)$$

onde R é o número total de pares de pixels utilizados para se construir a matriz de co-ocorrência.

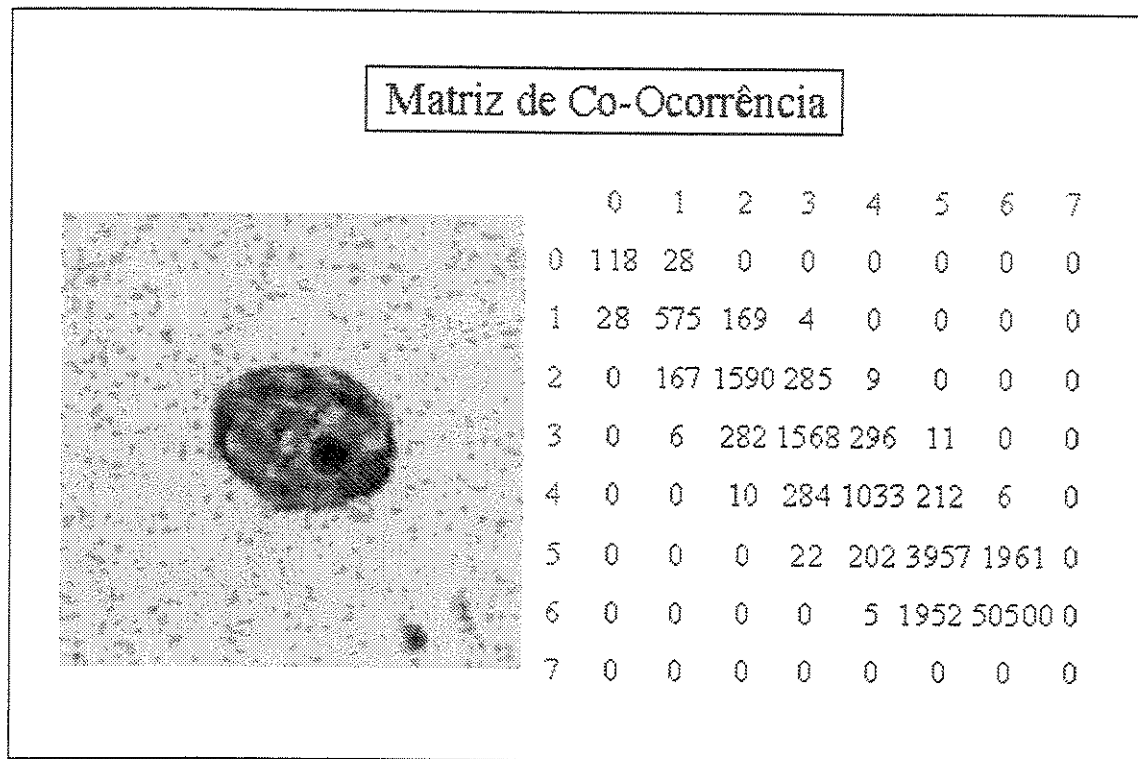


Figura 7.2: Matriz de co-ocorrência de uma imagem com 8 níveis de cinza.

7.1.1 Segundo Momento Angular

Nome Original: *Angular Second Moment* (HARALICK et al., 1973, DIEGENBACH & BAAK, 1978)

$$f_1 = \sum_i \sum_j (p(i, j))^2 \quad (7.2)$$

7.1.2 Inércia

Nome Original: *Inertia* (HE et al., 1988)

$$f_2 = \sum_i \sum_j (i - j)^2 p(i, j) \quad (7.3)$$

7.1.3 Homogeneidade Local

Nome Original: *Local homogeneity* (HE et al., 1988)

$$f_3 = \sum_i \sum_j \frac{1}{1 + (i - j)^2} p(i, j) \quad (7.4)$$

7.1.4 Entropia

Nome Original: *Entropy* (HE et al., 1988)

$$f_4 = - \sum_i \sum_j p(i, j) \log_2 p(i, j) \quad (7.5)$$

7.1.5 Entropia Normalizada

Nome Original: *Normalized Entropy*

$$f_5 = \frac{- \sum_i \sum_j p(i, j) \log p(i, j)}{\log C} \quad (7.6)$$

onde C é o número de níveis de cinza existentes na imagem.

7.1.6 Mx

Nome Original: *Mx* (HE et al., 1988)

$$f_6 = \sum_i \sum_j p(i, j) i \quad (7.7)$$

7.1.7 My

Nome Original: *My* (HE et al., 1988)

$$f_7 = \sum_i \sum_j p(i, j) j \quad (7.8)$$

7.1.8 Contraste

Nome Original: *Contrast* (DIEGENBACH & BAAK, 1978)
(HARALICK et al., 1973) (HARALICK, 1979)

$$f_8 = \sum_{n=0}^{C-1} n^2 \left(\sum_i \sum_j p(i, j) \right) \quad \text{onde} \quad |i - j| = n \quad (7.9)$$

7.1.9 Momento Inverso da Diferença

Nome Original: *Inverse Difference Moment*¹ (DIEGENBACH & BAAK, 1978, HARALICK et al., 1973)

$$f_9 = \sum_i \sum_j \frac{p(i, j)}{1 + (i - j)^2} \quad (7.10)$$

7.1.10 Probabilidade do Pico de Transição

Nome Original: *Peak Transition Probability*² (DIEGENBACH & BAAK, 1978)

$$f_{10} = \max\{p(i, j)\} \quad (7.11)$$

7.1.11 Momento Diagonal

Nome Original: *Diagonal Moment* (DIEGENBACH & BAAK, 1978)

$$f_{11} = \sum_i \sum_j \sqrt{\frac{|i - j| p(i, j)}{2}} \quad (7.12)$$

7.1.12 Segundo Momento Diagonal

Nome Original: *Second Diagonal Moment* (DIEGENBACH & BAAK, 1978)

$$f_{12} = \sum_i \sum_j \frac{|i - j| p(i, j)}{2} \quad (7.13)$$

¹Em 1979, HARALICK publicou como $f_9 = \sum_{|i-j|} \frac{p(i, j)}{|i - j|} / i \neq j$, não implementado ainda.

²Em 1979, HARALICK usou o termo *Maximum Probability*

7.1.13 Desvio-Padrão

Nome Original: *Standard Deviation* (DIEGENBACH & BAAK, 1978)

$$f_{13} = \sqrt{\frac{\sum_i \sum_j p(i, j)^2 - (\sum_i \sum_j p(i, j))^2}{R}} \quad (7.14)$$

7.1.14 Média

Nome Original: *Mean* (DIEGENBACH & BAAK, 1978)

$$f_{14} = \frac{\sum_i \sum_j p(i, j)}{R} \quad (7.15)$$

7.1.15 Coeficiente de Variação

Nome Original: *Variation Coefficient* (DIEGENBACH & BAAK, 1978)

$$f_{15} = \frac{f_{13}}{f_{14}} \quad (7.16)$$

7.1.16 Média das Somas

Nome Original: *Sum Average* (DIEGENBACH & BAAK, 1978, HARALICK et al., 1973)

$$f_{16} = \sum_{s=0}^{C-2} p(i, j)s, |i + j| = s \quad (7.17)$$

7.1.17 Média das Somas das Linhas

$$f_{17} = \sum_{j=0}^{C-1} \frac{\sum_i p(i, j)}{C} \quad (7.18)$$

7.1.18 Média das Somas das Colunas

$$f_{18} = \sum_{i=0}^{C-1} \frac{\sum_j p(i, j)}{C} \quad (7.19)$$

7.1.19 Tonalidade dos Agrupamentos

Nome Original: *Cluster Shade* (HE et al., 1988)

$$f_{19} = \sum_i \sum_j (i + j - Mx - My)^3 p(i, j) \quad (7.20)$$

7.1.20 Proeminência dos Agrupamentos

Nome Original: *Cluster Proeminence* (HE et al., 1988)

$$f_{20} = \sum_i \sum_j (i + j - Mx - My)^4 p(i, j) \quad (7.21)$$

7.1.21 Momento do Produto

Nome Original: *Product Moment* (DIEGENBACH & BAAK, 1978)

$$f_{21} = \sum_i \sum_j (i - f_{14})(j - f_{14})p(i, j) \quad (7.22)$$

7.1.22 Soma dos quadrados: Variância

Nome Original: *Sum of Squares: Variance*

$$f_{22} = \sum_i \sum_j (i - f_{14})^2 p(i, j) \quad (7.23)$$

Capítulo 8

Resultados

Os resultados desta seção do relatório são os comportamentos de variáveis provenientes das imagens dos núcleos e de suas transformadas de Fourier. Os melhores resultados estão relatados a seguir, compreendendo 9000 imagens de esfregaços citológicos dos núcleos de cardiomiócitos de rato em 7 idades de desenvolvimento.

8.1 Características físicas dos animais

Inicialmente são apresentados os pesos corporais dos animais em gramas, agrupados em 7 idades, conforme as figuras 8.1 e 8.2. Note que a escala logarítmica ressalta o intenso crescimento corporal durante a gestação. Observa-se que há uma redução abrupta da velocidade do crescimento após o nascimento.

A tabela 8.1 apresenta os pesos corporais apresentados nas figuras 8.1 e 8.2. Observar a enorme variação da escala das grandezas nos grupos mais jovens, que passa despercebida na figura 8.1, causando uma aparente pequena variação. Assim, entre os dias 19 e 21 de gestação, foi observado que a média do peso corporal quase dobrou.

Tabela 8.1: Peso corporal dos ratos em gramas segundo tempo de desenvolvimento.

Idade	N	Média	Confian. -95%	Confian. +95%	Mediana	Mín.	Máx.	Desvio Padrão	Skewness	Kurtosis
13 dias gest.	20	0,1014	0,0971	0,1056	0,1025	0,074	0,112	0,0090	-1,53906	3,32599
16 dias gest.	15	0,4553	0,4190	0,4916	0,466	0,344	0,548	0,06553	-0,43746	-1,07282
19 dias gest.	16	2,4750	2,3641	2,5859	2,500	2,000	2,900	0,20817	-0,32941	1,27116
21 dias gest.	27	4,7171	4,5565	4,8778	4,900	3,900	5,209	0,40615	-0,51210	-1,07889
1 dia a.n.	17	7,3647	6,9224	7,8070	7,500	4,600	8,400	0,86019	-2,10889	6,55938
5 dias a.n.	21	8,9095	8,3721	9,4469	9,100	6,100	10,40	1,18064	-0,85639	0,22293
8 dias a.n.	22	12,063	11,392	12,735	12,200	8,200	15,30	1,51518	-0,44675	1,17203
21 dias a.n.	16	41,806	40,599	43,014	42,300	38,20	45,10	2,26641	-0,16609	-1,33736
60 dias a.n.	22	159,19	143,18	175,21	151,15	115,7	238,3	36,11776	1,08269	0,38500

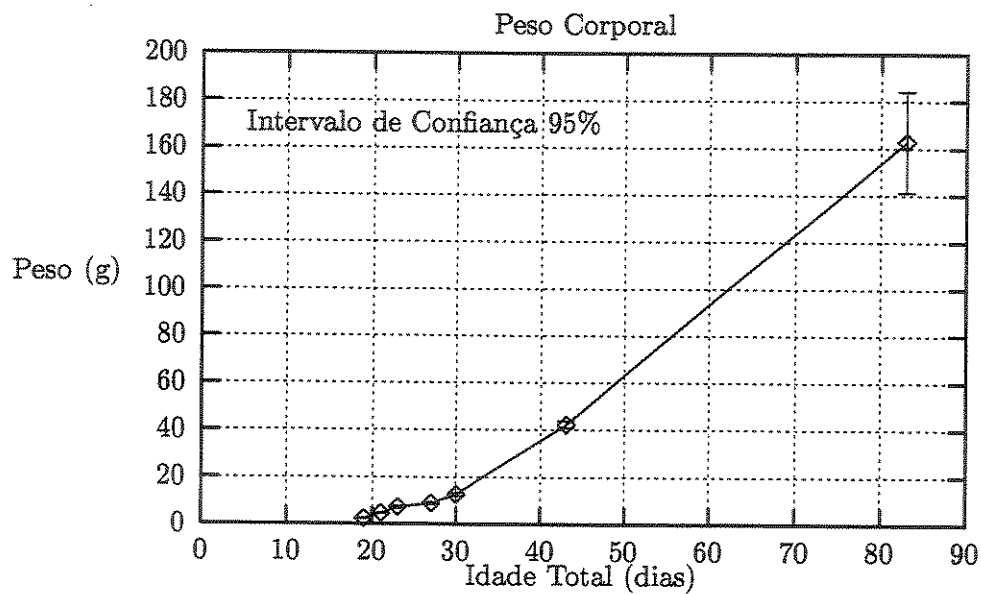


Figura 8.1: Correlação entre o peso corporal e a idade total dos ratos.

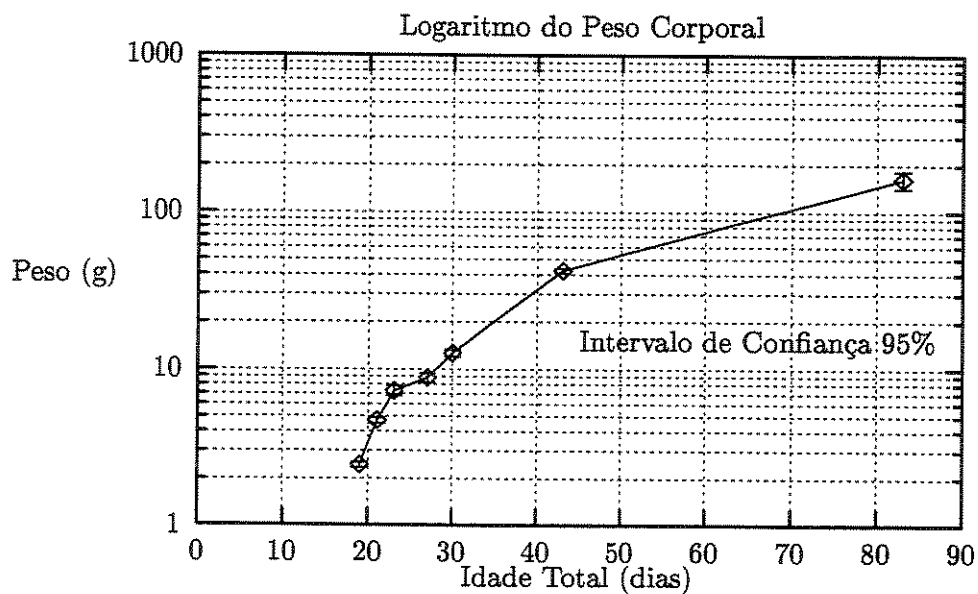


Figura 8.2: Correlação entre o logaritmo do peso corporal e a idade total dos ratos. ($p=2,00 \cdot 10^{-16}$ e $H=86,052$ calculados pelo teste de Kruskal-Wallis).

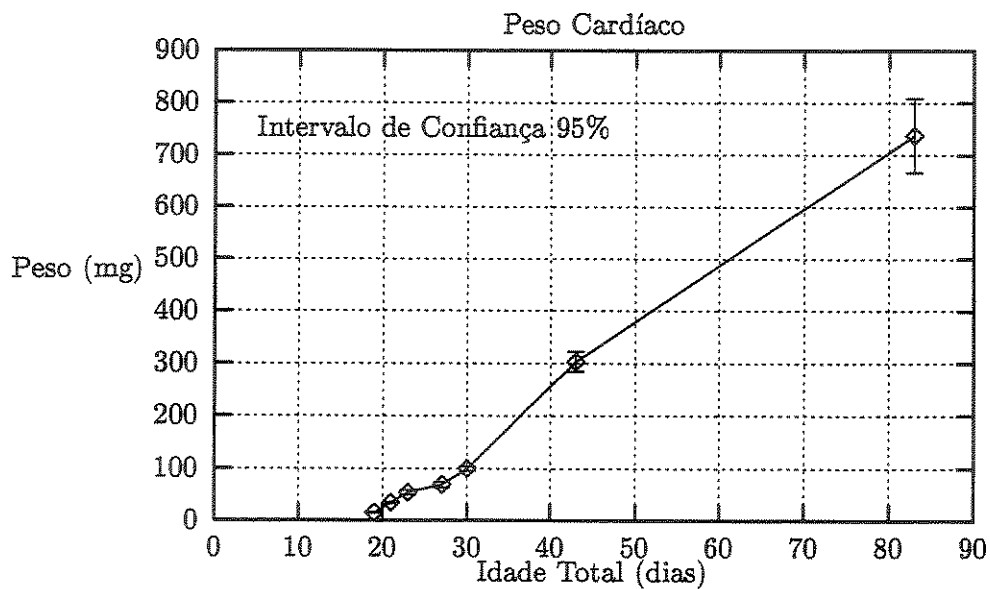


Figura 8.3: Correlação entre o peso cardíaco e a idade total de ratos.

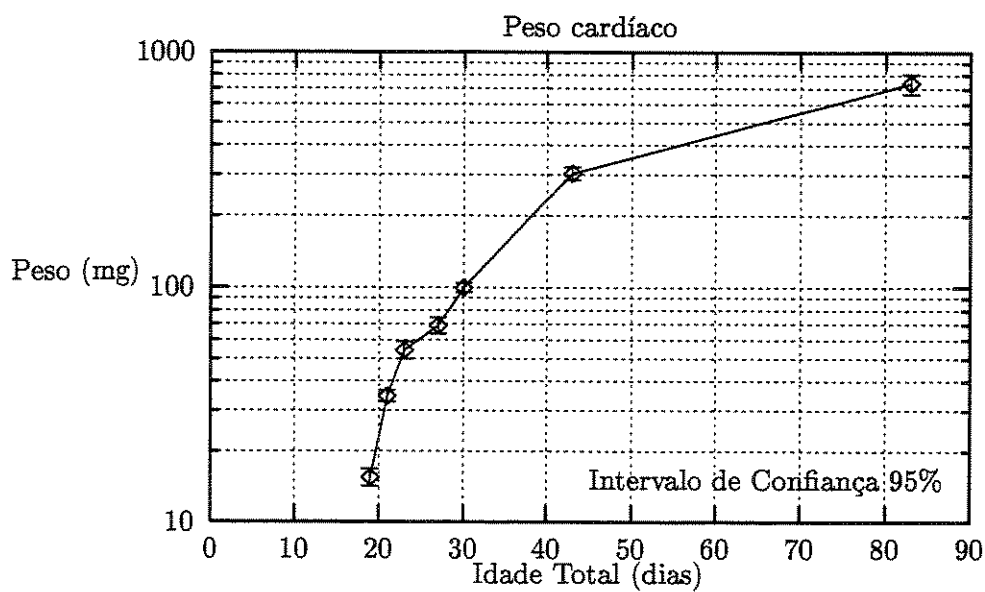


Figura 8.4: Correlação entre o logaritmo do peso corporal e a idade dos ratos ($p=1,79 \cdot 10^{-16}$, e $H=86,2825$, teste de Kruskal-Wallis).

Os pesos cardíacos são apresentados na tabela 8.2, junto com parâmetros estatísticos de cada grupo, os mesmos das figuras 8.3 e 8.4. Note o intenso e progressivo crescimento, principalmente entre os dias 19 e 21 da gestação, onde ocorre a duplicação do peso cardíaco.

Tabela 8.2: Peso do miocárdio dos ratos em miligramas segundo tempo de desenvolvimento.

Idade	N	Média	Confian. -95%	Confian. +95%	Mediana	Mín.	Máx.	Desvio Padrão	Skewness	Kurtosis
19 dias gest.	16	15,7500	14,5585	16,9415	16	11	20	2,2361	-0,337327	0,349538
21 dias gest.	27	34,2222	32,6810	35,7635	35	27	41	3,8961	-0,100725	-0,798419
1 dia a.n.	17	55,5294	51,3757	59,6831	56	35	70	8,0787	-0,662858	1,474440
5 dias a.n.	21	68,0952	64,2843	71,9601	67	54	84	8,3720	0,337105	-0,130199
8 dias a.n.	22	95,0000	89,5888	100,411	96	66	113	12,2046	-0,620306	-0,005801
21 dias a.n.	16	287,875	263,933	311,816	285,5	193	370	44,9294	-0,300061	0,291442
60 dias a.n.	22	725,045	672,067	778,023	731	543	988	119,4880	0,616343	0,085947

A tabela 8.3 apresenta as variáveis derivadas da matriz de co-ocorrência que melhor discriminaram os 90 animais entre os 7 grupos etários entre si. Estão listadas apenas as variáveis com $p < 0,05$. Para cada animal foi calculada a mediana de 100 células, para cada característica.

Assim, destas 40 variáveis calculadas a partir da matriz de co-ocorrência, 20 são derivadas das imagens transformadas, e 20 são derivadas das imagens originais.

As 25 variáveis que, isoladamente, tiveram o maior poder discriminante estão listadas na tabela 8.4.

Para tornar mais claro a capacidade discriminante de algumas variáveis, são apresentadas a seguir gráficos das variáveis que tiveram o melhor desempenho discriminante.

A contagem de mitoses (figura 8.5) é um parâmetro usual na avaliação de neoplasias. Observa-se uma rápida queda da contagem de mitoses após o nascimento, cessando completamente no dia 60 pós-parto (dia 83 de vida após a concepção).

8.2 Variáveis obtidas a partir de características morfométricas

A figura 8.6 apresenta as áreas dos núcleos dos cardiomiócitos, apresentando uma variação irregular ao longo do desenvolvimento, com valores máximos no dia 23 de vida após a concepção (dia 1 de vida pós-parto).

No processo de se encontrar a maior corda, buscou-se os pixels mais extremos, cuja quantidade se apresentou variável (figura 8.7), com comportamento semelhante à área nuclear (figura 8.6).

Tabela 8.3: Variáveis da matriz de co-ocorrência em ordem decrescente de poder discriminante, avaliadas através do teste Kruskal-Wallis

Variável Dependente	Imagem	Cada animal contribuiu com	H	p	Vide figura
Proeminência dos Agrupamentos	Transformada	Mediana	61,4703	$2,26 \cdot 10^{-11}$	8.29
Proeminência dos Agrupamentos	Original	Mediana	60,7981	$3,10 \cdot 10^{-11}$	8.20
Luminância Máxima	Transformada	Mediana	58,6187	$8,58 \cdot 10^{-11}$	8.44
Tonalidade dos Agrupamentos	Original	Mediana	58,4577	$9,25 \cdot 10^{-11}$	8.23
Entropia	Original	Mediana	55,1499	$4,32 \cdot 10^{-10}$	8.25
Desvio Padrão	Original	Mediana	55,0598	$4,51 \cdot 10^{-10}$	8.22
Segundo Momento Angular	Original	Mediana	54,2137	$6,68 \cdot 10^{-10}$	8.27
Probabilidade do Pico de Transição	Original	Mediana	53,3585	$9,94 \cdot 10^{-10}$	8.28
Momento do Produto	Transformada	Mediana	51,63	$2,21 \cdot 10^{-09}$	8.40
Variância (Soma dos Quadrados)	Transformada	Mediana	51,2787	$2,60 \cdot 10^{-09}$	8.35
Homogeneidade Local	Original	Mediana	50,9281	$3,06 \cdot 10^{-09}$	8.19
Momento Inverso da Diferença	Original	Mediana	50,9281	$3,06 \cdot 10^{-09}$	8.16
Momento Horizontal (Mx)	Transformada	Mediana	50,158	$4,37 \cdot 10^{-09}$	8.41
Momento Vertical (My)	Transformada	Mediana	50,158	$4,37 \cdot 10^{-09}$	8.42
Média das Somas	Transformada	Mediana	50,158	$4,37 \cdot 10^{-09}$	8.37
Momento Diagonal	Original	Mediana	49,8957	$4,93 \cdot 10^{-09}$	8.11
Segundo Momento Diagonal	Original	Mediana	44,4331	$6,07 \cdot 10^{-08}$	8.12
Inércia	Original	Mediana	39,6269	$5,39 \cdot 10^{-07}$	8.18
Contraste	Original	Mediana	39,6269	$5,39 \cdot 10^{-07}$	8.13
Luminância Máxima	Original	Mediana	37,0798	$1,70 \cdot 10^{-06}$	8.9
Tonalidade dos Agrupamentos	Transformada	Mediana	33,7708	$7,45 \cdot 10^{-06}$	8.32
Coefficiente de Variação (CV)	Original	Mediana	32,2127	$1,49 \cdot 10^{-05}$	8.10
Entropia Normalizada	Transformada	Mediana	29,079	$5,88 \cdot 10^{-05}$	8.43
Homogeneidade Local	Transformada	Mediana	28,4407	$7,76 \cdot 10^{-05}$	8.39
Momento Inverso da Diferença	Transformada	Mediana	28,4407	$7,76 \cdot 10^{-05}$	8.36
Segundo Momento Diagonal	Transformada	Mediana	27,9376	$9,65 \cdot 10^{-05}$	8.33
Inércia	Transformada	Mediana	26,2553	$2,00 \cdot 10^{-04}$	8.38
Contraste	Transformada	Mediana	26,2553	$2,00 \cdot 10^{-04}$	8.34
Variância (Soma dos Quadrados)	Original	Mediana	23,818	$5,64 \cdot 10^{-04}$	8.15
Momento Horizontal (Mx)	Original	Mediana	23,8037	$5,67 \cdot 10^{-04}$	
Momento Vertical (My)	Original	Mediana	23,8037	$5,67 \cdot 10^{-04}$	
Média das Somas	Original	Mediana	23,8037	$5,67 \cdot 10^{-04}$	8.17
Momento do Produto	Original	Mediana	23,6616	$6,03 \cdot 10^{-04}$	8.14
Momento Diagonal	Transformada	Mediana	20,8876	$1,92 \cdot 10^{-03}$	
Segundo Momento Angular	Transformada	Mediana	19,8667	$2,92 \cdot 10^{-03}$	
Desvio Padrão	Transformada	Mediana	19,8233	$2,97 \cdot 10^{-03}$	
Coefficiente de Variação (CV)	Transformada	Mediana	19,8233	$2,97 \cdot 10^{-03}$	
Média	Original	Mediana	19,3671	$3,58 \cdot 10^{-03}$	
Entropia	Transformada	Mediana	17,5123	$7,57 \cdot 10^{-03}$	
Probabilidade do Pico de Transição	Transformada	Mediana	13,0129	$4,28 \cdot 10^{-02}$	

Tabela 8.4: Variáveis com melhor desempenho

Ordem	Variável	H	p	Figura
1°	Peso Cardíaco	86,283	$1,79 \cdot 10^{-16}$	8.4
2°	Peso Corporal	86,052	$2,00 \cdot 10^{-16}$	8.2
3°	Energia Média do Setor 16	64,044	$6,76 \cdot 10^{-12}$	8.49
4°	Energia do Setor 16	63,465	$8,87 \cdot 10^{-12}$	
5°	Energia do Setor 17	63,313	$9,53 \cdot 10^{-12}$	
6°	Energia Média do Setor 17	63,201	$1,00 \cdot 10^{-11}$	
7°	Energia do Setor 4	62,413	$1,45 \cdot 10^{-11}$	8.51
8°	Energia Média do Setor 4	62,310	$1,53 \cdot 10^{-11}$	
9°	Energia do Setor 13	61,945	$1,81 \cdot 10^{-11}$	
10°	Momento de Inércia do Anel 2	61,875	$1,87 \cdot 10^{-11}$	8.52
11°	Momento de Inércia Médio do Anel 2	61,875	$1,87 \cdot 10^{-11}$	
12°	Energia do Setor 7	61,547	$2,18 \cdot 10^{-11}$	8.54
13°	Energia Média do Setor 13	61,514	$2,22 \cdot 10^{-11}$	
14°	Energia Média do Setor 7	61,513	$2,22 \cdot 10^{-11}$	
15°	Proeminência dos Agrupamentos da Transformada	61,470	$2,26 \cdot 10^{-11}$	8.29
16°	Energia do Anel 2	61,282	$2,47 \cdot 10^{-11}$	
17°	Energia Média do Anel 2	61,282	$2,47 \cdot 10^{-11}$	
18°	Energia Média do Setor 15	61,265	$2,49 \cdot 10^{-11}$	
19°	Energia do Setor 15	60,820	$3,07 \cdot 10^{-11}$	
20°	Energia do Anel 3	60,799	$3,10 \cdot 10^{-11}$	
21°	Energia Média do Anel 3	60,799	$3,10 \cdot 10^{-11}$	
22°	Proeminência dos Agrupamentos	60,798	$3,10 \cdot 10^{-11}$	8.20
23°	Energia Média do Setor 14	60,763	$3,15 \cdot 10^{-11}$	
24°	Momento de Inércia do Anel 3	60,712	$3,23 \cdot 10^{-11}$	
25°	Momento de Inércia Médio do Anel 3	60,712	$3,23 \cdot 10^{-11}$	

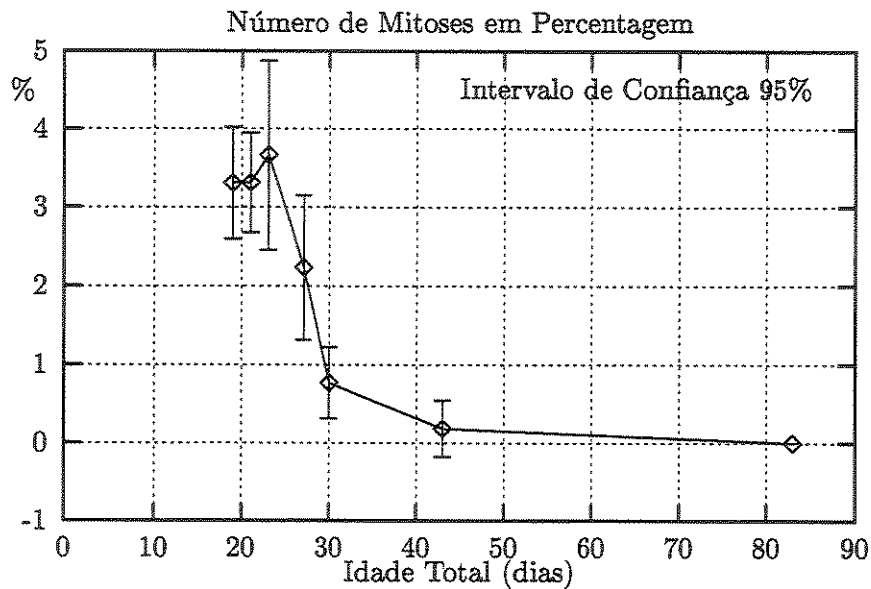


Figura 8.5: Número de mitoses em porcentagem avaliado em 400 cardiomiócitos para cada animal, em diferentes fases do desenvolvimento ($p=8,78.10^{-11}$, $H=58,5707$, teste de Kruskal-Wallis).

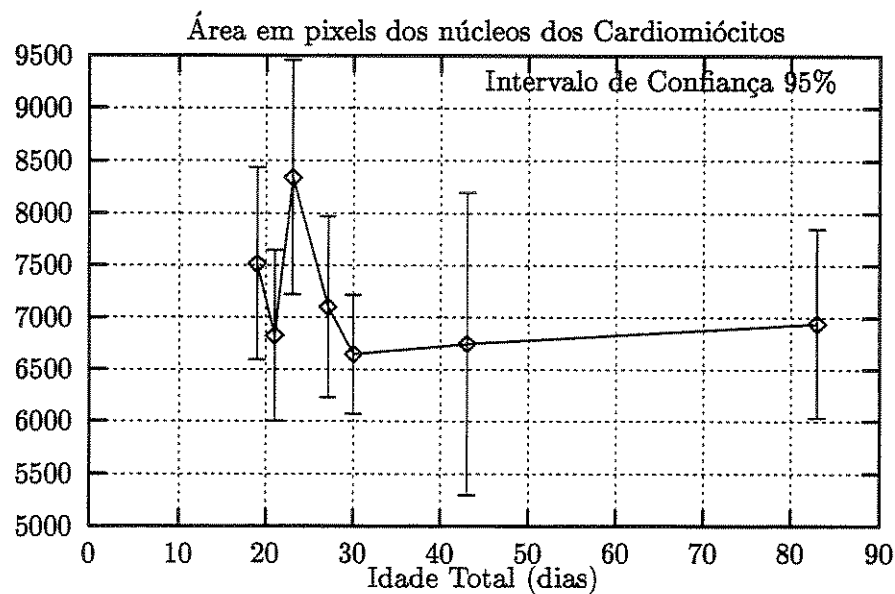


Figura 8.6: Área dos núcleos dos cardiomiócitos (em pixels) em diferentes fases do desenvolvimento ($p=3,53.10^{-3}$, $H=19,4$, teste de kruskal-Wallis).

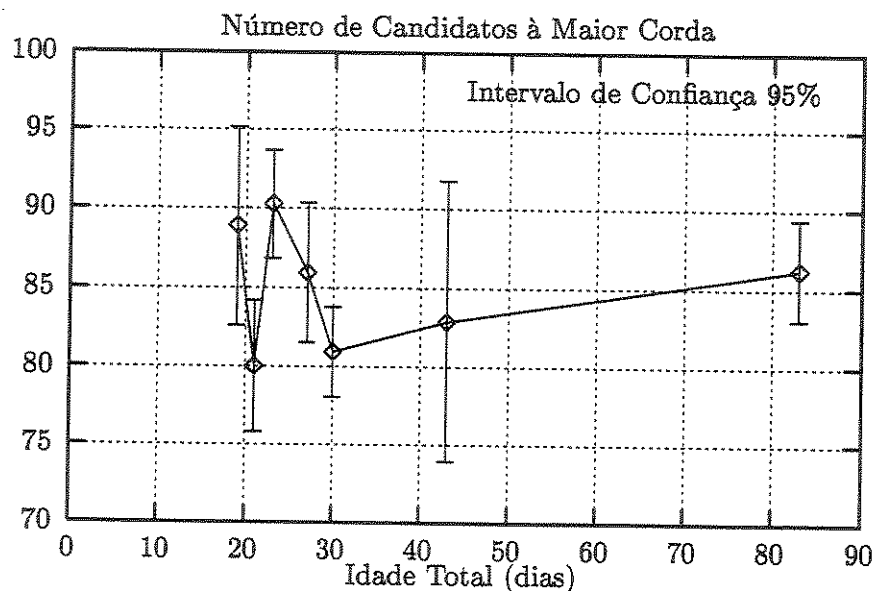


Figura 8.7: Número de candidatos à maior corda dos núcleos dos cardiomiócitos ($p=7,7 \cdot 10^{-3}$, $H=17,47$, teste de Kruskal-Wallis).

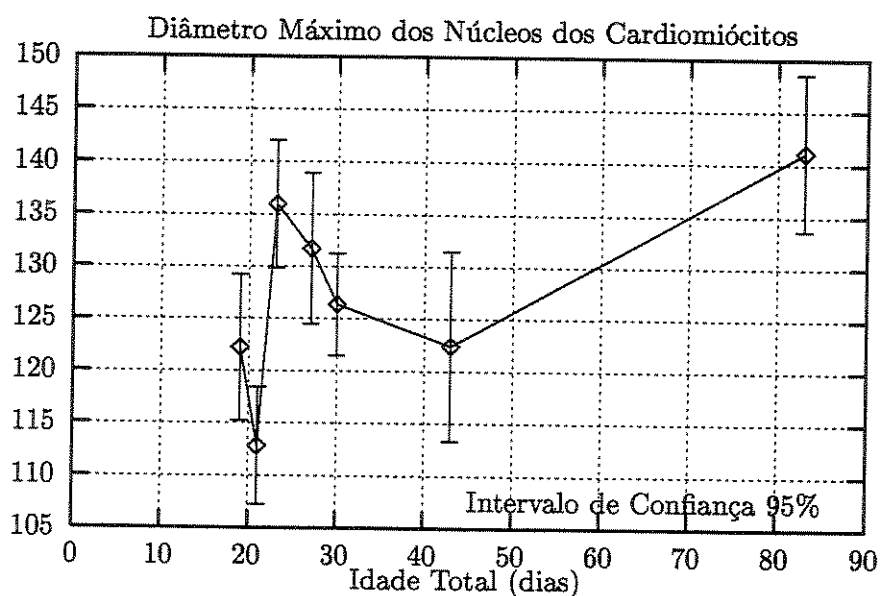


Figura 8.8: Comprimento da maior corda dos núcleos dos cardiomiócitos em diferentes fases do desenvolvimento ($p=9,91 \cdot 10^{-6}$, $H=33,127$, teste de Kruskal-Wallis).

O comprimento da maior corda dos núcleos (figura 8.8) é um dos parâmetros geométricos mais comumente utilizados. É importante ressaltar que essa variável alcança valores máximos na idade adulta, devido ao alongamento dos núcleos dos cardiomiócitos.

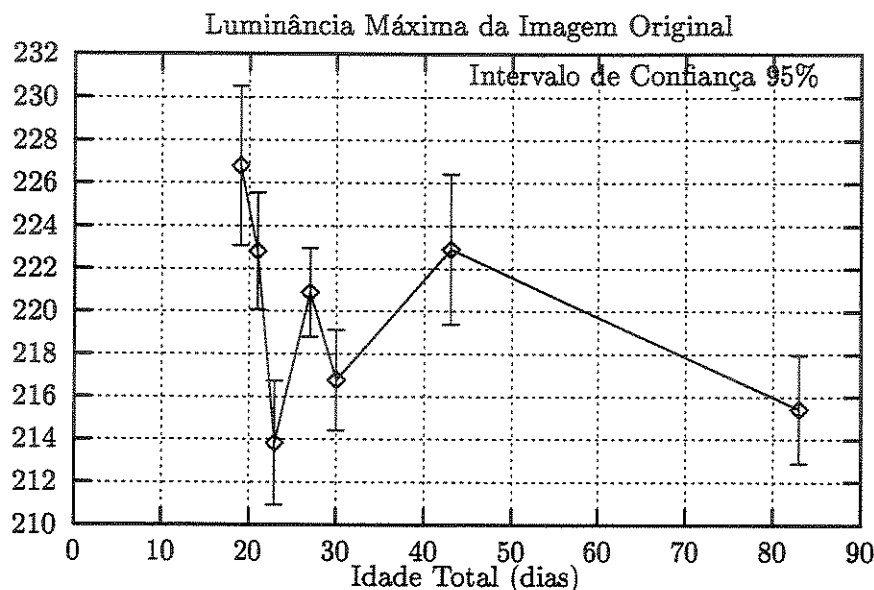


Figura 8.9: Luminância máxima dos núcleos dos cardiomiócitos em diferentes fases do desenvolvimento ($p=1,7 \cdot 10^{-6}$, $H=37,08$, teste de Kruskal-Wallis).

A luminância máxima do núcleo do cardiomiócito (figura 8.9) foi um dos parâmetros utilizados para o cálculo da entropia normalizada. Apresenta um comportamento irregular, alcançando valores máximos no dia 19 e valores mínimos no dia 23.

8.3 Análise textural da cromatina dos núcleos

A matriz de co-ocorrência é uma ferramenta amplamente utilizada na descrição da textura da cromatina nuclear. A seguir estão os gráficos das 13 variáveis que apresentaram um bom desempenho.

Estudando-se a matriz de co-ocorrência da imagem nuclear, foi calculado o coeficiente de variação, que é a razão entre o desvio-padrão e a média, apresentado na figura 8.10. Esta variável apresenta valores mínimos no dia 21, com aumento rápido nos primeiros dias de vida pós-parto, e estabilização na idade adulta. Valores máximos foram obtidos no dia 83 de vida

Coefficiente de Variação da Matriz de Co-ocorrência da Imagem Original

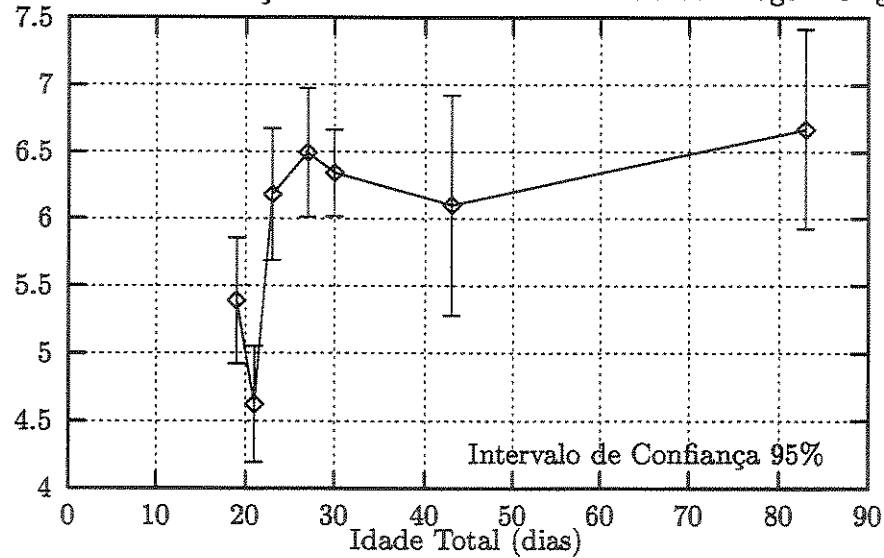


Figura 8.10: Coeficiente de variação (CV) da matriz de co-ocorrência da imagem dos núcleos dos cardiomiócitos ($p=1,49 \cdot 10^{-5}$, $H=32,21$, teste de Kruskal-Wallis).

após a concepção.

A figura 8.11 apresenta o comportamento decrescente do momento diagonal, alcançando valores máximos no dia 21 da gestação, estabilizando-se na idade adulta.

O segundo momento diagonal (figura 8.12) alcança valores máximos no dia 21 após a concepção, com queda rápida até o dia 30 após a concepção, estabilizando-se em seguida.

O contraste apresenta um pico no dia 21 de vida (figura 8.13), com evolução decrescente nos primeiros dias de vida pós-parto e estabilização na idade adulta.

A figura 8.14 apresenta o momento do produto da imagem nuclear, que apresenta um comportamento irregular, alcançando valores mínimos no dia 23 após a concepção.

A variância da matriz de co-ocorrência (figura 8.15) apresenta um comportamento muito semelhante ao do momento do produto (figura 8.14).

A figura 8.16 demonstra o comportamento crescente do momento inverso da diferença, que apresenta valores mínimos no dia 21 da gestação, com aumento progressivo, mais intenso nos primeiros dias de vida pós-parto.

A média das somas da matriz de co-ocorrência da imagem dos núcleos (figura 8.17)

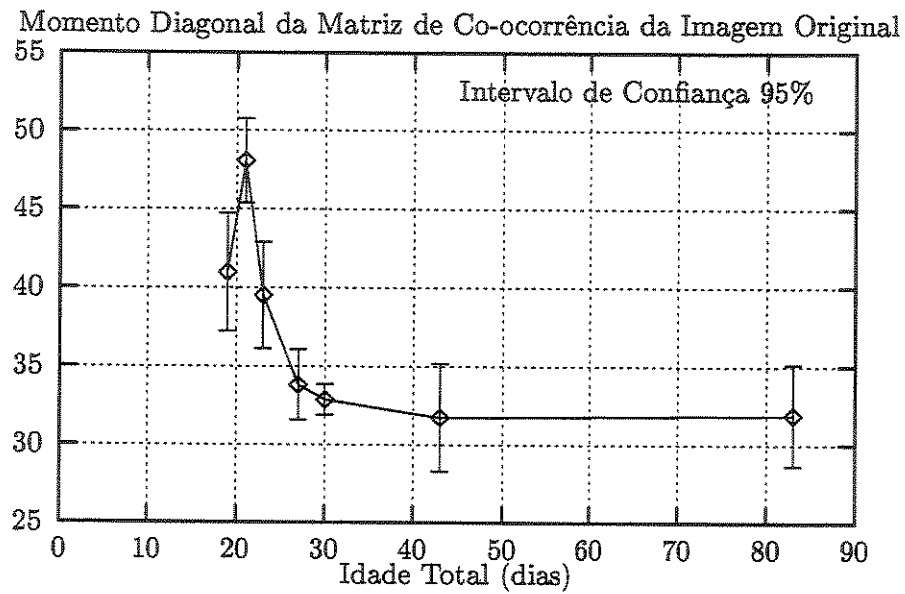


Figura 8.11: Momento diagonal da matriz de co-ocorrência da imagem dos núcleos dos cardiomiócitos ($p=4,93 \cdot 10^{-9}$, $H=49,896$, teste de Kruskal-Wallis).

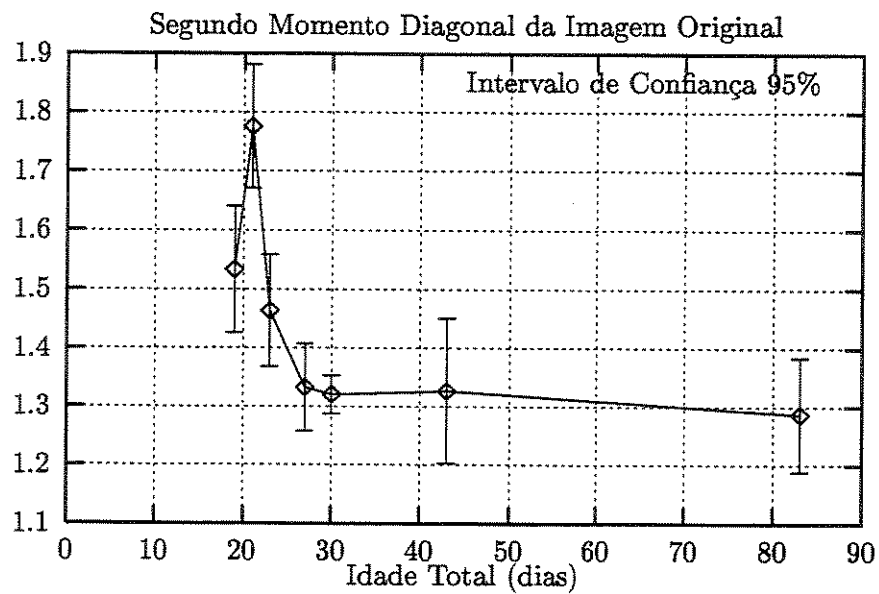


Figura 8.12: Segundo momento diagonal da matriz de co-ocorrência da imagem dos núcleos dos cardiomiócitos ($p=10^{-}$, $H=$, teste de Kruskal-Wallis).

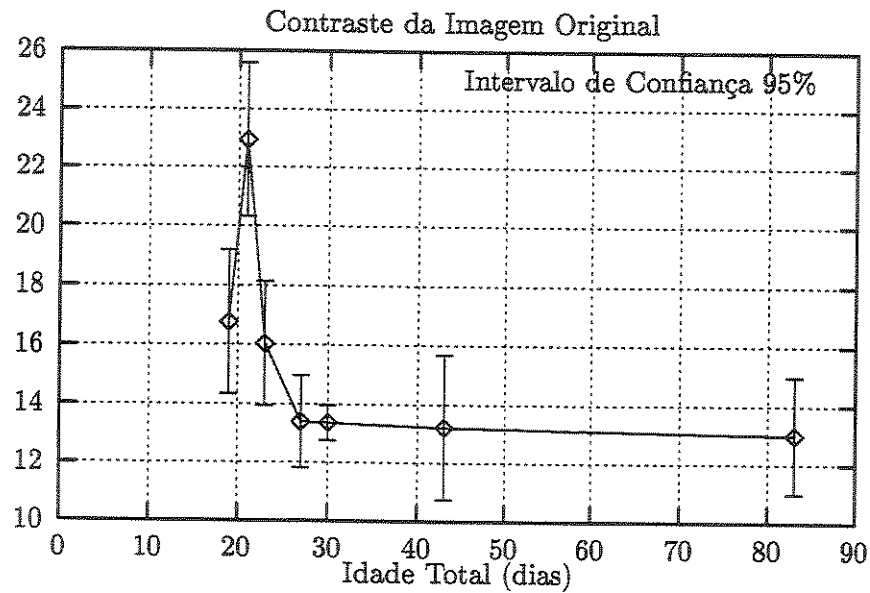


Figura 8.13: Contraste da matriz de co-ocorrência da imagem dos núcleos dos cardiomiócitos ($p=5,39 \cdot 10^{-7}$, $H=39,93$, teste de Kruskal-Wallis).

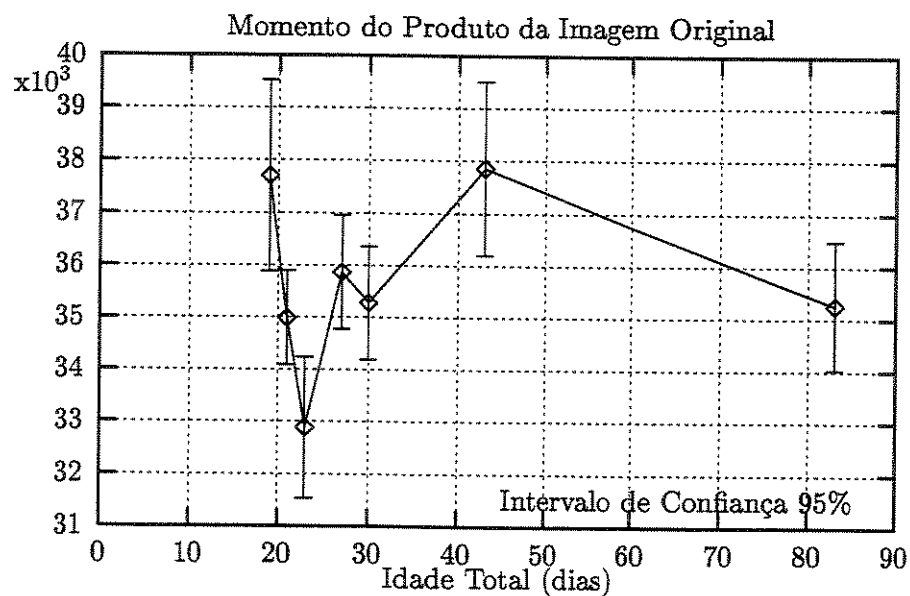


Figura 8.14: Momento do produto da matriz de co-ocorrência da imagem dos núcleos dos cardiomiócitos ($p=6,03 \cdot 10^{-4}$, $H=23,66$, teste de Kruskal-Wallis).

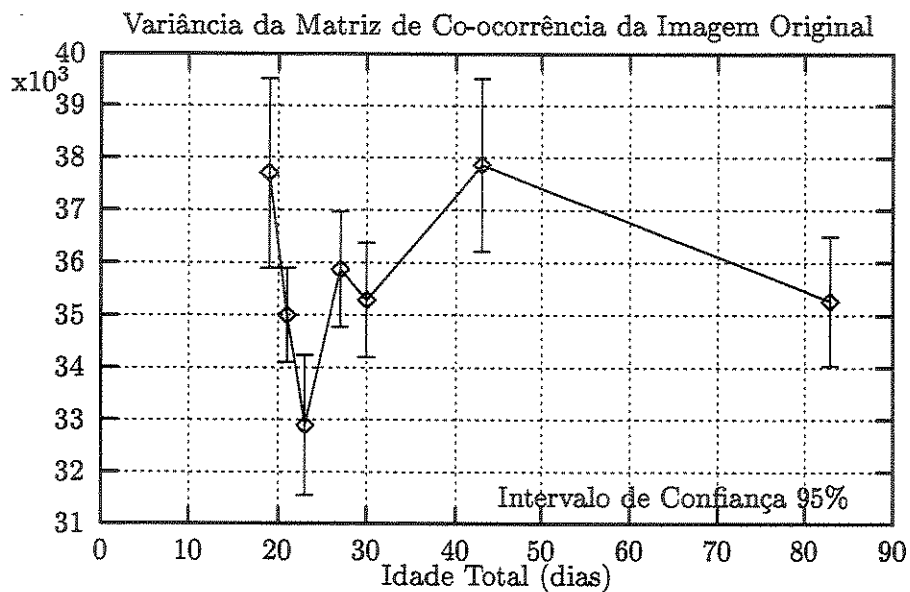


Figura 8.15: Soma dos quadrados (variância) da matriz de co-ocorrência da imagem dos núcleos dos cardiomiócitos ($p=5,64 \cdot 10^{-4}$, $H=23,818$, teste de Kruskal-Wallis).

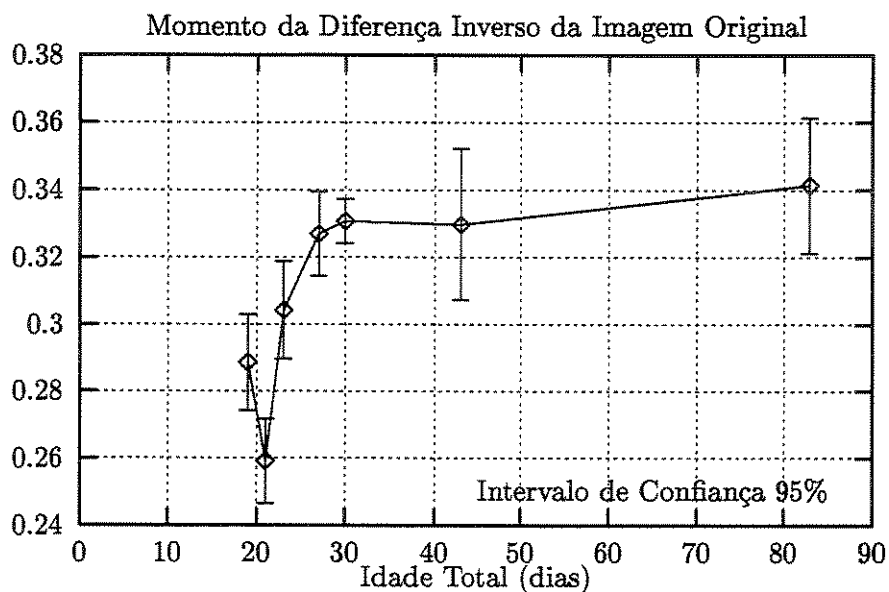


Figura 8.16: Momento inverso da diferença da matriz de co-ocorrência da imagem dos núcleos dos cardiomiócitos ($p=3,06 \cdot 10^{-9}$, $H=50,93$, teste de Kruskal-Wallis).

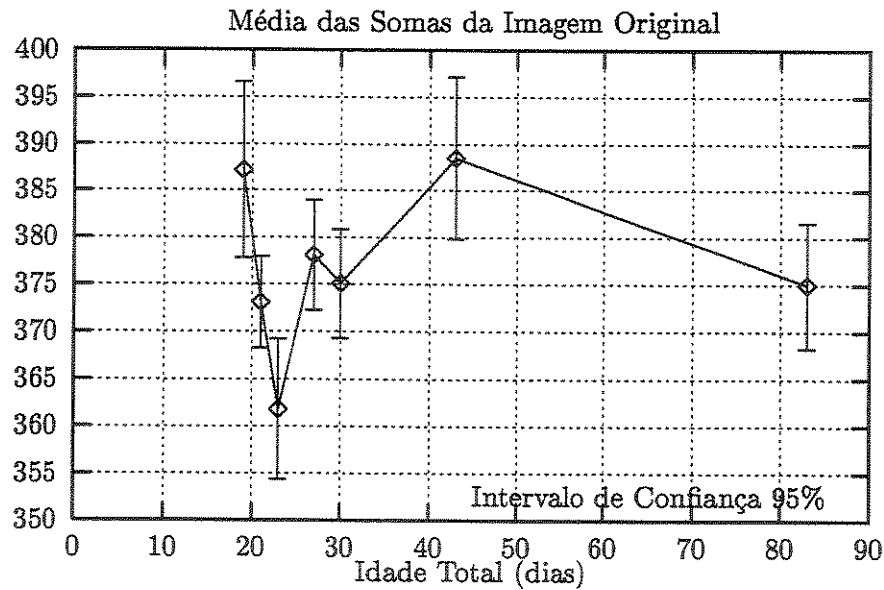


Figura 8.17: Média das somas da matriz de co-ocorrência da imagem dos núcleos dos cardiomiócitos ($p=5,67 \cdot 10^{-4}$, $H=23,8$, teste de Kruskal-Wallis).

apresenta um comportamento irregular, semelhante às figuras 8.14 e 8.15.

A figura 8.18 representa a inércia da textura nuclear, assumindo um pico no dia 21 de vida, estabilizando-se na idade adulta.

A homogeneidade local da textura nuclear é apresentada na figura 8.19. Esta variável apresenta valores mínimos no dia 21, com aumento progressivo, mais rápido nos primeiros dias de vida pós-parto. Gráfico semelhante ao momento inverso da diferença (figura 8.16).

A figura 8.20 representa a proeminência dos agrupamentos da textura nuclear, que assume valores máximos no dia 21, e rapidamente diminui nos primeiros dias de vida pós-parto, estabilizando-se em seguida.

O efeito das diferentes texturas artificiais na proeminência dos agrupamentos é ilustrada na figura 8.21. Observa-se que a textura nuclear original assume valores muito próximos aos da textura ordenada. Entretanto, não estão representadas as linhas da textura 'xadrez' (cujos valores foram sempre zero), 'aleatório' e 'harmônico' cujos valores foram muito maiores, na ordem de $2,8 \cdot 10^8$ e $1,3 \cdot 10^9$, respectivamente.

A figura 8.22 descreve o comportamento do desvio-padrão da matriz de co-ocorrência

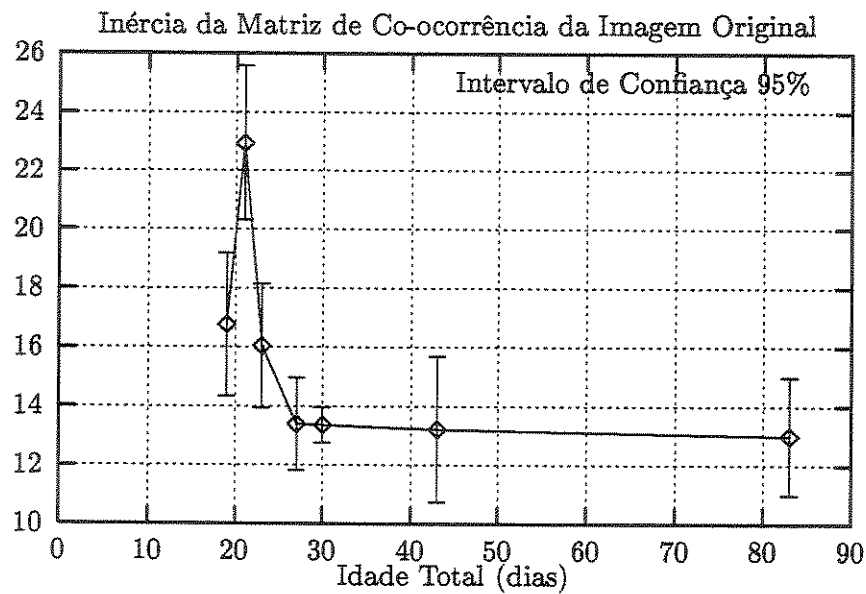


Figura 8.18: Inércia da matriz de co-ocorrência da imagem dos núcleos dos cardiomiócitos ($p=5,39 \cdot 10^{-7}$, $H=39,63$, teste de Kruskal-Wallis).

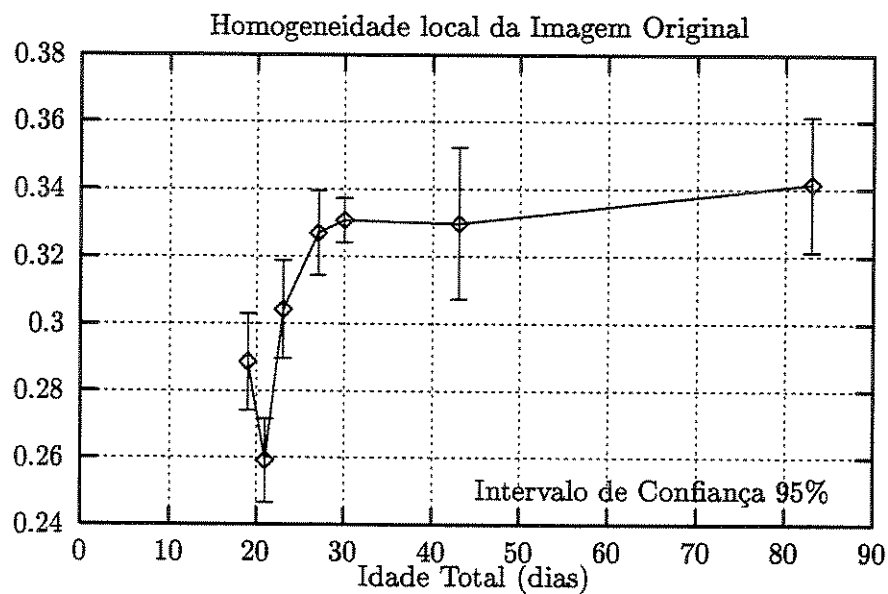


Figura 8.19: Homogeneidade local da matriz de co-ocorrência da imagem dos núcleos dos cardiomiócitos ($p=3,06 \cdot 10^{-9}$, $H=50,93$, teste de Kruskal-Wallis).

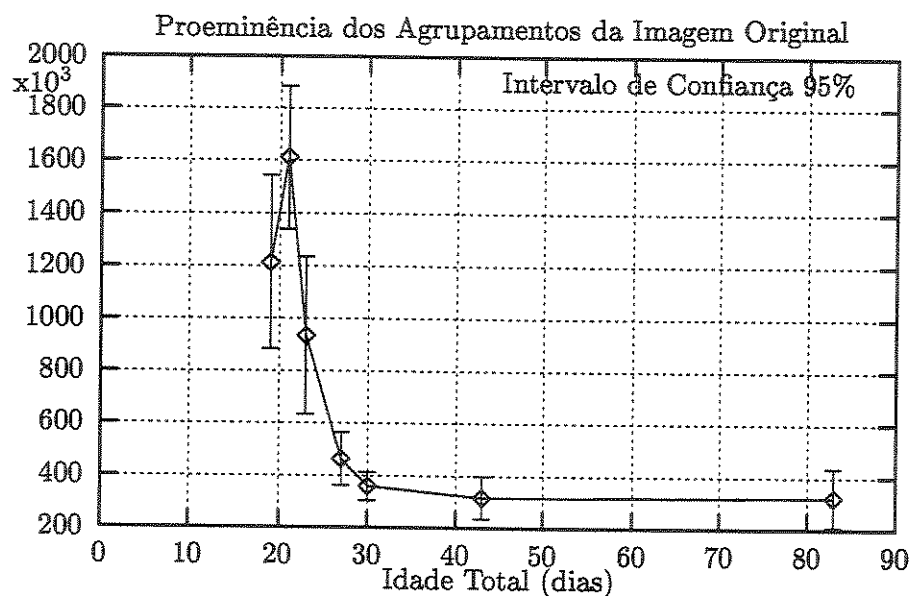


Figura 8.20: Proeminência dos agrupamentos da matriz de co-ocorrência da imagem dos núcleos dos cardiomiócitos ($p=3, 1.10^{-11}$, $H=60,798$, teste de Kruskal-Wallis).

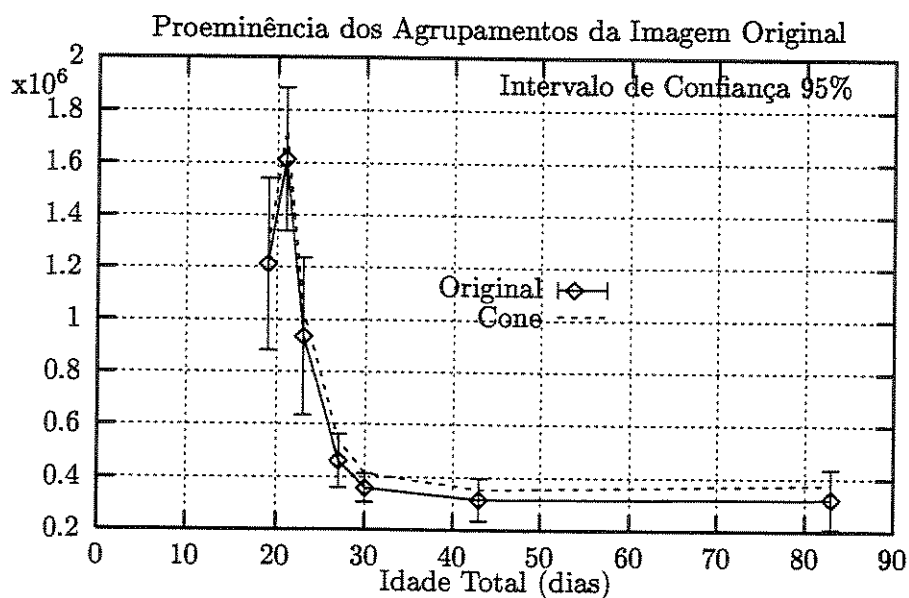


Figura 8.21: Efeito das texturas na proeminência dos agrupamentos da imagem dos núcleos dos cardiomiócitos.

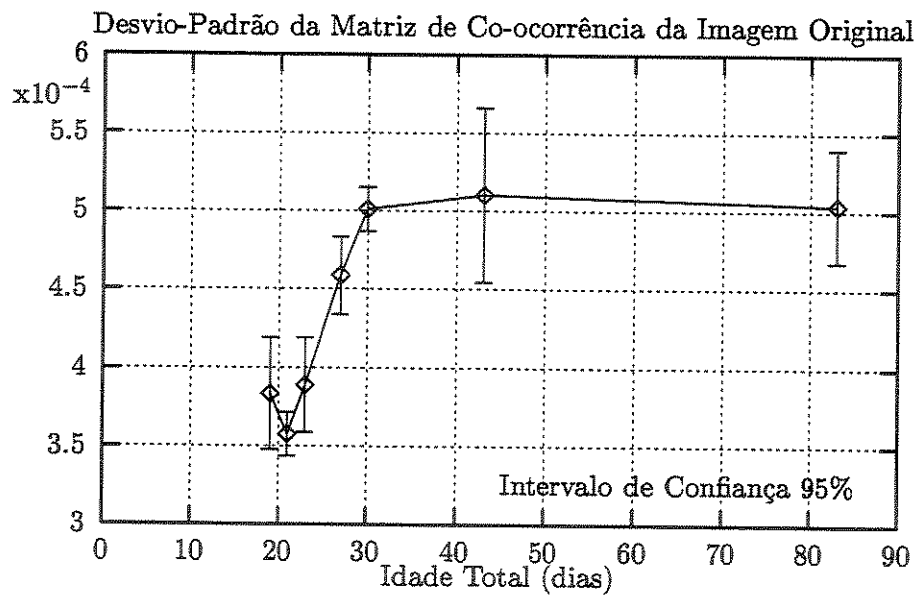


Figura 8.22: Desvio-padrão da matriz de co-ocorrência da imagem dos núcleos dos cardiomiócitos ($p=4,51.10^{-10}$, $H=55,06$, teste de Kruskal-Wallis).

da imagem dos núcleos dos cardiomiócitos, com valores mínimos no dia 21 de vida total, com aumento acentuado nos primeiros dias de vida pós-parto, com estabilização a partir do dia 30 de vida total.

A tonalidade dos agrupamentos dos núcleos (figura 8.23) é a única variável com valores negativos, apresentando valores mínimos no final da gestação, com aumento rápido até o dia 27 de vida total (dia 5 de vida pós-parto), com estabilização dos seus valores a partir dessa idade.

A figura 8.24 descreve o efeito de texturas artificiais na tonalidade dos agrupamentos. A textura 'ordenada' apresenta valores muito próximos aos da textura nuclear 'original' em todas as etapas do desenvolvimento. A textura 'aleatória' se torna próxima da textura 'original' a partir do dia 43 após a concepção. A textura 'xadrez' sempre assumiu valor zero em todas as idades.

A entropia da imagem dos núcleos (figura 8.25) apresenta valores máximos no dia 21 da gestação, com redução progressiva a partir de então, com diminuição mais intensa nos primeiros dias de vida pós-parto.

As diferentes texturas artificiais, quando utilizadas para se calcular a entropia da ma-

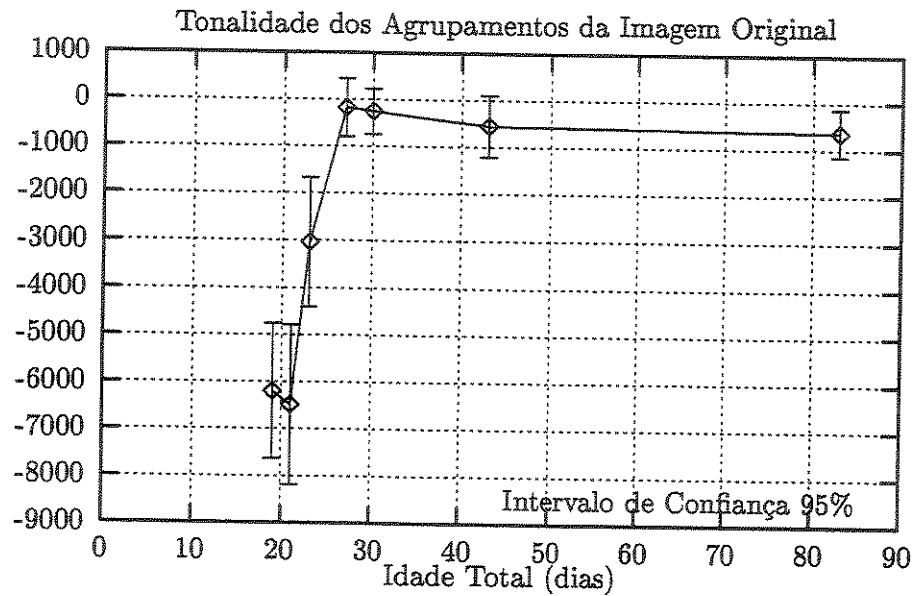


Figura 8.23: Tonalidade dos agrupamentos da matriz de co-ocorrência da imagem dos núcleos dos cardiomiócitos ($p=9,25 \cdot 10^{-11}$, $H=58,458$, teste de Kruskal-Wallis).

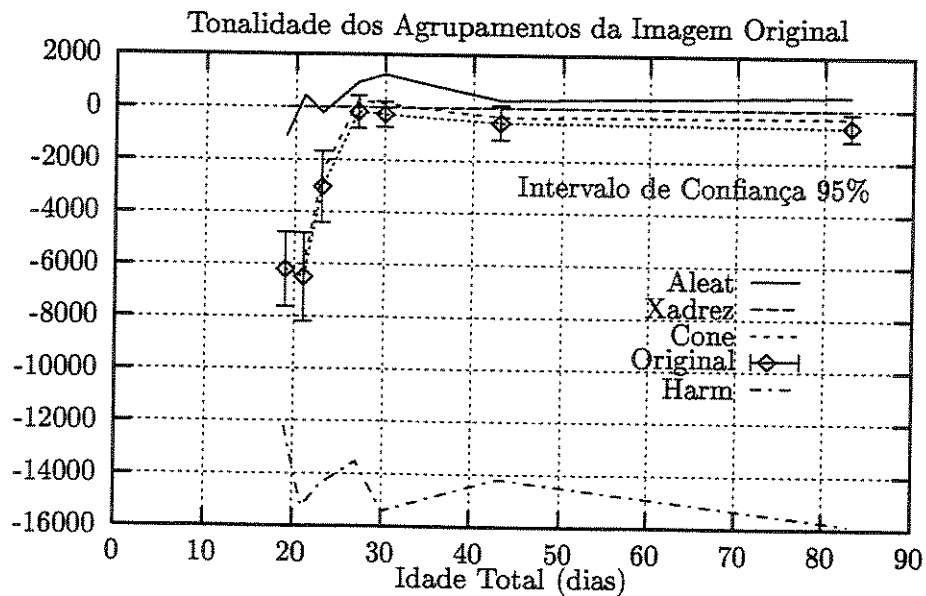


Figura 8.24: Efeito das texturas na tonalidade dos agrupamentos da imagem transformada dos núcleos dos cardiomiócitos.

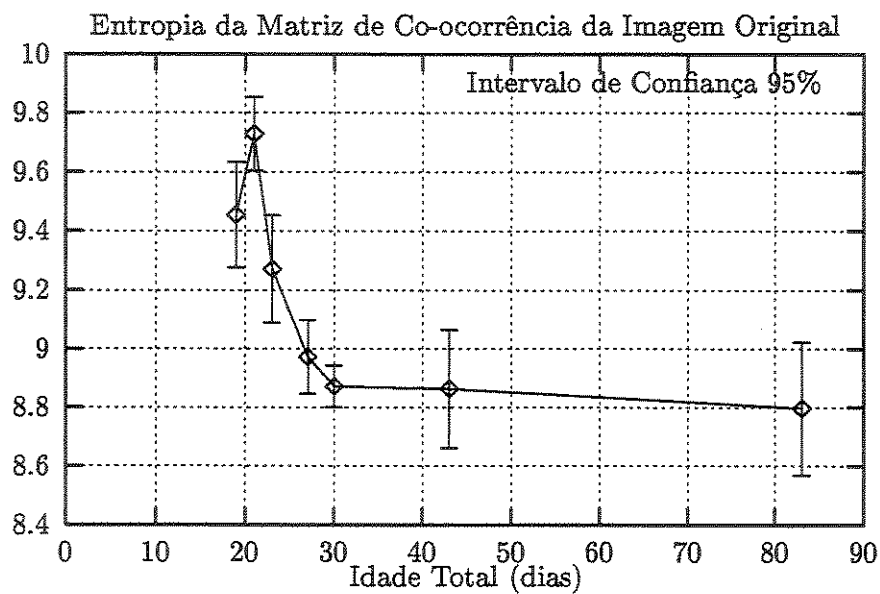


Figura 8.25: Entropia da matriz de co-ocorrência da imagem dos núcleos dos cardiomiócitos ($p=4, 32 \cdot 10^{-10}$, $H=55,15$, teste de Kruskal-Wallis).

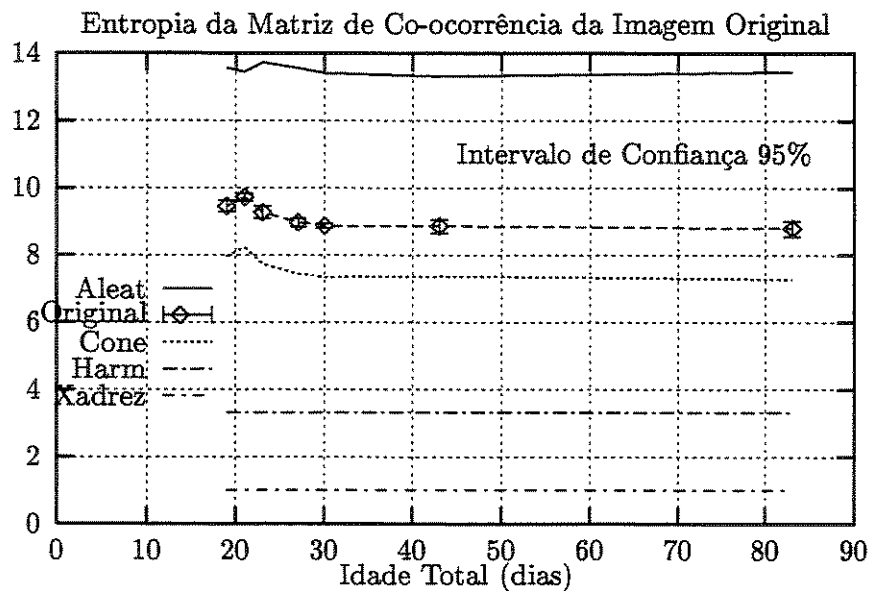


Figura 8.26: Efeito das texturas na entropia da matriz de co-ocorrência da imagem dos núcleos dos cardiomiócitos.

triz de co-ocorrência (figura 8.26), formaram um gráfico extremamente interessante: os maiores valores da entropia da matriz de co-ocorrência são da textura 'aleatória', seguida pela textura 'original', 'ordenada', 'harmônica' e 'xadrez'.

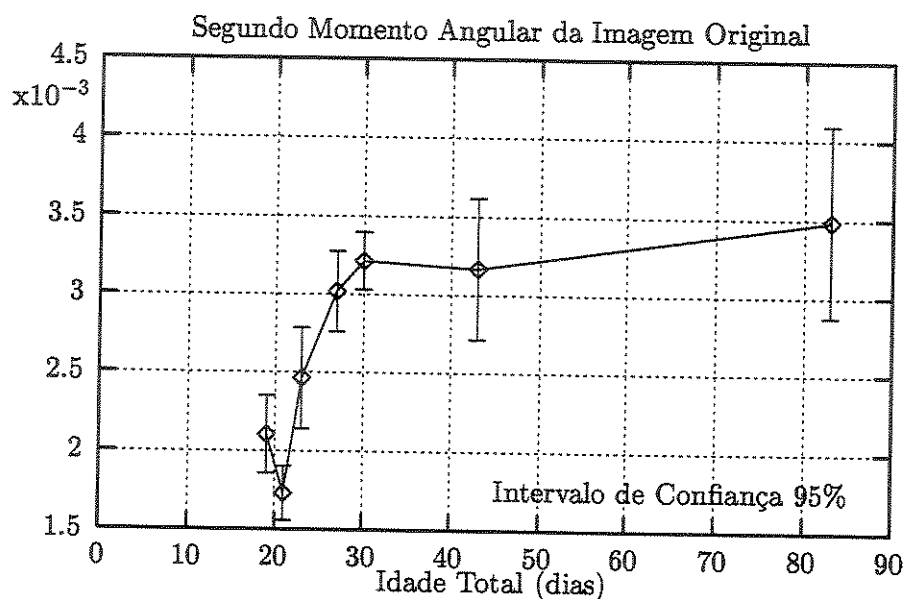


Figura 8.27: Segundo momento angular da matriz de co-ocorrência da imagem dos núcleos dos cardiomiócitos ($p=6,68 \cdot 10^{-10}$, $H=54,21$, teste de Kruskal-Wallis).

O segundo momento angular (figura 8.27) apresenta um comportamento semelhante à figura anterior, apenas com um leve aumento no dia 83 de vida total (dia 60 de vida pós-parto).

A probabilidade do pico de transição (figura 8.28) é muito semelhante à figura 8.28, com poder discriminante muito próximo.

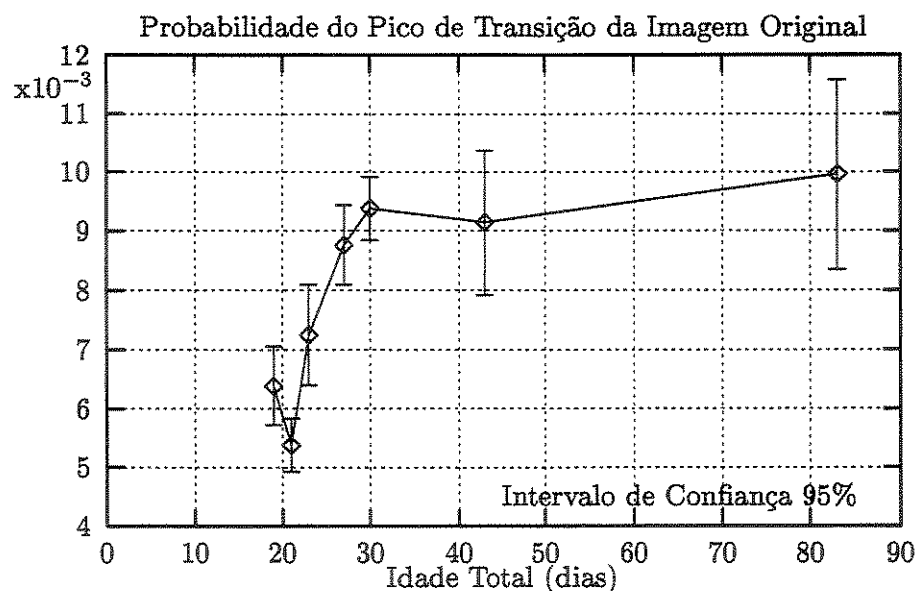


Figura 8.28: Probabilidade do pico de transição da matriz de co-ocorrência da imagem dos núcleos dos cardiomiócitos ($p=9,94 \cdot 10^{-10}$, $H=53,36$, teste de Kruskal-Wallis).

8.4 Análise textural da transformada de Fourier

A figura 8.29 apresenta a variável com o melhor poder discriminante entre aquelas derivadas da matriz de co-ocorrência. Apresenta valores máximos no dia 21, com rápido declínio nos primeiros dias pós-parto, com estabilização a partir do dia 30 (dia 8 pós-parto).

A figura 8.30 retrata a importante queda do poder discriminante da proeminência dos agrupamentos da imagem transformada devido à ausência do amaciamento das bordas dos núcleos. Observa-se uma mudança importante no comportamento da variável, chegando a alcançar valores nove vezes maiores.

O efeito das diferentes texturas artificiais na proeminência dos agrupamentos é mostrado na figura 8.31. A textura 'xadrez' apresentou os maiores valores, seguido pelas texturas 'original', 'harmônica', 'aleatória' e 'ordenada'. É interessante observar que, utilizando-se esta variável, a textura 'original' varia entre as texturas 'xadrez' e 'harmônica'.

A tonalidade dos agrupamentos da imagem transformada dos cardiomiócitos (figura 8.32) apresenta valores máximos no dia 21, com uma queda abrupta dos seus valores ao nascimento, apresentando a partir de então um comportamento estabilizado.

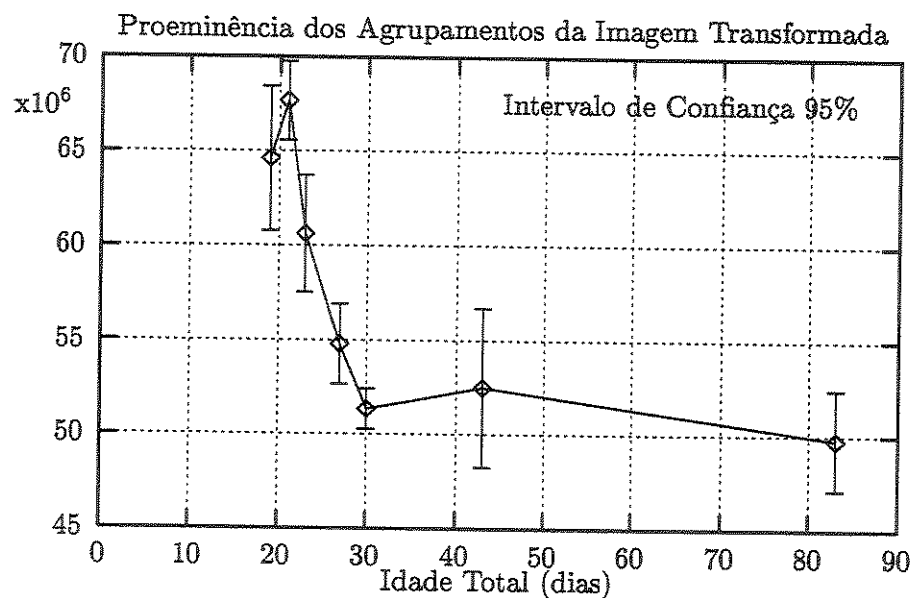


Figura 8.29: Proeminência dos Agrupamentos da matriz de co-ocorrência da Imagem Transformada ($p=2,26 \cdot 10^{-11}$, $H=61,47$, teste de Kruskal-Wallis).

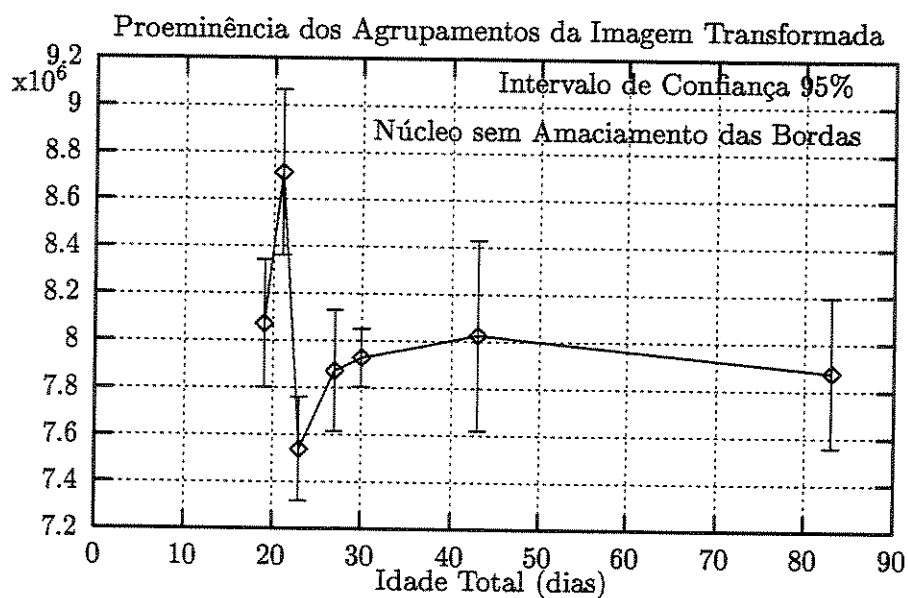


Figura 8.30: Proeminência dos agrupamentos da imagem transformada sem amaciamento das bordas dos núcleos dos cardiomiócitos ($p=8,45 \cdot 10^{-5}$, $H=28,2441$, teste de Kruskal-Wallis).

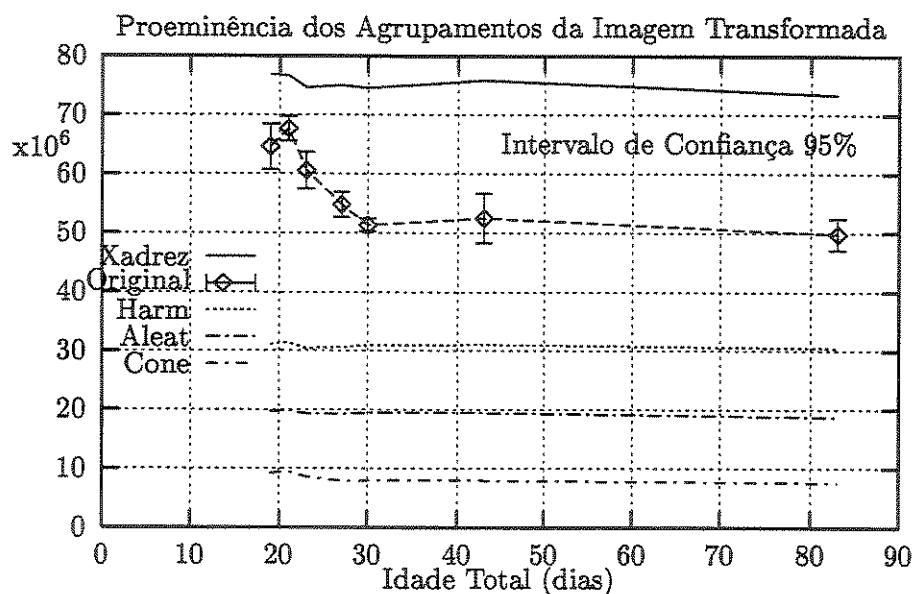


Figura 8.31: Efeito das texturas na proeminência dos agrupamentos da imagem transformada dos núcleos dos cardiomiócitos.

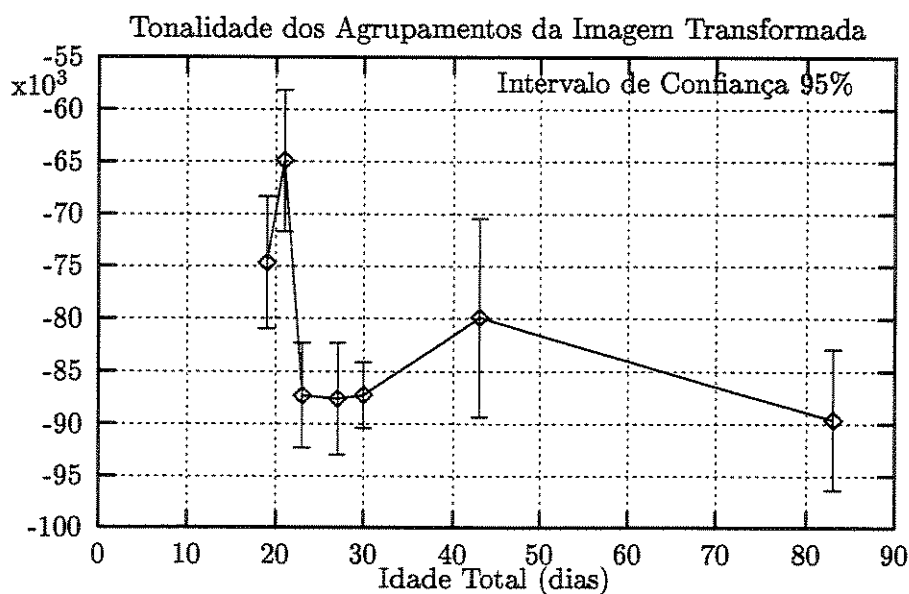


Figura 8.32: Tonalidade dos agrupamentos da imagem transformada dos cardiomiócitos ($p=7,45 \cdot 10^{-6}$, $H=33,77$, teste de Kruskal-Wallis).

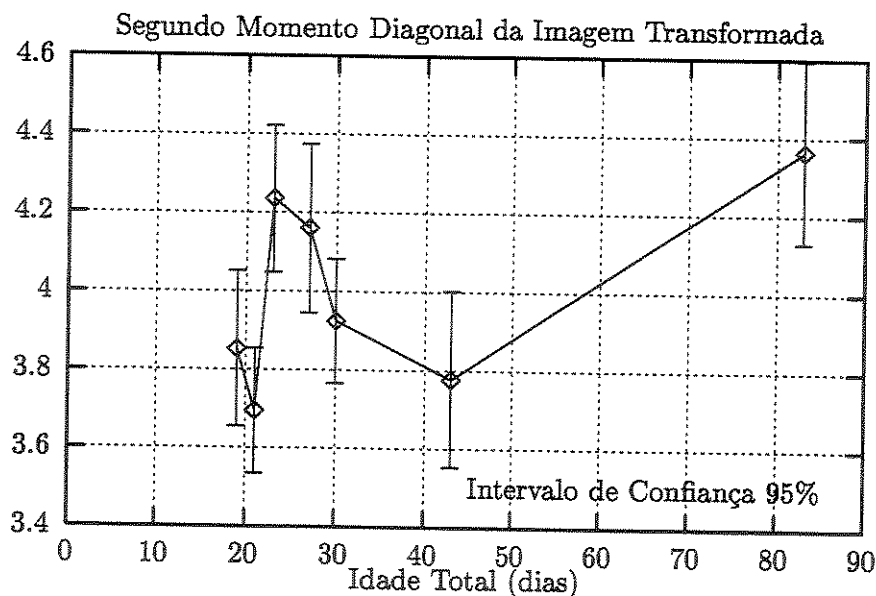


Figura 8.33: Segundo momento diagonal da imagem transformada dos cardiomiócitos ($p=9,65 \cdot 10^{-5}$, $H=27,938$, teste de Kruskal-Wallis).

O segundo momento diagonal da imagem transformada dos cardiomiócitos (figura 8.33) apresenta um comportamento muito irregular, com valores mínimos nos dias 21 e 43 de vida após a concepção, e valores máximos no dia 83.

O comportamento do contraste da imagem transformada dos cardiomiócitos (figura 8.34) é idêntico à figura 8.33 (segundo momento diagonal da imagem transformada).

A variância (soma dos quadrados) da matriz de co-ocorrência da imagem transformada dos cardiomiócitos (figura 8.35) apresenta valores máximos entre os dias 19 e 23 de vida após a concepção, rezundindo-se rapidamente nos primeiros dias após a concepção, com estabilização a partir do dia 30.

O momento da diferença inverso da imagem transformada dos núcleos dos cardiomiócitos (figura 8.36) apresenta um comportamento muito irregular, inversamente proporcional ao comportamento do segundo momento diagonal (figura 8.33) e do contraste (figura 8.34).

A figura 8.37 representa a média das somas da matriz de co-ocorrência da imagem transformada dos núcleos dos cardiomiócitos, com comportamento muito semelhante ao da variância da matriz de co-ocorrência (figura 8.35).

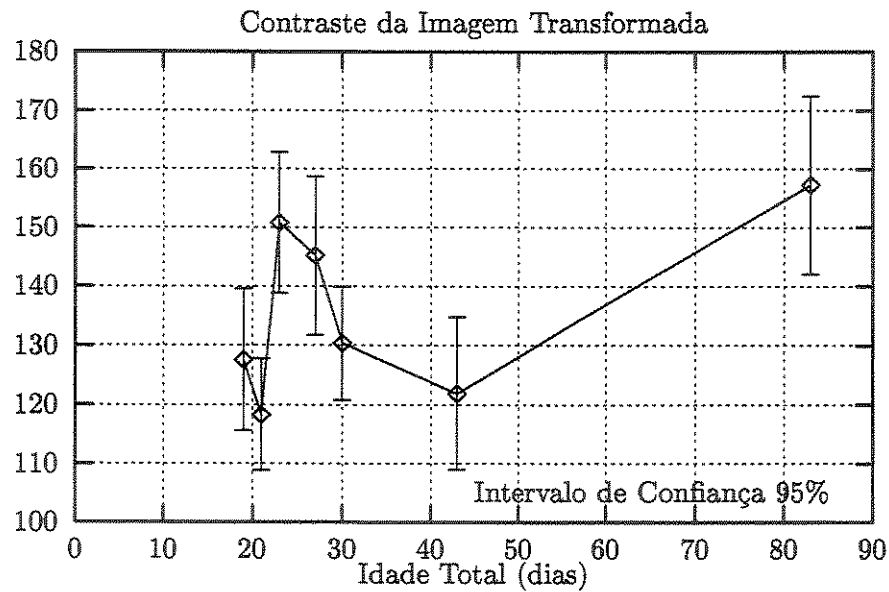


Figura 8.34: Contraste da imagem transformada dos cardiomiócitos ($p=2,0 \cdot 10^{-4}$, $H=26,255$, teste de Kruskal-Wallis).

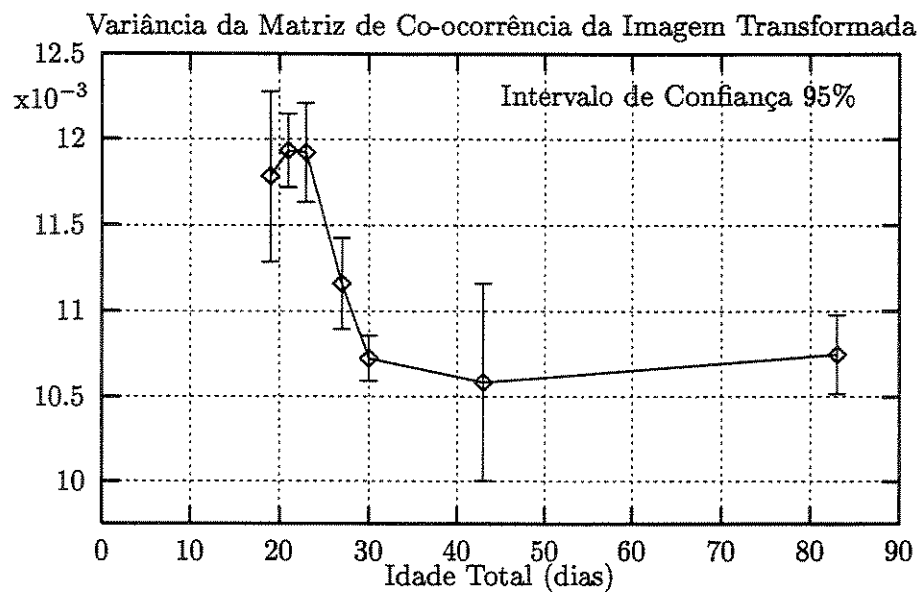


Figura 8.35: Soma dos quadrados (variância) da matriz de co-ocorrência da imagem transformada dos cardiomiócitos ($p=2,6 \cdot 10^{-9}$, $H=51,279$, teste de Kruskal-Wallis).

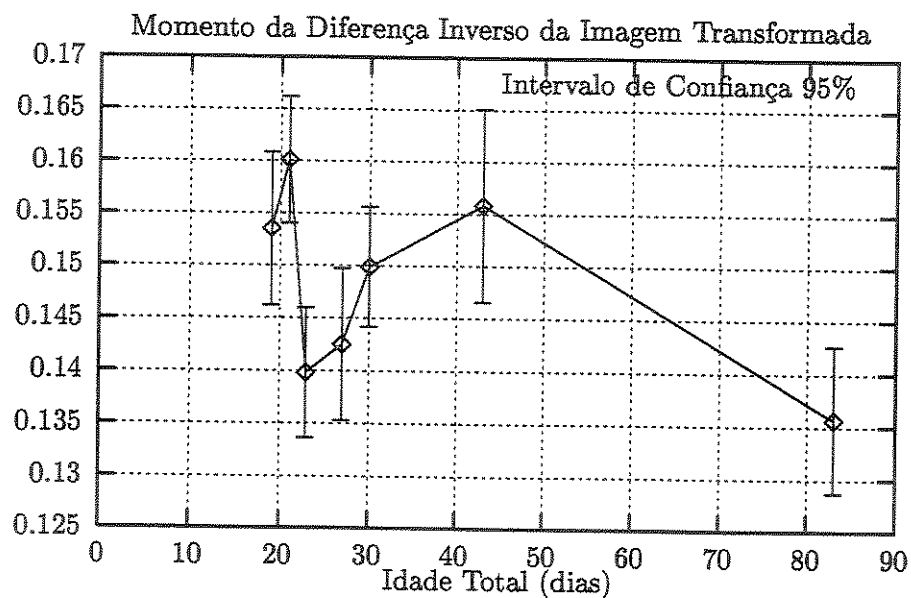


Figura 8.36: Momento da diferença inverso da imagem transformada dos cardiomiócitos ($p=7,76 \cdot 10^{-5}$, $H=28,441$, teste de Kruskal-Wallis).

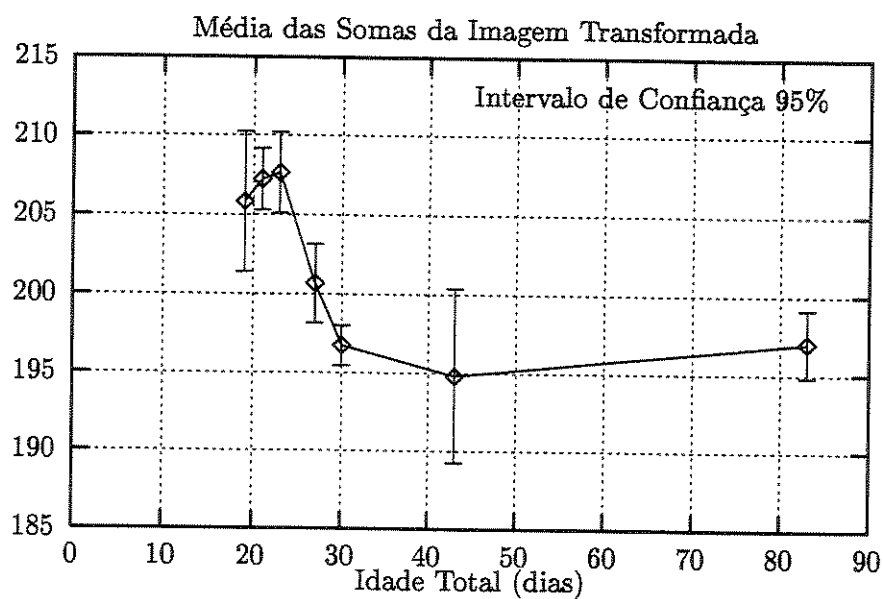


Figura 8.37: Média das somas da imagem transformada dos cardiomiócitos ($p=4,37 \cdot 10^{-9}$, $H=50,158$, teste de Kruskal-Wallis).

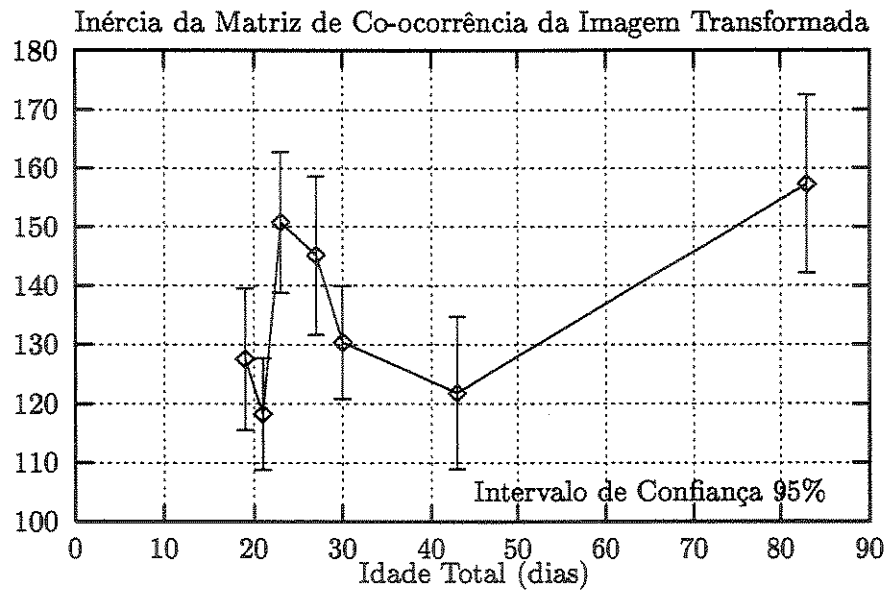


Figura 8.38: Inércia da matriz de co-ocorrência da imagem transformada dos cardiomiócitos ($p=2, 0.10^{-4}$, $H=26,255$, teste de Kruskal-Wallis).

A inércia da matriz de co-ocorrência da imagem transformada dos núcleos dos cardiomiócitos (figura 8.38) apresenta valores idênticas ao contraste da mesma imagem (figura 8.34).

A homogeneidade local da imagem transformada dos núcleos dos cardiomiócitos (figura 8.39) apresenta um comportamento muito irregular, semelhante ao do momento da diferença inverso (figura 8.36).

A figura 8.40 apresenta a evolução do momento do produto da imagem transformada dos núcleos dos cardiomiócitos apresenta um comportamento muito semelhante ao da média das somas da mesma imagem (figura 8.37).

O momento horizontal da imagem transformada dos núcleos dos cardiomiócitos (figura 8.41) apresenta um comportamento muito semelhante ao da figura anterior (momento do produto).

O momento vertical da imagem transformada dos núcleos dos cardiomiócitos (figura 8.42) apresenta um comportamento idêntico ao da figura anterior (momento horizontal).

A entropia normalizada da matriz de co-ocorrência da imagem transformada dos núcleos dos cardiomiócitos (figura 8.43) apresenta um comportamento muito semelhante ao da

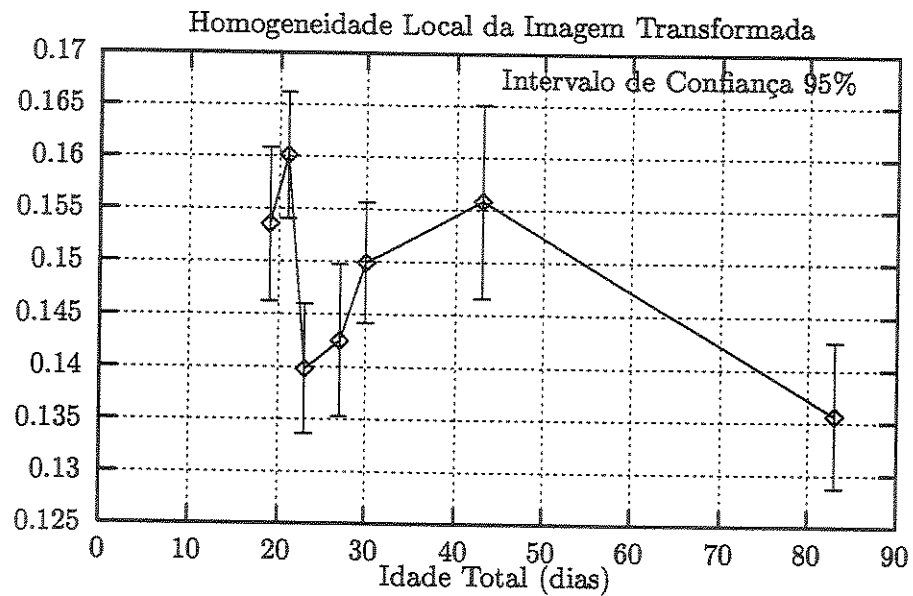


Figura 8.39: Homogeneidade local da imagem transformada dos cardiomiócitos ($p=7,76 \cdot 10^{-5}$, $H=28,441$, teste de Kruskal-Wallis).

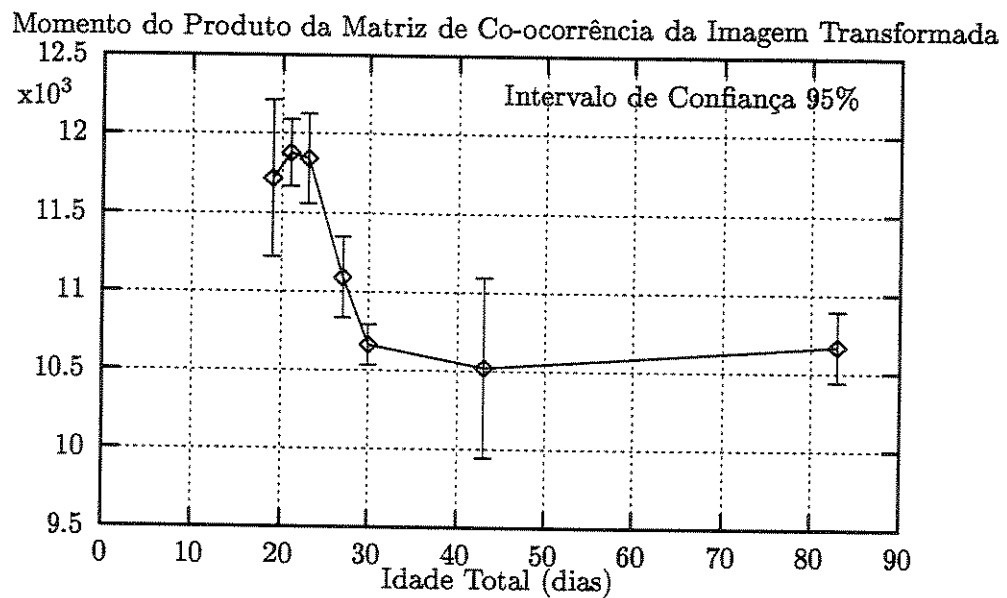


Figura 8.40: Momento do produto da imagem transformada dos cardiomiócitos ($p=2,21 \cdot 10^{-9}$, $H=51,63$, teste de Kruskal-Wallis).

Momento Horizontal (Mx) da Matriz de Co-ocorrência da Imagem Transformada

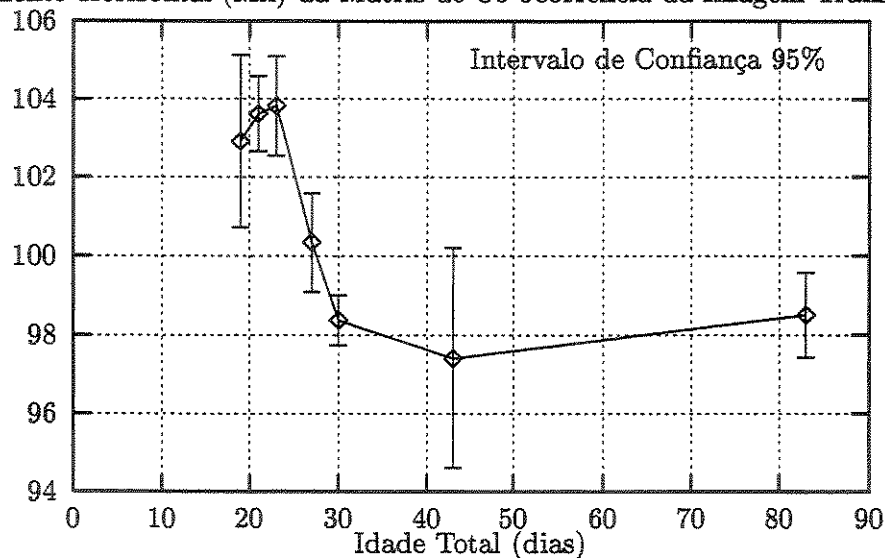


Figura 8.41: Momento horizontal (Mx) da imagem transformada dos cardiomiócitos ($p=4,37 \cdot 10^{-9}$, $H=50,158$, teste de Kruskal-Wallis).

Momento Vertical (My) da Matriz de Co-ocorrência da Imagem Transformada

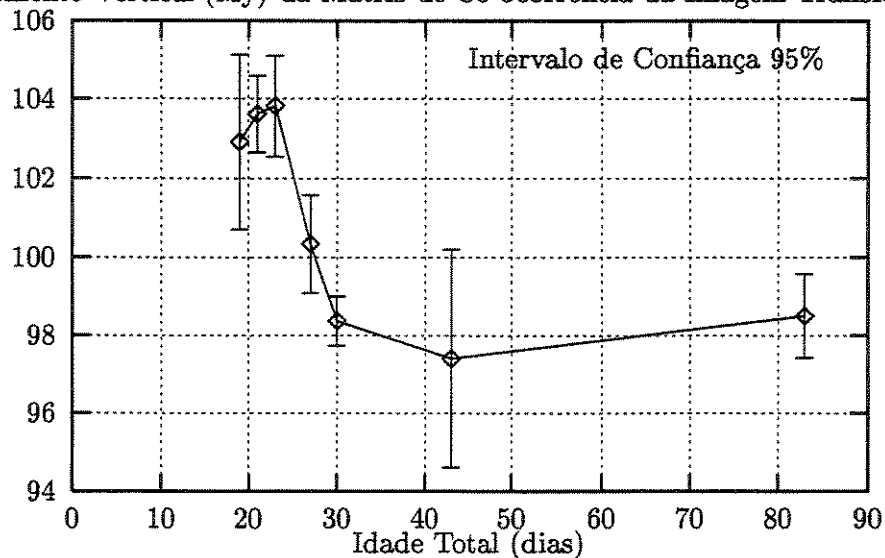


Figura 8.42: Momento vertical (My) da imagem transformada dos cardiomiócitos ($p=4,37 \cdot 10^{-9}$, $H=50,158$, teste de Kruskal-Wallis).

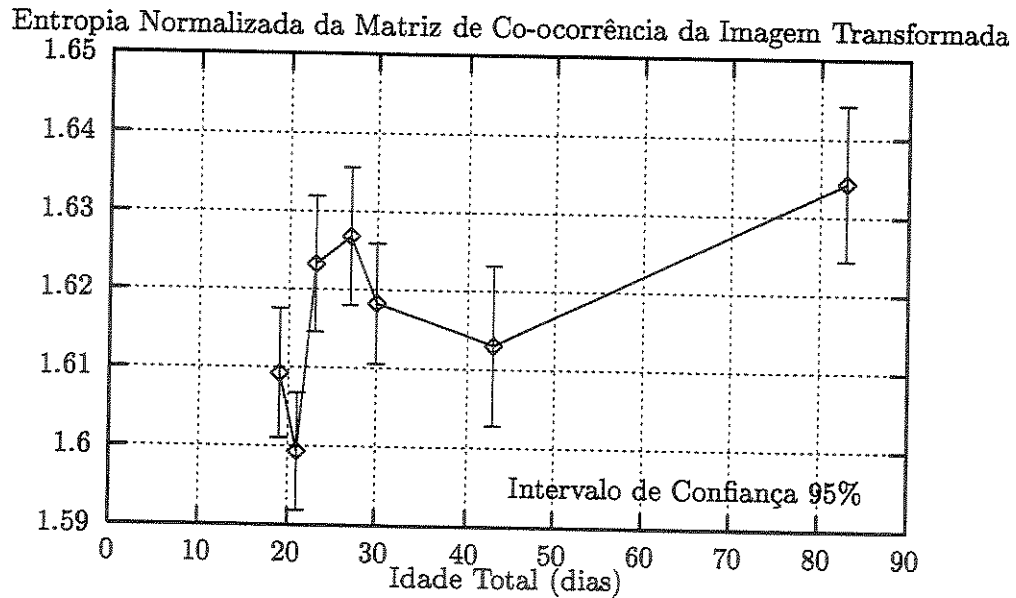


Figura 8.43: Entropia normalizada da matriz de co-ocorrência da imagem transformada dos cardiomiócitos ($p=5,88 \cdot 10^{-5}$, $H=29,079$, teste de Kruskal-Wallis).

Inércia da mesma imagem (figura 8.38).

8.5 Informações gerais das imagens transformadas

A luminância máxima da imagem transformada (figura 8.44) indica a intensidade máxima alcançada pelo logaritmo do momento de inércia. Apresenta um comportamento semelhante aos das figuras 8.40, 8.41 e 8.42.

A luminância máxima da imagem transformada sem amaciamento das bordas dos núcleos (figura 8.45) alcançou valores maiores do que a técnica com amaciamento das bordas. Entretanto, a variável sofreu uma importante queda do poder discriminante. Este gráfico é particularmente interessante porque esta variável foi a que obteve o melhor desempenho discriminante entre todas as variáveis calculadas a partir de imagens transformadas de núcleos sem amaciamento das bordas.

A luminância máxima da transformada de Fourier se altera com o uso de texturas artificiais, como é mostrado na figura 8.46. A textura 'ordenada' assume valores muito semelhantes, levemente inferiores aos da textura 'original'. Em ordem crescente, as texturas 'aleatória',

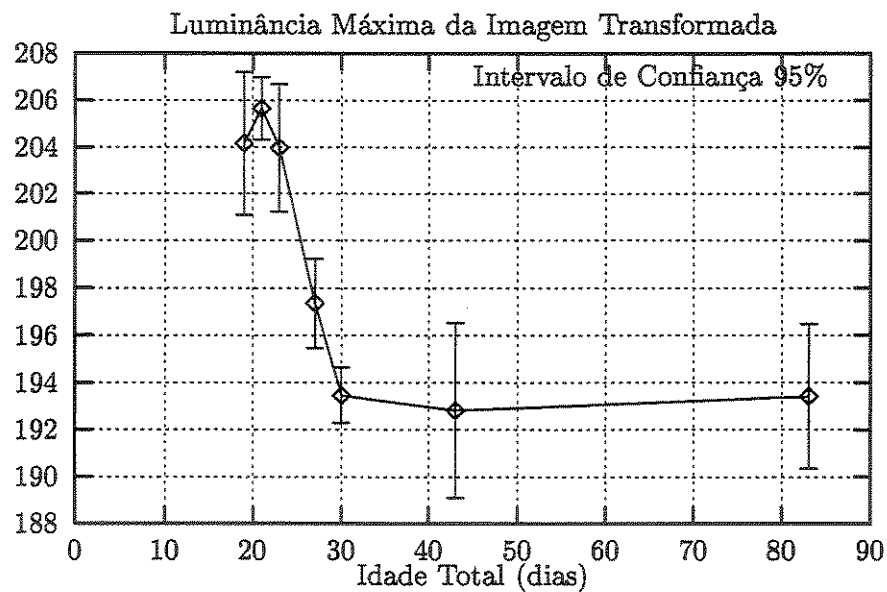


Figura 8.44: Luminância máxima da imagem transformada dos cardiomiócitos ($p=8,58.10^{-11}$, $H=58,619$, teste de Kruskal-Wallis).

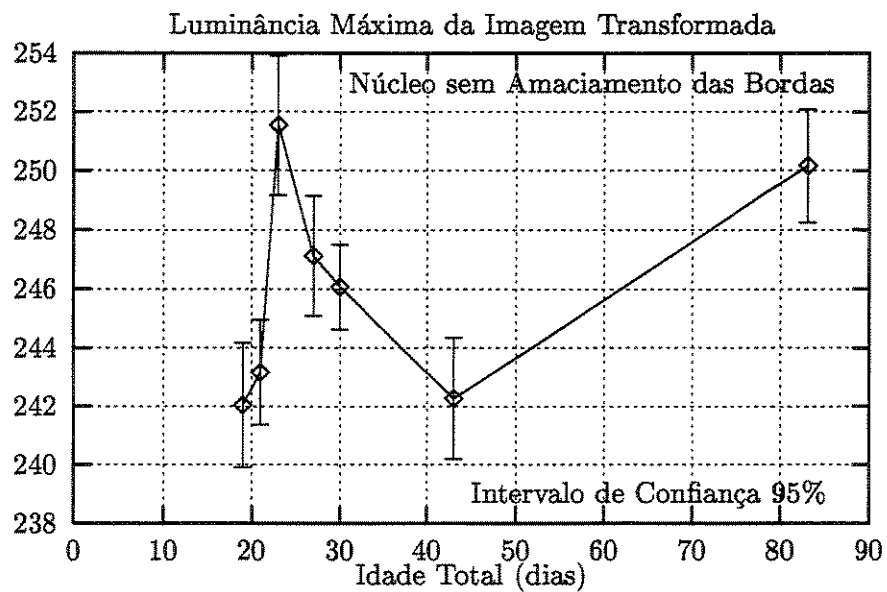


Figura 8.45: Luminância máxima da imagem transformada sem amaciamento das bordas dos núcleos dos cardiomiócitos ($p=1,02.10^{-7}$, $H=43,2919$, teste de Kruskal-Wallis).

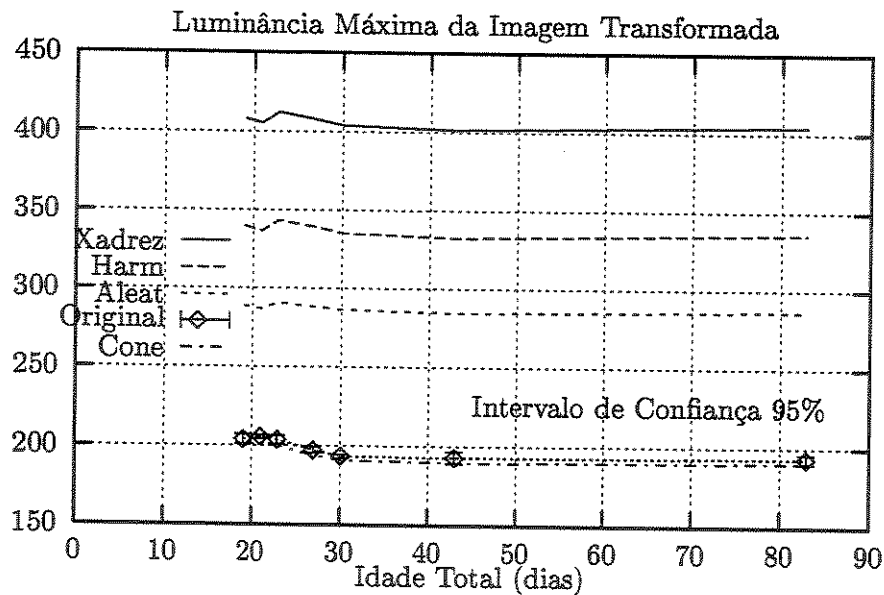


Figura 8.46: Efeito das texturas na luminância máxima da imagem transformada dos núcleos dos cardiomiócitos.

‘harmônica’ e ‘xadrez’ apresentam valores bem maiores que os da textura ‘original’.

A figura 8.47 apresenta a quantidade total de energia das oscilações da luminância no espaço contida na textura dos núcleos dos cardiomiócitos. Apresenta um comportamento muito irregular, assumindo valores mínimos no dia 23, e valores máximos nos dias 19 e 43 de vida após a concepção.

O momento de inércia total (figura 8.48) pode ser entendida como uma soma de todas as amplitudes das funções harmônicas que formam a imagem. Apresenta valores máximos em torno do dia 21 após a concepção, com queda rápida dos seus valores nos primeiros dias de vida pós-parto, estabilizando-se a partir do dia 30.

8.6 A distribuição da informação textural

A variável que isoladamente teve o melhor desempenho em discriminar os sete grupos etários foi a energia média do setor 16 (figura 8.49). Esta variável possui um comportamento muito semelhante ao do momento de inércia total (figura 8.48).

A energia média do setor 16 da imagem transformada dos núcleos sem amaciamento

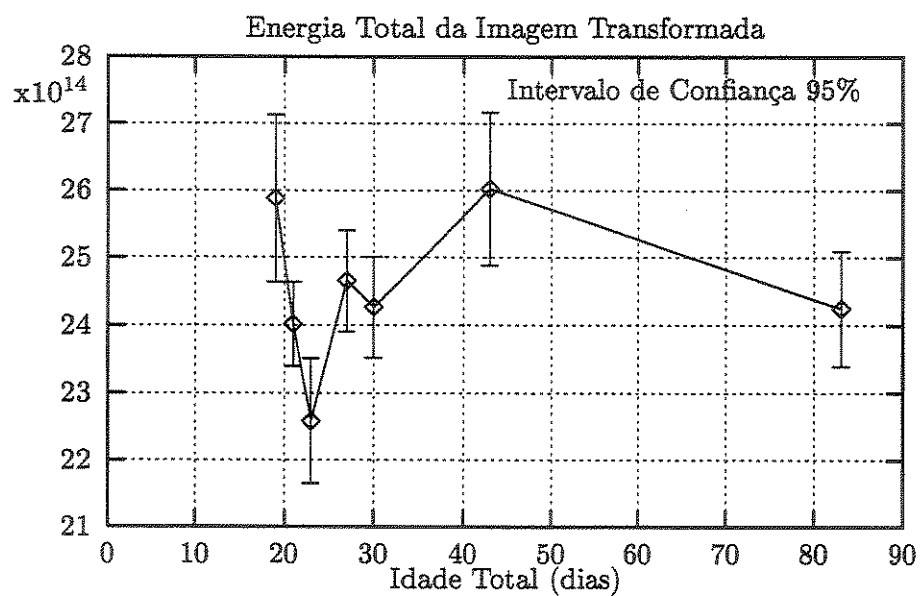


Figura 8.47: Energia total da imagem transformada dos núcleos dos cardiomiócitos ($p=5,08 \cdot 10^{-4}$, $H=24,064$, teste de Kruskal-Wallis).

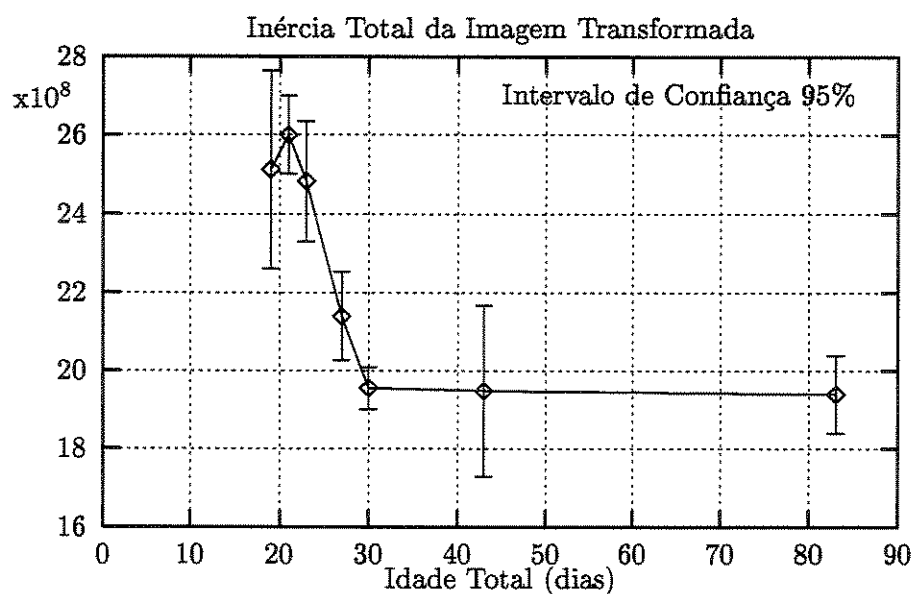


Figura 8.48: Momento de inércia total da imagem transformada dos cardiomiócitos ($p=3,53 \cdot 10^{-10}$, $H=55,583$, teste de Kruskal-Wallis).

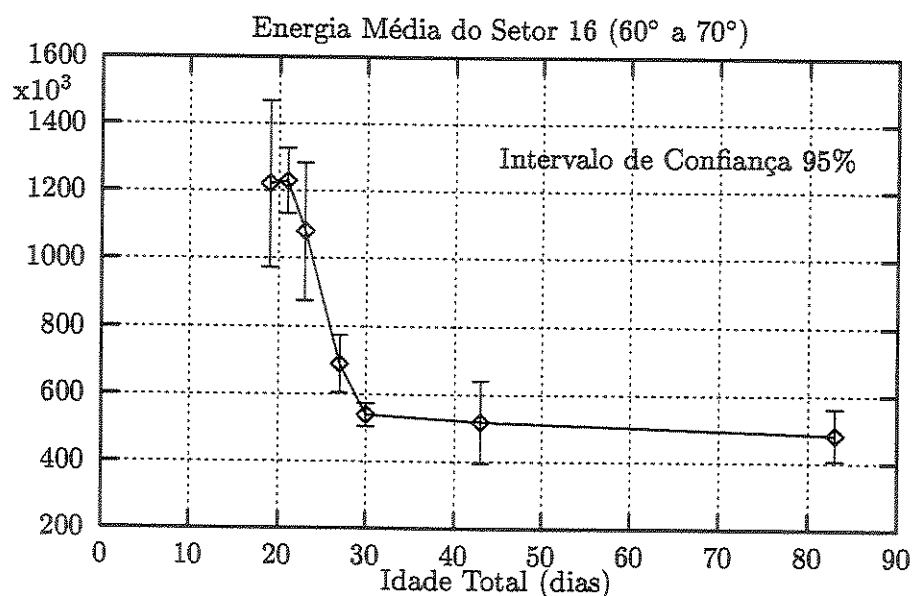


Figura 8.49: Energia média do setor 16 (entre 60° e 70° em sentido horário) da Imagem Transformada ($p=6,76 \cdot 10^{-12}$, $H=64,0435$, teste de Kruskal-Wallis).

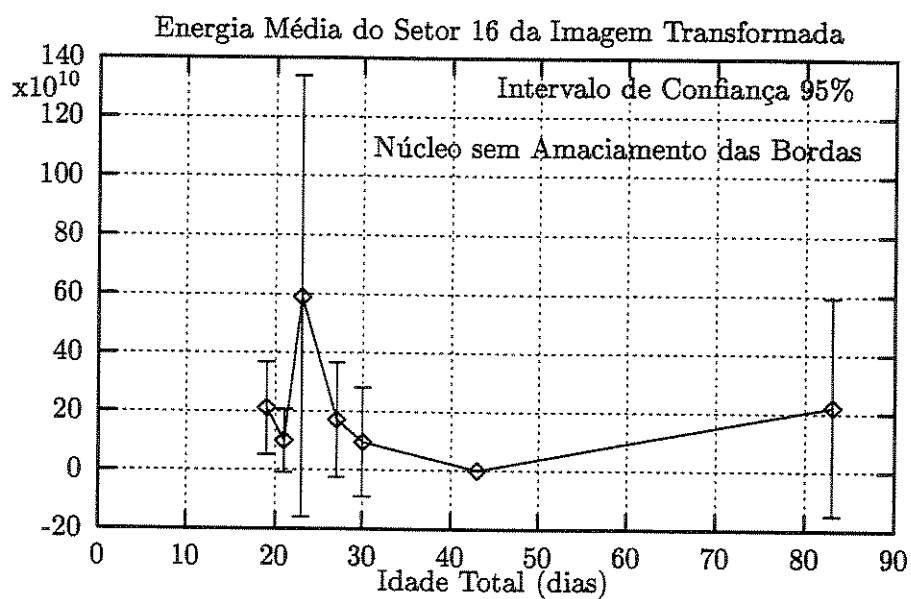


Figura 8.50: Energia média do setor 16 da imagem transformada sem amaciamento das bordas dos núcleos dos cardiomiócitos ($p=0,654$, $H=4,16493$, teste de Kruskal-Wallis).

das bordas (figura 8.50) é extremamente diferente por causa da brusca mudança da luminância nos contornos nucleares. Neste caso, a falta do amaciamento das bordas fez perder todo o poder discriminante da variável.

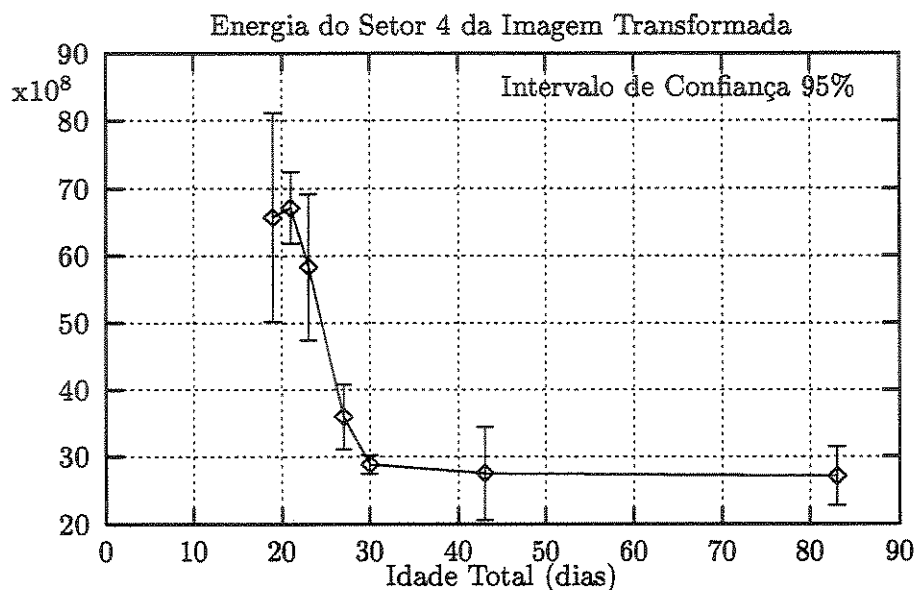


Figura 8.51: Energia do setor 4 da imagem transformada dos cardiomiócitos ($p=1,45 \cdot 10^{-11}$, $H=62,41$, teste de Kruskal-Wallis).

A energia do setor 4 (situada entre 50° e 60° em sentido anti-horário em relação à direção da maior corda) é mostrada na figura 8.51. Apresenta valores máximos ao redor do dia 21 após a concepção, sofre uma rápida redução nos primeiros dias de vida pós-parto, com estabilização após o dia 8 pós-parto (dia 30 após a concepção).

O momento de inércia médio do anel 2 (períodos espaciais entre 1,8 a $3,6 \mu\text{m}$, vide a tabela 12.3) foi a variável mais discriminante dentre aquelas que foram calculados a partir dos hemianéis da imagem transformada (figura 8.52). Seus valores são decrescentes com a idade, estabilizando-se a partir do dia 30 após a concepção (8 dias de vida pós-parto).

A figura 8.53 apresenta o momento de inércia médio do anel 2 da imagem transformada dos núcleos sem amaciamento das bordas. A presença de descontinuidades da imagem provoca uma sensível queda do poder discriminante.

A figura 8.54 descreve a energia contida no setor 7 (energia situada entre 60° e 70°

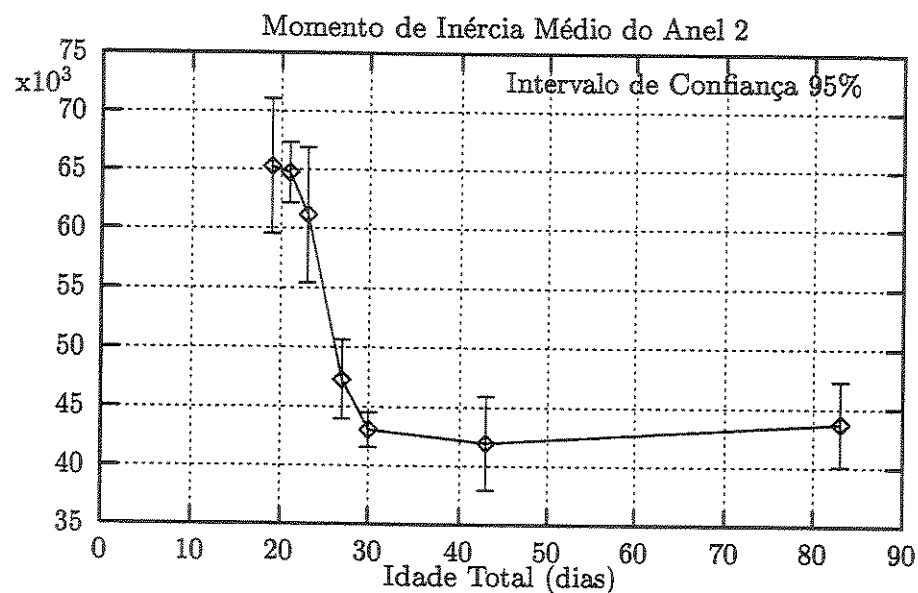


Figura 8.52: Momento de inércia médio do anel 2 (período espacial entre 1,8 e 3,4 μm) da imagem transformada ($p=1,87 \cdot 10^{-11}$, $H=61,875$, teste de Kruskal-Wallis).

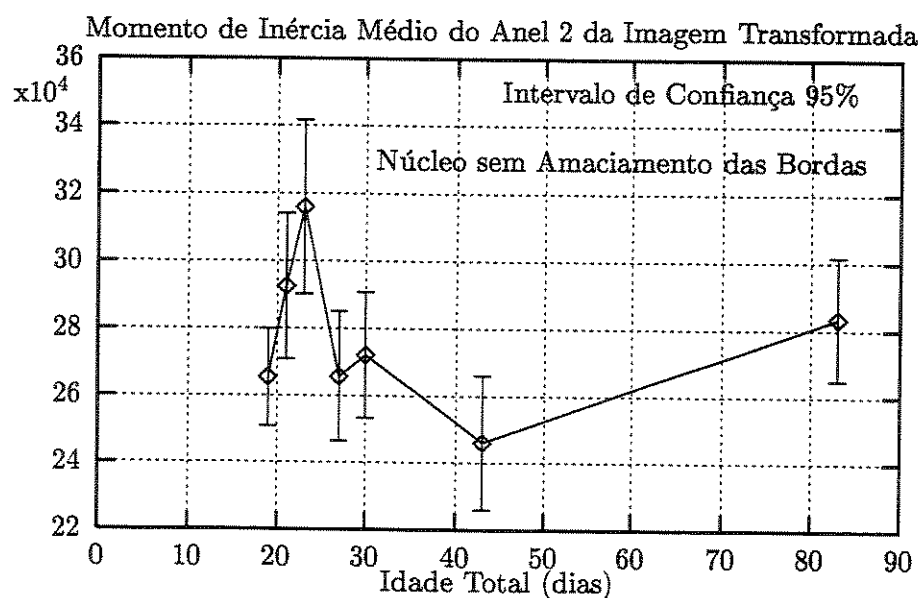


Figura 8.53: Momento de inércia médio do anel 2 da imagem transformada sem amaciamento das bordas dos núcleos dos cardiomiócitos ($p=2,06 \cdot 10^{-3}$, $H=20,7079$, teste de Kruskal-Wallis).

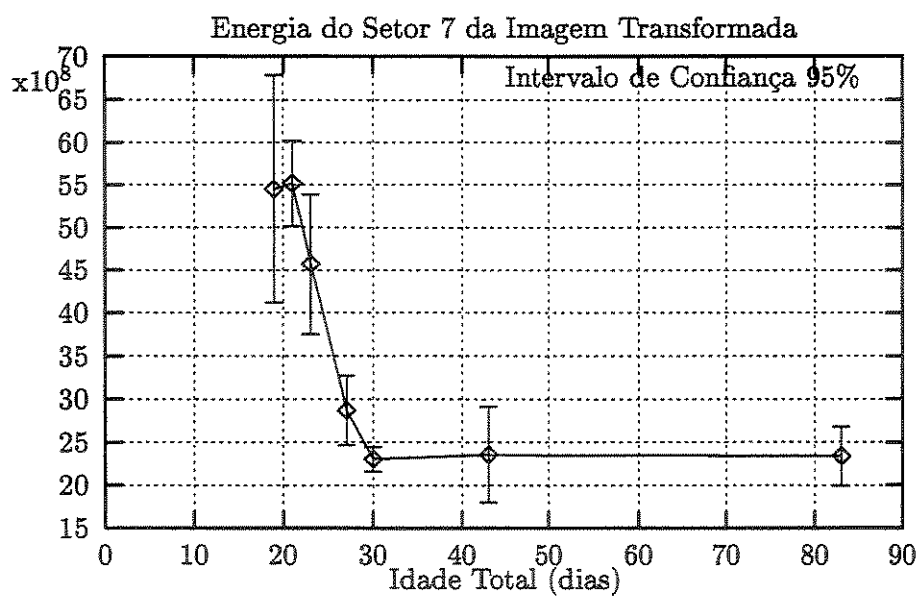


Figura 8.54: Energia do setor 7 da imagem transformada dos cardiomiócitos ($p=2,18 \cdot 10^{-11}$, $H=61,5466$, teste de Kruskal-Wallis).

em sentido anti-horário em relação à direção da maior corda). Valores máximos são obtidos no final do período gestacional, com declínio acentuado nos primeiros dias de vida pós-parto, estabilizando-se após o dia 30 após a concepção (dia 8 pós-parto).

Capítulo 9

Discussão

9.1 Sobre as Variáveis Estudadas

Baseando-se nos resultados obtidos, as características texturais da imagem original e da imagem transformada, que são intimamente relacionadas, produzem variáveis bem diferentes. Assim, pode ser obtido a partir das mesmas imagens outras informações completamente diferentes, fornecendo mais dados para serem utilizados numa análise discriminante linear.

O contraste da imagem nuclear (figura 8.13), descrito por Haralick (1973) é idêntico à inércia descrito por He (1988).

A elaboração da matriz de co-ocorrência proposta por Haralick (1973) merece ser revista e modificada. A metodologia empregada cria uma matriz P simétrica em relação à diagonal principal, devido ao fato de que para cada transição $i \rightarrow j$, são incrementados $P(i, j)$ e $P(j, i)$. Uma modificação pode ser proposta, incrementando apenas $P(i, j)$, com as seguintes vantagens: a) redução do tempo de processamento; b) geração de uma matriz P assimétrica, que torna o momento horizontal (M_x) diferente do momento vertical (M_y); c) possibilidade da criação de variáveis que medem a assimetria da matriz de co-ocorrência; e d) potencialidade de se obter matrizes de co-ocorrência diferentes a partir da mesma imagem, em 8 direções diferentes, ao contrário do que Haralick (1973) propôs, limitando a apenas 4 direções.

É interessante notar que o momento de inércia total (figura 8.48) possui um poder discriminante maior que a energia total (figura 8.47). Outro fato digno de nota é que a energia do anel 1 possui um poder discriminante idêntico ao da energia total, que pode ser explicado porque

cerca de 90% da energia da transformada de Fourier se concentra próximo ao centro da imagem (GONZALEZ & WINTZ, 1987). Pode-se, portanto, inferir que o momento de inércia seria uma forma mais balanceada de representar a informação textural da imagem, com vantagens sobre a energia.

A entropia da matriz de co-ocorrência (figura 8.25) nos revela a existência de um processo de diferenciação nuclear progressivo, por apresentar valores cada vez menores, denotando uma organização maior.

Neste trabalho foi demonstrado a diminuição do poder discriminante causado pela retirada do amaciamento das bordas nucleares. Quatro variáveis provenientes da imagem transformada foram apresentadas, com redução sensível do poder discriminante.

9.2 O Limite de Resolução e a Amostragem

Uma característica importante das imagens geradas pelo microscópio óptico é o seu limite de resolução. Isto é, a luz não consegue descrever detalhes menores que o seu comprimento de onda (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995). Em outras palavras, altas frequências espaciais cujo período espacial for menor que o dobro do limite de resolução não podem ser representadas, ou melhor, as altas frequências espaciais são filtradas. Assim, o microscópio óptico se comporta como um filtro passa baixa, isto é, deixa passar apenas as baixas frequências espaciais. Isto significa uma vantagem para quem utilizar a análise de Fourier, porque pode-se ter a certeza de que não existem frequências espaciais tão altas que a câmara digitalizadora não possa capturar. Este fenômeno ocorre quando se utiliza grandes aumentos, geralmente entre 600x a 1000x, necessitando comumente de imersão a óleo. Uma consequência prática e interessante deste fenômeno é que se pode traçar na imagem transformada o limite de resolução como uma circunferência cujo centro coincide com o centro da mesma. O raio desta circunferência é inversamente proporcional ao dobro do limite de resolução da lente objetiva do microscópio utilizado.

9.2.1 A Discretização da imagem

A transformada de Fourier discreta de uma imagem digital é considerada como uma aproximação da transformada de Fourier contínua da imagem de onde a imagem digital foi obtida. Essa aproximação é sujeita a vários efeitos importantes causados pela natureza do processo de digitalização. A qualidade da aquisição depende do fabricante, e artefatos, tais como linhas horizontais, interferências e interpolações podem ocorrer. Mas mesmo assim, a transformada de Fourier discreta representa precisamente o espectro de uma imagem digital, independente da qualidade do processo de aquisição da imagem digital (JAMES, 1987).

A digitalização de uma imagem $f(x,y)$ por um microchip de uma videocâmera que realiza uma amostragem a cada intervalo Δ (cerca de $0,1 \mu\text{m}$), pode produzir uma distorção (*frequency aliasing*) se a textura da imagem tiver variações da luminância de frequência maior que a frequência crítica de Nyquist (GONZALEZ & WINTZ, 1987). Em outras palavras, a amostragem crítica de uma onda é no mínimo de dois pontos por ciclo. Havendo uma frequência espacial maior, ocorrerá a obtenção de valores quase aleatórios (PRESS et al., 1992). Neste caso, as frequências que ultrapassarem a frequência crítica serão representadas na borda oposta, como se a imagem transformada fosse toroidal. Assim, isto pode ser motivo de distorções que poderiam prejudicar a análise de imagens microscópicas, a tal ponto de mascarar características importantes na periferia da transformada ou até gerar resultados irreais.

Alguns trabalhos anteriores (GONZALEZ & WINTZ, 1987, MILES & JAGGARD, 1981) que estudavam imagens digitalizadas em microscopia óptica forneceram a abertura numérica (AN) de suas objetivas e a resolução espacial Δ da videocâmera. Com isto, foi possível a avaliação da ocorrência de distorções nos trabalhos publicados (KUO et al., 1988, BANDA-GAMBOA et al., 1993), sabendo-se que o limite de resolução (LR) de uma objetiva é obtido pela fórmula (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995):

$$LR = \frac{0,61\lambda}{n \sin \alpha} = \frac{0,61\lambda}{AN} \quad (9.1)$$

sendo λ o comprimento de onda da luz em micrômetros, n sendo o índice de refração entre a

lente e o óleo (ou ar), e α o semi-ângulo de abertura do cone luminoso, sendo $n \sin \alpha$ denominado de abertura numérica (AN), um valor que é fornecido para cada objetiva pelo fabricante. O limite de resolução (LR) representa o período da frequência espacial máxima (F_{max}) da imagem microscópica, de maneira que dois pontos separados por uma distância menor que o limite de resolução serão vistos unidos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995).

$$F_{max} = \frac{1}{LR} \quad (9.2)$$

A resolução espacial Δ da videocâmara denota a distância entre duas amostragens. Para qualquer intervalo de amostragem Δ , pode ser calculada a frequência crítica de Nyquist (PRESS et al., 1992):

$$F_c = \frac{1}{2\Delta} \quad (9.3)$$

Assim, para que não ocorra distorções na transformada de Fourier, deve-se respeitar a seguinte relação:

$$F_{max} \leq F_c \quad (9.4)$$

Ou seja:

$$\Delta \leq \frac{LR}{2} \quad (9.5)$$

O intervalo de amostragem da videocâmara deve ser menor ou igual à metade do limite de resolução. Assim, a resolução da videocâmara deve ser muito boa para permitir descrever bem a frequência espacial máxima da imagem microscópica. Faltam ainda algumas considerações com relação ao comprimento de onda da luz λ . Como as videocâmeras analisam as intensidades luminosas correspondentes ao vermelho, verde e azul em três microchips separados, o menor limite de resolução corresponde ao da luz azul (435,8 nm (GONZALEZ & WINTZ, 1987) definido pelo *International Commission of Illumination* em 1931), sendo a cor que pode mais

se aproximar de Δ . Assim, aplica-se esse teste para afastar possíveis incompatibilidades que possam existir entre a videocâmara e as objetivas, evitando-se erros sistemáticos.

Por exemplo, utilizando-se o sistema KS-300, que possui um microscópio Zeiss, com uma objetiva Achroplan de imersão a óleo de 100 aumentos, com abertura numérica de 1,25, adotando-se o comprimento de onda da luz azul porque produz a melhor resolução :

Limite de resolução:

$$LR = \frac{0,61.0,4358}{1,25} = 212nm \quad (9.6)$$

Então a resolução da videocâmara deverá ser:

$$\Delta \leq \frac{LR}{2} \quad (9.7)$$

$$\Delta \leq 106nm/pixel \quad (9.8)$$

Em um trabalho que forneceu dados sobre o equipamento utilizado, Banda-Gamboa (BANDA-GAMBOA et al., 1993) utilizou uma objetiva com a mesma abertura numérica, porém com um intervalo de amostragem de 290 nm/pixel. Assim, não foi satisfeita a exigência da inequação 9.8. Outros trabalhos sequer citam as condições em que as imagens foram adquiridas (PRESSMAN, 1976, VRIES et al., 2000).

Apenas como ilustração, é possível assinalar na transformada de Fourier o limite de resolução do microscópio óptico. Por exemplo, utilizando-se uma matriz de 512x512 pixels para o cálculo da transformada discreta ($L = 512$ pixels), e conhecendo-se o limite de resolução $LR = 0,212\mu m$, através da equação 9.2 pode ser calculada a frequência espacial máxima $F_{max} = 4,72$ ciclos/ μm , ou $f = 0,472$ ciclos/pixel. Utilizando-se a equação 2.1, obtemos a distância em pixels do centro da imagem transformada ($d = 241,5$ pixels). O limite de resolução pode ser representado como uma circunferência com este raio.

9.3 A análise espectral na biologia e medicina

Na literatura científica, podem ser encontrados trabalhos que utilizaram a transformada de Fourier para se estudar a forma de contornos nucleares, e de até mesmo de aberturas nasais de crânios. Outros trabalhos realizaram a transformada de Fourier através da difração do laser em instrumentos ópticos, utilizando imagens microscópicas (KOPP et al., 1976, GUERIN et al., 1986, OSTROWSKI et al., 1983, DZIEDZIC-GOCLAWSKA et al., 1982, MILES & JAGGARD, 1980, PERNICK et al., 1978c, WOHLERS et al., 1978, PERNICK et al., 1978a, TUERKE et al., 1978). Apesar de produzir imagens transformadas instantaneamente, tais equipamentos apresentam desvantagens em relação aos computadores, porque nestes as imagens digitais podem sofrer um pré-processamento, filtrando descontinuidades e selecionando as texturas a serem estudadas. Poucos trabalhos empregaram a transformada de Fourier na análise de texturas de imagens digitais na anatomia patológica.

Pode-se atribuir esta falta de interesse ao fato de que o método possui um fundamento matemático pouco atraente, com uma teoria demasiadamente elaborada para ser entendido pela maioria dos profissionais da área de saúde. Alguns trabalhos subutilizaram as informações fornecidas pela imagem transformada, utilizando apenas poucos parâmetros ou realizando simplificações extremas, demonstrando pouco conhecimento sobre os princípios envolvidos. Nestes casos, o aprofundamento da análise poderia aumentar o poder discriminante.

Outros trabalhos se propuseram a investigar características texturais em modelos biológicos pouco adequados, onde o método apresenta pouco poder discriminante. Os modelos biológicos mais adequados para a utilização da análise de Fourier são aqueles que produzem imagens anisotrópicas, possuindo texturas com uma importante orientação direcional, como por exemplo, na imagem de um corte longitudinal de um nervo ou de um músculo. Em segundo lugar, as texturas harmônicas, rítmicas, cujos elementos formadores possuem dimensões definidas, como fibras colágenas, parênquima hepático, o corte transversal de um nervo ou músculo. Em terceiro lugar estão os modelos onde tenta-se diferenciar duas texturas isotrópicas entre si. Neste último

caso, a composição das frequências espaciais pode discriminar texturas entre si.

Muitos estudos que utilizaram a transformada de Fourier podem ser criticados pela resolução insuficiente na câmara de digitalização, gerando artefatos que dificultavam a discriminação entre os grupos de imagens. Nenhum trabalho utilizou técnicas de pré-processamento, visando a filtragem de descontinuidades e a seleção das áreas a serem estudadas.

9.4 As descontinuidades das bordas nucleares

Em núcleos de células, a transformada de Fourier é composta pelo espectro da textura da cromatina e pelo efeito da descontinuidade das bordas nucleares. Ao se amaciar as bordas nucleares, desaparecem componentes de alta frequência que formavam a transição abrupta da luminância na borda nuclear. Na imagem transformada, essas altas frequências formam anéis concêntricos, que em algumas direções são mais intensos, formando acentuações radiais. Esses anéis já foram descritos em estudos de refração por laser, chamados de anéis de Airy (BANDA-GAMBOA et al., 1993), e são indesejáveis porque se superpõem ao espectro da cromatina nuclear, prejudicando o seu estudo numa análise discriminante.

Uma alternativa para eliminar as descontinuidades produzidas pelas bordas dos núcleos das células é diminuir ao máximo a mudança abrupta da luminância, aplicando um fundo com a luminância média do núcleo segmentado e amaciando com filtros de média as regiões próximas às bordas nucleares. Este processo é chamado de pré-processamento da imagem, visto que se opera na imagem antes de ser transformada.

Como exemplos de pós-processamento, existem (A) a análise da distribuição da informação textural, (B) o cálculo do perfil da imagem transformada e (C) a extração de parâmetros estatísticos texturais da imagem transformada.

A distribuição da informação textural na imagem transformada pode ser analisada sob a forma de espectro de Fourier, espectro de potência ou de momento de inércia. Em cada uma destas representações, pode ser comparado a distribuição da energia em cada direção e cada frequência

9.5 O significado de cada variável obtida

À medida em que se explora os conceitos envolvidos com a textura da transformada de Fourier e a distribuição da informação textural contida nela, é dever do pesquisador exprimir uma opinião quanto ao significado prático de cada achado. Em alguns casos, as variáveis selecionadas podem chegar ser conceitos tão abstratos e pouco intuitivos, sendo difícil de se entender.

Uma tentativa de se avaliar o significado de cada valor obtido, cinco variáveis foram utilizadas para realizar comparações entre texturas artificiais conhecidas (vide figuras 8.21, 8.26, 8.24, 8.31 e 8.46). Estes tipos de gráficos permitem situar as texturas nucleares num espectro de padrões, favorecendo aproximações.

9.6 Apreciação de outros trabalhos

Um trabalho recente (CLARK, 2001) apresenta uma revisão de trabalhos que utilizaram a transformada de Fourier para analisar imagens de microscopia eletrônica do tecido conjuntivo da córnea e da esclera. Conseguiu-se demonstrar a diferença na organização ultra-estrutural, apesar de não utilizar técnicas para eliminar a descontinuidade provocada pelas bordas das imagens quadradas. Na hora de extrair características discriminantes, subutiliza os dados fornecidos pela imagem transformada, empregando apenas o ponto de inflexão do perfil na escala logarítmica. Poderia utilizar muito mais variáveis extraídas das imagens transformadas. Conclui que a especialização da ultraestrutura do colágeno I altera a função do tecido conjuntivo, tornando-o transparente ou opaco, analisando a disposição e a espessura das fibras. Não forneceu dados quanto ao limite de resolução do ME e do intervalo de amostragem da câmara digitalizadora.

Foi relatado que um bom poder discriminante foi obtido analisando-se somente as máscaras binárias dos núcleos da citologia esfoliativa do colo do útero (BANDA-GAMBOA et al., 1993). Mas melhores resultados foram alcançados quando se utilizou a textura nuclear. Este estudo poderia, com grande possibilidade, fornecer resultados mais satisfatórios se fossem filtradas as descontinuidades das bordas, eliminando a superposição da

informação textural com os anéis de Airy. Forneceu dados sobre a lente objetiva usada, bem como o intervalo de amostragem, que se revelou insuficiente, causando *aliasing*. Selecionou quatro características texturais de Haralick que foram as mais poderosas na discriminação das células: O contraste, a média, a homogeneidade local e a entropia. Neste trabalho, o contraste e a homogeneidade local ficaram entre os que tiveram maior poder discriminante.

A orientação das fibras colágenas da derme lesional e não lesional de pacientes com esclerodermia foi comparada utilizando-se o conceito de índice de orientação (*orientation ratio*), discriminando com sucesso as imagens (VRIES et al., 2000). Foram comparados os resultados com os de outro método, com resultados superiores sobre o da refração do laser. Foram subutilizadas as informações fornecidas pelas imagens transformadas, aplicando uma limiarização (*thresholding*), binarizando a imagem e estudando a forma da figura obtida. Poderiam ser usadas técnicas de detecção de anisotropia.

A transformada de Fourier de imagens histológicas de tumores malignos da próstata pode classificar corretamente 97,2% dos casos (SMITH et al., 1999). Foram segmentados os ácinos das glândulas prostáticas manualmente, mas as imagens binárias das glândulas apresentaram um poder discriminante menor, comparadas com as imagens originais. Não foi filtrada qualquer descontinuidade na imagem, e isto pode causar distorções nos resultados. O intervalo de amostragem foi muito grande para a resolução empregada, mas mesmo assim se obteve bons resultados.

Num estudo utilizando um sistema óptico coerente para a análise dos padrões de refração do laser em esfregaços citológicos (WOHLERS et al., 1978), afirma que a distribuição $\rho^2|F(\rho)|^2$ forneceu características novas e significativas para a separação das células. Esta forma de apresentação da transformada de Fourier é exatamente o quadrado do momento de inércia utilizado neste trabalho. Há duas justificativas para não se utilizar tal representação: a) custo computacional maior; b) dificuldade para a visualização da transformada numa imagem com apenas 256 níveis de cinza. Esta forma de visualização corresponde ao quadrado da amplitude das funções harmônicas que formam a imagem.

Capítulo 10

Conclusões

De acordo com os resultados obtidos a partir de um modelo biológico de desenvolvimento histológico do miocárdio, e da análise objetiva das imagens digitalizadas, pode-se enumerar algumas conclusões.

10.1 Conclusões relativas ao programa

A suavização das bordas é um método para estudar exclusivamente e com mais precisão a textura da cromatina, eliminando os componentes de alta frequência espacial que formam os anéis de Airy.

Os parâmetros obtidos a partir da imagem transformada de Fourier demonstram mais claramente as diferenças entre os núcleos, enquanto as imagens transformadas sem suavização os anéis de Airy “esconderam” a textura da cromatina.

As imagens transformadas podem ser analisadas tanto a partir da matriz de co-ocorrência quanto através do seu perfil obtido por anéis ou setores. Portanto, todas essas maneiras diferentes permitem demonstrar claramente diferenças, mesmo sutis, entre a cromatina dos núcleos de cardiomiócitos de diferentes idades.

É importante que a imagem que será analisada pela transformada de Fourier seja submetida ao alisamento das bordas, onde existem as principais descontinuidades que interferem nos resultados.

O uso da direção da maior corda da imagem é essencial para se estudar as concen-

trações da informação textural na transformada de Fourier.

Os parâmetros obtidos a partir da imagem transformada apresentaram entre os grupos etários diferenças maiores do que as obtidas com os parâmetros biológicos, morfológicos, e texturais, através do teste de Kruskal-Wallis.

A extração de características da matriz de co-ocorrência apresentou em conjunto um maior poder discriminante quando foi utilizada a imagem transformada em oposição à imagem original.

As imagens espacial e espectral, intimamente relacionadas entre si, fornecem parâmetros com informação textural distinta, útil no processo classificatório.

Portanto, as variáveis obtidas a partir das imagens transformadas demonstram claramente as variações da cromatina.

10.2 Conclusões relativas ao modelo biológico

Durante o período examinado, do dia 19 de gestação até o dia 60 pós-parto, a atividade mitótica diminuiu gradativamente até cessar. Paralelamente os núcleos se alongaram, refletindo a progressiva diferenciação celular dos cardiomiócitos.

Pode ser observado com facilidade que as variações (oscilações) de luminância da cromatina diminuíram com a idade. Ou seja, nas idades maiores a cromatina tornou-se mais homogênea.

Especialmente para os períodos espaciais entre 3,6 a 1,8 μ m, o momento de inércia apresentou redução com o desenvolvimento do animal.

As entropias do perfil da transformada de Fourier e da matriz de co-ocorrência das imagens transformada e original diminuíram com o crescimento do animal, podendo significar que a cromatina ficou mais “organizada”.

10.3 Conclusões relativas à revisão da literatura

A utilização do potencial de análise da transformada de Fourier foi pequena na literatura. Nos trabalhos levantados, os dados obtidos foram sub-utilizados, principalmente por falta de fundamentação teórica.

Em alguns trabalhos, não foi estimada o intervalo máximo de amostragem para a digitalização das imagens, que depende das especificações da objetiva do microscópio óptico.

Capítulo 11

Summary

The nuclear texture can be assessed by many approaches. The image can be considered as a mathematical function, and the variations of luminance between each pixel can be interpreted as spatial frequencies.

The Fast Fourier Transform (FFT) was used in this study for the texture analysis of chromatin in Pathology. The Fourier analysis finds out periodic events. In image processing, the spatial frequency represents the luminance changes rhythm that occurs in a sequence of pixels. In transformed images, the frequency distribution estimates its periodicity and its anisotropy or directional predominance. Regular texture patterns accumulate textural information in regions that correspond to its frequency and direction.

As a biological model, we analysed the chromatin changes of cardiomyocytes during physiological development of Wistar rats, between 19 days of fetal life and 60 days of post-partum life. The cardiac tissue was fixed in a buffered formalin for 24 hours at a 4°C. In order to obtain cytologic preparations, the specimens were hydrolysed in a alkaline solution of potassium hydroxide, for about 18 hours.

The nuclei were stained with haematoxylin. Images were acquired using the KS-300 system, with 10 pixels equivalent to 1 micrometer. The FFT of a segmented nucleus is result of (1) the chromatin texture, and (2) the edge effect of the nuclear contour. The later hides the chromatin spectrum. Therefore this effect must be eliminate by smoothing the edge, selected by 3 erosions and 12 dilations. As background, the mean luminance of the nucleus was used.

Textural data concentrations of the haematoxylin stained nuclear chromatin were quantified. These variables were compared with biologic features (age and mitotic activity), assessing the discriminative performance of separating different histologic development of the rat cardiomyocytes.

For each nucleus, area, the longest chord, parameters of the co-occurrence matrix, angular and ring distributions of the energy and moment of inertia were computed. Parameters derived from the co-occurrence matrix and transformed images could discriminate well the age groups. Both images, spatial and spectral, close related to each other, provided distinct information, useful for the classification.

Chromatin texture became more homogeneous in older animals. Specifically in the spatial periods between 3.6 and $1.8\mu\text{m}$, the moment of inertia diminished rapidly with age. The entropies of the co-occurrence matrix and the profile of the transformed images decreased, thus reflecting the progressive cellular differentiation of the cardiomyocytes.

In summary, the Fourier spectrum (after the smoothing of the edges) is able to provide useful information on the chromatin texture, as showed for the nuclear changes during development of the rat heart.

Referências Bibliográficas

- BACKER, D. 1979 . In: **The Academic Rat**. Academic Press Inc Ltda, New York.
- BAI, S.; CAMPBELL, S. E.; MOORE, J. A.; MORALES, M. C.; & GERDES, A. 226:207-12 1990 , Influence of age, growth and sex on cardiac myocytes size and number in rats, **The Anatomical Records** 1990 .
- BAKER, H. J.; LINDSEY, J. R.; & WEISBROTH, S. H. 1993 . **The Laboratory Rat: Research and Applications.**, volume 2. Academic Press, California, 2 edition.
- BANDA-GAMBOA, H.; RICKETTS, I.; CAIRNS, A.; & HUSSEIN, K. 5:85-102 1993 , Spectral analysis of cervical cells using the discrete fourier transform, **Analytical Cellular Pathology** 1993 .
- BARR, M. 7:283-8 1973 , Prenatal growth of wistar rats: circadian periodicity of fetal growth late in gestation, **Teratology** 1973 .
- BRACEWELL, R. N. 1965 . **The Fourier Transform and its Applications**. McGraw Hill Book Company, Singapore, 2 edition.
- BRODSKY, W. Y.; TSIREKIDZE, N. N.; & AREFYEVA, A. M. 17:445-55 1985 , Mitotic-cyclic and cycle-independent growth of cardiomyocytes, **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** 1985 .
- BUGAISKY, L. & ZAK, R. 39:123-38 1979 , Cellular growth of cardiac muscle after birth, **texas Report on Biology and Medicine** 1979 .
- CASTLEMAN, K. R. 1979 . **Digital Image Analysis**. Englewood Cliffs, N. J. Prentice Hall, 1 edition.

-
- CIA, E. M. M.; TREVISAN, M.; & METZE, K. 1091:30–9 1999 , Ag-nor technique: a helpful tool for the differential diagnosis in urinary cytology, **Cytopathology** 1999 .
- CLARK, J. I. 32:239–49 2001 , Fourier and power law analysis of structural complexity in cornea and lens, **Micron** 2001 .
- CLUBB, F. J. & BISHOP, S. P. 50:571–7 1984 , Formation of binucleated myocardial cells in the neonatal rat, **Laboratory Investigation** 1984 .
- DIAZ, G.; ZUCCA, A.; SETZU, M. D.; & CAPPAL, C. 39:305–11 1997 , Chromatin pattern by variogram analysis, **Microscopy Research and Technique** 1997 .
- DIEGENBACH, P. C. & BAAK, J. P. A. 8:109–19 1978 , Quantitative nuclear image analysis: Differentiation between normal and hyperplastic and malignant appearing uterine glands in a paraffin section. iii the use of texture features for classification, **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproduction Biology** 1978 .
- DONELLY, H. 1987 . In **Laboratory Animal: An introduction for new experimenters**. Tuffery A. A, New York.
- DZIEDZIC-GOCLAWSKA, A.; ROZYCKA, M.; CZYBA, J. C.; SAWICKI, W.; MOUTIER, R.; LENCZOWSKI, S.; & OSTROWSKI, K. 74:123–37 1982 , Application of the optical fourier transform for analysis of the spatial distribution of collagen fibers in normal and osteoporotic bone tissue, **Histochemistry** 1982 .
- EINSTEIN, A. J.; WU, H. S.; & GIL, J. 80:397–400 1998 , Self-affinity and lacunarity of chromatin texture in benign and malignant breast epithelial cell nuclei, **Physical Review Letters** 1998 .
- GILBERTI, M. F. P.; METZE, K.; & LORAND-METZE, I. 71:275–9 1995 , Changes of nucleolar organizer regions in granulopoietic precursors during the course of chronic myeloid leukemia, **Annals of Hematology** 1995 .
-

-
- GIMENEZ-MAS, J. A.; SANZ-MONCASI, M. P.; REMÓN, L.; GAMBÓ; & GALLEGOCALVO, M. P. 17:39–47 1995 , Automated textural analysis of nuclear chromatin, **Analytical and Quantitative Cytology and Histology** 1995 .
- GONZALEZ, R. C. & WINTZ, P. 1987 . **Digital Image Processing**. Addison-Wesley Publishing Company, Reading and Massachusetts, 2 edition.
- GROTTO, H. Z. W.; LORAND-METZE, I.; & METZE, K. 33:1–4 1991 , Nucleolar organizer regions in normal hematopoiesis relationship to cellular proliferation and maturation, **Nouvelle Revue Francaise D Hematologie** 1991 .
- GROTTO, H. Z. W.; METZE, K.; & LORAND-METZE, I. 5:203–12 1993 , Pattern of nucleolar organizer regions in human leukemic cells, **Analytical Cellular Pathology** 1993 .
- GUERIN, J. F.; ROZYCKA, M.; DZIEDZIC-GOCLAWSKA, A.; OSTROWSKI, K.; RAFAT, A.; & LESZCZYŃKI, K. 125:88–92 1986 , Objective evaluation of fibrosis in human testicular biopsies by analysis based on optical diffractometry, **Acta Anatomica** 1986 .
- HARALICK, R. M. 67(5):786–804 1979 , Statistican and structural approaches to texture, **Proceedings of IEEE** 1979 .
- HARALICK, R. M.; SHANMUGAN, K.; & DINSTEN, I. 3:610–21 1973 , Textural features for image classification, **IEEE Transactions on Systems, Man and and Cybernetics** 1973 .
- HE, D. C.; WANG, L.; & GUIBERT, J. 21(2):141–6 1988 , Texture discrimination based on an optimal utilization of texture features, **Pattern Recognition** 1988 .
- HIRAKOV, R.; GOTOH, T.; & WATANABE, T. 108:144–52 1980 , Quantitative studies on the ultrastructural differentiation and growth of mammalian cardiac muscle cells, **Acta Anatomica** 1980 .
- IRAZUSTA, S. P.; VASSALLO, J.; MAGNA, L. A.; METZE, K.; & TREVISAN, M. 194:33–9 1998 , The value of agnor and pcna staining in endoscopic biopsies of gastric mucosa, **Pathology Research and Practice** 1998 .
-

-
- JAMES, M. 1987 . **Pattern Recognition**. BSP Professional Books, Oxford, 1 edition.
- JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. 1995 . **Histologia Básica**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 4 edition.
- KNAAPEN, M. W. M.; VROLIJK, B. C. M.; & WENINK, A. C. G. 244:118–125 1996 , Nuclear and cellular size of myocytes in different segments of the developing rat heart, **The Anatomical Record** 1996 .
- KOPP, R. E.; LISA, J.; MENDELSON, J.; PERNICK, B.; SOTONE, H.; & WOHLERS, R. 24(1):122–37 1976 , Coherent optical processing of cervical cytologic samples, **J Histochem Cytochem** 1976 .
- KUO, H. R.; LAPIDUS, A.; & LAMBERT, W. C. 33:420–7 1988 , Identification of early apoptosis in feulgen stained cultured cells in situ by computerized image analysis, **Cytometry** 1988 .
- LI, F.; WANG, X.; CAPASSO, J. M.; & GERDES, M. 28:1737–46 1996 , Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development, **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** 1996 .
- LORAND-METZE, I.; CARVALHO, M. A.; & METZE, K. 32:51–6 1998 , Relationship between morphologic analysis of nucleolar organizer regions and cell proliferation in acute leukemia, **Cytometry** 1998 .
- LORAND-METZE, I. & METZE, K. 49(6):357–60 1996 , Agnori clusters as a cell kinetic parameter in chronic lymphocytic leukemia, **Journal of Clinical Pathology : Molecular Pathology** 1996 .
- MARCHEVSKY, A. M. & BARTELS, P. H. 1994 . **Image analysis: A Primer for Pathologists**. Raven Press, New York, 1 edition.
- MATTFELDT, T. & MALL, G. 19:1237–47 1987 , Growth of capillaries and myocardial cells in the normal rat heart, **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** 1987 .
-

-
- METZE, K. & LORAND-METZE, I. 44:526 1991 , Agnor staining in normal bone marrow cells (letter), **Journal of Clinical Pathology** 1991 .
- METZE, K. & LORAND-METZE, I. 21:97–8 1992 , Silver staining of nucleolar organizer regions in prostatic lesions(letter), **Histopathology** 1992 .
- METZE, K. & LORAND-METZE, I. 89(2):110–1 1993 , Interpretation of the agnor pattern in heamatologic cytology, **Acta Haematologica** 1993 .
- METZE, K. & LORAND-METZE, I. 52:52 1999 , Age related decrease of agnor activity in acute and chronic lymphocytic leukemias, **Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology** 1999 .
- METZE, K. & TREVISAN, M. 85:250 1999 , The use of epithelial membrane antigen and silver-stained nucleolar organizer regions testing in the differential diagnosis of mesothelioma form benign reactive mesothelioses, **Cancer** 1999 .
- MILES, C. P. & JAGGARD, D. 24:81 1980 , Models to demonstrate fourier transforms of nuclear size, pleomorphism and hypercromasia, **Acta Cytologica** 1980 .
- MILES, C. P. & JAGGARD, D. L. 3(2):149–56 1981 , The use of optical fourier transforms to diagnose pleomorphism, size and chromatin clumping in nuclear models, **Analytical and Quantitative Cytology** 1981 .
- OLIVETTI, G.; CIGOLA, H.; MAESTRI, R.; CORRADI, D.; LAGRASTA, C.; GAMBERT, S. R.; & ANVERSA, P. 28:1463–77 1996 , Aging, cardiac hypertrophy and ischemic cardiomyopathy do not affect the proportion of mononucleated and multinucleated myocytes in the humam heart, **Journal of Mollecular and Cellular Cardiology** 1996 .
- OSTROWSKI, K.; THYBERG, J.; DZIEDZIC-GOCLAWSKA, A.; KSIAZEK, T.; NILSSON, J.; PALMBERG, L.; & SJOLUND, M. 78:435–49 1983 , Application of optical diffractometry in studies of cell fine structure, **Histochemistry** 1983 .
-

-
- PERNICK, B.; JOST, S.; HEROLD, R.; KOPP, R. E.; MENDELSON, J.; & WOHLERS, R. 17:43–51 1978a , Screening of cervical cytological samples using coherent optical processing. part 2, **Applied Optics** 1978a .
- PERNICK, B.; KOPP, R. E.; LISA, J.; MENDELSON, J.; STONE, H.; & WOHLERS, R. 17:21–34 1978b , Screening of cervical cytological samples using coherent optical processing: Part 1, **Applied Optics** 1978b .
- PERNICK, B.; KOPP, R. E.; LISA, J.; MENDELSON, J.; STONE, H.; & WOHLERS, R. 17:21–34 1978c , Screening of cervical cytological samples using coherent optical processing. part 1, **Applied Optics** 1978c .
- PISSAIA, O.; ROSSI, M. A.; & OLIVEIRA, J. S. M. 110:2035–44 1980 , The heart in protein-calorie malnutrition in rats: Morphological and electrophysiological and biochemical changes, **Journal of Nutrition** 1980 .
- PRESS, W. H.; TEUTOWSKY, S. A.; VETTERLING, W. T.; & FLANNERY, B. 1992 . **Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing**. Cambridge University Press, New York, 2 edition.
- PRESSMAN, N. J. 24:138–44 1976 , Markovian analysis of cervical cells images, **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry** 1976 .
- RAKUSAN, K.; RAMAN, S.; LAYBERRY, R.; & KORECKY, B. 42:212–8 1978 , The influence of aging and growth on the postnatal development of cardiac muscle in rats, **Circulation Research** 1978 .
- ROBBINS 1994 . **Patologia**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 4 edition.
- ROZYCKA, M.; SAWICKI, W.; TRACZYK, Z.; BEM, W.; & STROJNY, P. 41(5):504–9 1988 , Analysis of chromatin pattern in blood lymphocytes of healthy donors and in lymphoid cells of patients with chronic lymphocytic leukaemia, **Journal of Clinical Pathology**. 1988 .
-

-
- RUSS, J. C. 1995 . **The Image Processing Handbook**. CRC Press Inc., Boca Raton and Florida, 2 edition.
- SCHNEIDER, R. & PFITZER, P. 12:238–58 1973 , Die zahl der kerne in isolierten zellen des menschlichen myocards, **Virchows Archiv Abteilung B Zellpathologie** 1973 .
- SMITH, Y.; ZAJICEK, G.; & WERMAN, M. 32:1–12 1999 , Similarity measurement method for the classification of architecturally differentiated images, **Computer and Biomedical Reserach** 1999 .
- SPINA, D.; DISANTO, A.; LUZI, P.; TOSI, P.; GALLORINI, M.; MOUTHON, A.; KRAFT, R.; & COTTIER, H. 62:119–124 1992 , Novel, contrast gradient oriented, automated chromatin texture analysis, **Virchows Archives B - Cellular Pathology** 1992 .
- STEPHENSON, T. J. 166(1):83–7 1992 , Image analysis, **Journal of Pathology** 1992 .
- STOTSEMBURG, J. M. 9:667–82 1915 , The growth of the fetus of the albino rat from the thirteenth to the twenty-second day of gestation, **The Anatomical Record** 1915 .
- THEILER, K. 1972 . **Development and normal stages from fertilization to 4 weeks of ages. In: The House Mouse**. Springer-Verlag, Heidelberg.
- THUNNISSEN, F. B. J. M. & DIEGENBACH, P. C. 8:301–4 1986 , Classification of lung carcinoma by means of digital nuclear image analysis, **Analytical and Quantitative Cytology and Histology** 1986 .
- TUERKE, B.; SEGER, G.; ACHATZ, M.; & SEELEN, W. V. 17:2754–61 1978 , Fourier optical approach to the extraction of morphological parameters from the diffraction pattern of biological cells, **Applied Optics** 1978 .
- VEENLAND, J. F.; GRASIUS, J. L.; & GESELMA, E. S. 25:922–36 1998 , Texture analysis in radiographs: The influence of modulation transfer function and noise on the discriminative ability of texture features, **Medical Physics** 1998 .
- VRIES, H. J. C. D.; ENOMOTO, D. N. H.; MARLE, J. V.; ZUIJLEN, P. P. M. V.; MEKKES, J. R.; & BOS, J. D. 80:1281–9 2000 , dermal organization in scleroderma: The fft and the
-

laser scatter method objectify fibrosis in nonlesional as well as lesional skin, **Laboratory Investigation** 2000 .

WOHLERS, R.; MENDELSON, J.; KOPP, R. E.; & PERNICK, B. J. 17:35-42 1978 , Screening of cervical cytological samples using coherent optical processing. part 2, **Applied Optics** 1978 .

WOUVER, G. V. D.; WEYN, B.; SCHEUNDERS, P.; JACOB, W.; MARCK, E. V.; & DYCK, D. V. 197:25-35 2000 , Wavelets as chromatin texture descriptors for the automated identification of neoplastic nuclei, **Journal of Microscopy** 2000 .

Capítulo 12

Apêndices

A seguir são apresentados os pesos corporais e os pesos dos corações de todos os animais estudados.

Tabela 12.1: Características dos animais examinados

Caso	Ninhada	Rato	Sexo	Peso Corp.(g)	Peso Card.(mg)	Tempo de Gestação	Vida Pós-Natal	Idade Total
Mãe	1			260			69	
Filhote	1	1	M	2,4	18	19		19
Filhote	1	2	M	2,3	16	19		19
Filhote	1	3	M	2,6	20	19		19
Filhote	1	4	F	2	13	19		19
Filhote	1	5	F	2,4	17	19		19
Filhote	1	6	M	2,5	17	19		19
Filhote	1	7	F	2,4	16	19		19
Filhote	1	8	F	2,4	15	19		19
Filhote	1	9	M	2,6	18	19		19
Filhote	1	10	F	2,5	11	19		19
Mãe	2			225	900		90	
Filhote	2	1	M	2,6	17	19		19
Filhote	2	2	M	2,6	16	19		19
Filhote	2	3	F	2,7	13	19		19
Filhote	2	4	F	2,2	15	19		19
Filhote	2	5	M	2,9	16	19		19
Filhote	2	6	F	2,5	14	19		19
Mãe	3			280	873		92	
Filhote	3	1	F	4,1	38	21		21
Filhote	3	2	M	5	35	21		21
Filhote	3	3	F	4,5	32	21		21
Filhote	3	4	F	4,5	33	21		21
Filhote	3	5	F	4,2	36	21		21

continua na próxima página

Tabela 12.1: Características dos animais examinados (Continuação)

Caso	Ninhada	Rato	Sexo	Peso Corp.(g)	Peso Card.(mg)	Tempo Gestação	Vida Pós-Natal	Vida Total
Filhote	3	6	F	4,1	30	21		21
Filhote	3	7	F	3,9	32	21		21
Filhote	3	8	M	4,4	32	21		21
Filhote	3	9	F	4,1	30	21		21
Filhote	3	10	F	4,3	27	21		21
Filhote	3	11	M	4,6	38	21		21
Filhote	3	12	M	4,5	34	21		21
Mãe	4			212	900		97	
Filhote	4	1	M	10,2	68	21	5	26
Filhote	4	2	F	10,4	65	21	5	26
Filhote	4	3	F	9,8	72	21	5	26
Filhote	4	4	M	8,7	79	21	5	26
Filhote	4	5	F	9,8	72	21	5	26
Filhote	4	6	M	9,1	84	21	5	26
Filhote	4	7	M	9,3	82	21	5	26
Filhote	4	8	M	9,6	82	21	5	26
Filhote	4	9	F	8,2	66	21	5	26
Mãe	5			194	895		105	
Filhote	5	1	M	12	113	24	5	29
Filhote	5	2	F	12,4	118	24	5	29
Filhote	5	3	F	11,5	124	24	5	29
Mãe	6			219	1034		75	
Filhote	6	1		0,108		13		13
Filhote	6	2		0,101		13		13
Filhote	6	3		0,092		13		13
Filhote	6	4		0,097		13		13
Filhote	6	5		0,112		13		13
Filhote	6	6		0,098		13		13
Filhote	6	7		0,111		13		13
Filhote	6	8		0,106		13		13
Mãe	7			210	1062		77	
Filhote	7	1		0,108		13		13
Filhote	7	2		0,102		13		13
Filhote	7	3		0,103		13		13
Filhote	7	4		0,11		13		13
Filhote	7	5		0,109		13		13
Filhote	7	6		0,074		13		13
Filhote	7	7		0,094		13		13
Filhote	7	8		0,107		13		13
Filhote	7	9		0,102		13		13

continua na próxima página

Tabela 12.1: Características dos animais examinados (Continuação)

Caso	Ninhada	Rato	Sexo	Peso Corp.(g)	Peso Card.(mg)	Tempo Gestação	Vida Pós-Natal	Vida Total
Filhote	7	10		0,103		13		13
Filhote	7	11		0,09		13		13
Filhote	7	12		0,1		13		13
Mãe	8			242	1129		113	
Filhote	8	1	F		41	21		2
1 Mãe	9			260	1160		114	
Filhote	9	1	M	44,7	330	22	21	43
Filhote	9	2	F	43,7	330	22	21	43
Filhote	9	3	F	42	295	22	21	43
Filhote	9	4	M	44,5	340	22	21	43
Filhote	9	5	F	38,2	295	22	21	43
Filhote	9	6	M	45,1	370	22	21	43
Filhote	9	7	M	43,4	320	22	21	43
Mãe	10						131	
Filhote	10	1	M	134	701	21	60	81
Filhote	10	2	M	151,1	726	21	60	81
Filhote	10	3	M	216,9	887	21	60	81
Filhote	10	4	M	181,1	723	21	60	81
Filhote	10	5	M	205,1	791	21	60	81
Filhote	10	6	M	143,7	749	21	60	81
Filhote	10	7	F	123,2	543	21	60	81
Filhote	10	8	F	145,2	646	21	60	81
Filhote	10	9	F	125,7	573	21	60	81
Filhote	10	10	F	115,7	593	21	60	81
Filhote	10	11	F	130,9	593	21	60	81
Filhote	10	12	F	135,9	644	21	60	81
Filhote	10	13	F	116,8	616	21	60	81
Mãe	11			280	717		98	
Filhote	11	1	M	5	35	21		21
Filhote	11	2	M	4,9	35	21		21
Filhote	11	3	M	4,6	32	21		21
Filhote	11	4	M	5	34	21		21
Filhote	11	5	M	4,9	36	21		21
Filhote	11	6	F	4,9	38	21		21
Mãe	12			246	965		104	
Filhote	12	1	F	10,1	64	22	5	27
Filhote	12	2	M	8,1	66	22	5	27
Filhote	12	3	F	6,7	62	22	5	27
Filhote	12	4	M	6,1	55	22	5	27
Filhote	12	5	M	10	67	22	5	27

continua na próxima página

Tabela 12.1: Características dos animais examinados (Continuação)

Caso	Ninhada	Rato	Sexo	Peso Corp.(g)	Peso Card.(mg)	Tempo Gestação	Vida Pós-Natal	Vida Total
Filhote	12	6	F	7,7	56	22	5	27
Filhote	12	7	M	8,6	69	22	5	27
Filhote	12	8	M	9,2	66	22	5	27
Filhote	12	9	M	10,2	68	22	5	27
Filhote	12	10	F	8,6	64	22	5	27
Filhote	12	11	F	7,6	54	22	5	27
Filhote	12	12	M	9,1	69	22	5	27
Mãe	13			270,9	1327		107	
Filhote	13	1	F	11,6	111	22	8	30
Filhote	13	2	F	10,3	87	22	8	30
Filhote	13	3	M	10,1	77	22	8	30
Filhote	13	4	F	8,2	66	22	8	30
Filhote	13	5	M	11,1	95	22	8	30
Filhote	13	6	F	12,1	109	22	8	30
Filhote	13	7	F	11	98	22	8	30
Filhote	13	8	M	15,3	106	22	8	30
Filhote	13	9	F	11,8	94	22	8	30
Filhote	13	10	F	10,4	84	22	8	30
Mãe	14			268,2	1161		113	
Filhote	14	1	M	12,7	103	22	8	30
Filhote	14	2	F	12,3	107	22	8	30
Filhote	14	3	M	12,6	90	22	8	30
Filhote	14	4	F	13,7	99	22	8	30
Filhote	14	5	M	11,7	84	22	8	30
Filhote	14	6	M	12,1	77	22	8	30
Filhote	14	7	F	13,5	91	22	8	30
Filhote	14	8	M	13,1	101	22	8	30
Filhote	14	9	F	12,3	95	22	8	30
Filhote	14	10	F	13,1	97	22	8	30
Filhote	14	11	F	12,8	113	22	8	30
Filhote	14	12	M	13,6	106	22	8	30
Mãe	15			226,8	997		154	
Filhote	15	1	M	237,5	988	23	60	83
Filhote	15	2	M	238,3	965	23	60	83
Filhote	15	3	F	151,8	809	23	60	83
Filhote	15	4	F	158,3	756	23	60	83
Filhote	15	5	F	155,5	747	23	60	83
Filhote	15	6	F	173,5	736	23	60	83
Filhote	15	7	F	151,2	740	23	60	83
Filhote	15	8	F	163,7	803	23	60	83

continua na próxima página

Tabela 12.1: Características dos animais examinados (Continuação)

Caso	Ninhada	Rato	Sexo	Peso Corp.(g)	Peso Card.(mg)	Tempo Gestação	Vida Pós-Natal	Vida Total
Filhote	15	9	F	147,2	622	23	60	83
Mãe	16			230,2	982		91	
Filhote	16	1		0,368		16		16
Filhote	16	2		0,355		16		16
Filhote	16	3		0,414		16		16
Filhote	16	4		0,455		16		16
Filhote	16	5		0,407		16		16
Filhote	16	6		0,344		16		16
Mãe	17			245,2	995		92	
Filhote	17	1		0,433		16		16
Filhote	17	2		0,507		16		16
Filhote	17	3		0,488		16		16
Filhote	17	4		0,466		16		16
Filhote	17	5		0,511		16		16
Filhote	17	6		0,493		16		16
Filhote	17	7		0,548		16		16
Filhote	17	8		0,516		16		16
Filhote	17	9		0,525		16		16
Mãe	18			278	955		97	
Filhote	18	1	M	4,78	40	21		21
Filhote	18	2	F	5,072	36	21		21
Filhote	18	3	M	5,174	39	21		21
Filhote	18	4	F	5,179	28	21		21
Filhote	18	5	F	5,045	28	21		21
Filhote	18	6	F	5,18	30	21		21
Filhote	18	7	M	5,113	40	21		21
Filhote	18	8	F	5,111	35	21		21
Filhote	18	9	F	5,209	41	21		21
Mãe	20			254,9	961		106	
Filhote	20	1	M	8	49	22	1	23
Filhote	20	2	F	7,3	53	22	1	23
Filhote	20	3	F	4,6	35	22	1	23
Filhote	20	4	F	7,8	49	22	1	23
Filhote	20	5	M	7,9	59	22	1	23
Filhote	20	6	M	8,4	70	22	1	23
Filhote	20	7	F	7,5	55	22	1	23
Filhote	20	8	M	8,4	64	22	1	23
Mãe	21			257,4	1173		106	
Filhote	21	1	M	7,1	59	22	1	23
Filhote	21	2	F	7,5	57	22	1	23

continua na próxima página

Tabela 12.1: Características dos animais examinados (Continuação)

Caso	Ninhada	Rato	Sexo	Peso Corp.(g)	Peso Card.(mg)	Tempo Gestação	Vida Pós-Natal	Vida Total
Filhote	21	3	F	7,3	63	22	1	23
Filhote	21	4	M	7,6	61	22	1	23
Filhote	21	5	M	7,7	63	22	1	23
Filhote	21	6	F	6,9	56	22	1	23
Filhote	21	7	F	7,1	50	22	1	23
Filhote	21	8	F	6,6	50	22	1	23
Filhote	21	9	M	7,5	51	22	1	23
Mãe	22			278,8	1158		112	
Filhote	22	1	M	41	242	22	20	42
Filhote	22	2	F	39,8	283	22	20	42
Filhote	22	3	F	42,6	279	22	20	42
Filhote	22	4	F	40,9	223	22	20	42
Filhote	22	5	F	39,4	273	22	20	42
Filhote	22	6	F	39	193	22	20	42
Filhote	22	7	M	42,6	269	22	20	42
Filhote	22	8	F	38,8	276	22	20	42
Filhote	22	9	F	43,2	288	22	20	42

Tabela 12.2: Áreas dos setores e hemi-anéis.

	Áreas dos Anéis		Áreas dos Setores
	(pixels)		(pixels)
Hemi-anel 1	335	Setor 1	5835
Hemi-anel 2	970	Setor 2	5726
Hemi-anel 3	1598	Setor 3	5721
Hemi-anel 4	2238	Setor 4	5718
Hemi-anel 5	2869	Setor 5	5718
Hemi-anel 6	3514	Setor 6	5718
Hemi-anel 7	4142	Setor 7	5720
Hemi-anel 8	4778	Setor 8	5723
Hemi-anel 9	5398	Setor 9	5585
Hemi-anel 10	6077	Setor 10	5841
Hemi-anel 11	6686	Setor 11	5723
Hemi-anel 12	7330	Setor 12	5720
Hemi-anel 13	7942	Setor 13	5718
Hemi-anel 14	8601	Setor 14	5718
Hemi-anel 15	9222	Setor 15	5718
Hemi-anel 16	9866	Setor 16	5721
Hemi-anel 17	10482	Setor 17	5726
Hemi-anel 18	11136	Setor 18	5835

Tabela 12.3: Linhas divisórias dos anéis						
Anel	Distância (pixels)	Período (pixels)	Frequência (Ciclos/pixel)	Distância (μm)	Período (μm)	Frequência (Ciclos/ μm)
A	$D = \frac{255 \cdot A}{18}$	$T = \frac{512}{D}$	$F = \frac{1}{T}$	$d = \frac{D}{10}$	$t = \frac{T}{10}$	$f = \frac{1}{t}$
0	0	∞	0	0	∞	0
1	14,167	36,141	0,028	1,417	3,614	0,277
2	28,333	18,071	0,055	2,833	1,807	0,553
3	42,500	12,047	0,083	4,250	1,205	0,830
4	56,667	9,035	0,111	5,667	0,904	1,107
5	70,833	7,228	0,138	7,083	0,723	1,383
6	85,000	6,024	0,166	8,500	0,602	1,660
7	99,167	5,163	0,194	9,917	0,516	1,937
8	113,333	4,518	0,221	11,333	0,452	2,214
9	127,500	4,016	0,249	12,750	0,402	2,490
10	141,667	3,614	0,277	14,167	0,361	2,767
11	155,833	3,286	0,304	15,583	0,329	3,044
12	170,000	3,012	0,332	17,000	0,301	3,320
13	184,167	2,780	0,360	18,417	0,278	3,597
14	198,333	2,582	0,387	19,833	0,258	3,874
15	212,500	2,409	0,415	21,250	0,241	4,150
16	226,667	2,259	0,443	22,667	0,226	4,427
17	240,833	2,126	0,470	24,083	0,213	4,704
18	255,000	2,008	0,498	25,500	0,201	4,980
