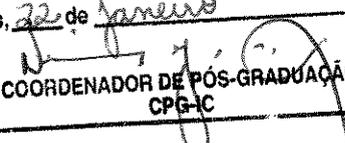


Este exemplar corresponde à redação final da
Tese/Dissertação devidamente corrigida e defendida
por: Wanderley de Souza Filho
e aprovada pela Banca Examinadora.
Campinas, 32 de Janeiro de 2002

COORDENADOR DE PÓS-GRADUAÇÃO
CPG-IC

**Determinação de Parâmetros de Forma para
Análise de Células Sangüíneas**

Wanderley de Souza Filho

Dissertação de Mestrado

Determinação de Parâmetros de Forma para Análise de Células Sangüíneas

Wanderley de Souza Filho

06 de Novembro de 2000

Banca Examinadora:

- Prof. Dr. Neucimar Jerônimo Leite
IC – Unicamp (Orientador)
- Prof. Dr. João Marques de Carvalho
FEE – UFPb
- Profa. Dra. Anamaria Gomide
IC – Unicamp
- Prof. Dr. Alexandre Xavier Falcão (Suplente)
IC - Unicamp

UNIDADE	B2
Nº CHAM	T/UNICAMP
	So. 89d
V	
TOMNO BC	48164
PROC	16-837102
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	
Nº CPD	

CM00165782-6

BIB ID 235900

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO IMECC DA UNICAMP**

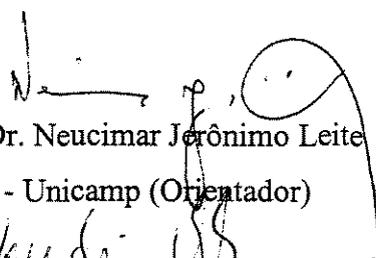
Souza Filho, Wanderley de
So89d Determinação de parâmetros de forma para análise de células
sanguíneas / Wanderley de Souza Filho -- Campinas, [S.P. :s.n.], 2000.

Orientador : Neucimar Jerônimo Leite
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Computação.

1. Processamento de imagens. 2. Morfologia (Matemática). I.
Leite, Neucimar Jerônimo. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Computação. III. Título.

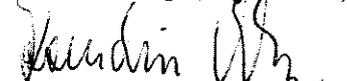
Determinação de Parâmetros de Forma para Análise de Células Sangüíneas

Campinas, 06 de Novembro de 2000.



Prof. Dr. Neucimar Jerônimo Leite

IC - Unicamp (Orientador)



Prof. Dr. Konradin Metze

DAP/FCM - Unicamp (Co-orientador)

Dissertação apresentada ao Instituto de
Computação, UNICAMP, como requisito parcial
para a obtenção do Título de Mestre em Ciência da
Computação.

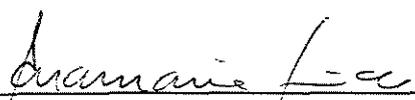
17/01/2002

TERMO DE APROVAÇÃO

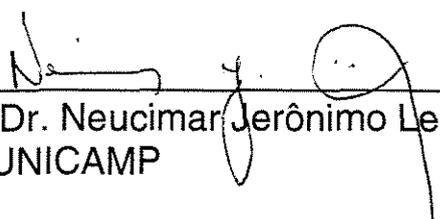
Tese defendida e aprovada em 18 de dezembro de 2000, pela Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores:



Prof. Dr. João Marques de Carvalho
UFPB



Prof. Dra. Anamaria Gomide
IC – UNICAMP



Prof. Dr. Neucimar Jerônimo Leite
IC – UNICAMP

*Aos meus pais,
com muita gratidão.*

Agradecimentos

A Deus.

Aos meus pais por tudo.

À Vera, minha esposa, pela paciência, compreensão e efetiva ajuda nos momentos difíceis.

Ao meu orientador, Neucimar, pela oportunidade e apoio.

Ao meu co-orientador, Konradin, pelo enorme e indispensável incentivo.

Aos meus familiares, amigos e a todos aqueles que apoiaram, incentivaram e/ou criticaram meu trabalho.

À FAPESP e à CAPES pelo fundamental apoio financeiro.

Sumário

Este trabalho foi realizado juntamente com o Laboratório de Anatomia Patológica – UNICAMP na análise de AgNORs (Regiões Organizadoras do Nucléolo) em células sanguíneas. Estudos anteriores demonstram que o padrão das AgNORs pode evidenciar alterações de proliferação e diferenciação celular. Assim, o estudo das AgNORs poderia dar informações adicionais sobre a cinética celular. Na grande maioria das pesquisas, a análise de AgNORs é restrita a parâmetros simples, como o número de precipitações ou a área ocupada pelas AgNORs. O objetivo deste trabalho é introduzir novos parâmetros de forma, ainda não considerados na literatura, que possam trazer informações objetivas adicionais para melhorar a classificação entre vários tipos de neoplasias e, eventualmente, trazer informações prognósticas complementares. Para tanto, foi desenvolvido um sistema – ImAgNOR – com ferramentas que possibilitam tanto a segmentação semi-automática das estruturas como a extração dos parâmetros relacionados.

Abstract

This work was accomplished together with the Laboratory of Pathological Anatomy - UNICAMP in the analysis of AgNORs (Nucleolar Organizing Regions) in blood cells. Previous studies demonstrate that the pattern of AgNORs can evidence proliferation alterations and cellular differentiation. Thus, the study of AgNORs could give additional information on the cellular kinetics. In many researches, the analysis of AgNORs is restricted to simple parameters, as the number of precipitations or the area occupied by AgNORs. The goal of this work is to introduce new shape parameters, not yet considered in the literature that can bring additional objective information to improve the classification among several types of neoplasias and, eventually, to bring supplementary prognostic information. In this sense, a system was developed - ImAgNOR - with tools that facilitate the semiautomatic segmentation of the structures as well as the extraction of the related parameters.

Conteúdo

INTRODUÇÃO	1
SEGMENTAÇÃO	5
2.1 IMAGENS.....	6
2.1.1 AQUISIÇÃO	6
2.1.2 PRÉ-PROCESSAMENTO	6
2.2 TÉCNICAS DE SEGMENTAÇÃO.....	7
2.2.1 VALORES DE EXTINÇÃO	7
2.2.1.1 Dinâmica	9
2.2.1.2 Superfície	10
2.2.1.3 Volume.....	11
2.2.1.4 Segmentação usando Valores de Extinção	13
2.2.2 ÁRVORE DE COMPONENTES.....	18
2.2.2.1 Árvore Simplificada	19
2.2.2.2 Segmentação usando a Árvore de Componentes	22
2.3 EXEMPLOS.....	25
2.4 SEGMENTAÇÃO DE NÚCLEOS.....	34
2.4.1 LIMAR DE CINZA	35
2.4.2 LIMAR DE ÁREA	36
2.4.3 REFINAMENTO	37
2.4.4 EXEMPLOS	38
2.5 SEGMENTAÇÃO DE AGNORS.....	44
2.5.1 ETAPAS.....	44
2.5.2 EXEMPLOS	45
2.6 CONCLUSÃO	50
PARÂMETROS DE FORMA.....	51
3.1 PARÂMETROS QUANTITATIVOS.....	51
3.2 PARÂMETROS QUALITATIVOS	52

3.2.1	ENTROPIA	53
3.2.2	SIMETRIA	56
3.2.2.1	Simetria de Contorno.....	57
3.2.2.2	Simetria em Níveis de Cinza	61
3.3	PARÂMETROS DA ÁRVORE DE COMPONENTES	64
EXTRAÇÃO DE PARÂMETROS E APLICAÇÕES		71
4.1	DISCRIMINAÇÃO ENTRE ENTIDADES DIAGNÓSTICAS	75
4.2	MORFOLOGIA COMO EQUIVALENTE DE PROCESSOS FISIOLÓGICOS OU PATOLÓGICOS.....	85
CONCLUSÃO		86
REFERÊNCIAS		88

Lista de Figuras

Figura 1 Exemplo de AgNORs.....	4
Figura 2 Pré-processamento.....	6
Figura 3 Princípio do cálculo dos valores de extinção.....	9
Figura 4 Cálculo do valor de extinção por imersão do relevo da imagem.....	11
Figura 5 Princípio da reconstrução geodésica.....	14
Figura 6 Segmentação por Valor de Extinção.....	16
Figura 7 Interface do programa mostrando a segmentação por valor de extinção.....	17
Figura 8 Árvore de componentes.....	18
Figura 9 Árvore Simplificada.....	19
Figura 10 Imagem hipotética simplificada.....	21
Figura 11 Imagens reais simplificadas.....	22
Figura 12 As 3 etapas da filtragem usando a árvore de componentes.....	23
Figura 13 Atributos dos nós da árvore.....	24
Figura 14 Interface do sistema ImAgNOR mostrando a segmentação por atributos usando a árvore de componentes.....	26
Figura 15 Imagens.....	28
Figura 16 Imagens.....	29
Figura 17 Imagens.....	30
Figura 18 Imagens.....	31
Figura 19 Imagens.....	32
Figura 20 Imagens.....	33
Figura 21 Interface do sistema ImAgNOR.....	34
Figura 22 Histograma hipotético exemplificando o funcionamento do algoritmo e um caso de falha.....	35
Figura 23 Refinamento por Reconstrução Binária.....	37
Figura 24 Etapas da segmentação.....	39
Figura 25 Etapas da segmentação.....	40

Figura 26 Etapas da segmentação.....	41
Figura 27 Etapas da segmentação.....	42
Figura 28 Interface mostrando os limiares de cinza.....	43
Figura 29 Exemplos de AgNORs.....	44
Figura 30 Segmentação de AgNORs usando a Árvore de Componentes.....	47
Figura 31 Segmentação sobre a Imagem Simplificada.....	48
Figura 32 Segmentação usando imagem simplificada e árvore de componentes.....	49
Figura 33 Entropia mínima e máxima.....	53
Figura 34 Exemplos do cálculo de entropia.....	55
Figura 35 Simetria de contorno.....	58
Figura 36 Exemplos do cálculo da distância de simetria de contorno.....	59
Figura 37 Transformada e Distância de Simetria Radial de Contorno.....	60
Figura 38 Transformada e Distância de Simetria Radial de Superfície.....	63
Figura 39 Parâmetros da Árvore de Componentes	65
Figura 40 Núcleos reais e tabela de medidas das árvores.....	66
Figura 41 Árvore de Componentes de um núcleo de célula normal.....	67
Figura 42 Árvore Simplificada da Árvore da Figura 41.....	68
Figura 43 Árvore de Componentes de um núcleo de célula cancerígena.....	69
Figura 44 Árvore Simplificada da Árvore da Figura 43.....	70
Figura 45 Interface do sistema mostrando a caixa de diálogo “Extrair Dados”.....	73
Figura 46 Interface do sistema mostrando a Grade de Dados.....	74
Figura 47 <i>Box-plot</i> para a Distância de Simetria Radial de Contorno (DSR-C) medida para os núcleos dos casos Controle e LLC.....	77
Figura 48 <i>Box-plot</i> para a Distância de Simetria Radial de Superfície (DSR-S) medida para os núcleos dos casos Controle e LLC.....	77
Figura 49 <i>Box-plot</i> para a Distância de Simetria Radial de Superfície (DSRS-Ag) das AgNORs dentro de cada núcleo medida para os casos Controle e LLC.....	78
Figura 50 <i>Box-plot</i> para a Entropia medida para os núcleos dos casos Controle e LLC.....	78
Figura 51 <i>Box-plot</i> para o número de Folhas da árvore medido para os núcleos dos casos Controle e LLC.....	79

Figura 52 <i>Box-plot</i> para o número de nós da árvore medido para os núcleos dos casos Controle e LLC.....	79
Figura 53 <i>Box-plot</i> para o número de nós da árvore simplificada medido para os núcleos dos casos Controle e LLC.....	80
Figura 54 <i>Box-plot</i> para o número máximo de filhos dos nós da árvore medido para os núcleos dos casos Controle e LLC.....	80
Figura 55 <i>Box-plot</i> para a média do número de filhos dos nós da árvore medida para os núcleos dos casos Controle e LLC.....	81
Figura 56 <i>Box-plot</i> para o número de Folhas da árvore medido para as AgNORs dos casos Controle e LLC.....	81
Figura 57 <i>Box-plot</i> para o número de nós da árvore medido para as AgNORs dos casos Controle e LLC.....	82
Figura 58 <i>Box-plot</i> para o número máximo de filhos dos nós da árvore medido para as AgNORs dos casos Controle e LLC.....	82
Figura 59 <i>Box-plot</i> para a área das AgNORs medida para as AgNORs dos casos Controle e LLC.....	83
Figura 60 <i>Box-plot</i> para a Distância de Simetria Radial de Contorno (DSR-C) medida para as AgNORs dos casos Controle e LLC.....	83
Figura 61 <i>Box-plot</i> para a Distância de Simetria Radial de Superfície (DSR-S) medida para as AgNORs dos casos Controle e LLC.....	84
Figura 62. <i>Box-plot</i> para a Entropia medida para as AgNORs dos casos Controle e LLC.....	84

Capítulo 1

Introdução

Este trabalho foi realizado juntamente com o Laboratório de Anatomia Patológica - UNICAMP, através de interação com o professor Konradin Metze, na análise de AgNORs (Regiões Organizadoras do Nucléolo) em células sanguíneas.

O núcleo celular se tornou objeto de maior atenção no campo de Anatomia Patológica com a introdução de uma técnica de visualização de regiões organizadoras do nucléolo (NORs), que evidenciam genes do DNA ribossomal em processo de transcrição¹ (rRNA). Como o rRNA é um componente importante dos ribossomos, a transcrição dos genes NOR é vital para a síntese de proteínas. A localização das NORs pode ser visualizada por uma técnica de impregnação pela prata (AgNORs) que tem sido usada na citogenética para identificar NORs em células em metáfase. Foi concluído, por pesquisadores, que somente NORs em atividade transcripcional podem ser visualizadas com prata (AgNORs). Nos últimos anos as AgNORs têm sido estudadas em células em interfase em lâminas histológicas ou citológicas, predominantemente de neoplasias [Gro91] [Lor96] [Lor98] [Met93] [Met99a] [Met99b] [Met99c] [Met99d].

A maneira de avaliação das AgNORs, por se tratar de um processo subjetivo, como será descrito adiante, varia muito entre os diversos pesquisadores, o que dificulta a comparação dos resultados.

¹Transferência da informação genética contida em um DNA para uma molécula de RNA mensageiro que, posteriormente, iniciará a síntese de proteínas.

Trabalhos anteriores demonstram que o padrão das AgNORs pode evidenciar alterações de proliferação e diferenciação celular. Assim, o estudo das AgNORs poderia dar informações adicionais sobre a cinética celular.

De acordo com a Figura 1, as AgNORs podem ser subdivididas em duas formas diferentes, em clusters, que são grupos de pontos com uma matriz comum correspondendo aos nucléolos, e dots, que são simples pontos não associados a um nucléolo. Analisando a imagem como um relevo, observamos que os pontos que constituem as AgNORs são vistos como picos. Os dots são picos finos com base no platô definido pelo núcleo, e os clusters são "montanhas" que emergem dos núcleos com bases mais grossas e com picos emergindo de sua parte mais alta.

A análise de AgNORs é usada na classificação de neoplasias malignas e na obtenção de informações prognósticas adicionais. Na grande maioria dos trabalhos, esta análise é restrita a parâmetros simples, como número de precipitações ou área ocupada pelas AgNORs. Como mostra a Figura 1, tratam-se de estruturas complexas que merecem uma abordagem mais sofisticada.

Histopatologia e citopatologia são áreas diagnósticas na medicina empenhadas em fazer um diagnóstico mais preciso possível a partir de lâminas histológicas ou citológicas de tecidos humanos examinados microscopicamente.

Esta habilidade é adquirida a partir de um treinamento individual de vários anos ao lado de pessoas experientes do ramo. O ato diagnóstico porém é um processo subjetivo sujeito a variações entre observadores, mesmo entre pessoas experientes.

Comparações de diagnósticos feitos por diferentes observadores experientes comprovaram estas variações em todas as áreas da histopatologia, o que implica um certo grau de incerteza em relação a um diagnóstico preciso.

Apesar de os critérios diagnósticos estarem sujeitos a adaptações constantes, um certo grau da variação subjetiva sempre irá permanecer. Por isso métodos objetivos como morfometria ou análise de textura foram introduzidos com a finalidade de garantir diagnósticos mais objetivos, e assim maior segurança para os pacientes [Baa83][Mar94][Ham95].

Inicialmente foram introduzidos parâmetros simples, tais como número de mitoses por campo microscópico, diâmetro (ferret) dos núcleos ou nucléolos, área dos núcleos ou

nucléolos, seguidos por dados mais sofisticados, tais como fatores de forma, dimensão fractal ou os descritores de textura [Har87].

A meta principal deste trabalho baseia-se nesta tentativa de objetivar as análises histológicas e citológicas. O objetivo é implementar novos parâmetros morfológicos, ainda não usados na literatura, que possam trazer informações objetivas adicionais, para melhorar a classificação entre vários tipos de neoplasias e, eventualmente, trazer informações prognósticas complementares.

A determinação de parâmetros de forma, neste trabalho, baseou-se em três fontes de informações: no estudo dos trabalhos realizados sobre AgNORs, principalmente, aqueles com a participação do professor co-orientador Konradin Metze; no estudo de técnicas de processamento de imagens para extração de informações da imagem; e na análise de algumas imagens. O resultado consiste na definição e implementação de algumas operações que, teoricamente, podem constituir um bom vetor discriminante. Estes parâmetros de forma que podem servir para classificação foram divididos em quantitativos, qualitativos e medidas de complexidade.

Para que os parâmetros possam ser extraídos das estruturas de interesse da imagem é necessário que estas sejam segmentadas. Assim, a segmentação constitui outro objetivo importante deste trabalho. Várias técnicas de segmentação foram estudadas, entre estas, foi dada ênfase àquelas que possibilitam um processo de segmentação semi-automático. O capítulo 2 dedica-se a este assunto.

Como resultado deste trabalho, foi construído um sistema de processamento de imagens, denominado ImAgNOR, para o ambiente Windows, desenvolvido na ferramenta Visual C++. Este sistema dispõe de uma série de ferramentas que auxiliam na análise e extração de informações das estruturas presentes nas imagens digitais obtidas em laboratório. Uma das principais funções do sistema é a segmentação, exemplificada por algumas telas da interface no capítulo 2.

O capítulo 3 aborda os aspectos teóricos sobre os parâmetros de forma. No capítulo 4 é demonstrada a metodologia de extração de parâmetros através do sistema ImAgNOR e algumas aplicações práticas. As conclusões sobre o trabalho são apresentadas no capítulo 5.

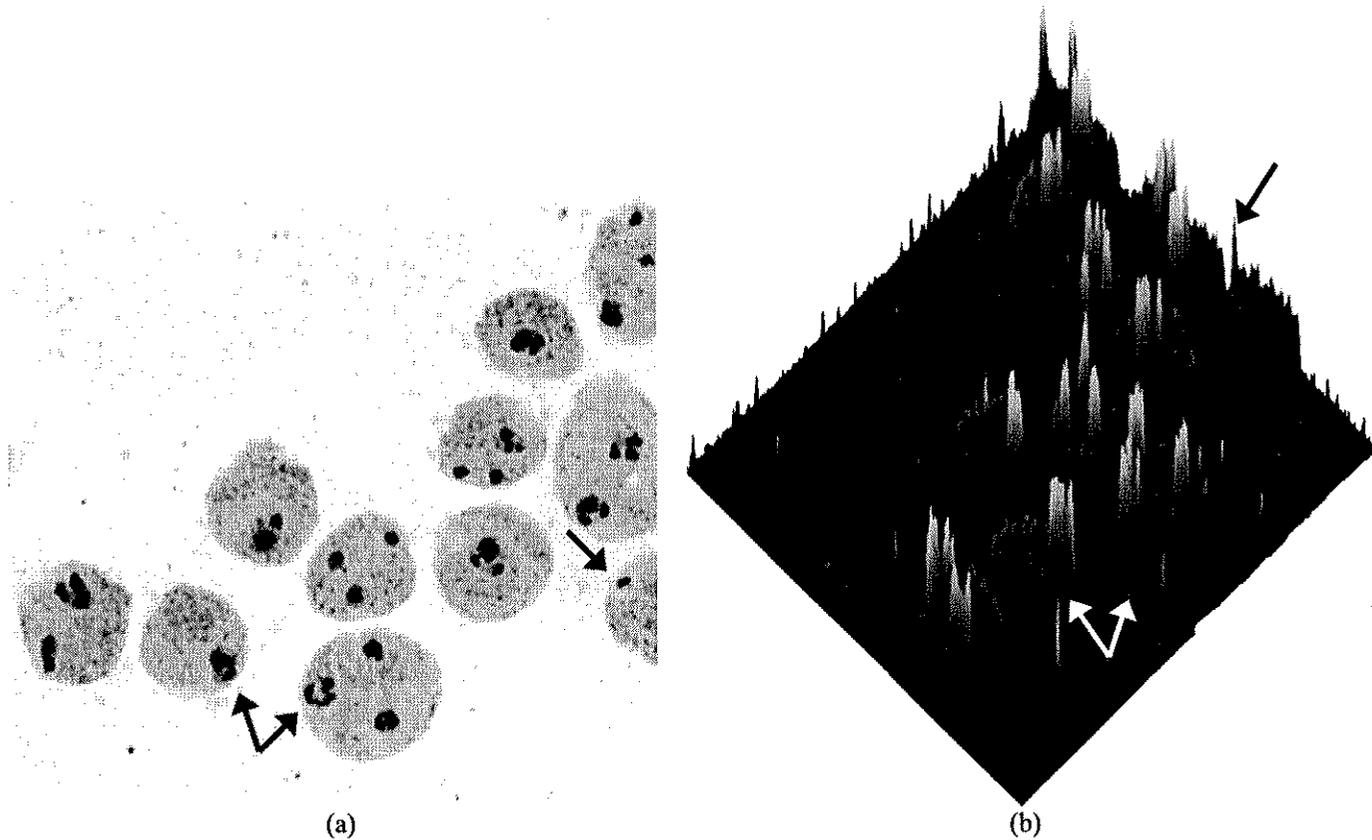


Figura 1. Exemplo de AgNORs. A imagem (a) mostra um grupo de células sanguíneas (linfócitos de leucemia mielóide aguda) e a imagem (b) representa o seu horizonte flutuante. A seta simples, em (a), aponta para um núcleo contendo um *dot* e, em (b), a seta simples aponta para a região do relevo correspondente a este núcleo. As setas duplas, em (a), apontam para *clusters* de dois núcleos diferentes e, em (b), as setas duplas apontam para as regiões do relevo correspondentes a estes núcleos.

Capítulo 2

Segmentação

Neste capítulo são apresentadas as técnicas de segmentação de imagens utilizadas no trabalho, assim como a maneira como são empregadas de acordo com a dificuldade encontrada no processo de segmentação.

As imagens deste trabalho podem ser caracterizadas por não possuírem uma homogeneidade em relação aos níveis de cinza das estruturas (*background*, núcleo e AgNOR) entre um caso e outro. Contudo, dentro de um mesmo caso, as imagens possuem características comuns. Esta heterogeneidade em relação aos níveis de cinza se deve, principalmente, ao processo de coloração. As estruturas, quando submetidas à coloração de prata, não a absorvem de forma constante, durante o mesmo período de tempo.

Como o grau de dificuldade na segmentação destas imagens varia bastante, foram testadas várias técnicas, visando definir uma forma adequada de segmentação sem perda de informações importantes. Em alguns casos, um simples limiar global de nível de cinza é suficiente para segmentar as estruturas de interesse, mas em outros, em que estas aparecem de forma mais complexa, outras técnicas devem ser utilizadas, como os valores de extinção e a segmentação por atributos usando a árvore de componentes, descritas a seguir.

As primeiras seções deste capítulo fazem considerações sobre as imagens e algumas técnicas de segmentação aqui empregadas. Nas últimas seções são apresentadas as etapas de segmentação para núcleos e AgNORs, ilustrando o emprego destas técnicas. Nestas seções é exemplificada igualmente a utilização do sistema ImAgNOR desenvolvido neste trabalho.

2.1 Imagens

2.1.1 Aquisição

As imagens de células utilizadas no trabalho foram adquiridas no Laboratório de Patologia - UNICAMP com o sistema KS 300 ZEISS-KONTRON e gravadas em formato bitmap windows de 24 bits. Como células normais foram usadas imagens citológicas (coradas pela técnica de AgNOR) de linfócitos normais. Como células cancerígenas foram consideradas imagens citológicas (coradas pela técnica de AgNOR) de blastos de pacientes com leucemia aguda (LLA) [Lor98]. Estas imagens foram obtidas de lâminas contendo células submetidas ao processo de impregnação pela prata por 10 minutos.

2.1.2 Pré-processamento

As imagens coloridas obtidas originalmente são transformadas para níveis de cinza (8 bits), ver Figura 2. Para a eliminação de alguns ruídos, gerados pela distorção da imagem na aquisição, foi aplicado o filtro da mediana com uma máscara 3x3 [Gon79], que elimina ruídos, suavizando a imagem, sem no entanto incluir novos níveis de cinza. Esta filtragem é utilizada apenas no processo de segmentação. A extração dos parâmetros é realizada a partir da imagem original em níveis de cinza.

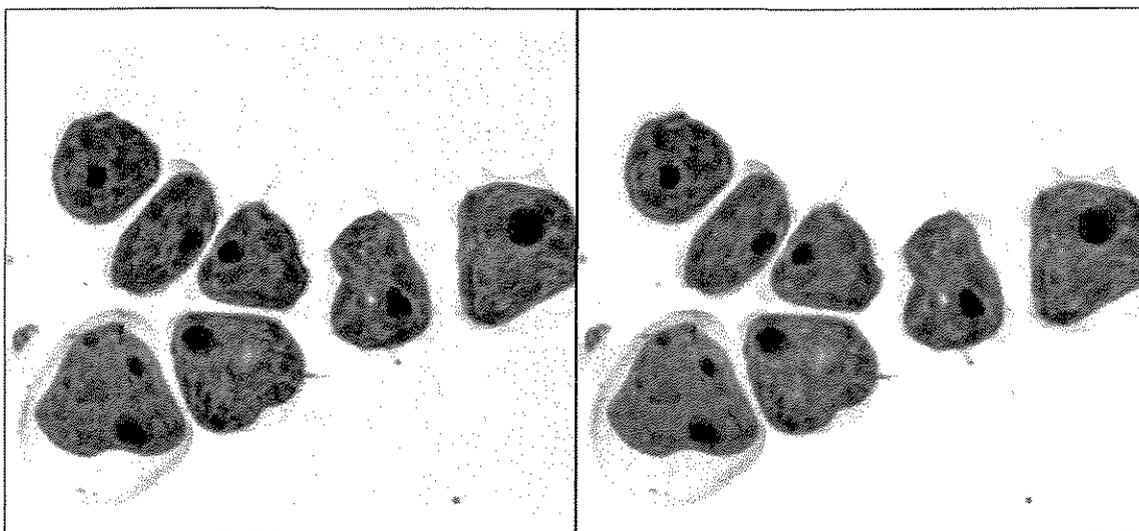


Figura 2. Pré-processamento. As imagens originalmente em cores 24 bits são convertidas para níveis de cinza a partir da média aritmética das componentes RGB.

2.2 Técnicas de Segmentação

2.2.1 Valores de Extinção

O cálculo dos valores de extinção utiliza os conceitos de platô e extremo regional de uma imagem. Para entender melhor este cálculo são apresentadas as seguintes definições, baseadas em [Gri92][Vac95]:

Definição 1: Imagem digital em níveis de cinza

Uma imagem digital em níveis de cinza é uma função $f: D \rightarrow \mathbb{N}$, onde $D \subseteq \mathbb{Z}^2$ é o domínio da imagem. Para um *pixel* $p \in D$ o valor $f(p)$ representa o nível de cinza deste *pixel*. Se a imagem for vista como um relevo, $f(p)$ pode ser interpretada como a altitude do *pixel* p .

Definição 2: Caminho

Considere G a grade subjacente de uma imagem digital. G é um subconjunto de $\mathbb{Z}^2 \times \mathbb{Z}^2$. Um caminho P de comprimento l entre os *pixels* p e q é uma $l+1$ -tupla $(p_0, p_1, \dots, p_{l-1}, p_l)$ tal que $p_0 = p, p_l = q$ e $\forall i \in [0, l-1] : (p_i, p_{i+1}) \in G$.

Definição 3: Componente conexo

Considere um conjunto de *pixels* $S \subset D$. O conjunto S é dito conexo se para cada par de *pixels* $p, q \in S$ há um caminho entre p e q que passa apenas pelos *pixels* de S . Um componente conexo de S , C , é um conjunto conexo máximo e não vazio de *pixels* (elementos) de S .

Definição 4: Platô

O platô de uma função f no ponto x ($x \in D$), $\text{Plt}_x(f)$, é a maior componente conexa contendo x e de altitude (nível de cinza) constante igual a $f(x)$. Seja uma imagem E :

$$\text{Plt}_x(f) = C_x (y \in E \mid f(y) = f(x))$$

Definição 5: Extremos regionais

Um extremo regional (mínimo ou máximo) é um platô S onde cada vizinho q de qualquer pixel $p \in S$ é tal que $f(q) \geq f(p)$, para o caso de mínimos regionais, e $f(q) \leq f(p)$, para o caso de máximos regionais.

Definição 6: Operador conexo numérico

Um operador numérico ψ é conexo se, e somente se, ele estende os platôs da imagem de entrada (E):

$$\psi \text{ é conexo} \Leftrightarrow \forall x \in E, \text{Plt}_x(f) \subset \text{Plt}_x(\psi(f))$$

Definição 7: Valor de extinção de um conjunto conexo

Seja $\Psi = (\psi_\lambda)_{\lambda \geq 0}$ uma família decrescente de transformações conexas anti-extensivas, isto é:

1. $\forall \lambda \geq 0, \psi_\lambda(f)$ é conexo;
2. $\forall M \geq \lambda \geq 0 \Rightarrow \psi_\lambda \leq \psi_M$ (decrescente);
3. $\forall \lambda \geq 0, \psi_\lambda(f) \leq f$ e $\psi_0 = \text{Id}$ (anti-extensiva).

O índice λ caracteriza a persistência de uma partícula conexa x em relação à família Ψ . O valor de extinção de x , em relação a Ψ , $\varepsilon_\psi(x)$, é o valor máximo de λ tal que ψ_λ preserva x :

$$\varepsilon_\psi(x) = \sup \{ \lambda \geq 0 \mid \psi_\lambda(x) = x \}$$

Definição 8: Valor de extinção de um extremo regional

Seja M um máximo (mínimo) regional de f , e $\Psi = (\psi_\lambda)_{\lambda \geq 0}$ uma família decrescente de transformações conexas anti-extensivas. O valor de extinção de M , $\varepsilon_\psi(M)$, é o máximo valor λ tal que M continua ser um máximo (mínimo) regional de $\psi_\lambda(f)$:

$$\varepsilon_\psi(M) = \sup \{ \lambda \geq 0 \mid \forall M \leq \lambda, M \subset \text{Max}(\psi_M(f)) \}$$

O valor de extinção caracteriza uma medida de “persistência” das estruturas na imagem durante um processo de filtragem. A importância da extração destas características nas operações morfológicas levou a considerá-las na análise das estruturas das imagens abordadas neste trabalho.

Neste caso são consideradas três medidas de valor de extinção associadas aos extremos da imagem: os valores de extinção dinâmica, de superfície e de volume, descritos a seguir.

2.2.1.1 Dinâmica

Um dos métodos mais utilizados em morfologia matemática para selecionar os extremos de uma imagem, segundo seu contraste, é a dinâmica.

Definição 9: Dinâmica

Seja M um máximo regional e um conjunto de caminhos $C = (p_0, p_1, \dots, p_n)$ tal que $p_0 \in M$ e $f(p_n) > f(p_0)$. A dinâmica de M pode ser definida como (Figura 3):

$$\text{Din}(M) = f(M) - \sup \{ \inf \{ f(x), x \in C \} \}$$

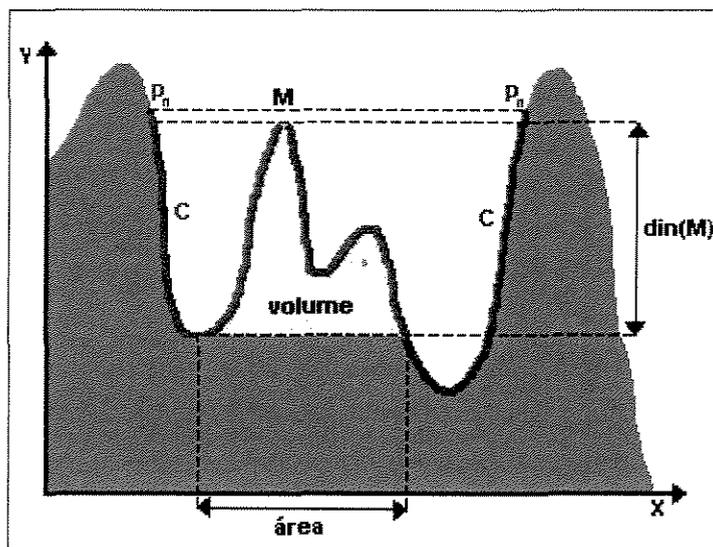


Figura 3. Princípio do cálculo dos valores de extinção. A imagem é considerada em relevo com os níveis de cinza em camadas. M é um máximo regional e $\text{din}(M)$ indica o seu valor de extinção de dinâmica, assim como a medida indicada pelo identificador “área” indica a dimensão do valor de extinção de superfície associado ao máximo M , e a região em amarelo correspondente ao valor de extinção de volume associado a este máximo. (fonte: [Vac95])

Informalmente, a dinâmica de um máximo regional M mede o desnivelamento mínimo a percorrer, quando, partindo de M , se atinge um ponto de maior altitude [Gri92]. Pela Figura 3, percebe-se que, para o máximo indicado por M , existem dois caminhos que o levam para outros máximos de maior altitude. Estes caminhos estão representados na figura pelas cores azul e vermelho. O conjunto $\inf \{ f(x), x \in C \}$, para este exemplo,

correspondente aos níveis de cinza dos mínimos (2) regionais dos caminhos azul e vermelho. O conjunto $\sup \{ \inf \{ f(x), x \in C \} \}$ corresponde, então, ao maior destes 2 valores, neste caso, o nível de cinza do mínimo regional do caminho azul. E assim, o valor de dinâmica, para o máximo regional M , é calculado pela diferença entre seu nível de cinza e o nível de cinza do mínimo do caminho azul. O mesmo princípio pode ser utilizado para calcular os outros dois valores de extinção abordados a seguir.

2.2.1.2 Superfície

O valor de extinção de superfície permite extrair uma característica de tamanho das estruturas da imagem, ou seja, caracteriza uma medida de persistência destas estruturas segundo sua área [Vac95]. Antes de definir o valor de extinção é considerado, a seguir, o conceito de conjunto limiar.

Definição 10: Conjunto Limiar

Seja uma imagem f . Os conjuntos abaixo são definidos como conjuntos limiares de f no nível h .

Definição 10.1: conjunto limiar superior

$$X_h^+(f) = \{ x \in D \mid f(x) \geq h \}$$

Definição 10.2: conjunto limiar inferior

$$X_h^-(f) = \{ x \in D \mid f(x) \leq h \}$$

Definição 11: Valor de Extinção de Superfície

Seja a abertura de superfície, $\gamma_\lambda^a(f)$, de uma imagem numérica f , de tamanho λ , dada por:

$\gamma_\lambda^a(f)(x) = \sup \{ h \leq f(x) \mid \text{Área}(C_x(X_h^+(f))) \geq \lambda \}$, em que $\text{Área}(X)$ = superfície do conjunto X (número de *pixels* da componente).

O valor de extinção de superfície, \mathcal{E}^a , é dado por:

$$\mathcal{E}^a(M) = \sup \{ \lambda \geq 0 \mid M \cap \text{Max}(\gamma_\lambda^a(f)) \neq \emptyset \}, \forall M \in \text{Max}(f).$$

O cálculo do valor de extinção de superfície pode ser entendido considerando um processo de imersão do relevo da imagem em água. Para o caso dos mínimos, quando o nível das águas de dois mínimos se encontram, calcula-se a área da base da bacia do

mínimo de maior altitude e associa-se a ele este valor. Na Figura 4, a medida indicada pelo atributo “área” corresponde ao valor de extinção de superfície do mínimo regional M4.

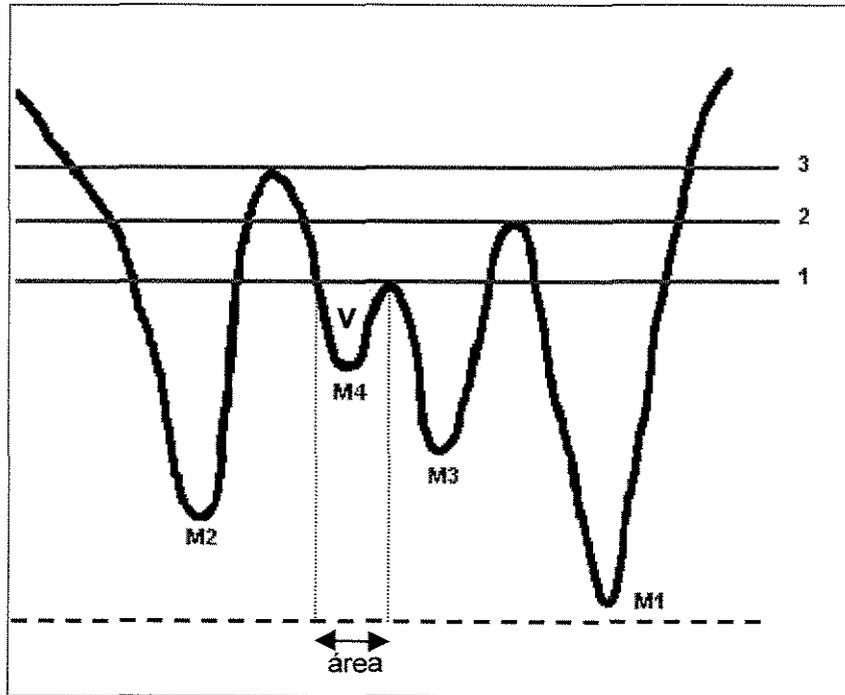


Figura 4. Cálculo do valor de extinção por imersão do relevo da imagem. À medida que o nível da água sobe, calcula-se, a cada encontro das águas de dois mínimos, os valores de extinção referentes ao mínimo de maior altitude. Assim, os valores de extinção seriam calculados para M4, no nível de água 1, M3, no nível 2, M2, no nível 3, e M1.

2.2.1.3 Volume

O valor de extinção de volume permite extrair uma característica de volume das estruturas da imagem, ou seja, caracteriza uma medida de persistência destas estruturas segundo o volume ocupado. Isto permite distinguir objetos com dinâmica e valores de extinção de superfície iguais [Vac95].

Definição 12: Valor de Extinção de Volume

Seja o arrasamento de volume λ de f , $a^v_\lambda(f)$, sendo f uma imagem numérica, dado por:

$$a^v_\lambda(f)_{(x)} = \sup \{ s \leq f(x) \mid \text{Vol}^s_X(f) \geq \lambda \},$$
 em que $\text{Vol}^s_X =$ volume do domo contendo X acima do limiar s :

$$\text{Vol}^s_X = \sum (f(x) - s), y \in C_x(X^+_s(f)).$$

O valor de extinção de volume, \mathcal{E}^v , é dado por:

$$\mathcal{E}^v(M) = \sup \{ \lambda \geq 0 \mid \forall M \leq \lambda, M \cap \text{Max}(a_M^v(f)) \neq \emptyset \}, \forall M \in \text{Max}(f).$$

Assim como para o cálculo do valor de extinção de superfície, o cálculo do valor de extinção de volume pode ser entendido considerando um processo de imersão do relevo da imagem em água. Quando os níveis das águas de dois mínimos se encontram, calcula-se o volume do domo do mínimo de maior altitude e associa-se a ele este valor. Na Figura 4, a região amarela referenciada pela letra “V” corresponde ao valor de extinção de volume do mínimo regional M4.

O cálculo da dinâmica também pode ser realizado utilizando esta técnica [Gri92].

2.2.1.4 Segmentação usando Valores de Extinção

Como explicado anteriormente, os valores de extinção estão associados aos extremos de uma função. Esta informação pode ser utilizada para segmentar a imagem, extraindo apenas as estruturas de interesse, utilizando para isso a técnica de reconstrução geodésica [Beu92] abordada a seguir.

Definição 13: Dilatação geodésica

A dilatação geodésica de uma função g limitada por f utiliza o conceito de dilatação morfológica (δ) [Ser82] e é dada por:

$$\delta^1_f(g) = \inf \{ \delta^1(g), f \mid g \leq f \}$$

$$\delta^n_f(g) = \delta^1_f(\delta^1_f(\dots \delta^1_f(g))), g \leq f$$

Definição 14: Erosão geodésica

A erosão geodésica de uma função g limitada por f utiliza o conceito de erosão morfológica (ε) [Ser82] e é dada por:

$$\varepsilon^1_f(g) = \sup \{ \varepsilon^1(g), f \mid g \geq f \}$$

$$\varepsilon^n_f(g) = \varepsilon^1_f(\varepsilon^1_f(\dots \varepsilon^1_f(g))), g \geq f$$

Definição 15: Reconstrução geodésica por dilatação

A reconstrução geodésica por dilatação de uma função f marcada por g é dada por:

$$R_f(g) = \delta^\infty_f(g),$$

onde o símbolo “ ∞ ” significa que a função de dilatação geodésica é realizada até a idempotência, ou seja, até que o resultado não seja mais modificado pelas operações sucessivas.

Definição 16: Reconstrução geodésica por erosão

A reconstrução geodésica por erosão de uma função f marcada por g , definida de maneira dual em relação à operação anterior, é dada por:

$$R^*_f(g) = \varepsilon^\infty_f(g),$$

onde o símbolo “ ∞ ” significa que a função de erosão geodésica é realizada até a idempotência.

Esta reconstrução “recupera” na imagem original as informações indicadas pela imagem marcadora. A Figura 5 exemplifica o princípio da reconstrução geodésica.

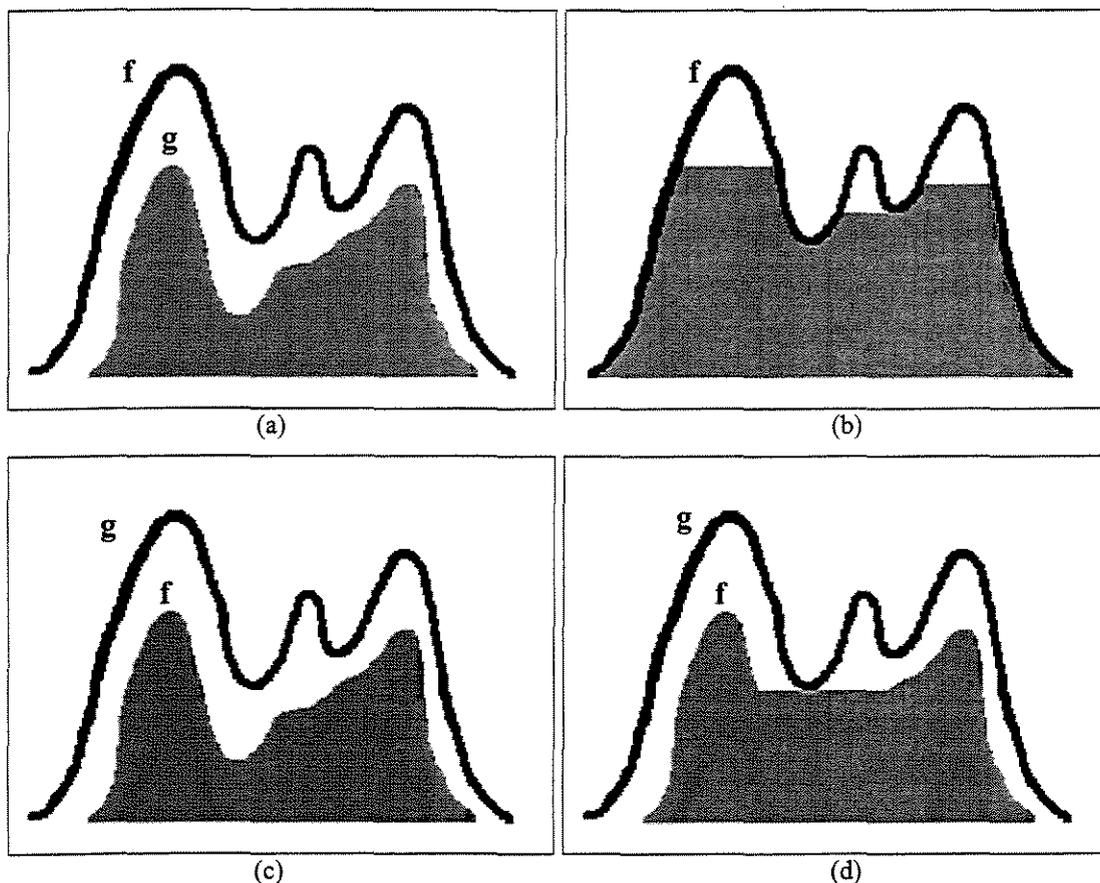


Figura 5. Princípio de reconstrução geodésica. Imagens: (a) imagem original f e imagem marcadora g ; (b) reconstrução de f por g ; (c) imagem original f e marcadora g ; (d) reconstrução dual de f por g .

O método empregado aqui para obter a segmentação das estruturas da imagem constitui-se dos seguintes passos (Figura 6):

1. Define-se os extremos (Figura 6b) da imagem original (Figura 6a);
2. Gera-se a imagem da Figura 6c por limiarização do valor de extinção (dinâmica, área ou volume) da Figura 6b;
3. Gera-se a imagem da Figura 6d obtida pela diferença entre a imagem da Figura 6b e a imagem da Figura 6c;
4. Gera-se a imagem da Figura 6f obtida da reconstrução da original (Figura 6a) utilizando a imagem da Figura 6d como Marcador;

5. Finalmente, gera-se a imagem binária da Figura 6g obtida pelo seguinte processo:

- Seja f_1 a imagem da Figura 6a, f_2 a imagem da Figura 6f e f_3 uma imagem binária de saída;
- Para cada *pixel* $p_1 \in f_1$ e para cada *pixel* $p_2 \in f_2$ de mesma coordenada (x, y) verifica-se se $f_1(p_1) \neq f_2(p_2)$;
- Se a resposta acima for verdadeira, gera-se na imagem de saída f_3 um *pixel* p_3 de coordenada (x, y) com o valor 1 (cor preta), ou seja, $f_3(p_3)=1$, senão faz-se $f_3(p_3)=0$ (cor branca). Assim, após a análise de todos os *pixels*, a imagem de saída f_3 é obtida como na Figura 6g.

A segmentação não pode ser obtida diretamente da reconstrução da imagem original pela imagem marcadora (Figura 6c) porque o processo de reconstrução “recupera” mais informação que o desejado, como pode ser visto na imagem da Figura 6e.

Por isso, este processo deve ser realizado em dois passos: gerando primeiro uma imagem obtida da reconstrução da imagem original, usando como marcadora a imagem da Figura 6d. Esta imagem representa os marcadores para as outras estruturas não desejadas, obtendo a imagem da Figura 6f em que as estruturas desejadas não aparecem. A partir desta informação, gera-se a imagem binária da Figura 6g obtida como descrito acima e utilizada como domínio para a definição da imagem da Figura 6h representando o resultado final desejado.

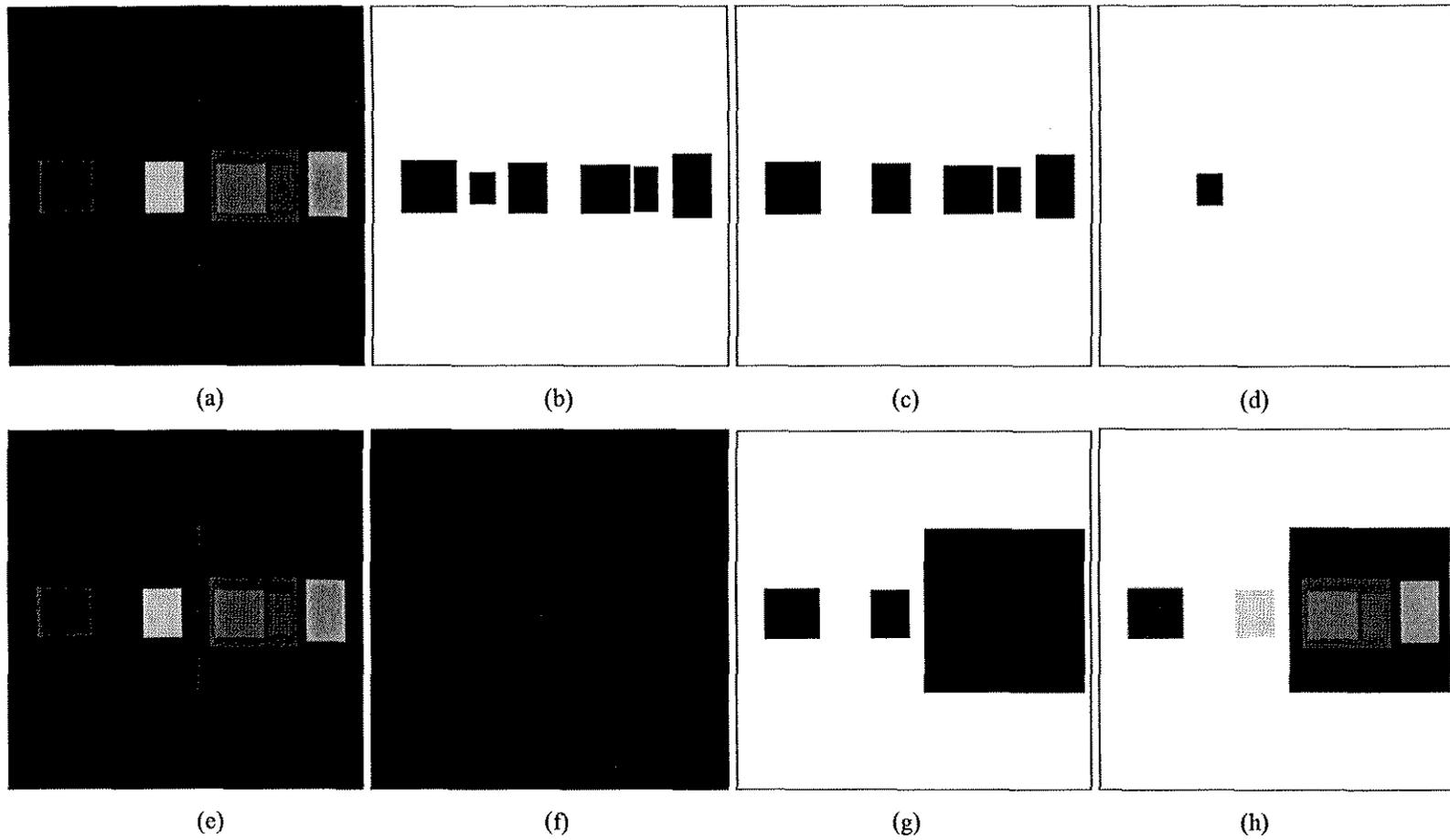


Figura 6. Segmentação por Valor de Extinção. Imagens: (a) original; (b) extremos; (c) extremos seleccionados (marcadores); (d) extremo não seleccionado; (e) reconstrução de (a) usando (c); (f) reconstrução de (a) usando (d); (g) pixels de nível de cinza diferentes entre (a) e (f); (h) resultado final (imagem segmentada) obtido de (a) usando (g) como domínio.

Como pode ser observado, este método de segmentação é interativo e exige conhecimento das técnicas utilizadas. Para facilitar este trabalho foi elaborada, no sistema ImAgNOR, uma interface que simplifica o processo, de tal forma que algumas etapas são realizadas de modo transparente para o usuário.

Esta interface, que pode ser vista na Figura 7, apresenta a visualização de três imagens: a original, o resultado da filtragem e o resultado da segmentação usando o limiar selecionado de valor de extinção, que pode ser de um dos três tipos: dinâmica, superfície ou volume. A interface possui um botão “Testar” que permite a realização de vários testes, gerando as pré-visualizações dos resultados. Alguns botões de *zoom* também estão disponíveis facilitando a análise dos resultados de teste.

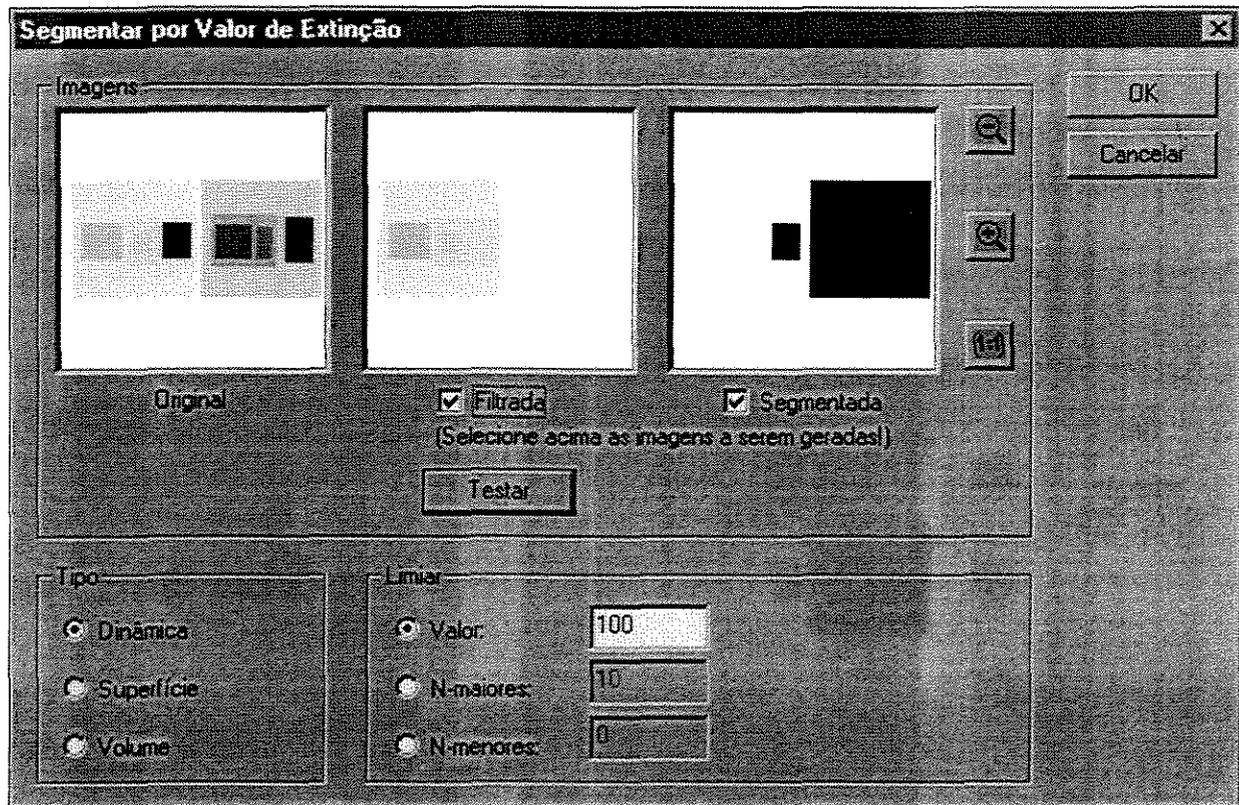


Figura 7. Interface do programa ilustrando a segmentação por valor de extinção.

2.2.2 Árvore de Componentes

A árvore de componentes é uma representação, em forma de grafo, de uma imagem em níveis de cinza contendo informações sobre cada componente da imagem e as ligações existentes entre as componentes a níveis de cinza seqüenciais na imagem [Jon97a].

Assim, pode-se definir a árvore de componentes como um conjunto de nós conectados por um conjunto de arestas. Cada nó na árvore representa uma componente particular na imagem em níveis de cinza. Uma componente em uma imagem em níveis de cinza é definida como um conjunto conexo de pixels em um conjunto limiarizado da imagem. O nó é uma representação abstrata da componente que pode ser desde uma lista de todos os pixels na componente até um simples atributo tal como a área da componente [Jon97a]. Um exemplo de uma árvore de componentes é mostrado na Figura 8.

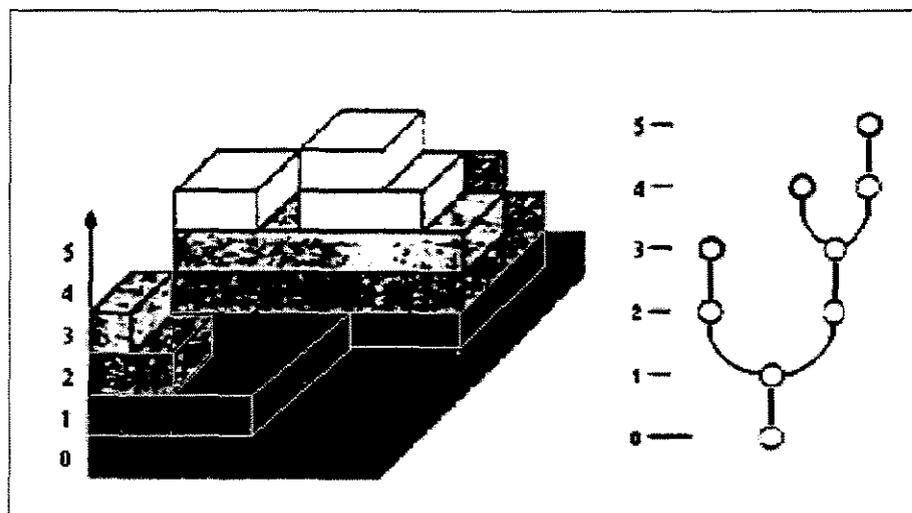


Figura 8. Árvore de componentes (fonte: [Jon97a]).

Nesta representação da imagem, pode-se aplicar tanto filtragem como segmentação, através de um processo de decisão que classifica os nós de modo a serem removidos ou preservados. Esta análise, por sua vez, pode ser feita baseando-se em informações armazenadas nos nós. Neste trabalho, alguns atributos, tais como área e volume da componente, descritos na seção 2.2.2.2, foram definidos para serem utilizados no processo de segmentação.

2.2.2.1 Árvore Simplificada

Com o objetivo de gerar uma imagem contrastada, para facilitar o processo de segmentação, é proposta neste trabalho uma simplificação da Árvore de Componentes.

A Árvore Simplificada, obtida da Árvore de Componentes, foi definida para se obter uma representação da mesma árvore, e portanto, da mesma imagem, que agrupasse as componentes intermediárias. Estas componentes são representadas pelos nós com apenas um filho que se encontram entre dois nós com mais de um filho (nó 4 na Figura 9), ou entre uma folha e um nó com mais de um filho (nós 2 e 7 na Figura 9). Este processo gera uma imagem contrastada e permite avaliar o grau de fragmentação da árvore de um objeto da imagem. A Figura 9 mostra um exemplo de árvore simplificada.

O algoritmo em alto nível abaixo descreve o método de simplificação da árvore:

```

Simplifica_Arv (Nó)
{
  - Se Nó é uma folha então RETORNA;
  - Se Nó é NULL então faça Nó igual à RAIZ;
  - Para cada filho de Nó faça:
    - Se Nó possui apenas um filho então
      {
        - "Eleva-se" os pixels da componente que o Nó
          representa para o nível de cinza do filho;
      }
    - Simplifica_Arv (Nó); //chamada recursiva
}

```

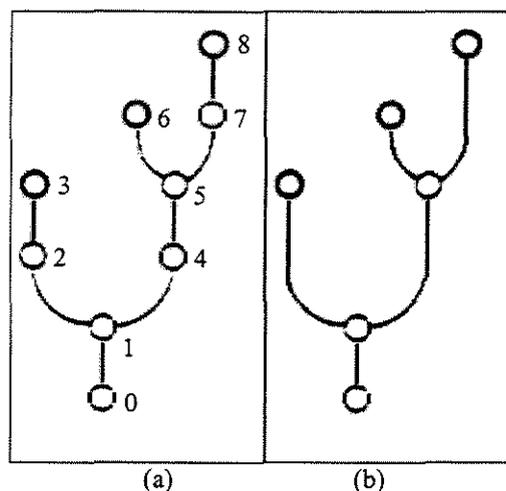


Figura 9. Árvore Simplificada. Note que os nós intermediários da árvore original (a) foram “eliminados” na árvore simplificada (b).

A partir da Árvore Simplificada, pode-se percorrer a imagem original gerando uma imagem correspondente mais contrastada, como ilustrado na Figura 10 e Figura 11.

A Figura 10 mostra como o processo de simplificação da árvore gera um maior contraste na imagem original. A imagem da Figura 10b representa a imagem simplificada da original (Figura 10a). As linhas brancas sobre as imagens da Figura 10a e Figura 10b marcam os pontos para os quais foram gerados os gráficos da Figura 10c e Figura 10d que mapeiam nível de cinza para altura. As imagens da Figura 10e e Figura 10f representam o horizonte flutuante das imagens da Figura 10a e Figura 10b, respectivamente.

A partir desta figura, pode-se verificar como o contraste é gerado, elevando-se os níveis de cinza da imagem original. Neste caso, o número de folhas é preservado, ou seja, o número de máximos da imagem mantém-se o mesmo, assim como os seus níveis de cinza.

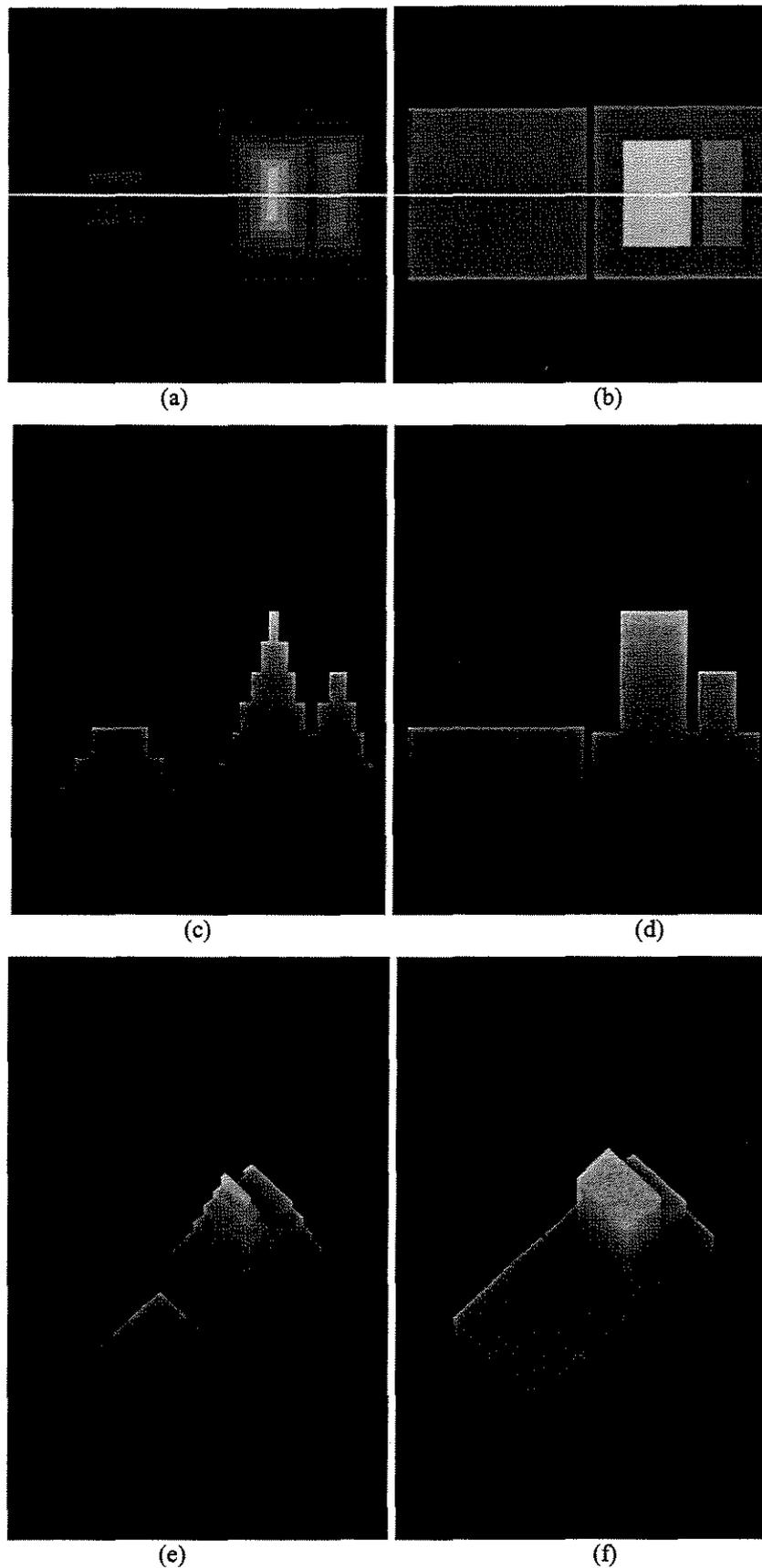


Figura 10. Imagem hipotética simplificada. Imagens: (a) original; (b) simplificada de (a); (c) e (d) são gráficos de coluna, respectivamente de (a) e (b), que mapeiam nível de cinza para altura dos pontos sobre a linha branca; (e) e (f) são horizontes flutuante de (a) e (b), respectivamente.

Este método é adequado a imagens contendo objetos com uma relação de inclusão, como no caso das imagens deste trabalho, em que as AgNORs são estruturas contidas nos núcleos das células. A Figura 11 mostra um exemplo deste processo aplicado a imagens reais. As imagens apresentadas nesta figura são o complemento (negativo) das originais.

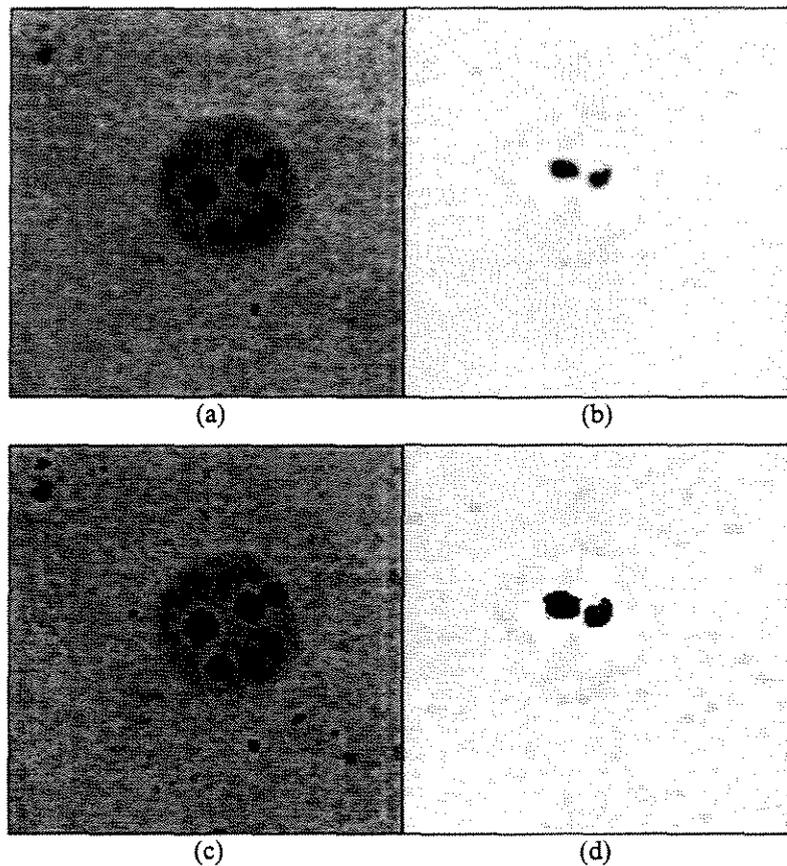


Figura 11. Imagens reais simplificadas. As imagens (c) e (d) representam as imagens contrastadas das imagens originais (a) e (b), respectivamente, obtidas através de suas árvores simplificadas.

2.2.2.2 Segmentação usando a Árvore de Componentes

De modo geral, a árvore de componentes, uma vez definida, pode ser utilizada para segmentar e filtrar a imagem através das informações armazenadas nos nós ou, ainda, através da estrutura global da árvore.

O processo geral de filtragem consiste de três etapas [Jon97b]:

1. Construção da árvore a partir da imagem original;
2. Percorrer a árvore, das folhas até a raiz, verificando se as informações nos nós se encontram dentro dos limiares dos parâmetros seleccionados. Se os dados do nó se encontram dentro destes limiares, então, este nó é marcado.
3. Após percorrer toda a árvore realizando esta verificação, a árvore é novamente percorrida para saber que componentes não foram marcadas, as quais deverão ser filtradas para gerar a nova imagem de saída. A Figura 12 abaixo exemplifica o processo.

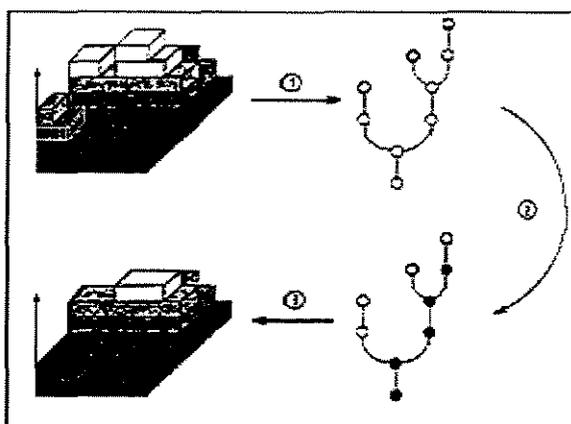


Figura 12. As 3 etapas da filtragem usando a árvore de componentes (fonte: [Jon97b]).

A segmentação segue os mesmos passos da filtragem, gerando a imagem segmentada a partir da diferença entre a imagem original e a filtrada.

Neste trabalho, os atributos armazenados nos nós da árvore e utilizados para a segmentação são indicados na Figura 13. Abaixo, segue a descrição deste atributos acompanhados de um “identificador” para facilitar a referência aos mesmos:

- Área (AREA): número de *pixels* que compõem a componente;
- Nível de cinza (NC): nível de cinza dos *pixels* da componente;
- Altura de domo (ALT_DOMO): diferença entre o nível de cinza da folha mais alta a partir de um dado nó e o nível de cinza do nó-pai;
- Volume (VOL): soma dos níveis de cinza dos *pixels* das componentes a partir de um dado nó (deste para cima);
- Volume de domo (VOL_DOMO): esta medida representa o volume das componentes a partir de um dado nó, ou seja, é igual ao valor de Volume

subtraído do volume abaixo desta componente. $VOL_DOMO = VOL - (AREA \times (NC \text{ do nó-pai}))$;

- Valores de Extinção: valores de extinção dinâmica (VE_DIN), superfície (VE_SUP) e volume (VE_VOL), calculados para as folhas da árvore.

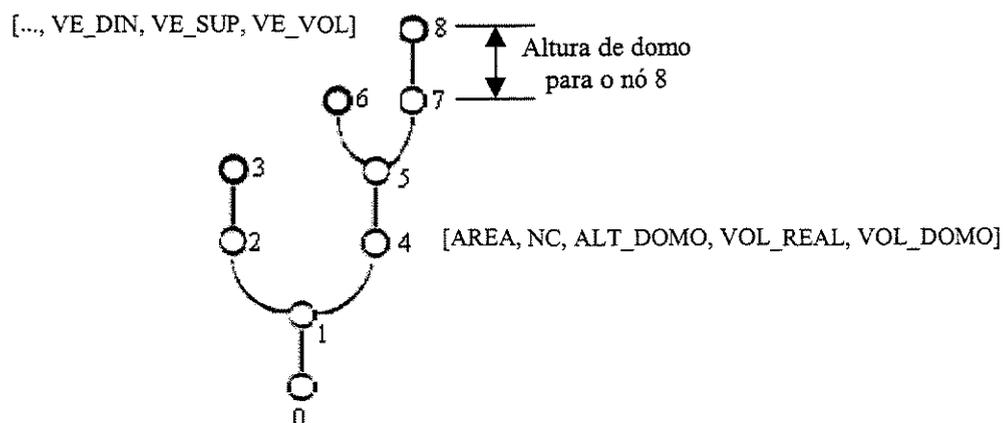


Figura 13. Atributos dos nós da árvore. O vetor de atributos ao lado do nó com *label* 4 exemplifica os valores armazenados em cada nó. Para as folhas, além destes valores, são armazenados os valores de extinção, como exemplificado na folha com *label* 8. Na imagem é demonstrada a medida relativa à altura de domo do nó 8.

2.3 Exemplos

A Figura 14 mostra a caixa de diálogo do programa onde é feita a interação do usuário com o sistema, no processo de segmentação usando a Árvore de Componentes. Neste diálogo, pode-se escolher limiares de vários atributos, como área, volume, limiar de cinza e altura de domo, que podem ser testados (botão “Testar”) e os resultados visualizados de duas maneiras:

- Imagem filtrada: mostra o que permanece da imagem original quando os limiares selecionados são aplicados aos nós da árvore;
- Imagem segmentada: imagem binária resultante da limiarização correspondente às estruturas satisfazendo os respectivos limiares.

Outros atributos que podem ser aplicados utilizando a árvore são os valores de extinção que, diferentemente dos parâmetros anteriores, só se aplicam às folhas da árvore. As imagens também podem sofrer um *zoom* para uma melhor visualização dos resultados.

Da Figura 15 a Figura 20 são ilustrados a utilização da árvore de componentes no processo de segmentação por atributos e filtragem de estruturas.

Para a seqüência das figuras de 15 a 17 é utilizada uma Imagem Teste (Figura 15a) sobre a qual são aplicados sucessivos refinamentos usando dados conhecidos.

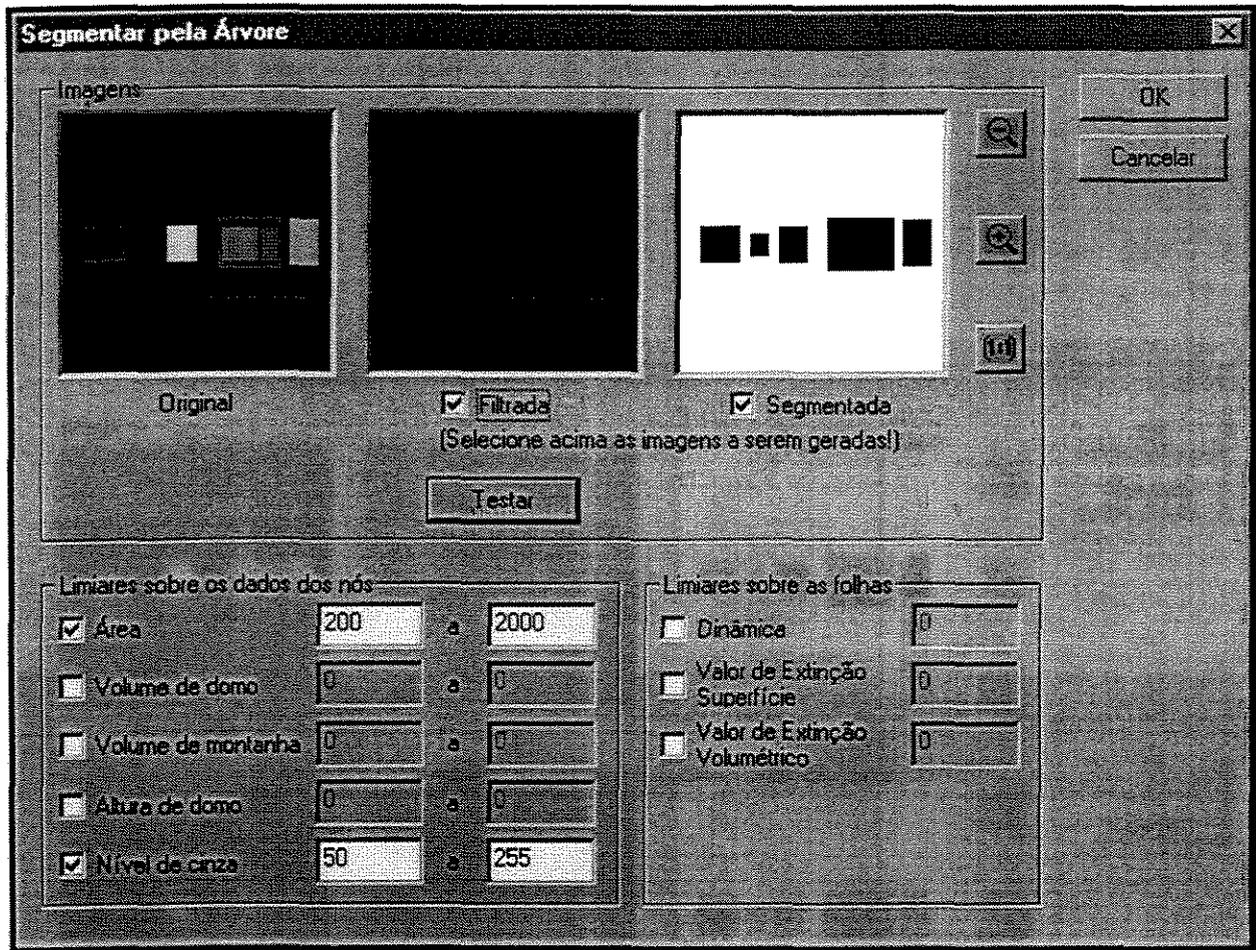


Figura 14. Interface do sistema ImAgNOR mostrando a segmentação por atributos usando a árvore de componentes.

A Figura 15 mostra um exemplo de segmentação considerando o nível de cinza e a área como atributos sobre a árvore de componentes. Nesta figura são mostrados exemplos usando cada atributo separadamente e em conjunto, ou seja, trabalhando com a interseção entre os limiares. Nota-se que, com a interseção, o resultado é diferente, mais refinado.

Utilizando o resultado obtido na Figura 15d como domínio para recuperar as estruturas na imagem original (Figura 15a), foi gerada a imagem da Figura 16a que exemplifica o uso do volume, refinando ainda mais a segmentação anterior, eliminando estruturas com valor baixo para este atributo, relativo ao limiar selecionado de volume = [90000, 500000].

Como pode ser visto pelos horizontes flutuantes das imagens da Figura 16b e Figura 16d as estruturas de volume baixo foram eliminadas.

A partir deste último resultado, gerou-se uma terceira imagem sobre a qual foi aplicado um limiar de volume de domo, utilizado para eliminar os domos de pequeno volume. A Figura 17 mostra o resultado da aplicação do limiar de volume de domo = [10000, 90000] sobre esta imagem gerada, identificada pela Figura 17a. Neste exemplo, o objetivo era eliminar a pequena estrutura da imagem presente na componente do meio.

A Figura 18 e Figura 19 fazem uma comparação entre utilizar o valor de extinção dinâmica, aqui calculado sobre a árvore, e o atributo altura de domo. Percebe-se pela Figura 18 que, utilizando a dinâmica, não é possível obter isoladamente as três componentes da imagem da Figura 18a indicadas pelos três domos na imagem da Figura 18b. Assim, utilizou-se a segmentação pelo limiar de atributo altura de domo = [32, 70] para obter o resultado desejado.

Na figura Figura 19 é mostrada uma forma alternativa de utilização da altura de domo. O resultado obtido pode ser gerado, como no exemplo anterior, utilizando um limiar de altura de domo = [20, 140] ou ainda, combinando os atributos altura de domo = [45, 255] e nível de cinza = [55, 255].

Pode-se desejar realizar antes da segmentação, uma filtragem na imagem. Este pré-processamento pode ser realizado utilizando a árvore de componentes para eliminar as estruturas de acordo com o limiar e o atributo desejados. A Figura 20 exemplifica a utilização deste processo de filtragem por atributos, eliminando da imagem as estruturas com altura de domo dentro do intervalo [1, 20].

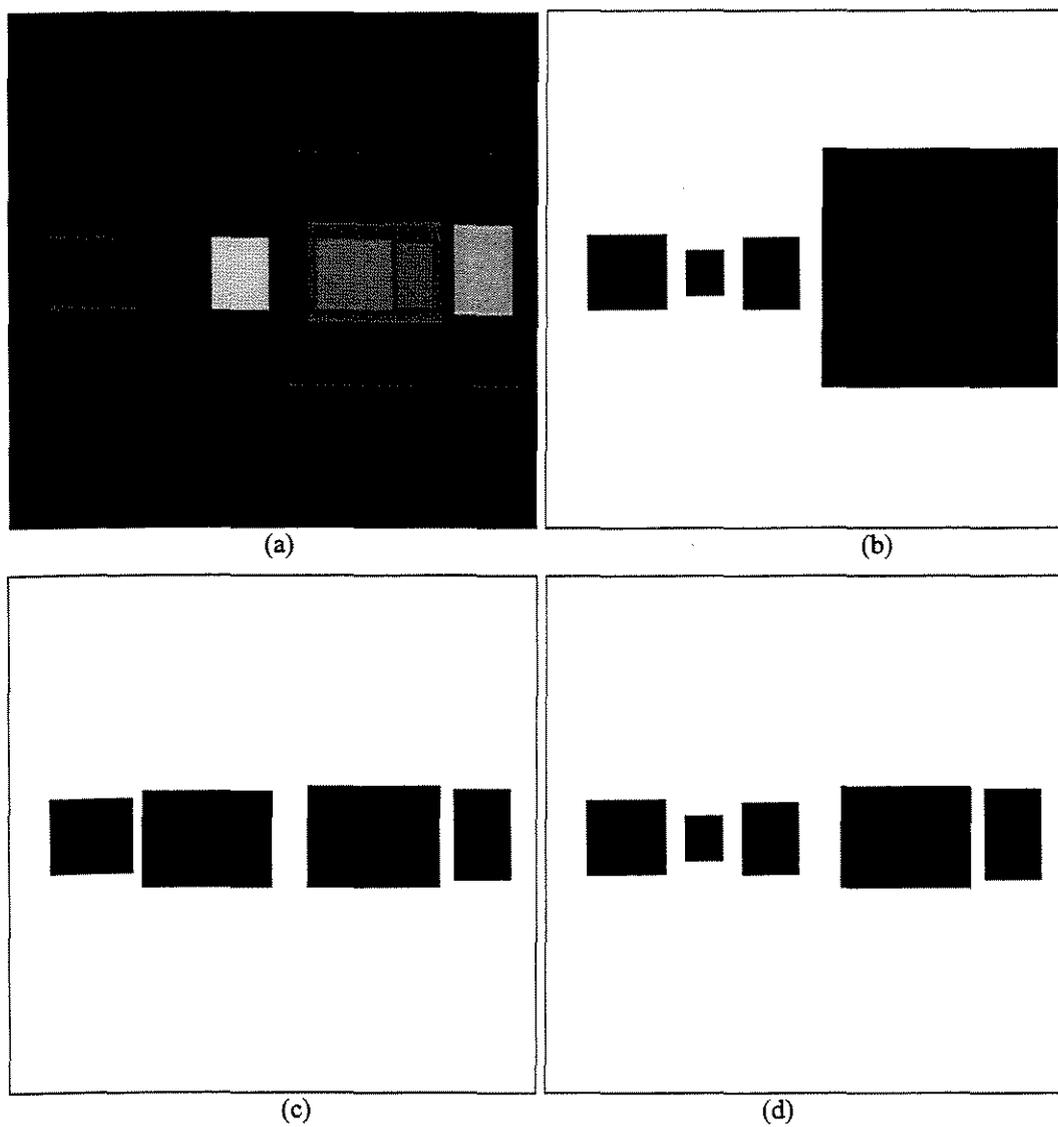


Figura 15. Imagens: (a) original; (b) limiar cinza = $[50, 255]$; (c) limiar área = $[200, 2000]$; (d) limiar cinza = $[50, 255]$ e limiar área = $[200, 2000]$.

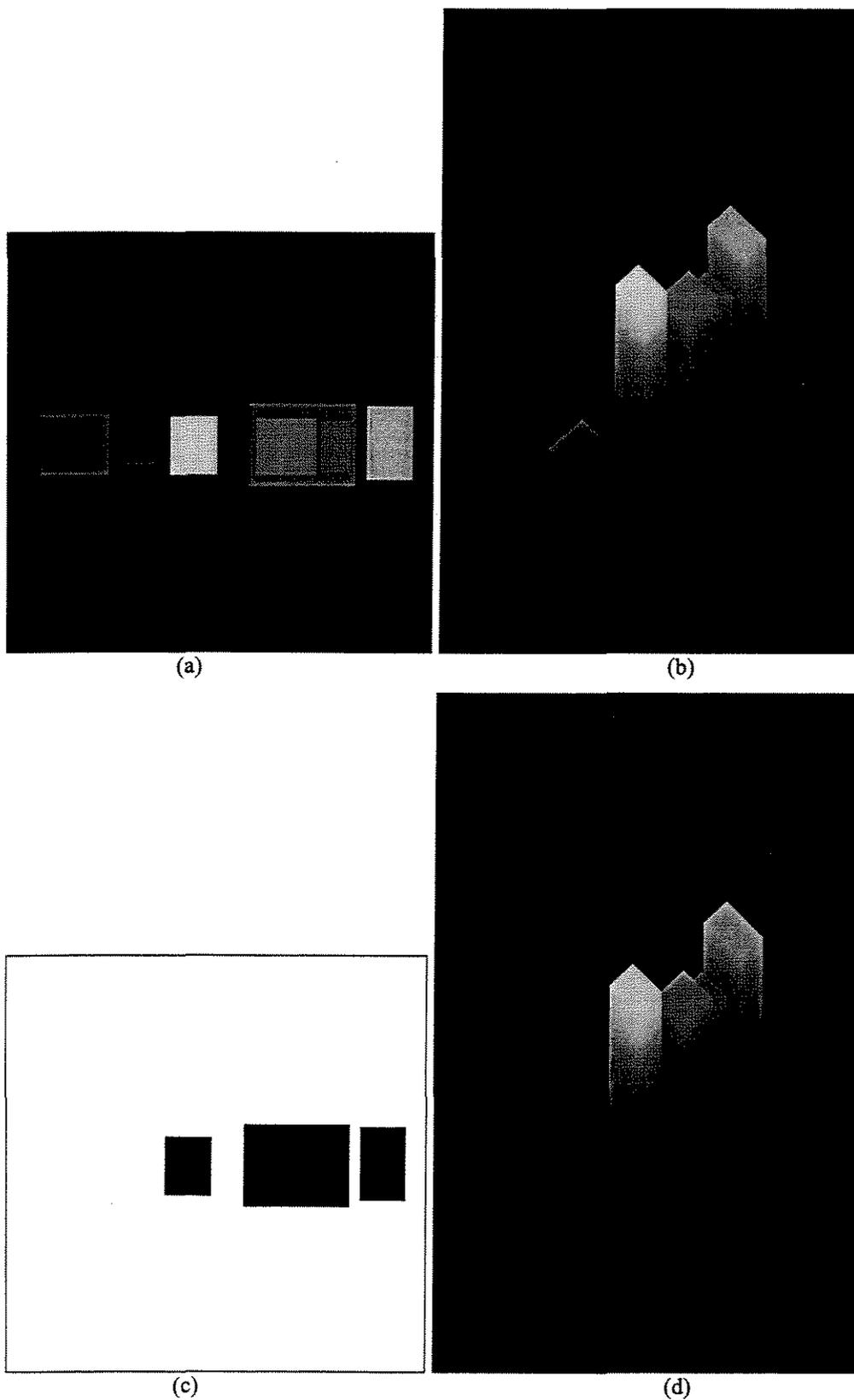


Figura 16. Imagens: (a) imagem obtida das imagens Figura 15a e Figura 15d; (b) horizonte flutuante de (a); (c) limiar volume = [90000,500000] sobre a imagem (a); (d) horizonte flutuante mostrando as estruturas preservadas pelo limiar.

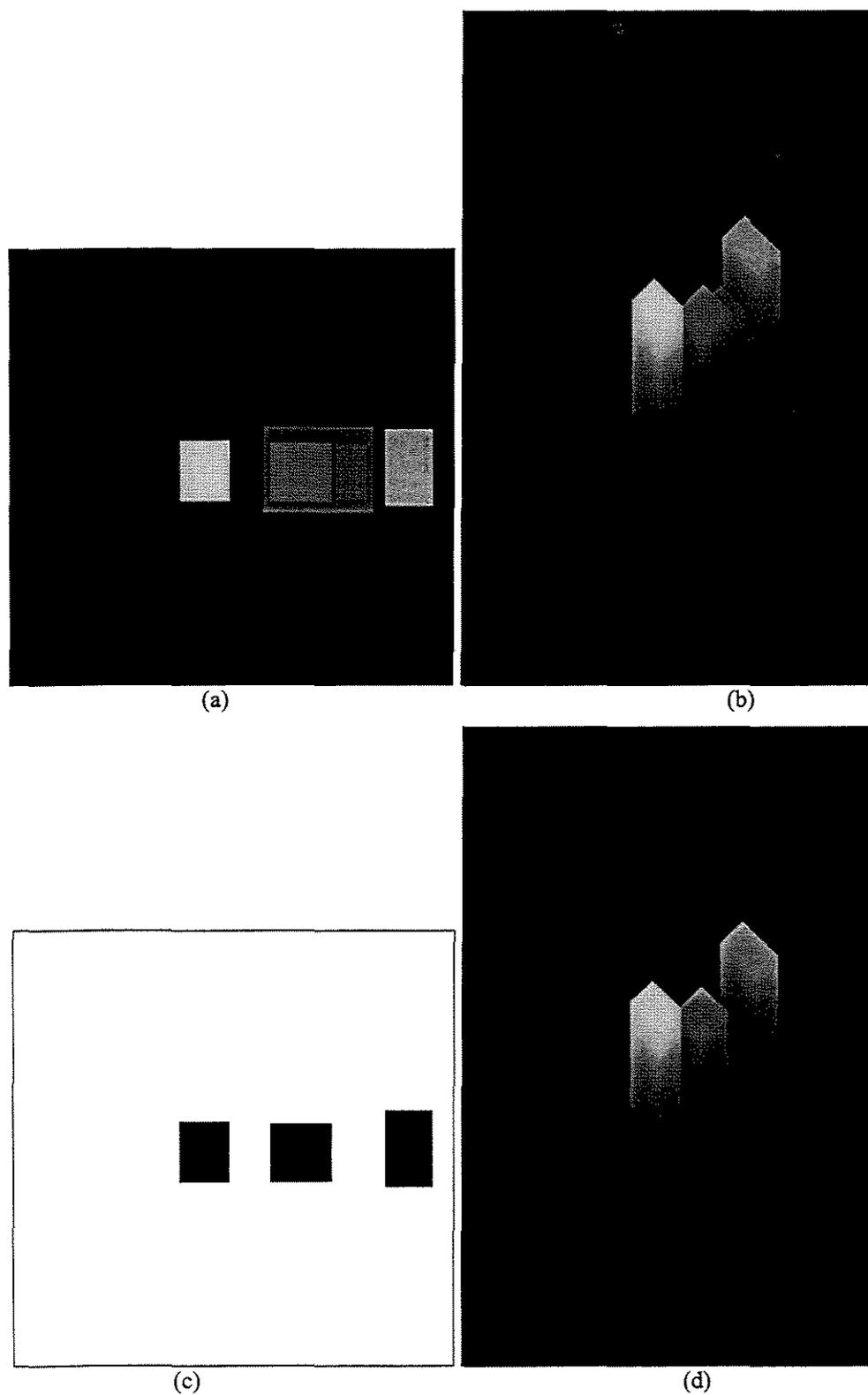


Figura 17. Imagens: (a) imagem obtida das imagens Figura 16a e Figura 16c; (b) horizonte flutuante de (a); (c) limiar volume de domo = [10000, 90000] sobre a imagem(a); (d) horizonte flutuante mostrando as estruturas preservadas pelo limiar.

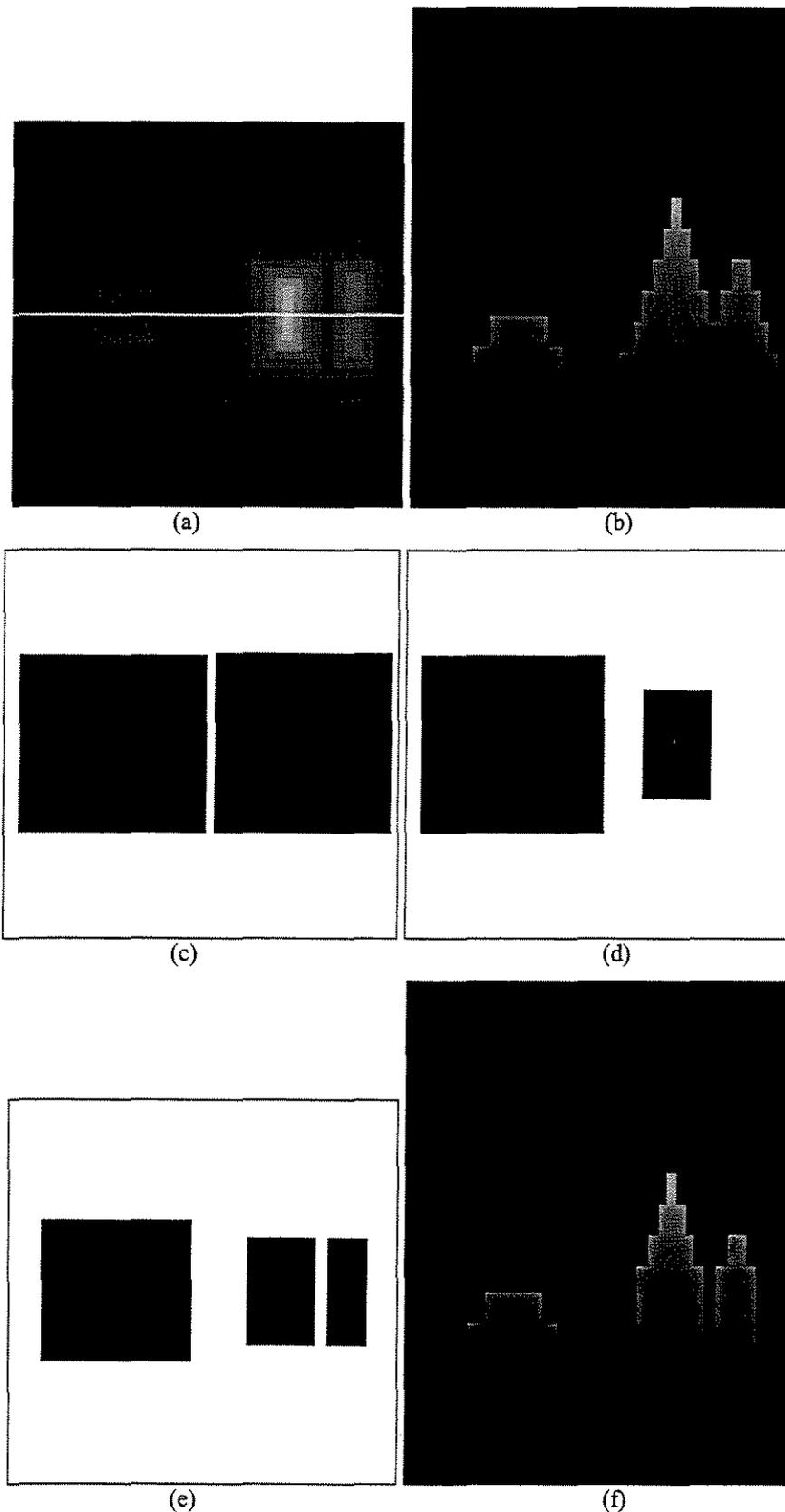


Figura 18. Imagens: (a) original; (b) gráfico de coluna para os pontos da imagem (a) sob a linha branca; (c) limiar de dinâmica=32; (d) limiar de dinâmica=33; (e) limiar de altura de domo = [32,70]; (f) gráfico de coluna mostrando as estruturas preservadas pela segmentação em (e).

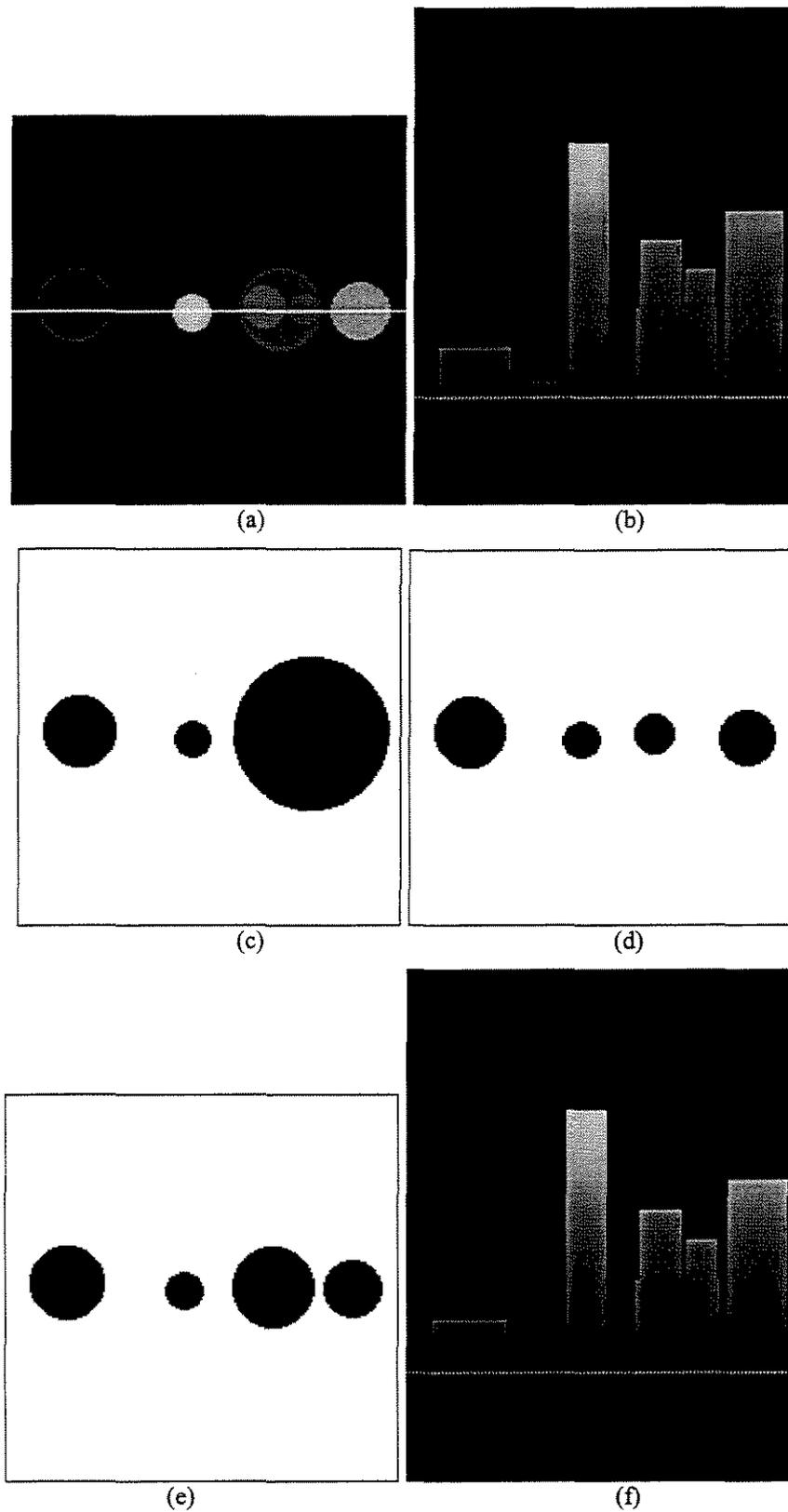


Figura 19. Imagens: (a) original; (b) gráfico de coluna para os pontos da imagem (a) sob a linha branca; (c) limiar dinâmica=20; (d) limiar dinâmica=21; (e) limiar de altura de domo $= [20,140]$ ou limiar de altura de domo $= [45,255]$ e limiar cinza $= [55,255]$; (f) gráfico de coluna mostrando as estruturas preservadas pela segmentação (e). As linhas pontilhadas em (b) e (f) marcam o nível de cinza = 50.

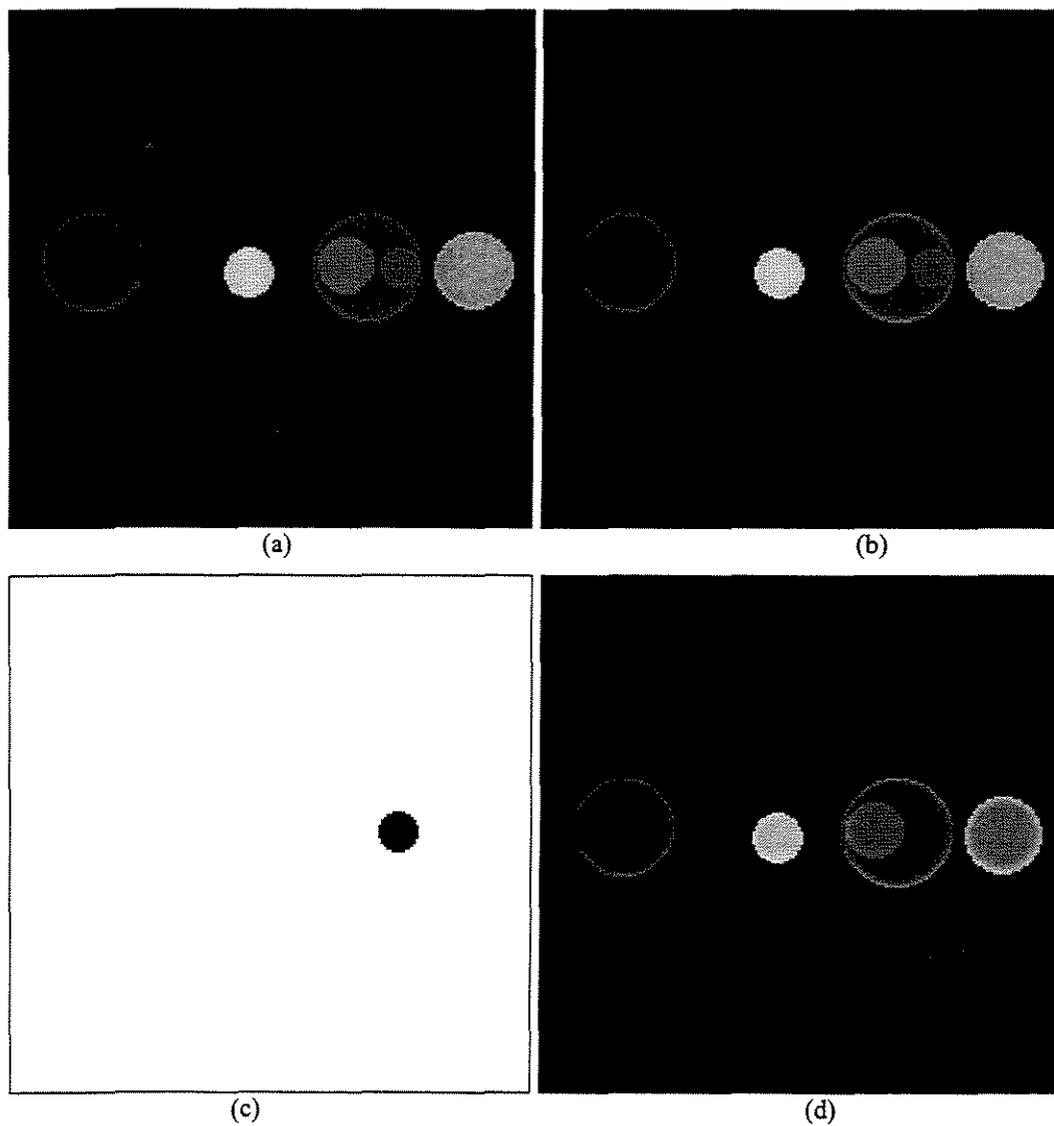


Figura 20. Imagens: (a) original; (b) correspondente ao resultado obtido da segmentação da Figura 19; (c) segmentada pelo limiar de altura de domo = $[1, 20]$; (d) filtrada pelo limiar de altura de domo = $[1, 20]$.

2.4 Segmentação de Núcleos

Para a análise das AgNORs são segmentados inicialmente os núcleos das células sanguíneas. As etapas descritas a seguir objetivam segmentar os núcleos de uma forma semi-automática, fornecendo ferramentas (algoritmos) que auxiliam nesta segmentação. Em algumas imagens, no entanto, é praticamente impossível detectar semi ou automaticamente as bordas do núcleo. Neste caso, a segmentação deve ser realizada de forma manual.

Como os núcleos são componentes de dimensões grandes, se comparados às dimensões da imagem, o subjetivismo aplicado a este processo manual não é considerado um problema, principalmente quando realizado por um especialista, usuário comum ao qual se destina o sistema.

Para realizar a segmentação dos núcleos são aplicados limiares de cinza e de área e são fornecidos alguns algoritmos adicionais para refinar esta segmentação. Além disto, geralmente é aplicado como pré-processamento, o filtro da mediana. A decisão de aplicar este filtro deve-se ao fato de ele não inserir novos níveis de cinza na imagem [Gon79], ou seja, não causar grandes alterações na informação original. A Figura 21 mostra a interface do sistema ImAgNOR através da qual é feita a interação com o usuário. As principais operações empregadas nesta interação são indicadas a seguir

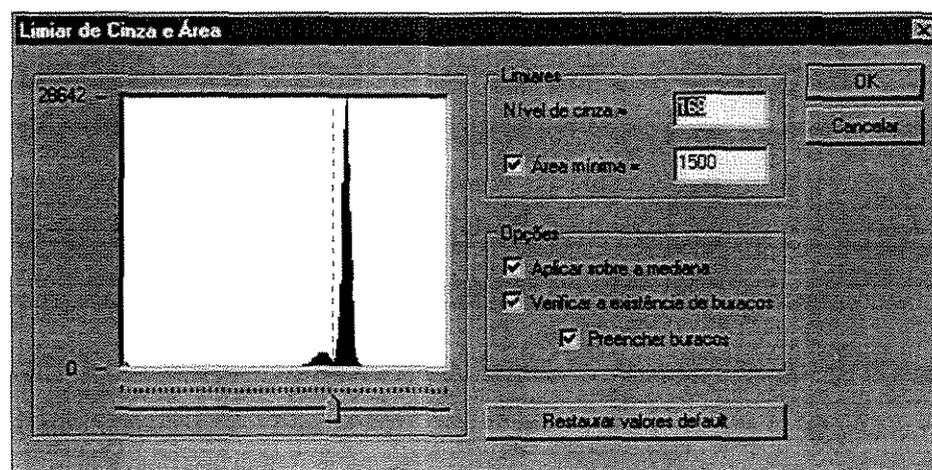


Figura 21. Interface do sistema ImAgNOR. Neste diálogo é feita a escolha dos limiares de cinza e área, além das opções de refinamento.

2.4.1 Limiar de Nível de Cinza

O limiar de nível de cinza é inicialmente guiado por um algoritmo que encontra o ponto de mínimo entre os dois maiores picos do histograma da imagem. Este algoritmo trabalha sobre a hipótese de que as duas maiores regiões da imagem são, em ordem decrescente, compostas por pixels do *background* e por *pixels* dos núcleos.

Como, nas imagens deste trabalho, os níveis de cinza dos *pixels* do *background* são normalmente mais claros e, portanto, com valores próximos a 255, o algoritmo inicia a varredura do histograma a partir deste nível, à procura do ponto mais alto (nível de cinza dos *pixels* de maior freqüência no *background*). O algoritmo percorre o histograma analisando apenas os seus pontos de máximo e, a partir do ponto mais alto encontrado, ele encontra o primeiro ponto de mínimo, ou seja, o primeiro ponto cujos vizinhos imediatos - o anterior e o posterior - apresentam uma freqüência maior que a sua. Outros métodos de definição de limiar podem ser encontrados na literatura [Gon79].

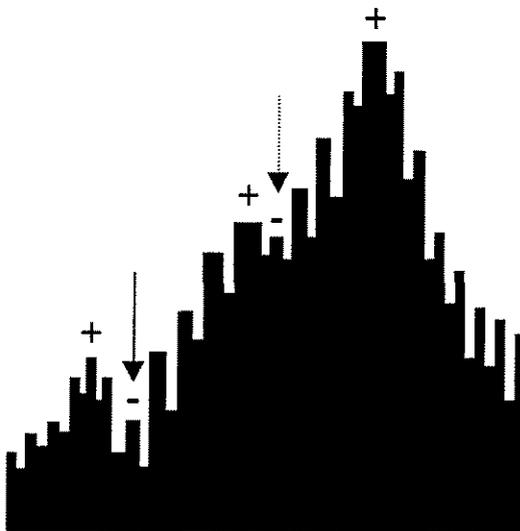


Figura 22. Histograma hipotético exemplificando o funcionamento do algoritmo e um caso de falha. O conjunto de pontos de análise se constitui das freqüências que aparecem como máximos no histograma. Dentro deste conjunto, o símbolo “+” (mais) indica os máximos regionais, o símbolo “-” (menos) indica os mínimos e a seta aponta para o mínimo de interesse.

A Figura 22 exemplifica o funcionamento e ilustra igualmente um caso de falha do método. O conjunto de pontos de análise é constituído dos máximos regionais do histograma. O ponto mais alto indicado pelo símbolo “+” é o ponto de partida do algoritmo. Em seguida, de acordo com a heurística definida, o primeiro ponto de mínimo encontrado entre as freqüências anteriores é selecionado como o limiar. Assim, o algoritmo selecionaria o ponto de mínimo indicado pela seta tracejada, quando o ideal seria selecionar

o ponto indicado pela outra seta. Neste caso, uma decisão sobre a escolha do próximo ponto de inflexão selecionaria o ponto correto.

Esta falha deve-se ao fato de surgir no histograma da imagem alguns pontos de mínimo que possuem uma diferença (em níveis de cinza) pequena com relação aos seus vizinhos, lembrando que os pontos considerados pelo algoritmo são apenas os máximos do histograma, ou seja, os mínimos considerados são relativos a este conjunto de pontos.

Outra situação em que o algoritmo pode falhar é quando os níveis de cinza do *background* e do núcleo são muito próximos, caso em que a diferença entre os níveis é suave e o histograma apresenta um comportamento unimodal. Neste caso, o usuário deve interagir com o sistema, em busca de um limiar de cinza mais adequado. Como auxílio, o usuário pode percorrer o *cursor* do *mouse* sobre os *pixels* da borda dos núcleos e os dos vizinhos destes no *background*, visualizando o valor de cinza na barra de *status* do sistema, para facilitar visualmente a escolha do limiar mais adequado.

2.4.2 Limiar de Área

Inicialmente, o limiar de área é um valor pré-definido baseado em testes. Este limiar é antecedido por uma etapa de identificação das componentes conexas da imagem limiarizada. Nesta etapa, cada componente identificada é rotulada. Após esta rotulação, executa-se uma varredura na imagem verificando quais componentes satisfazem o limiar de área. Aquelas que não satisfazem são eliminadas. Isto corresponde a marcar as componentes que estabelecem o limiar de área e realizar uma reconstrução binária [Ser82] como definida abaixo. Este conceito de reconstrução binária é exemplificado na Figura 23.

Definição 17: Dilatação geodésica binária

A dilatação geodésica binária, de tamanho 1, de Y em X , denotada por $\delta^1_X(Y)$, é obtida a partir da interseção entre o dilatado morfológico [Ser82] de tamanho 1 de Y , $\delta^1(Y)$, e a imagem máscara X . A dilatação geodésica binária, de tamanho n , de Y em X , denotada por $\delta^n_X(Y)$, é obtida efetuando-se n dilatações geodésicas de tamanho 1 de Y em X .

$$\delta^n_X(Y) = X \setminus \delta^1_X(\delta^1_X(\dots \delta^1_X(Y))), \forall X, Y \in \mathbb{Z}^2 \mid Y \subset X.$$

Definição 18: Reconstrução geodésica binária

A reconstrução binária por dilatação é um caso particular da dilatação geodésica que permite reconstruir totalmente os objetos de X cuja interseção com Y não é nula. A dilatação é realizada até a idempotência, ou seja, até que a imagem não seja mais modificada por operações sucessivas.

$$R_X(Y) = \delta_X^\infty(Y), \forall X, Y \in \mathbb{Z}^2 \mid Y \subset X.$$

Neste trabalho, esta etapa é muito útil para eliminar pequenos ruídos (manchas geradas pela coloração) do *background*.

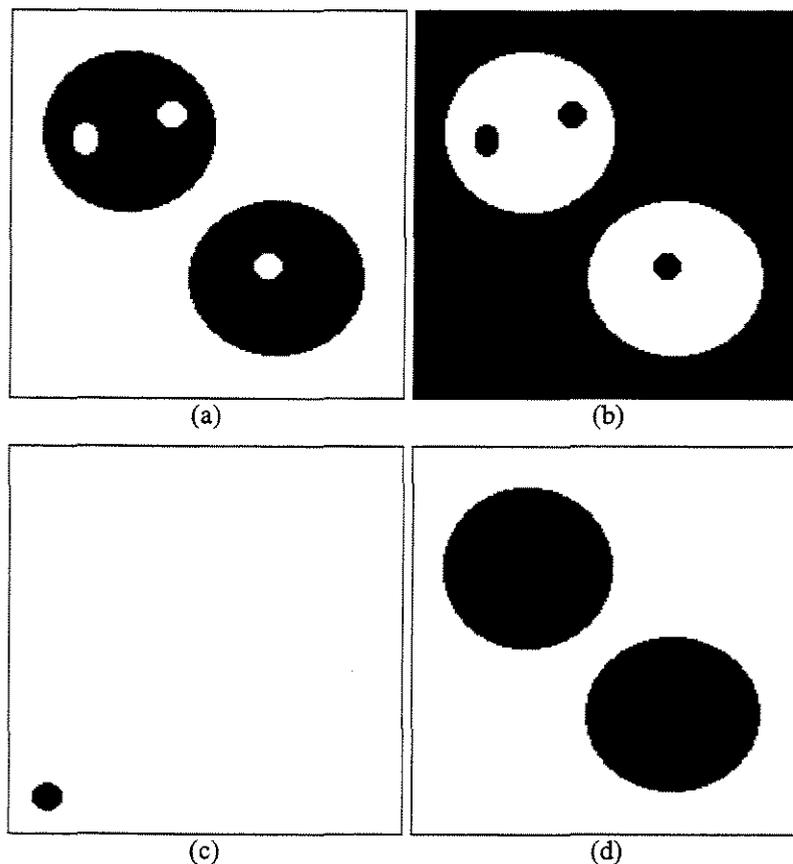


Figura 23. Refinamento por Reconstrução Binária. Imagens: (a) original; (b) negativo da original; (c) marcador para o *background*; (d) resultado final igual ao negativo da reconstrução de (b) usando a imagem (c) como marcadora.

2.4.3 Refinamento

Após a limiarização, pode-se aplicar sobre as imagens binárias limiarizadas um algoritmo de preenchimento de buracos. Este algoritmo analisa o complemento da imagem binária, “eliminando” todas as suas componentes (componentes conexas formadas por *pixels*

pretos), com exceção da maior (*background* na imagem binária original). Estas componentes eliminadas correspondem aos buracos na imagem binária original.

A partir desta imagem negativo com as componentes eliminadas, gera-se novamente uma imagem negativo que equivale à original com os buracos preenchidos. Uma operação morfológica equivalente a este refinamento pode ser obtida a partir do conceito de reconstrução binária [Ser82], usando um marcador para o *background*, como pode ser visto na Figura 23.

2.4.4 Exemplos

As figuras 24 a 27 mostram exemplos de segmentação e suas etapas. A Figura 24 apresenta as imagens geradas nas etapas da segmentação utilizando o limiar de cinza obtido pelo algoritmo descrito anteriormente (seção 2.4.1).

A Figura 25 mostra as imagens geradas nas etapas da segmentação, para um outro caso, utilizando também o limiar de cinza obtido pelo algoritmo.

A Figura 26 mostra outro exemplo onde pode-se observar que, apesar da distribuição menos regular dos níveis de cinza do *background*, o algoritmo de definição de limiar gerou bons resultados.

A Figura 27 mostra um exemplo em que as imagens têm como característica núcleos com níveis de cinza muito próximos aos do *background*, caso em que o histograma aparenta ter apenas uma moda. Neste caso, o algoritmo de definição automática de limiar falhou e o limiar teve de ser testado algumas vezes até se chegar ao resultado apresentado na Figura 27b.

Na Figura 28, que mostra o histograma da imagem da Figura 27a e os limiares fornecidos pelo algoritmo e o escolhido, pode-se perceber que o histograma da imagem não apresenta uma característica bimodal. Isto se deve ao fato de os níveis de cinza dos núcleos e do *background* serem muito próximos e também pelo fato de os núcleos apresentarem um aspecto fragmentado, ou seja, com regiões dispersas de mesmo nível de cinza que o *background*. Estes aspectos são melhor visualizados na imagem da Figura 27b.

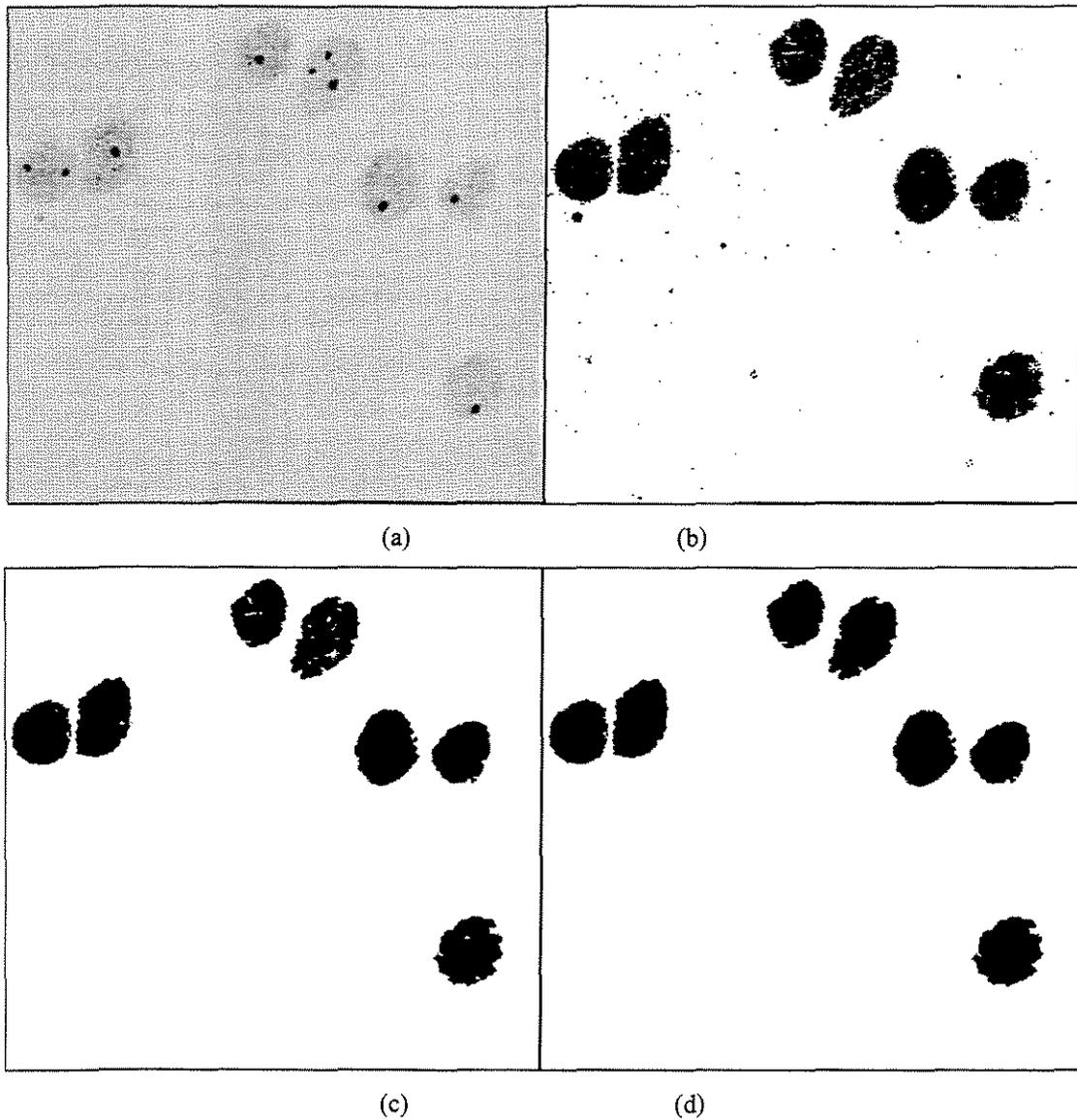


Figura 24. Etapas da segmentação. (a) imagem original; (b) limiar de cinza; (c) limiar de cinza e área; (d) buracos preenchidos.

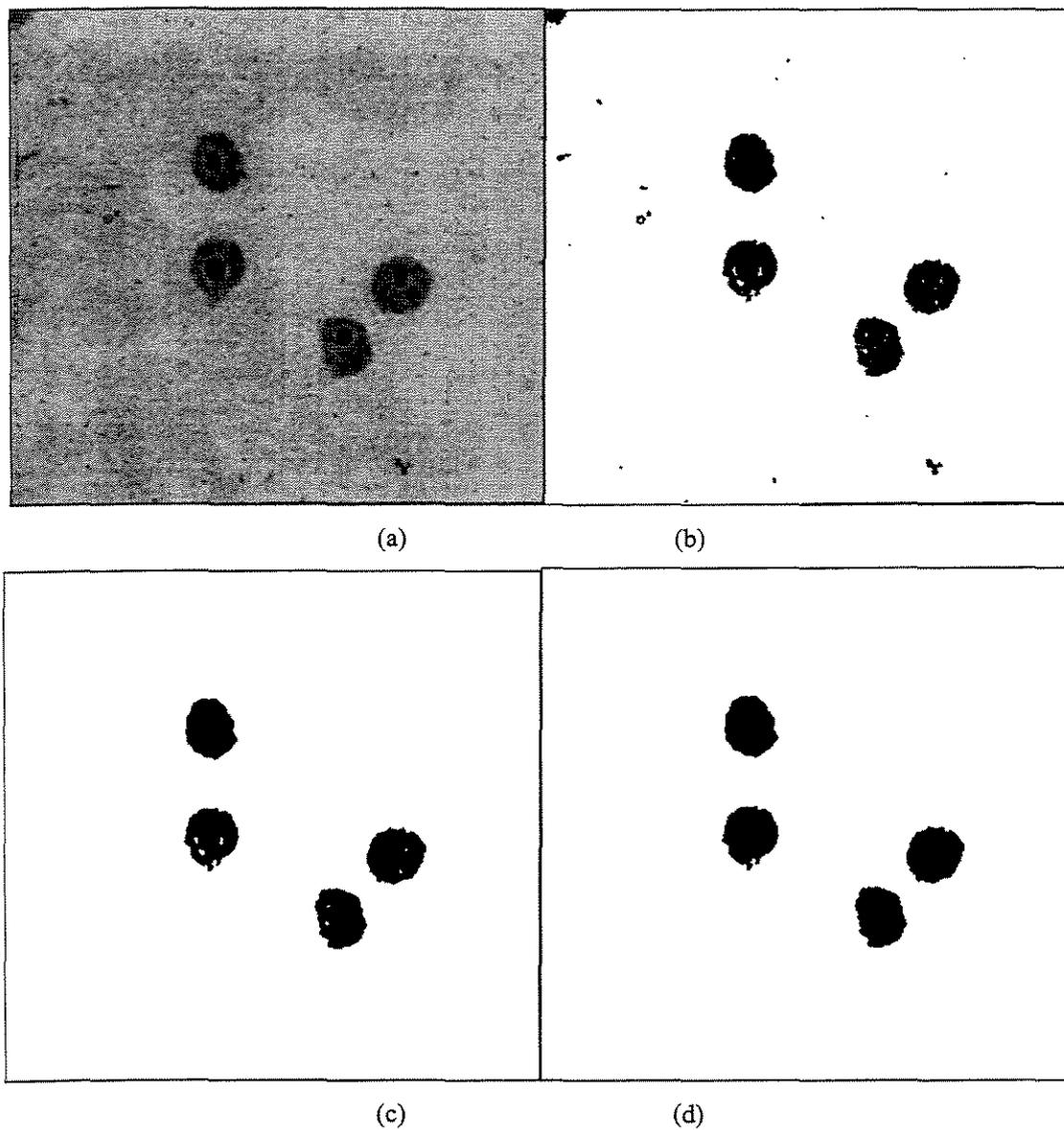


Figura 25. Etapas da segmentação. (a) imagem original; (b) limiar de cinza; (c) limiar de cinza e área; (d) buracos preenchidos.

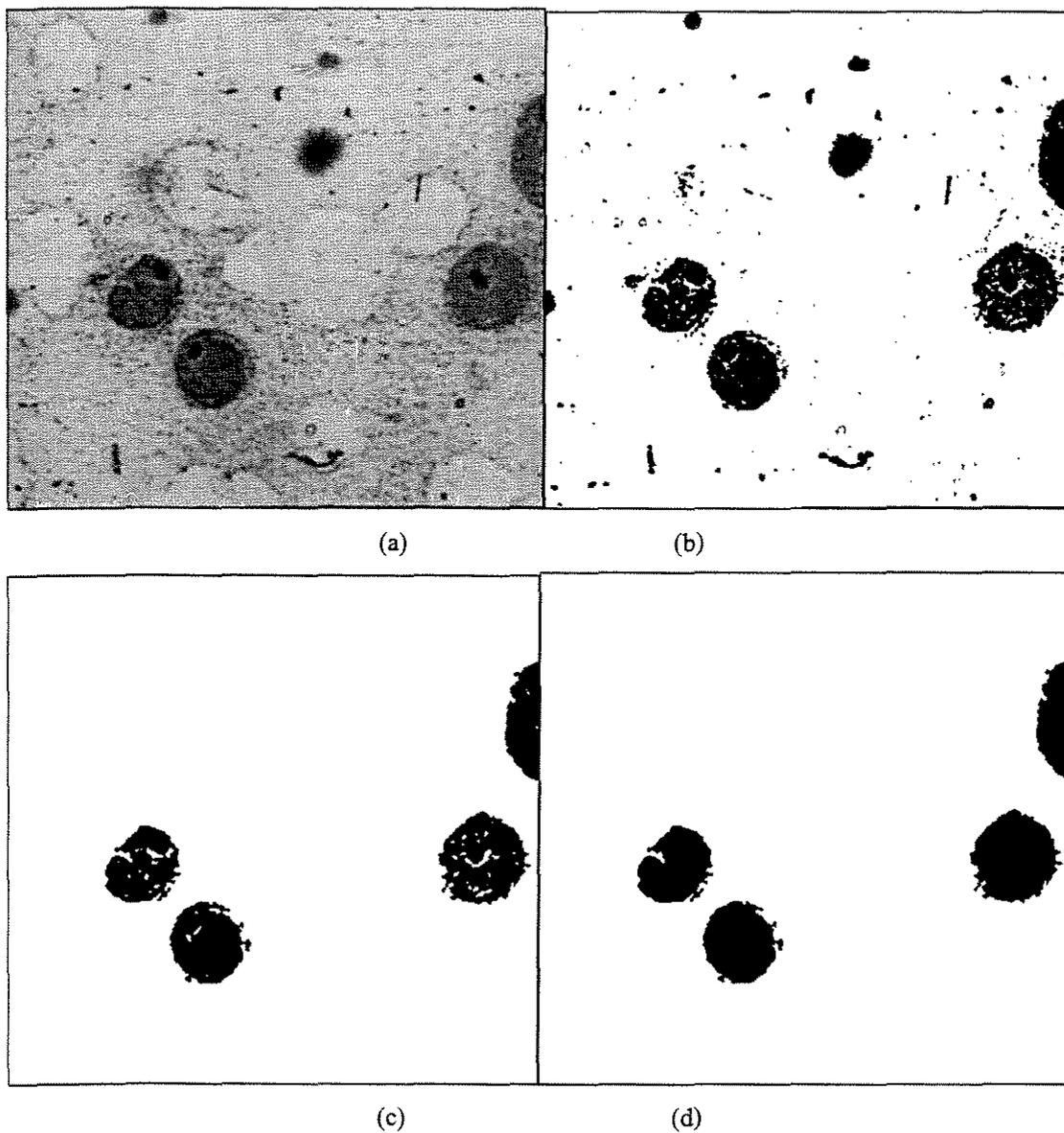


Figura 26. Etapas da segmentação. (a) imagem original; (b) limiar de cinza; (c) limiar de cinza e área; (d) buracos preenchidos.

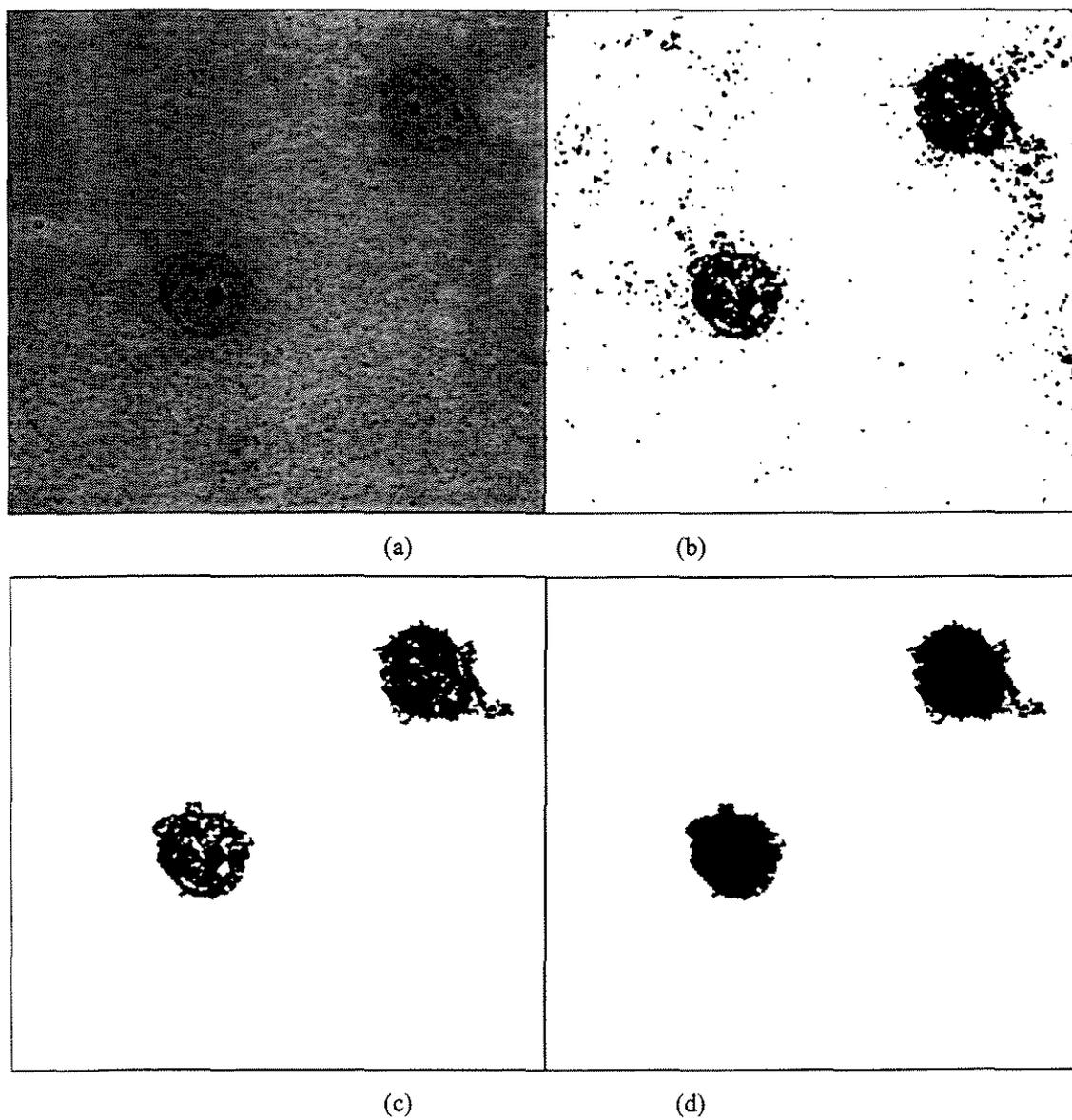


Figura 27. Etapas da segmentação. (a) imagem original; (b) limiar de cinza; (c) limiar de cinza e área; (d) buracos preenchidos.

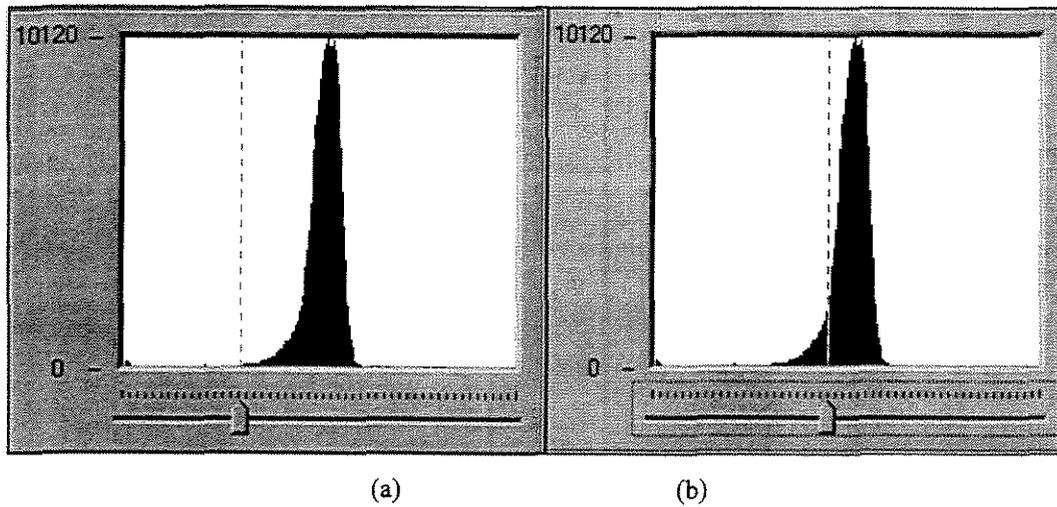


Figura 28. Interface mostrando os limiares de cinza (a) sugerido (76) e (b) escolhido (115) para a imagem da Figura 27.

2.5 Segmentação de AgNORs

2.5.1 Etapas

Após a segmentação dos núcleos, a imagem segmentada é utilizada como domínio para gerar a imagem empregada na segmentação das AgNORs. A Figura 29a exemplifica esta etapa. Isto diminui os pontos a serem analisados no processo de segmentação destas componentes, implicando na diminuição do tempo de processamento.

Como mencionado anteriormente e observado na imagem da Figura 29, as estruturas das imagens deste trabalho podem ser caracterizadas por não possuírem uma homogeneidade em relação aos seus níveis de cinza, principalmente as AgNORs que, mesmo em uma imagem, e até dentro de um mesmo núcleo, podem se diferir bastante.

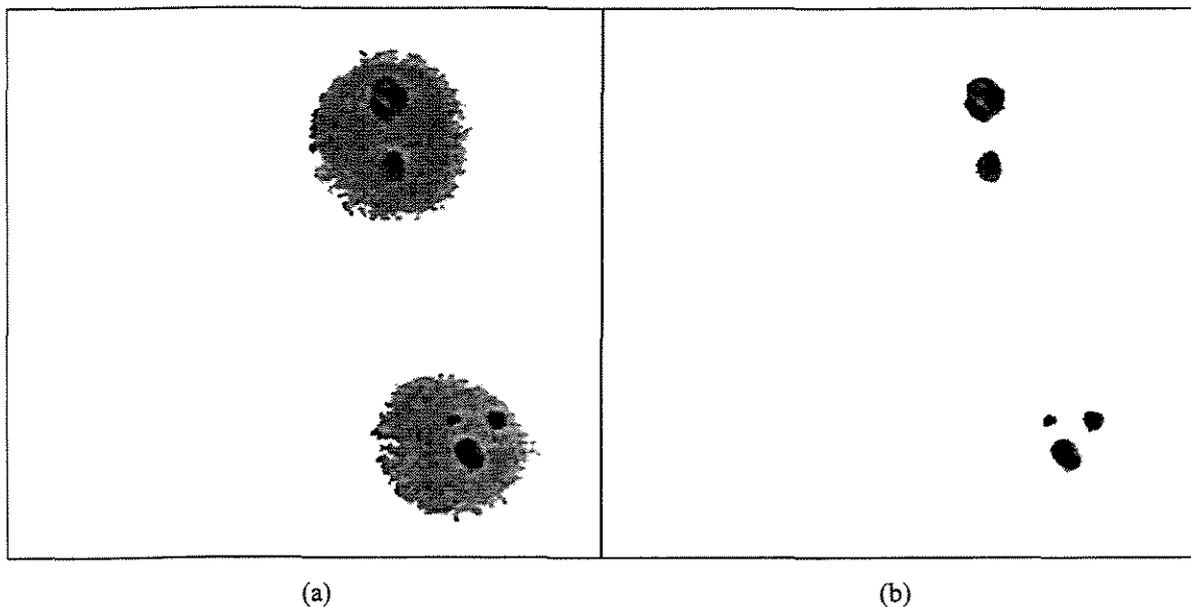


Figura 29. Exemplos de AgNORs. Imagens: (a) núcleos, (b) AgNORs isoladas. Percebe-se que, dentro de uma mesma imagem e até dentro de um mesmo núcleo, as estruturas AgNORs podem se diferir bastante.

Como o grau de dificuldade da segmentação varia muito aqui, foram testadas várias técnicas de segmentação. Em alguns casos, um simples limiar global de nível de cinza é suficiente para segmentar as AgNORs. Em outros, em que estas estruturas aparecem de forma mais complexa, as outras técnicas (segmentação por valor de extinção e pela árvore de componentes) vistas anteriormente são consideradas.

Quando o limiar de cinza não fornece bons resultados, esta segmentação é realizada, normalmente, utilizando-se a árvore de componentes montada a partir da imagem original, considerando a imagem de núcleos segmentados como domínio.

2.5.2 Exemplos

A Figura 30 mostra uma comparação entre segmentação usando limiar global e segmentação por atributos usando a Árvore de Componentes. Como pode ser observado, as AgNORs apresentam características diferentes de um núcleo para outro e até mesmo dentro de um mesmo núcleo. Algumas estruturas AgNOR apresentam algumas regiões que são mais claras com níveis de cinza próximos aos do núcleo. Como há outras AgNORs que não possuem esta característica, isto dificulta o processo de segmentação, inviabilizando a utilização do limiar global de nível de cinza, pois, como ilustrado na Figura 30, muito artefato é gerado. Assim, o método empregado foi a segmentação pela Árvore de Componentes que permite um controle maior sobre o processo, explorando os atributos das estruturas.

A Figura 31 utiliza a mesma imagem original da Figura 30 para mostrar como a imagem simplificada pode facilitar o processo de segmentação. Neste exemplo, o limiar global de nível de cinza aplicado sobre a imagem simplificada foi suficiente para segmentar apropriadamente as estruturas da imagem.

Como ilustrado na Figura 32, nem sempre a imagem simplificada torna possível a segmentação das estruturas de interesse por uma simples aplicação de limiar de cinza e área. Neste exemplo (Figura 32c), outros objetos apareceram como resultado da segmentação por possuírem características semelhantes aos objetos de interesse. Isso se deve, principalmente, ao alto limiar de cinza que teve que ser empregado para não se perder informação importante. Apesar de ter sido empregado um limiar de área (igual a 100), esta filtragem não foi suficiente para eliminar todos os objetos extras.

Para se obter o resultado apresentado na Figura 32d, foi realizada a segmentação utilizando a Árvore de Componentes, definindo os intervalos: área=[100,500], alt_domo=[45,255], NC=[130,255]. O mesmo resultado foi obtido aplicando-se a segmentação por atributos pela Árvore de Componentes da Imagem Simplificada com os intervalos: alt_domo=[45,255], NC=[140,255]. Neste último caso não foi necessário definir um intervalo de área, apenas o limiar de cinza foi alterado de 130 para 140, ou seja, o

processo de simplificação da imagem elevou os níveis de cinza dos objetos de interesse em uma quantidade superior aos dos outros objetos, aumentando o contraste na informação original.

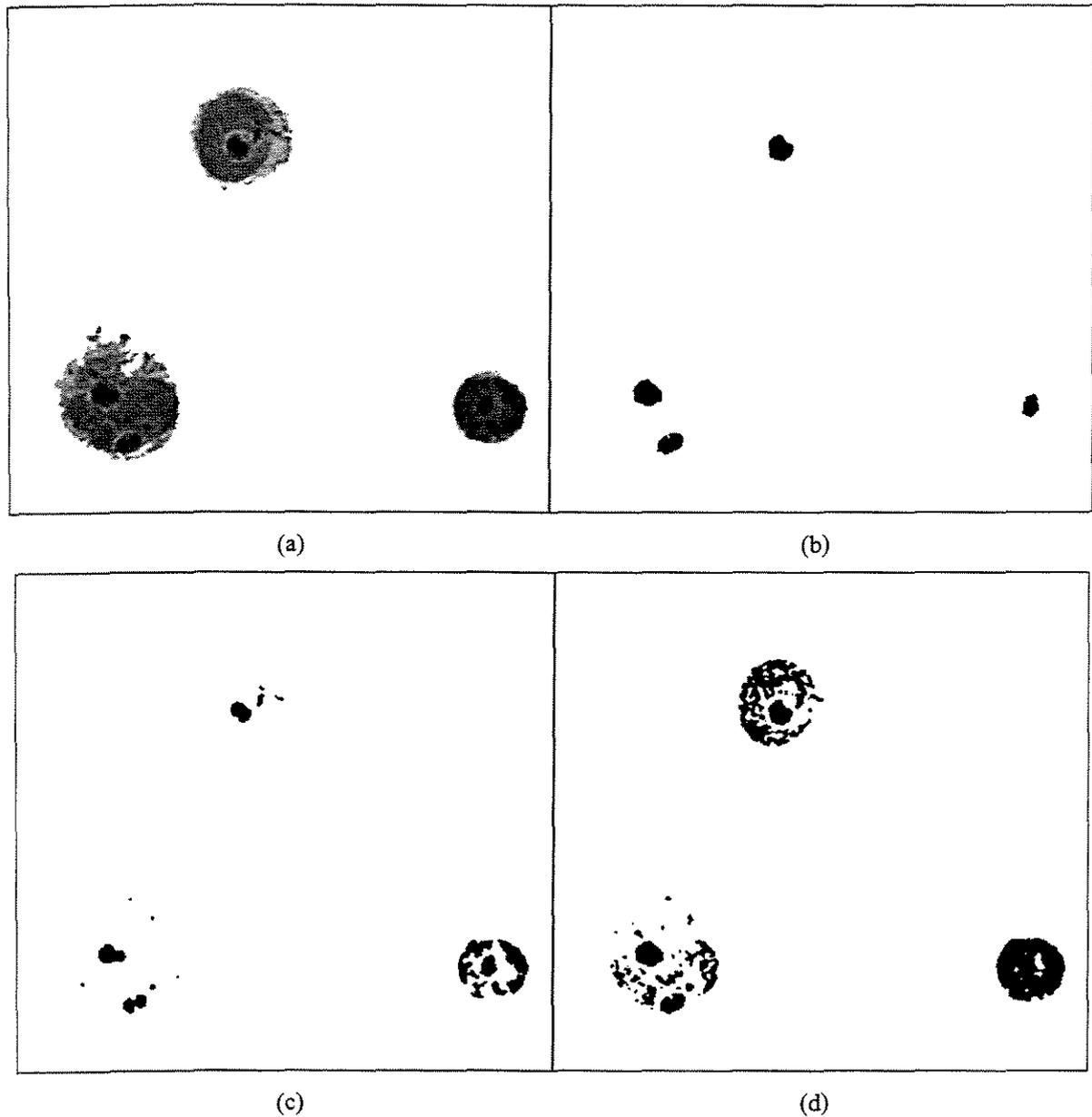


Figura 30. Segmentação de AgNORs usando a Árvore de Componentes. Imagens: (a) original, (b) segmentada pela Árvore de Componentes (área=[100,500]; vol_domo=[3000,20000]; alt_domo=[45,255]; NC=[135,255]), (c) segmentada por limiar global (NC=90), (d) segmentada por limiar global (NC=115).

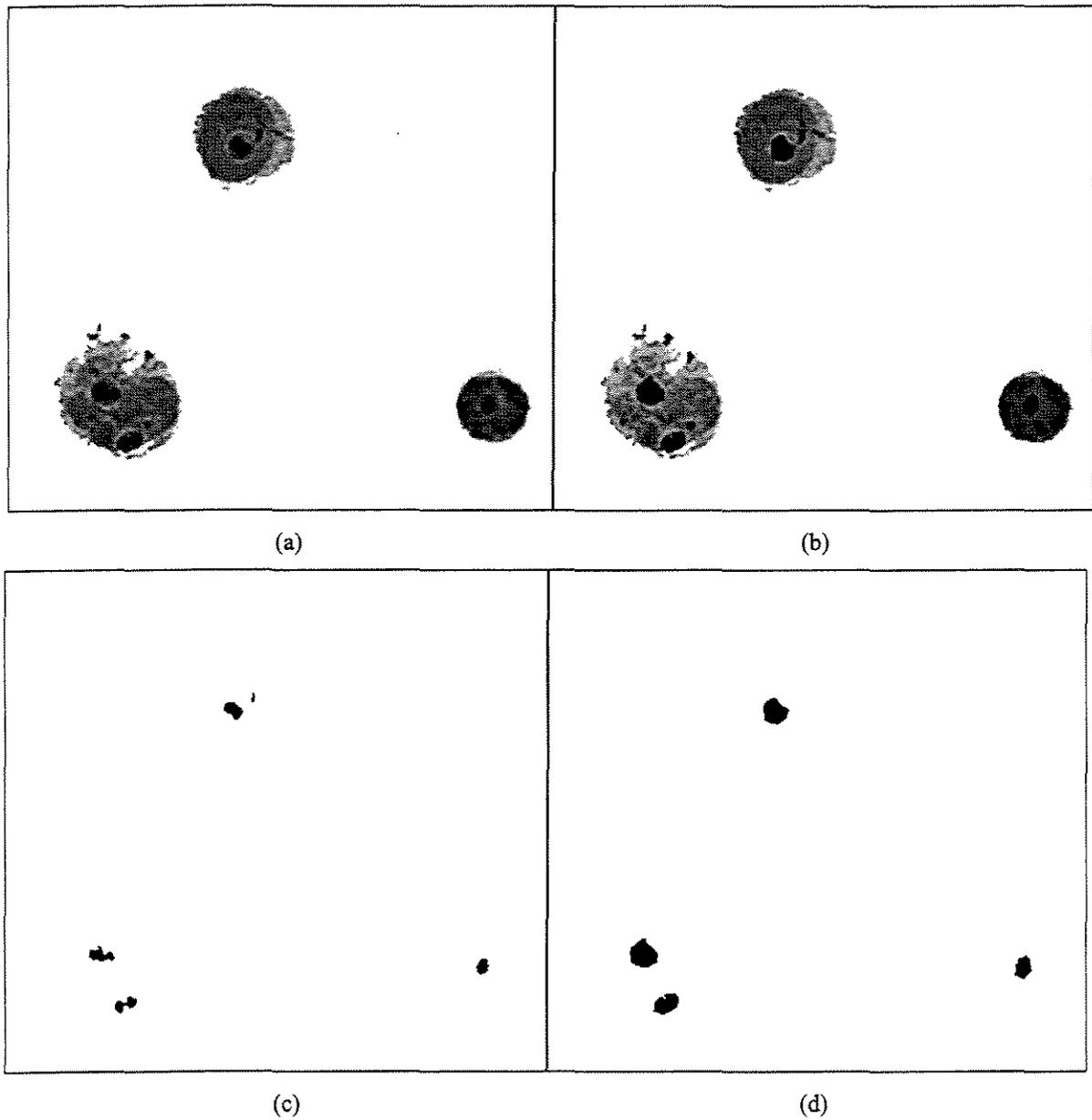


Figura 31. Segmentação sobre a Imagem Simplificada. Imagens: (a) original, (b) Imagem Simplificada, (c) segmentada de (a) por limiar global (NC=65), (d) segmentada de (b) por limiar global (NC=65; área=100).

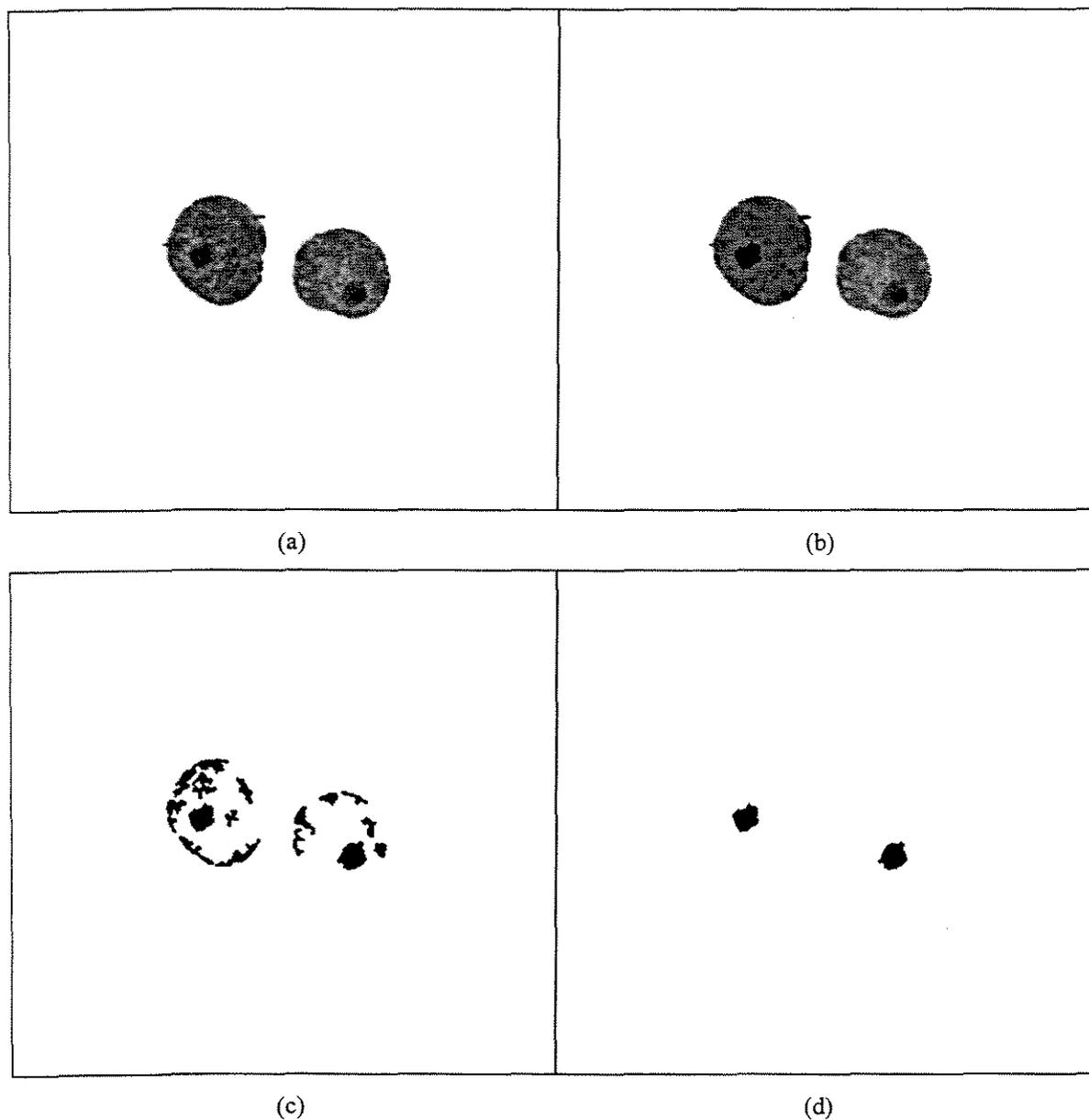


Figura 32. Segmentação usando imagem simplificada e árvore de componentes. Imagens: (a) original, (b) Imagem Simplificada, (c) segmentada de (b) por limiar global (NC=115; área=100), (d) segmentada de (b) pela Árvore de Componentes de (a) (área=[100,500]; alt_domo=[45,255]; NC=[130,255]) e pela Árvore de Componentes de (b) (alt_domo=[45,255]; NC=[140,255]).

2.6 Conclusão

Estas etapas do processo de segmentação têm auxiliado na obtenção de uma imagem adequada, eliminando, quase por completo, a necessidade de se realizar a segmentação manualmente.

O algoritmo que “sugere” um limiar tem funcionado bem em imagens que não apresentam muitas manchas, caso em que ele pode falhar.

A utilização da *Árvore Simplificada* na segmentação de AgNORs tem auxiliado muito neste processo. O contraste gerado por esta técnica aproveita bem a característica de inclusão das estruturas deste tipo de imagem. Em muitos casos, este contraste é suficiente para aplicação de um limiar global. Em outros, a segmentação por atributos usando a *Árvore de Componentes* tem fornecido bons resultados.

Capítulo 3

Parâmetros de Forma

Neste trabalho, foram estudadas várias técnicas de extração de informação sobre a forma dos objetos. Com o objetivo de constituir um vetor discriminante, foram selecionados alguns parâmetros freqüentemente utilizados em trabalhos científicos sobre AgNORs, e novos parâmetros foram definidos.

Os parâmetros de forma constituem diferentes medidas de características, quantitativas ou qualitativas, que se deseja analisar sobre os objetos nas imagens, tais como área, entropia da distribuição de seus níveis de cinza ou o grau de simetria da forma dos objetos. Além destas, foram extraídas ainda algumas medidas que convencionou-se chamar de medidas de complexidade, baseadas na representação da imagem em forma de grafo, a árvore de componentes descrita anteriormente.

3.1 Parâmetros Quantitativos

Estes parâmetros descrevem quantitativamente as estruturas da imagem e são bastante empregados nos trabalhos científicos sobre AgNORs [Met95][Met96][Lor98][Gro93]. Estes parâmetros são geralmente calculados como uma taxa relacionando as AgNORs com seus núcleos.

Alguns destes parâmetros são:

- Área: razão entre a área ocupada pelas estruturas AgNORs e a área do núcleo correspondente (em pixels);
- Número de AgNORs: como o próprio nome diz, este parâmetro indica o número de estruturas AgNOR em cada núcleo.

A estes parâmetros, pode-se acrescentar, por exemplo, uma medida de volume sobre as estruturas da imagem, descrita como:

- Volume: razão entre o volume ocupado pelas estruturas AgNORs e o volume do núcleo correspondente. Este volume é calculado somando-se os níveis de cinza dos *pixels* que compõem cada estrutura na imagem.

3.2 Parâmetros Qualitativos

A fim de possibilitar uma análise mais sofisticada, agregando mais informações àquelas envolvendo apenas parâmetros quantitativos, foram sugeridas e elaboradas algumas medidas que permitem qualificar as estruturas da imagem.

Uma medida selecionada como importante, dentro do escopo deste trabalho, foi a medida de entropia, calculada sobre o histograma da imagem. Esta medida permite uma análise qualitativa da organização ou distribuição dos níveis de cinza das estruturas.

Além desta, foram elaboradas medidas de simetria. A importância da análise de simetria aqui se deve ao fato dos tumores benignos apresentarem, em sua maioria, formas arredondadas ("bem diferenciadas"), ao passo que os tumores malignos caracterizam-se por possuir formas mais irregulares e, geralmente, proporcionais à malignidade.

Assim, algumas técnicas de extração de informação sobre a simetria das estruturas foram consideradas. A técnica mais interessante e que se encaixa nos propósitos do trabalho foi abordada em [Zab95] e apresenta uma forma genérica para o cálculo de uma "Distância de Simetria".

Esta técnica gera, a partir da imagem original, uma outra imagem, chamada "Transformada de Simetria", que mais se aproxima da sua forma simétrica, de acordo com o tipo de simetria desejado, e calcula a distância entre os pontos do contorno do objeto e os correspondentes de sua Transformada de Simetria.

Baseando-se na idéia de Distância de Simetria, foram propostas duas medidas de cálculo de simetria radial das estruturas, uma calculada sobre o contorno e, a outra, sobre a distribuição radial dos níveis de cinza dos pontos do objeto, ao redor de seu centro de massa.

Estas medidas são explicadas, mais detalhadamente, nas seções que se seguem.

3.2.1 Entropia

O fator de entropia, calculado sobre o histograma, é um indicativo da “desordem” da distribuição das freqüências dos níveis de cinza das estruturas. Seu valor mais baixo é atingido quando todos os pontos possuem o mesmo nível de cinza e aparecem como um único pico no histograma. Seu maior valor é alcançado se o histograma apresenta as freqüências igualmente distribuídas [Sch97] (Figura 33).

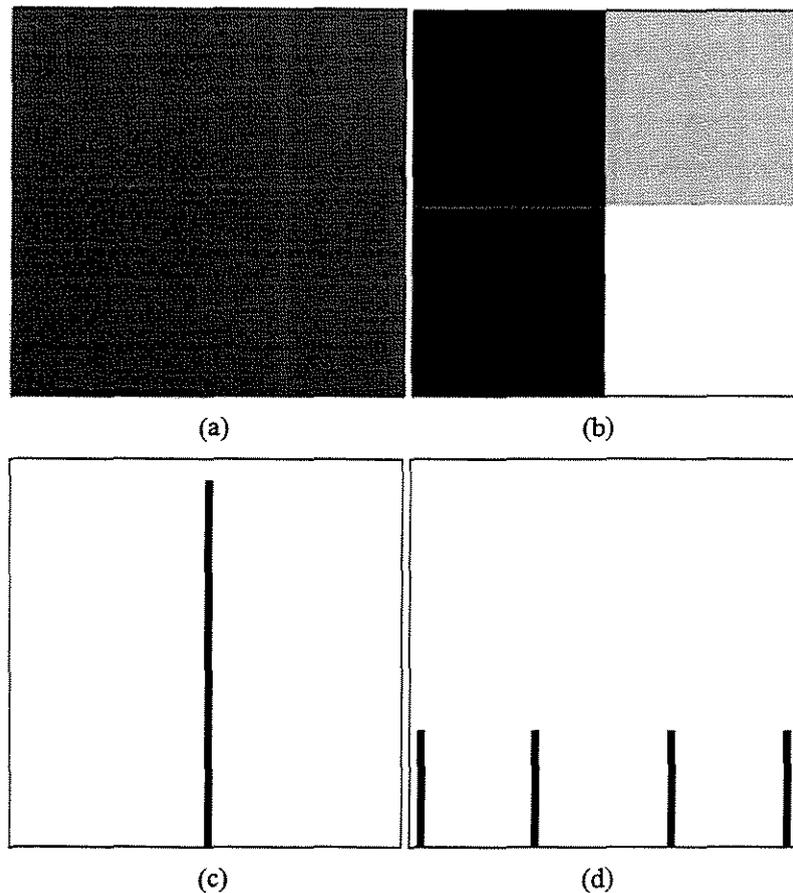


Figura 33. Entropia mínima e máxima. Em (a) a entropia é mínima ($=0$), seu histograma (c) apresenta um único pico, e em (b) a entropia é máxima ($=1$) com as freqüências do histograma (d) igualmente distribuídas.

Devido à irregularidade das estruturas AgNORs em células de indivíduos com câncer, o fator de entropia, calculado sobre o histograma destas estruturas, pode ser útil para comparar a desordem na distribuição de freqüência (Figura 34).

A entropia do histograma pode ser definida pela seguinte fórmula:

$$E = - \frac{\sum_{i=0}^n P(i) \times \text{Log}P(i)}{\text{Log } n} ,$$

em que

$$P(i) = \frac{\text{histo}(i)}{\sum_{j=0}^n \text{histo}(j)} ,$$

histo (*i*) é a frequência do nível de cinza *i* na imagem,
n é o número de níveis de cinza presentes na imagem.

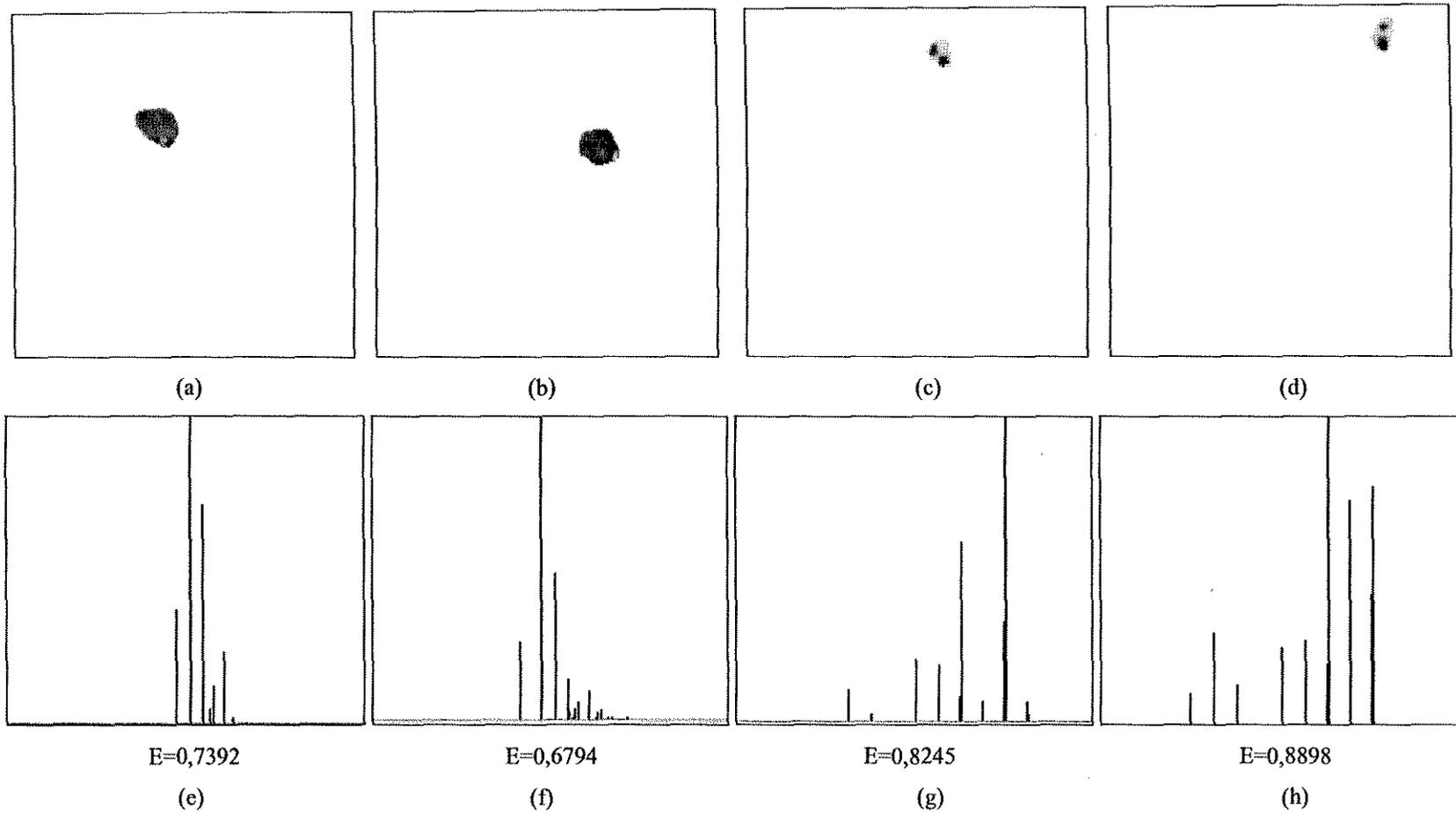


Figura 34. Exemplos do cálculo de entropia. Imagens: (a) e (b) representam AgNORs de células normais e seus histogramas são mostrados em (e) e (f), respectivamente; (c) e (d) representam AgNORs em células de tumor e seus histogramas são mostrados em (g) e (h), respectivamente. Os valores abaixo das imagens (e), (f), (g) e (h) são as entropias para os respectivos histogramas.

3.2.2 Simetria

A Distância de Simetria (DS), de acordo com [Zab95], pode ser definida como um quantificador do mínimo esforço requerido para transformar uma dada forma em uma forma simétrica.

Seja:

Ω - o espaço de todas as formas de uma dada dimensão,

P - forma representada por uma seqüência de n pontos $\{P_i\}_{i=0}^{n-1}$,

A métrica d, que define uma função de distância entre duas formas em Ω , é dada por:

$d: \Omega \times \Omega \rightarrow \mathbb{R}$

$$d(P, Q) = d(\{P_i\}, \{Q_i\}) = \frac{1}{n} \sum_{i=0}^{n-1} \left\| P_i - Q_i \right\|^2$$

A Transformada de Simetria de uma forma P é definida como a forma simétrica \hat{P} mais próxima a P em termos da métrica d.

Enfim, a Distância de Simetria (DS) de uma forma P é definida como a distância entre P e sua Transformada de Simetria:

$$DS = d(P, \hat{P}), \text{ ou}$$

$$DS = \frac{1}{n} \sum_{i=0}^{n-1} \left\| P_i - \hat{P}_i \right\|^2$$

Para o cálculo destas diferenças vetoriais, utiliza-se, normalmente, como ponto de origem, o centro de massa do objeto, para o qual o cálculo de simetria está sendo aplicado.

Este centro de massa pode ser calculado, por exemplo, através do conceito de Momento Espacial.

Para uma dada função bidimensional contínua $f(x, y)$, o Momento Espacial de ordem $m+n$, M_{mn} é definido pela relação [Gon79]:

$$M_{mn} = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} x^m y^n f(x, y) dx dy, \text{ para } m \text{ e } n = 0, 1, 2, \dots$$

Para uma imagem digital, a relação dos momentos espaciais torna-se:

$$M_{mn} = \sum_j \sum_i x_i^m y_j^n f(i, j), \text{ onde } f(i, j) \text{ é o nível de cinza do ponto } P(i, j).$$

Para uma imagem binária, pode-se considerar dois níveis de cinza, $f(i,j) = 0$ ou 1 , e o centro de massa ou centróide pode ser definido como o ponto $G(x_g, y_g)$ em que:

$$x_g = M_{10} / M_{00};$$

$$y_g = M_{01} / M_{00};$$

M_{00} : representa o número de pixels constituindo a região - área;

M_{01} : momento de primeira ordem de linha;

M_{10} : momento de primeira ordem de coluna.

A seguir, baseando-se nestes conceitos, são apresentadas as duas medidas de simetria elaboradas neste trabalho.

3.2.2.1 Simetria de Contorno

Com base no algoritmo genérico para o cálculo da Distância de Simetria, apresentado em [Zab95], foi proposto e implementado um algoritmo para gerar a Transformada de Simetria Radial do Contorno (TSR-C) de um objeto, e calcular sua respectiva Distância de Simetria Radial do Contorno (DSR-C).

Este cálculo consiste da divisão dos pontos do contorno do objeto em pares, de tal forma que os pontos de cada par estejam sobre uma mesma reta e que, partindo-se de um deles, esta reta cruze o centro de massa do objeto. Assim, para cada par $[P_0, P_1]$, realiza-se as seguintes operações (Figura 35):

1. Dobrar os pontos : sobrepor as retas formadas pelos dois pontos até o centro de massa, gerando o par $[P^{\sim}_0, P^{\sim}_1]$;
2. Calcular a média : calcular a reta de tamanho médio baseado no tamanho das retas dos dois pontos;
3. Desdobrar os pontos : gerar dois novos pontos, na imagem de Transformada de Simetria, que estejam sobre a mesma distância do centro de massa (a distância média calculada anteriormente), e que estejam numa reta de mesma inclinação de seus pontos de origem, e em direção contrária, o que resulta no par $[P^{\wedge}_0, P^{\wedge}_1]$.

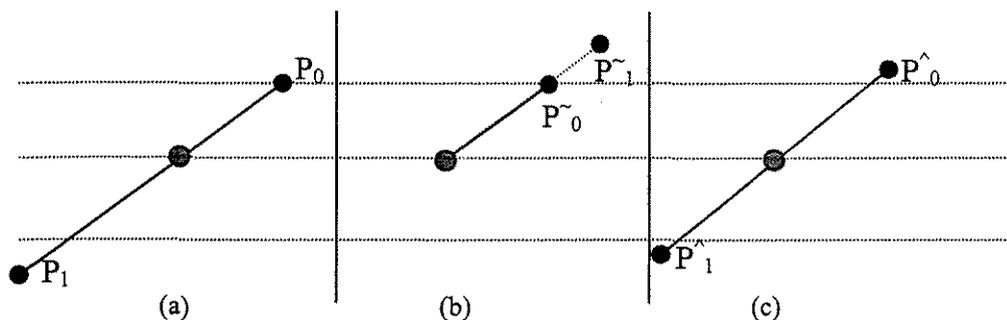


Figura 35. Simetria de contorno. (a) Par de pontos originais, (b) pontos dobrados, e (c) pontos desdobrados.

A Distância de Simetria é calculada somando-se as diferenças vetoriais entre os pontos de origem e os obtidos (desdobrados) pelo processo descrito acima, para cada par de pontos.

Para se obter um valor normalizado, divide-se a diferença pela média das distâncias dos pontos originais ao centro de massa do objeto:

$$M_i(P, \hat{P}) = \frac{\|P_i - G\|^2 + \|\hat{P}_i - G\|^2}{2},$$

Assim, pode-se descrever a fórmula para o cálculo do valor DSR-C como segue:

$$DSR - C = \frac{1}{n} \sum_{i=0}^{n-1} \frac{\|P_i - \hat{P}_i\|^2}{M_i(P, \hat{P})},$$

sendo n o número de pontos.

Portanto, para formas radialmente simétricas, como um círculo, o valor DSR-C será zero, ver Figura 36. E quanto maior este valor, menor é a simetria radial do contorno do objeto.

A Figura 37 mostra um exemplo de aplicação do cálculo da distância de simetria radial de contorno, sobre estruturas AgNORs, de algumas imagens reais de células normais e de tumor.

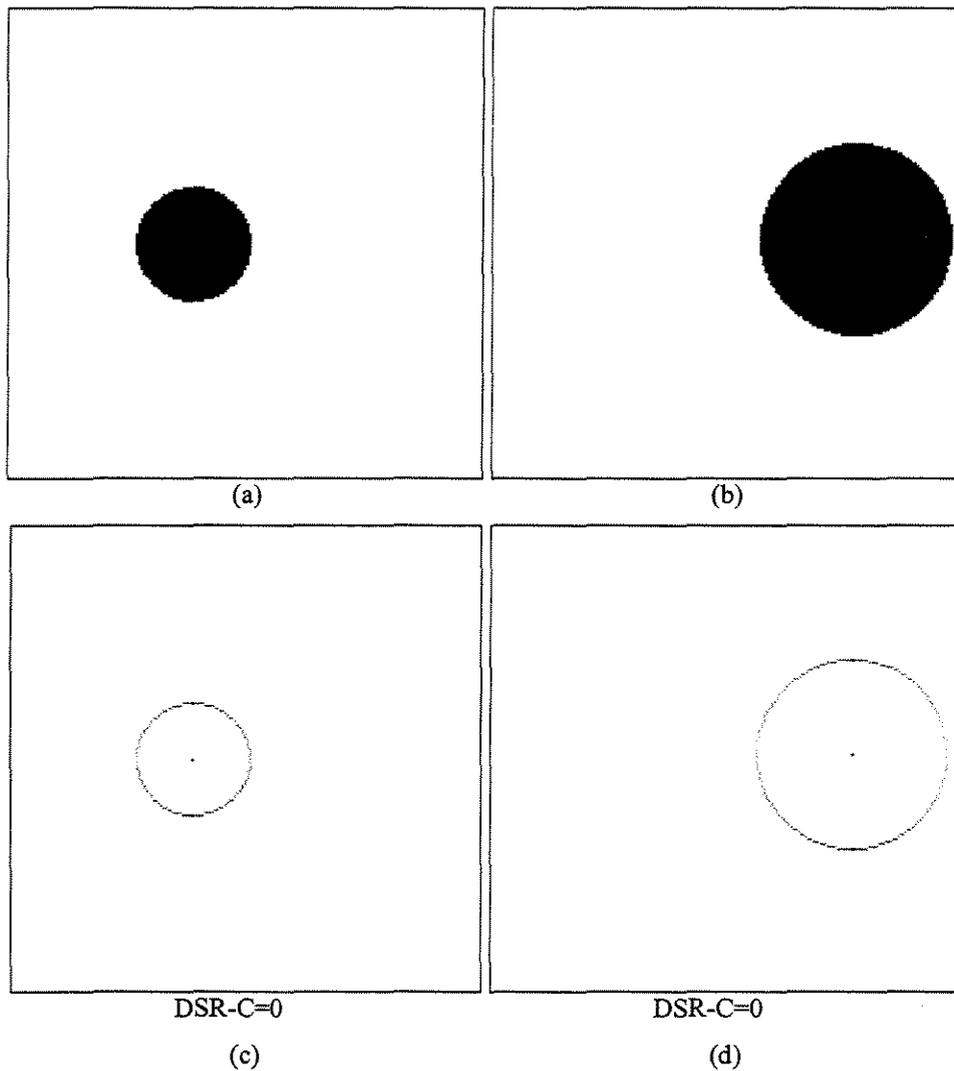


Figura 36. Exemplos do cálculo da distância de simetria de contorno. Imagens: (a) e (b) são as originais; (c) e (d) são suas respectivas Transformadas de Simetria Radial de Contorno mostrando também o centróide. Este exemplo mostra que, para formas simétricas o valor DSR-C é zero. Além disso, pode-se observar que esta medida é invariante à translação e escala.

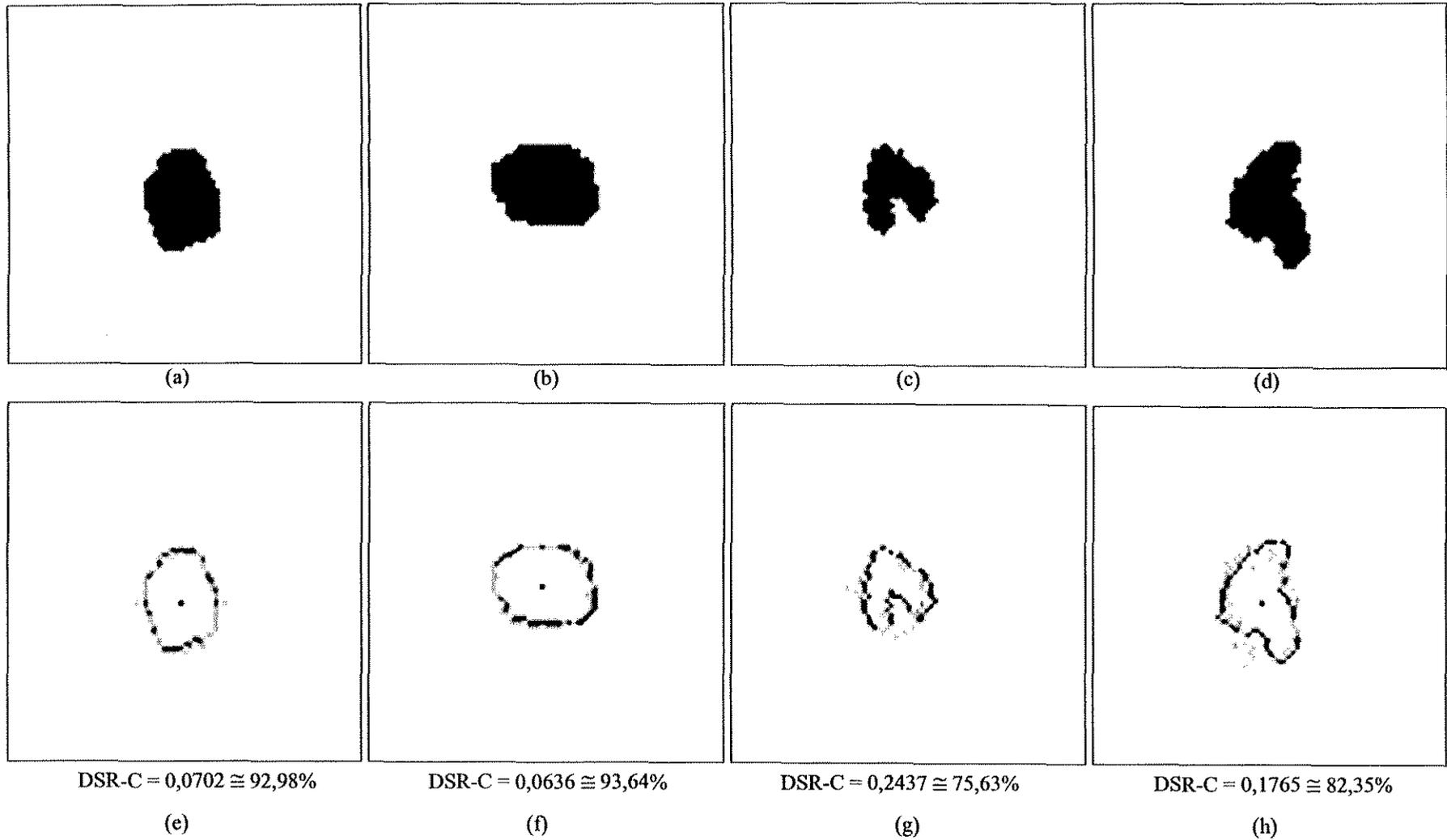


Figura 37. Transformada e Distância de Simetria Radial de Contorno. Imagens: (a) e (b) são exemplos de AgNORs de células normais e (e) e (f) suas respectivas Transformadas de Simetria; (c) e (d) são exemplos de AgNORs de células de tumor e (g) e (h) suas respectivas Transformadas de Simetria. Nestas últimas, os pontos pretos representam o contorno original e os pontos em cinza os gerados, ou seja, correspondentes à Transformada de Simetria do objeto.

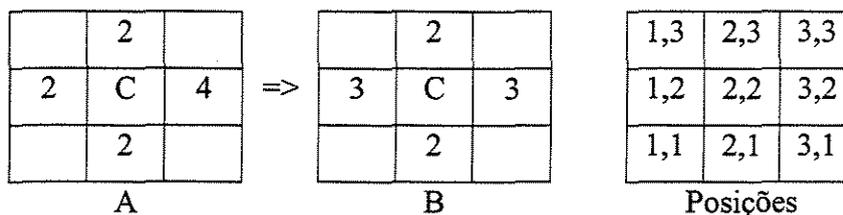
3.2.2.2 Simetria em Níveis de Cinza

A Transformada de Simetria Radial em Níveis de Cinza (TSR-NC) de uma imagem, elaborada neste trabalho, é outra imagem, obtida da original, representando a sua forma radialmente simétrica mais próxima, em relação aos seus níveis de cinza.

Esta imagem pode ser obtida considerando-se janelas de raios crescentes, 1, 3, 5, ..., MAX, centradas no centro de massa do objeto, onde MAX é o raio que abrange os pontos do objeto que se encontram mais distantes deste centro. Para tanto:

- 1 Com os pontos do contorno da janela, forma-se pares, seguindo uma direção radial;
- 2 Calcula-se a média do valor de cinza entre os pontos de cada par;
- 3 Atualiza-se a imagem de saída (transformada de simetria), definindo o nível de cinza de seus pontos, com o valor correspondente à média de cada par.

Exemplo: seja A a imagem original, B sua respectiva transformada de simetria, e o vetor de posições na imagem mostrados abaixo:



Os pares de pontos de A seriam:

- 2 e 2, das posições (2,1) e (2,3), e
- 2 e 4, das posições (1,2) e (3,2).

As médias para este pares, seriam então, 2 e 3, respectivamente, valores que foram atualizados na imagem de saída B, como pode ser visto acima.

Uma vez definida a Transformada de Simetria, a Distância de Simetria associada pode ser calculada. Assim, a Distância de Simetria Radial em Níveis de Cinza (DSR-NC) entre uma imagem e sua Transformada de Simetria, pode ser definida da seguinte forma:

Seja p um ponto da imagem:

$NC(p)$ = nível de cinza de p ,

$R(p)$ = raio do círculo centrado no objeto que contém p , ou seja, distância de p ao centro de massa do objeto;

A = imagem original;

B = transformada de simetria da imagem.

Define-se Distância de Simetria Radial em Níveis de Cinza como:

$$DSR - NC = \frac{|B - A|}{\sum A}$$

onde:

$$|B - A| = \sum (|NC(b) - NC(a)| \times R(a))$$

para todo a e b , tal que a e b sejam pontos de A e B , respectivamente, de mesma coordenada,

$$\sum A = \sum NC(p) \times R(p)$$

para todo p pertencente ao objeto em A .

Considerando-se o exemplo acima, pode-se calcular:

$$|B - A| = (|2 - 2| \times 1) + (|3 - 2| \times 1) + (|3 - 4| \times 1) + (|2 - 2| \times 1) = 2$$

$$\sum A = (2 \times 1) + (2 \times 1) + (4 \times 1) + (2 \times 1) = 10$$

$$DSR - NC = \frac{|B - A|}{\sum A} = \frac{2}{10} = 0,2 \cong 20\%$$

O valor obtido para DSR-NC corresponde a um grau (%) de simetria igual a:

$$Simetria = (1 - DSR) \times 100.$$

A Figura 38 mostra exemplos da Transformada de Simetria e seus respectivos valores de Distância de Simetria, assim como a Simetria equivalente, calculados sobre imagens reais.

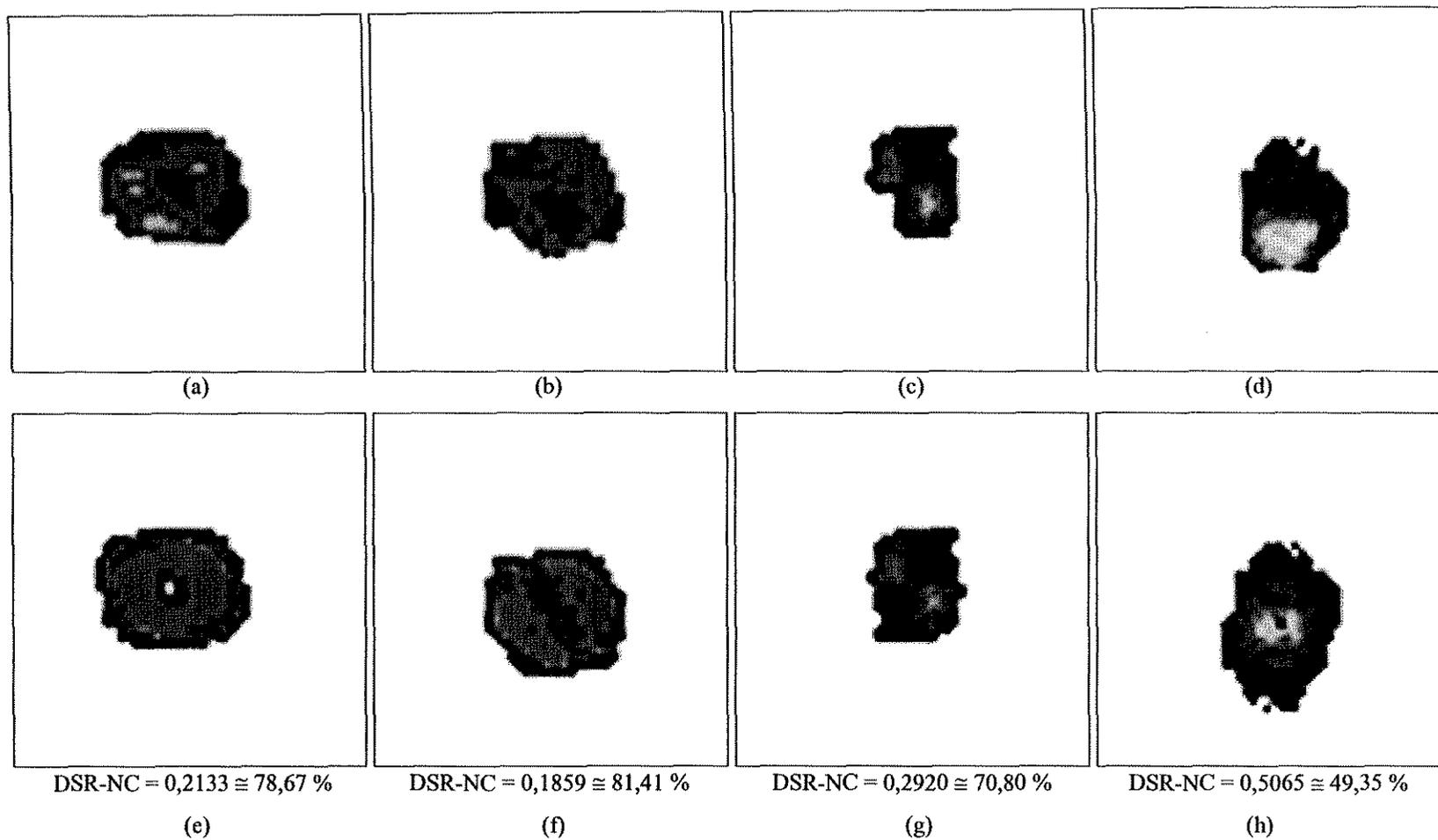


Figura 38. Transformada e Distância de Simetria Radial de Superfície. Imagens: (a) e (b) são exemplos de AgNORs de células normais e (e) e (f) suas respectivas Transformadas de Simetria; (c) e (d) são exemplos de AgNORs de células de tumor e (g) e (h) suas respectivas Transformadas de Simetria. Os valores mostrados abaixo das imagens (e), (f), (g) e (h) são os respectivos valores da Distância de Simetria Radial de Superfície para estas imagens e o valor equivalente, dado em em porcentagem, corresponde ao grau de simetria do objeto.

3.3 Parâmetros da Árvore de Componentes

Nesta seção são apresentados os parâmetros definidos sobre a árvore de componentes considerada anteriormente. Estes parâmetros visam a obtenção de um conjunto de medidas que expressem a complexidade da forma dos objetos representados por esta árvore.

Alguns parâmetros da árvore são extraídos da árvore original e outros da árvore simplificada. Através destes, são calculadas algumas taxas, obtidas da razão entre os valores medidos das árvores simplificada e original.

As seguintes medidas podem ser extraídas da árvore de componentes (Figura 39):

- Número de nós: número total de nós na árvore do objeto. Esta medida é calculada sobre a árvore original e simplificada, permitindo extrair uma taxa do número de nós. Para a Figura 39, este valor seria 9 para a árvore original e 6 para a sua árvore simplificada;
- Número de folhas: número total de folhas da árvore. Este valor é o mesmo para as duas árvores. Para a Figura 39 é igual a 3.

Para as seguintes medidas, são extraídas informações estatísticas básicas, tais como o valor mínimo, máximo, a média e o desvio-padrão:

- Número de filhos: número de filhos de um nó da árvore. Isto permite avaliar a ramificação da árvore. Para a Figura 39 tem-se os valores:
 - Mínimo = 1;
 - Máximo = 2;
 - Média = 0,88;
- Nível de cinza: nível de cinza do nó da árvore;
- Distância: esta medida corresponde à diferença entre os níveis de cinza de um nó e seu nó-pai (aquele imediatamente abaixo). Na Figura 39 poderíamos considerar que esta medida tem o mesmo valor para todos os nós;
- Altura de domo (folhas): esta medida, calculada apenas para as folhas da árvore simplificada, corresponde à diferença entre o nível de cinza da folha e o nível de cinza de seu nó-pai. Assim, de acordo com a Figura 39, considerando que todos os nós possuem a mesma “Distância” (D), tem-se que a folha com o *label* 8 tem altura de domo igual a 2D, visto que o nó 7 não pertence à árvore simplificada.

Da mesma forma, para a folha 6 este valor é igual a D , e para a folha 3, igual a $2D$, pois o nó 2 não pertence à árvore simplificada.

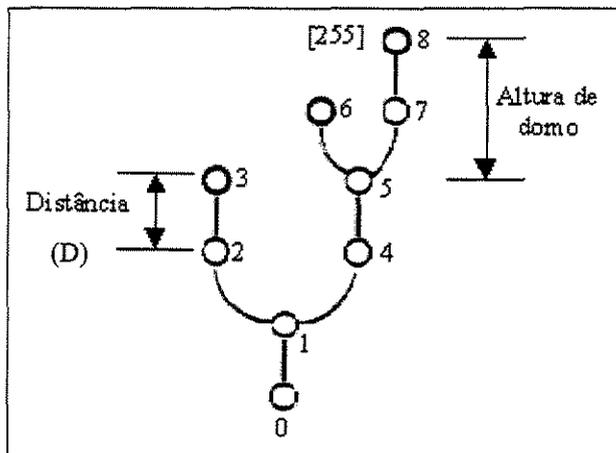
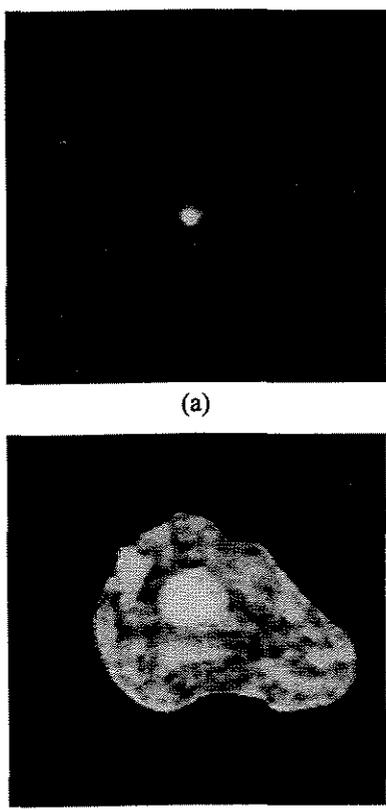


Figura 39. Parâmetros da Árvore de Componentes.

As Figuras 41 a 44 mostram os gráficos representando as árvores de dois núcleos de células reais, uma normal e outra de tumor, correspondentes às imagens da Figura 40. Estes gráficos servem de exemplo para evidenciar a fragmentação das árvores. As medidas calculadas sobre estas árvores são apresentadas na Figura 40.



			Normal	Câncer
Número de Nós	Árvore	Total	568	1056
		Folhas	183	307
	Árvore Simplificada	Total	257	493
		Folhas	183	307
Altura de Domo	Folhas da Árvore Simplificada	Mín	1	1
		Máx	31	13
		Méd	2.77	3.29
Distância entre Nós	Árvore	Mín	1	1
		Máx	29	87
		Méd	1.36	1.5
	Árvore Simplificada	Mín	1	1
		Máx	108	133
		Méd	2.89	3.21
Número de filhos	Árvore	Mín	1	1
		Máx	22	8
		Méd	1.47	1.4
	Árvore Simplificada	Mín	1	1
		Máx	22	8
		Méd	3.45	2.64
Nível de cinza	Árvore	Mín	29	87
		Máx	189	205
		Méd	102.9	146.68
	Árvore Simplificada	Mín	37	133
		Máx	189	205
		Méd	75.62	169.7

Figura 40. Núcleos reais e tabela de medidas das árvores. Imagens: (a) núcleo de célula normal; (b) núcleo de célula de tumor.

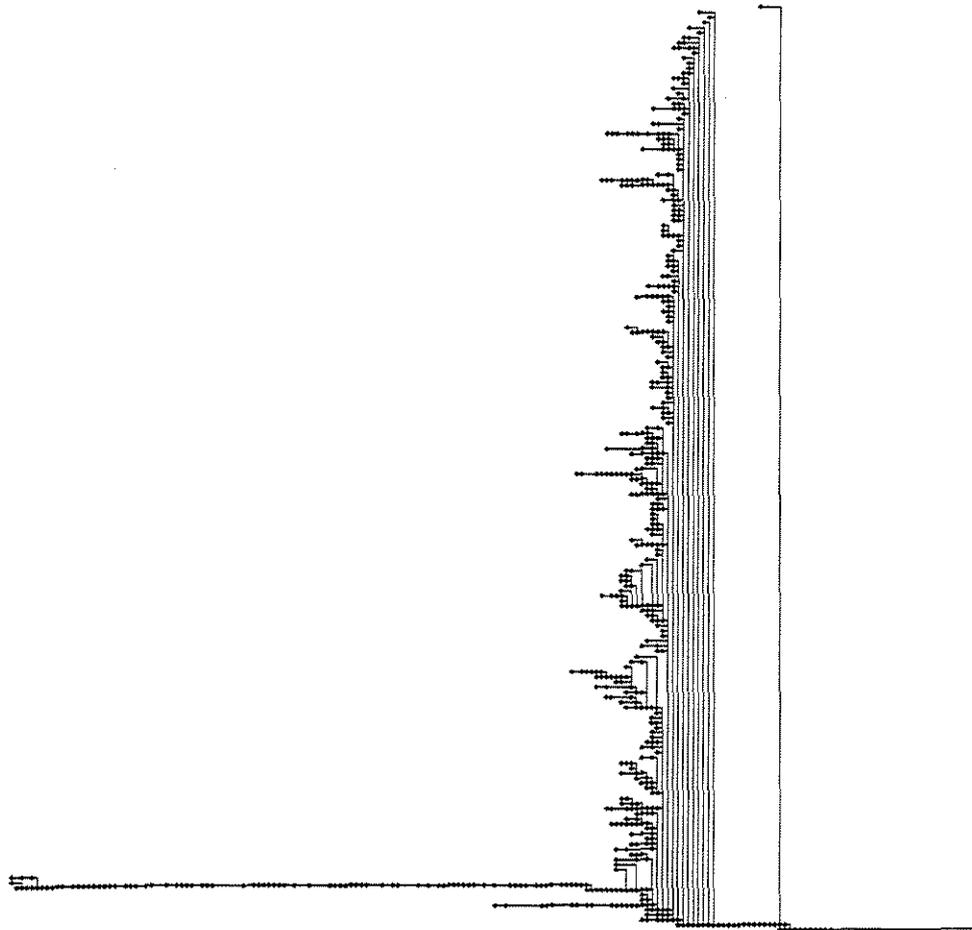


Figura 41. Árvore de Componentes de um núcleo de célula normal.

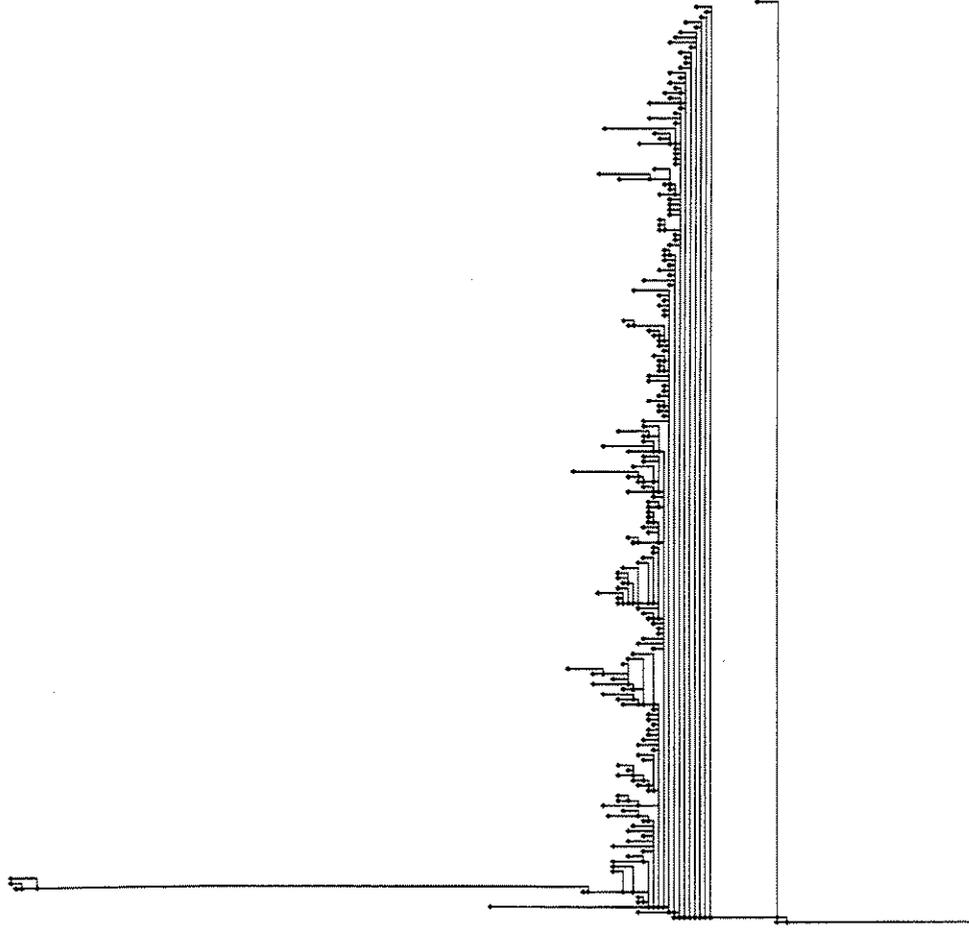


Figura 42. Árvore Simplificada da Árvore da Figura 41.

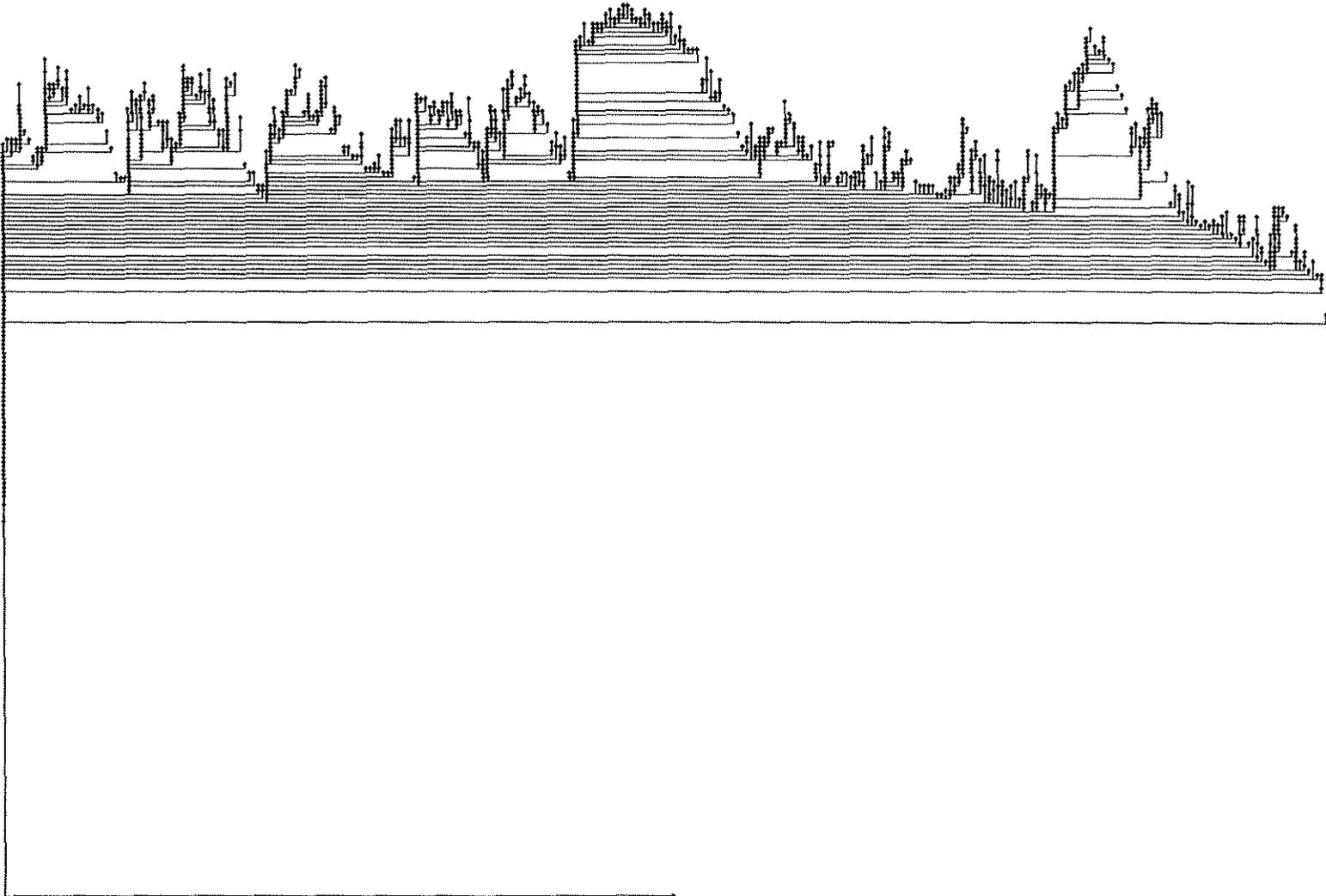


Figura 43. Árvore de Componentes de um núcleo de célula cancerígena.

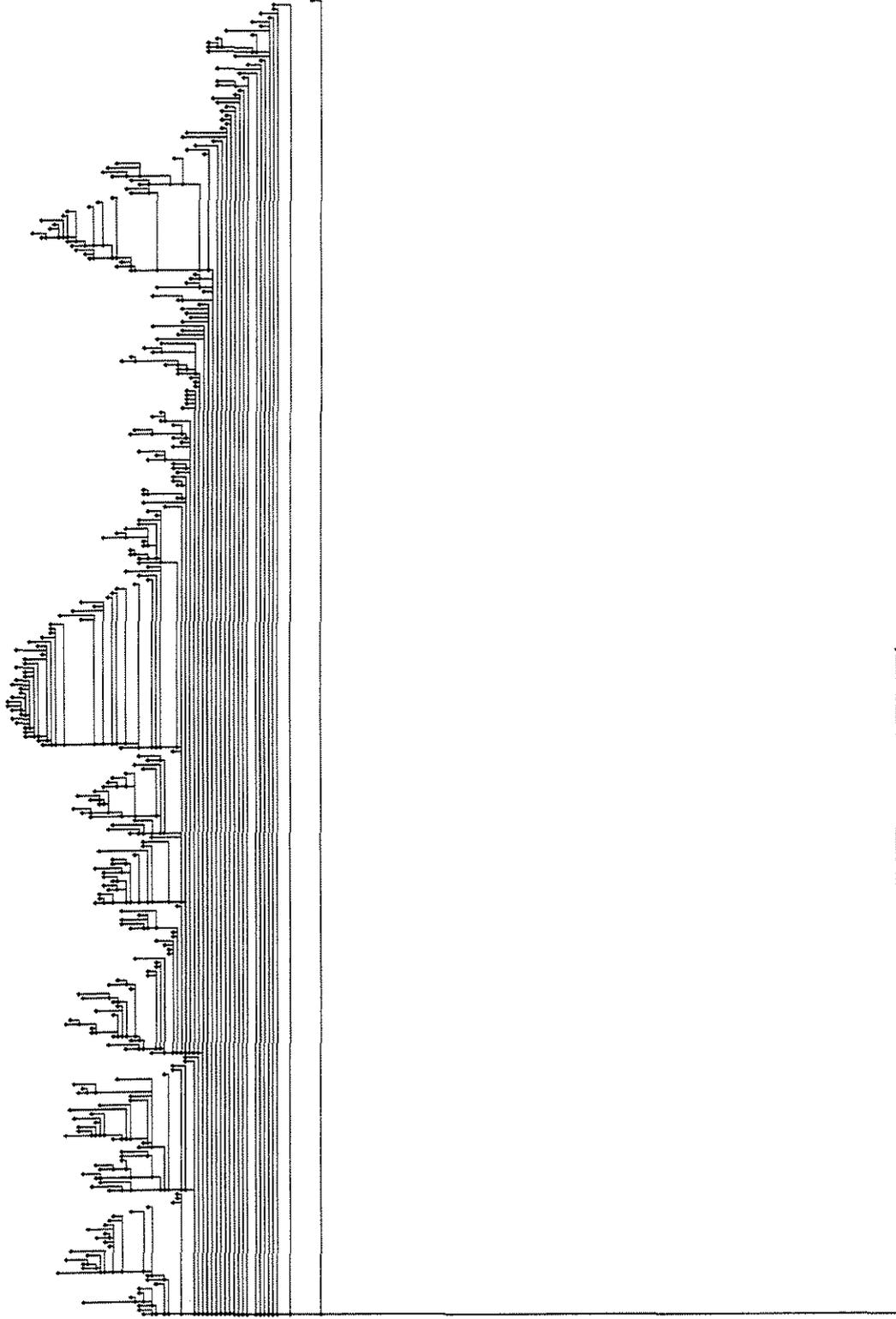


Figura 44. Árvore Simplificada da Árvore da Figura 43.

Capítulo 4

Extração de Parâmetros e Aplicações

Antes de ilustrar algumas possíveis aplicações dos parâmetros apresentados neste trabalho, é importante entender os passos seguidos na extração destes parâmetros, medidos sobre as componentes da imagem. A extração é realizada utilizando-se três imagens: a original, a imagem de núcleos e a imagem de AgNORs segmentadas.

Este primeiro passo é realizado de acordo com a Figura 45, onde o usuário fornece as imagens segmentadas com núcleos e AgNORs para que o sistema inicie o processo de extração dos parâmetros.

Após a extração, os parâmetros são exibidos em forma de grade (Figura 46) para cada componente (núcleo) e sub-componentes (AgNORs), possibilitando a cópia dos dados para a área de transferência do sistema. Os dados, então, podem ser exportados para alguma planilha onde serão agrupados e analisados. Os dados também são impressos em forma de arquivo texto.

Como pode ser visto na Figura 46, o sistema fornece várias possibilidades de configuração que auxiliam o processo de importação dos dados para uma planilha ou para algum *software* de análise estatística, como:

- número de dígitos de precisão;
- o separador de decimais (ponto ou vírgula);
- exibição separada dos dados das componentes e os das sub-componentes;
- cópia de toda a grade para a área de transferência - o que inclui os cabeçalhos - ou apenas os dados.

Após a extração, os parâmetros podem ser usados, por exemplo, como fator discriminante na classificação de doenças ou como equivalentes morfológicos de processos fisiológicos e fisiopatológicos. As seções seguintes abordam estas duas aplicações.

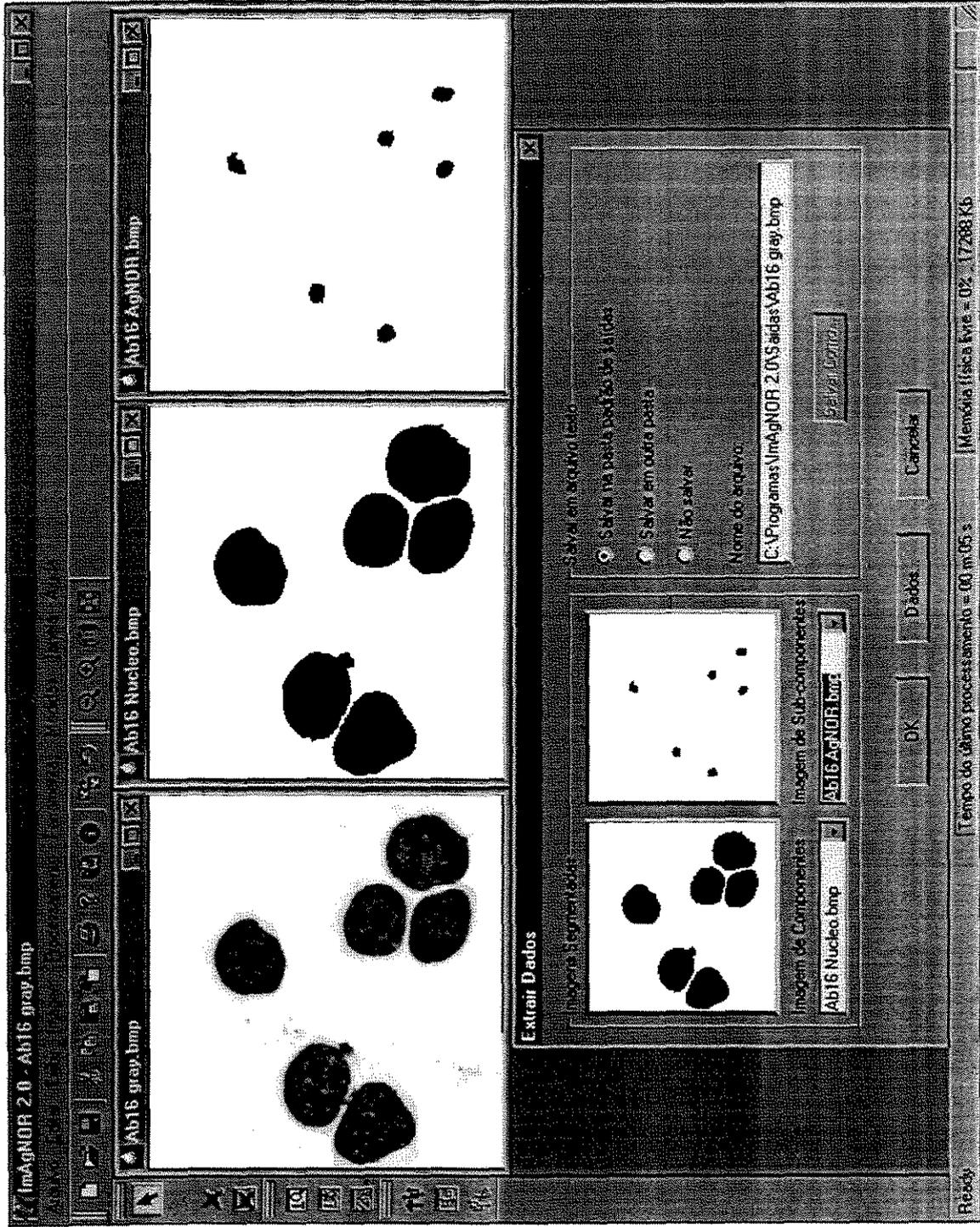


Figura 45. Interface do sistema mostrando a caixa de diálogo "Extrair Dados".

Grade de Dados

Componente	Area	Volume	DSSES	DSSES	DSSES Sub-comp	Entropia	Folhas	Núm. Sub-comp.
1	7074	473958	0.0313	0.1778	0.1071	0.8552	252	
2	9582	680322	0.0366	0.2127	0.0984	0.9042	294	
3	9539	629574	0.0727	0.3281	0.2256	0.9068	286	
4	7481	486265	0.0271	0.1961	0.0908	0.8886	221	
5	9103	664519	0.0739	0.3235	0.1672	0.9127	283	
6	8204	566076	0.0371	0.2124	0.1783	0.8654	273	
Médo								
Devo. Patro								

Fechar

Mostrar Grade

Exibir Componentes
 Exibir Sub-componentes
 Exibir tudo

Tipo de Dado:

 Copiar toda a grade para a Área de transferência

 Copiar apenas os dados para a área de transferência

Atualizar

Copiar

Precisão:

 Número de dígitos =

 Usar vírgula como separador

 Usar ponto como separador

Figura 46. Interface do sistema mostrando a Grade de Dados.

4.1 Discriminação entre entidades diagnósticas

Como mencionado na introdução, a análise morfométrica e textural pode ajudar na discriminação das diferentes entidades diagnósticas. Para tanto, pode-se empregar um conjunto de dados simultaneamente numa análise discriminante linear.

A técnica multicamadas de análise discriminante desenvolvida em [Fis36] provê um método efetivo na subdivisão de casos em grupos. A análise discriminante preocupa-se com a separação eficiente de dois ou mais grupos de casos, baseando-se em atributos (neste trabalho, os parâmetros de forma) observados destes casos. Para a separação entre dois grupos, o caso mais simples, o método comum baseia-se em encontrar a combinação linear dos atributos medidos, normalmente referido como a função discriminante linear de Fisher, que maximiza a razão da variação entre os grupos com a variação dentro dos grupos [Bru90].

Ao medir a efetividade de funções discriminantes em predizer os membros de um grupo, uma taxa de erro aparente (TEAP) resulta do uso do mesmo conjunto de dados para gerar a função de classificação e para validar a função, ou seja, o classificador pode estar altamente ajustado aos dados de treinamento.

O procedimento *holdout* descrito em [Lac68] pode ser usado para compensar a influência da utilização do mesmo conjunto de dados, ao gerar o TEAP, para estimar a taxa de erro real. O procedimento *holdout* ou método *leave-one-out*, ou ainda *jackknife*, é um dos vários métodos de *cross-validation* e baseia-se em calcular a função discriminante usando todos os dados exceto um que é, então, classificado. Isto é repetido até que todos os dados sejam classificados. Resumindo, este método é uma alternativa para dividir o conjunto de dados em amostras de treinamento e amostras de validação para estimar a taxa de erro real [Ebd98].

Num estudo piloto foi comparado aqui um conjunto de linfócitos normais com os de leucemia linfóide crônica. Os parâmetros mencionados a seguir mostraram diferenças que podem ser consideradas numa análise discriminante linear para diferenciar os dois tipos de células.

As figuras 47 a 55 mostram *box-plots*, gerados para alguns dos parâmetros definidos neste trabalho, medidos sobre os núcleos das células sanguíneas de pacientes normais (caso de Controle) e com leucemia linfóide crônica (LLC). Nestes gráficos, são apresentadas as

variações das medidas para cada caso (Controle e LLC) em termos de percentis. No eixo das abcissas é indicado o caso e no das ordenadas os valores medidos para o respectivo parâmetro. O extremo inferior da reta vertical indica, para cada caso, o seu percentil de 5%, ou seja, esta posição no eixo das ordenadas representa 5% dos dados medidos ordenados crescentemente. Da mesma forma o extremo superior desta reta indica o percentil de 95%. O retângulo preenchido representa o intervalo compreendido entre o percentil de 25% e o de 75%. A linha horizontal sobre o retângulo representa o percentil de 50% que corresponde à mediana dos dados.

As figuras 56 a 62 mostram os *box-plots* para alguns parâmetros medidos sobre as AgNORs dos mesmos casos acima.

Estes resultados não são estatisticamente conclusivos, visto que um número insuficientes de casos foi analisado. Todavia, as diferenças observadas para parâmetros como a Distância de Simetria de Superfície (Figura 48), Entropia (Figura 50) e Número de Folhas (Figura 51) calculados para os núcleos, assim como a Distância de Simetria de contorno (Figura 60), DSR-S (Figura 61) e Entropia (Figura 62) calculados para as AgNORs apontam algumas tendências que deverão ser confirmadas em trabalhos estatísticos mais aprofundados por pesquisadores desta área.

A posição do vetor discriminante de um caso novo, ainda com diagnóstico desconhecido, criado a partir destas variáveis, poderia sugerir um diagnóstico simplesmente comparando as distâncias com os centróides do grupo de controle e do grupo da leucemia linfóide crônica. O grupo com o centróide menos distante iria indicar o diagnóstico mais provável.

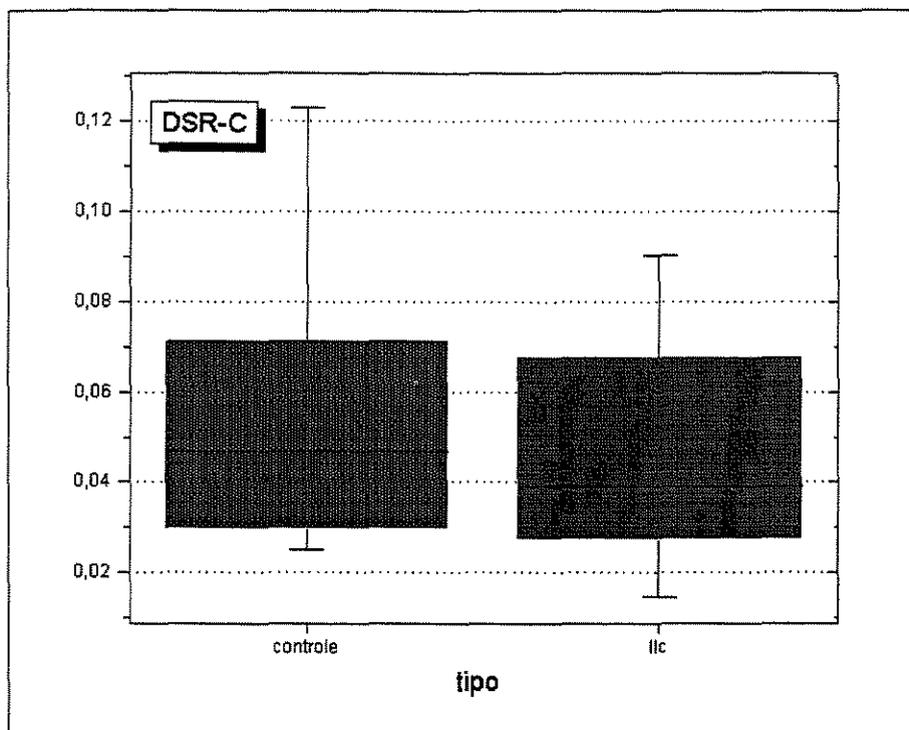


Figura 47. *Box-plot* para a Distância de Simetria Radial de Contorno (DSR-C) medida para os núcleos dos casos Controle e LLC.

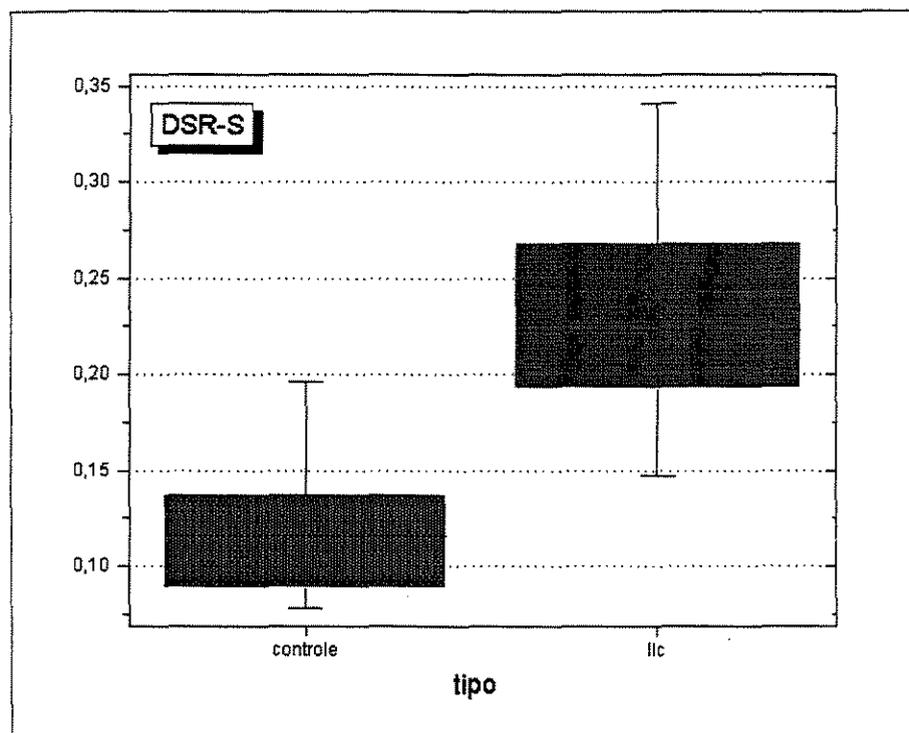


Figura 48. *Box-plot* para a Distância de Simetria Radial de Superfície (DSR-S) medida para os núcleos dos casos Controle e LLC.

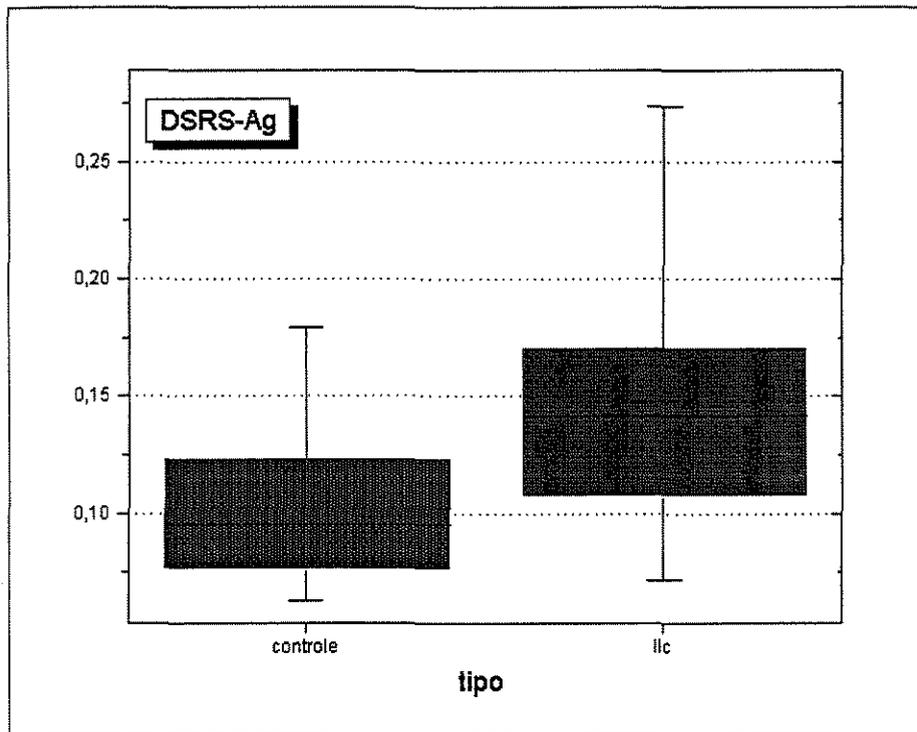


Figura 49. *Box-plot* para a Distância de Simetria Radial de Superfície (DSRS-Ag) das AgNORs dentro de cada núcleo medida para os casos Controle e LLC.

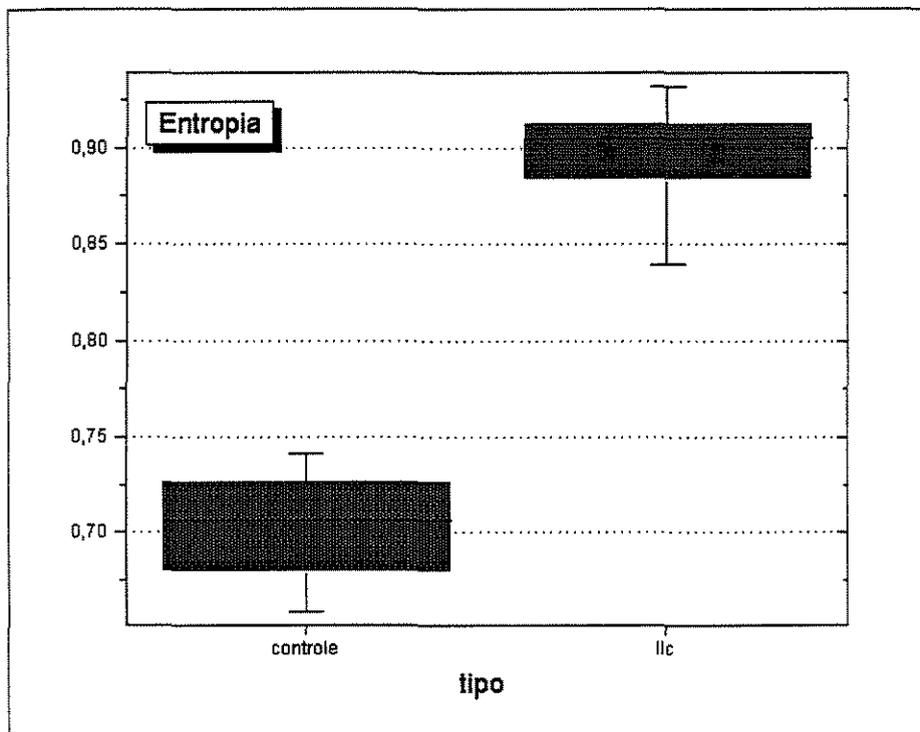


Figura 50. *Box-plot* para a Entropia medida para os núcleos dos casos Controle e LLC.

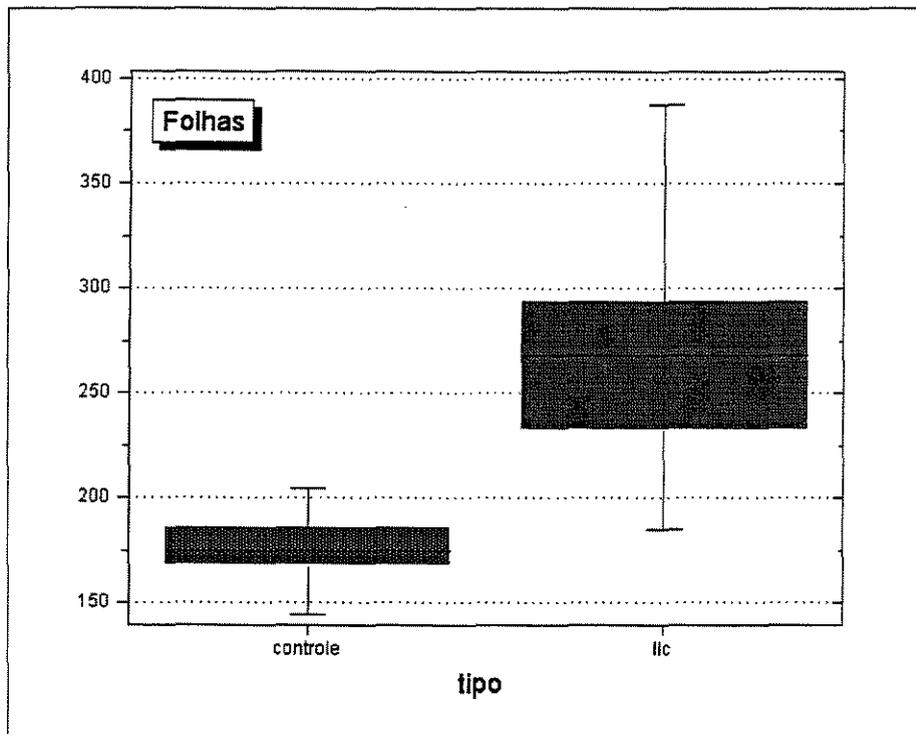


Figura 51. *Box-plot* para o número de Folhas da árvore medido para os núcleos dos casos Controle e LLC.

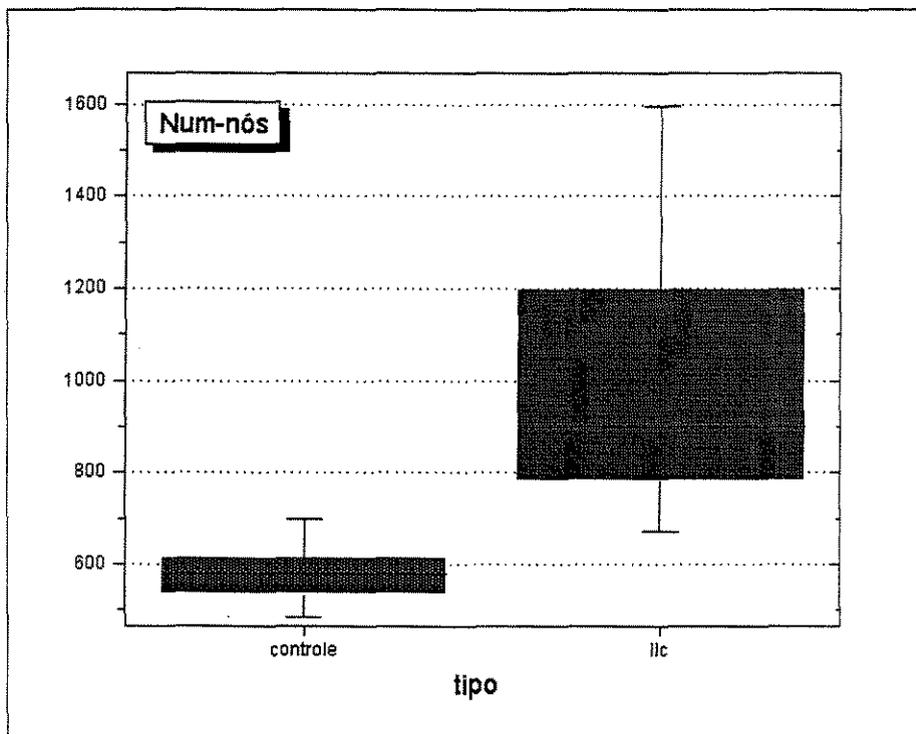


Figura 52. *Box-plot* para o número de nós da árvore medido para os núcleos dos casos Controle e LLC.

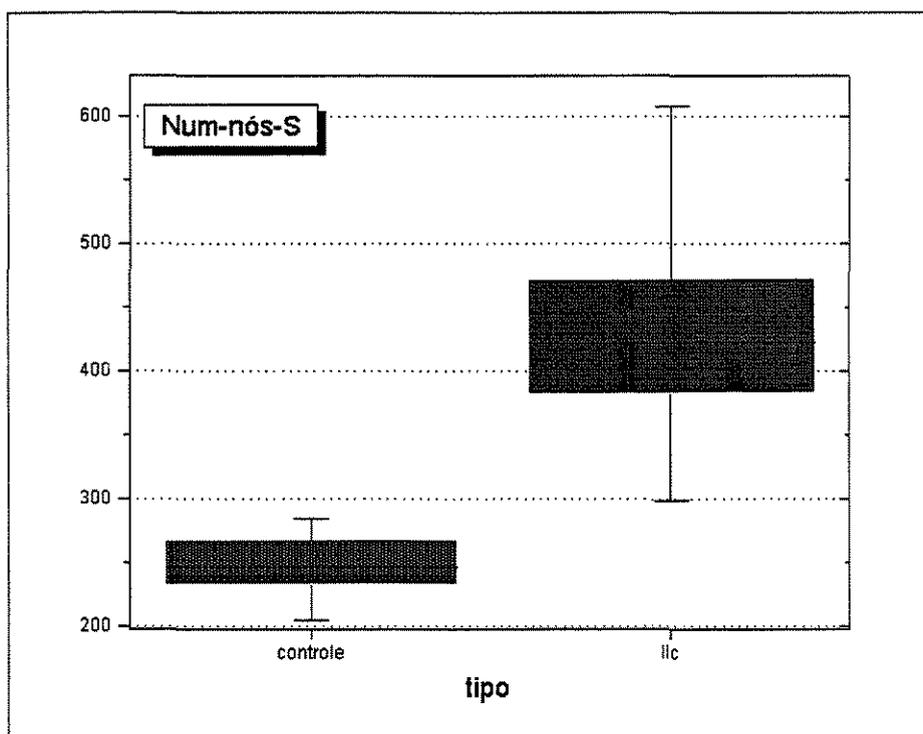


Figura 53. *Box-plot* para o número de nós da árvore simplificada medido para os núcleos dos casos Controle e LLC.

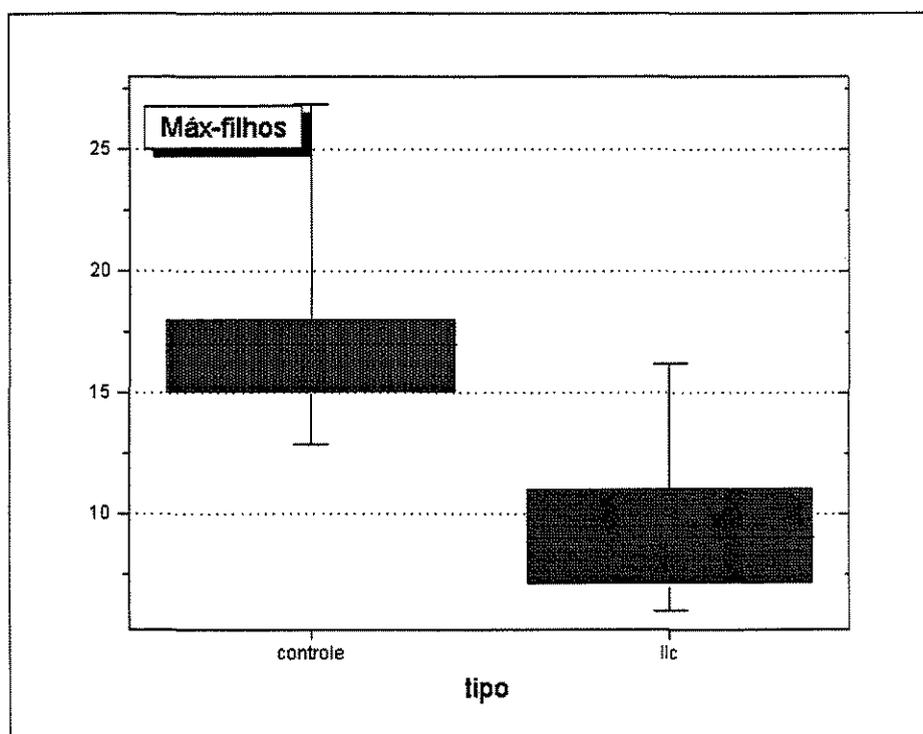


Figura 54. *Box-plot* para o número máximo de filhos dos nós da árvore medido para os núcleos dos casos Controle e LLC.

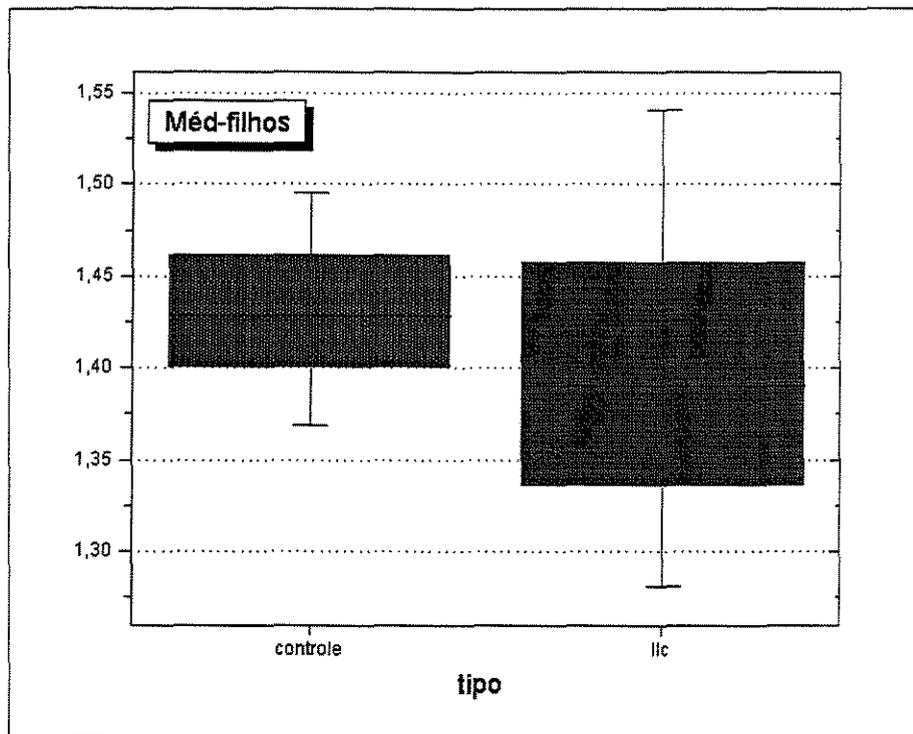


Figura 55. *Box-plot* para a média do número de filhos dos nós da árvore medida para os núcleos dos casos Controle e LLC.

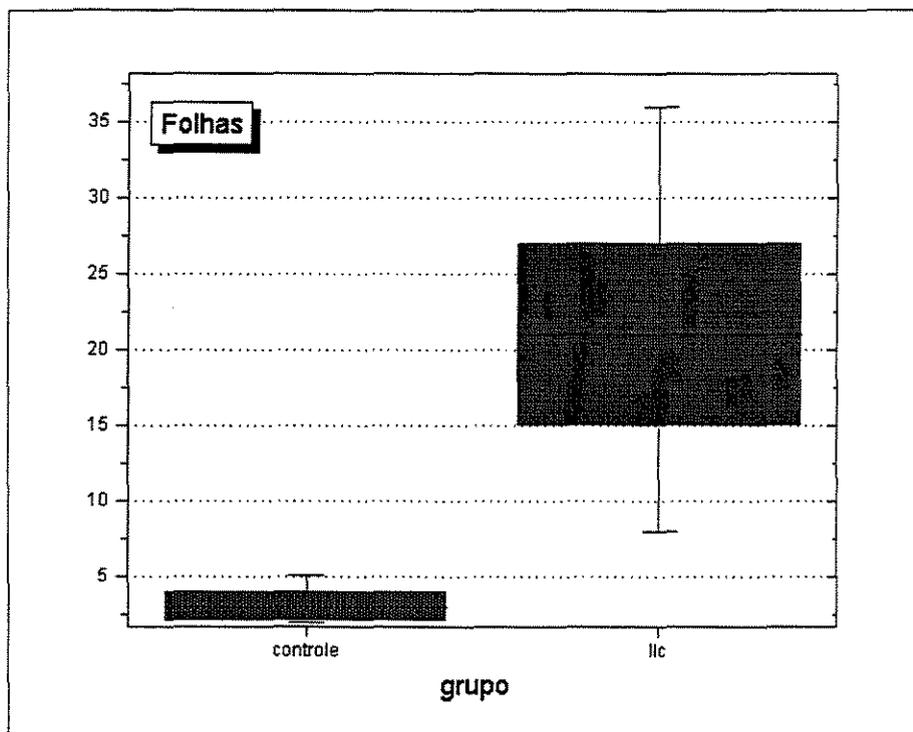


Figura 56. *Box-plot* para o número de Folhas da árvore medido para as AgNORs dos casos Controle e LLC.

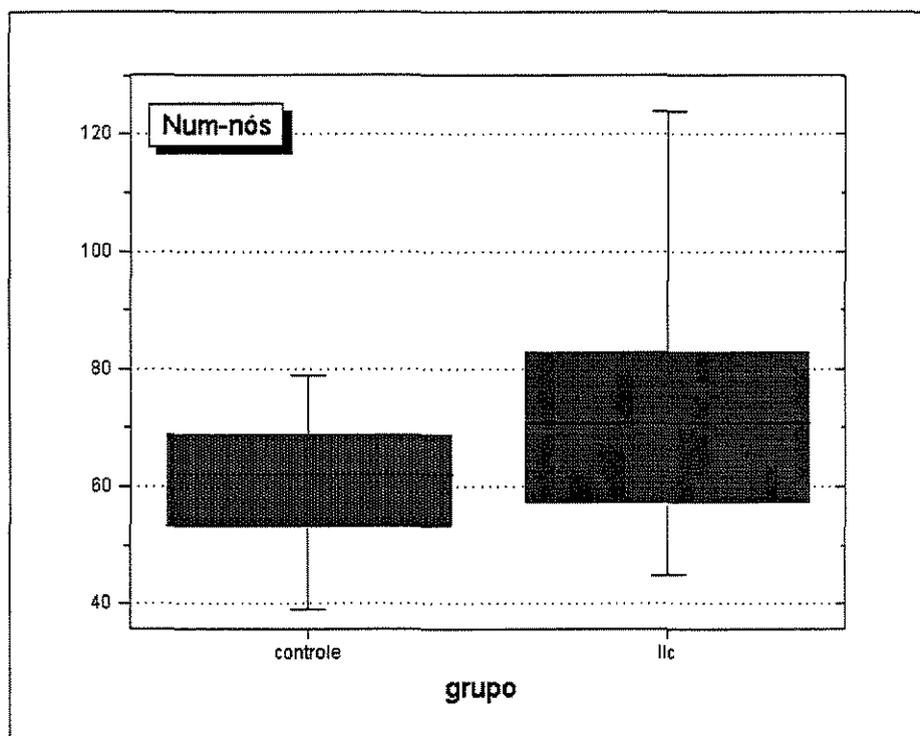


Figura 57. *Box-plot* para o número de nós da árvore medido para as AgNORs dos casos Controle e LLC.

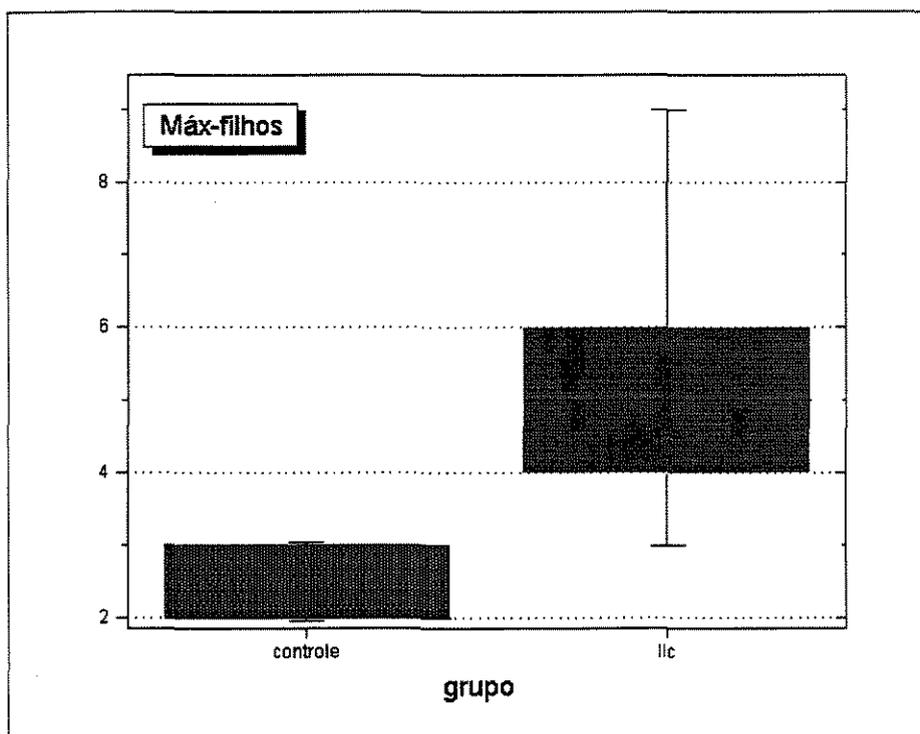


Figura 58. *Box-plot* para o número máximo de filhos dos nós da árvore medido para as AgNORs dos casos Controle e LLC.

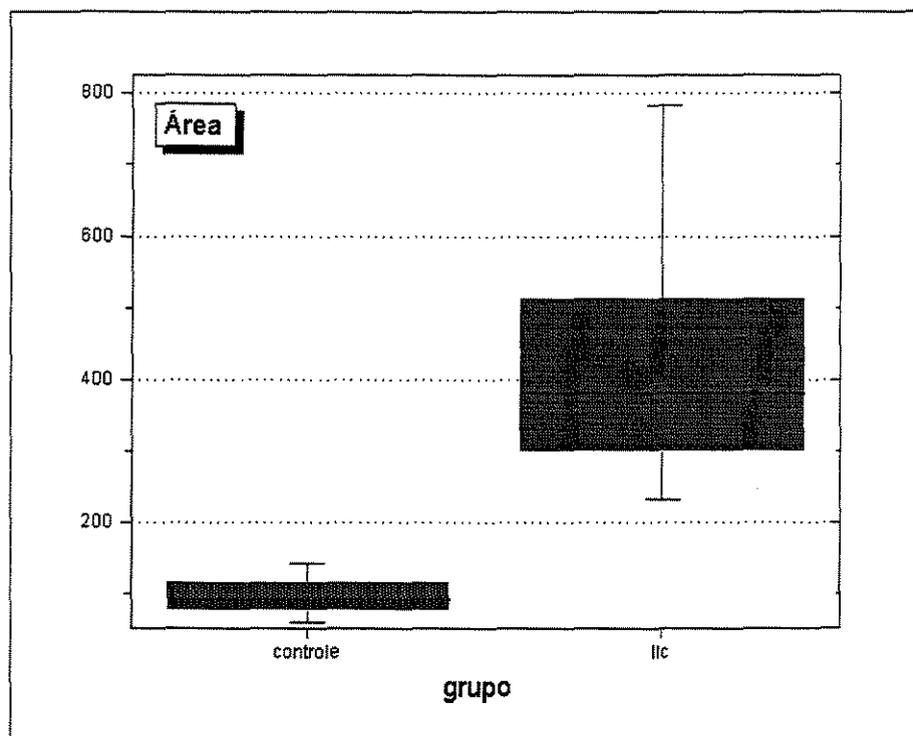


Figura 59. *Box-plot* para a área das AgNORs medida para as AgNORs dos casos Controle e LLC.

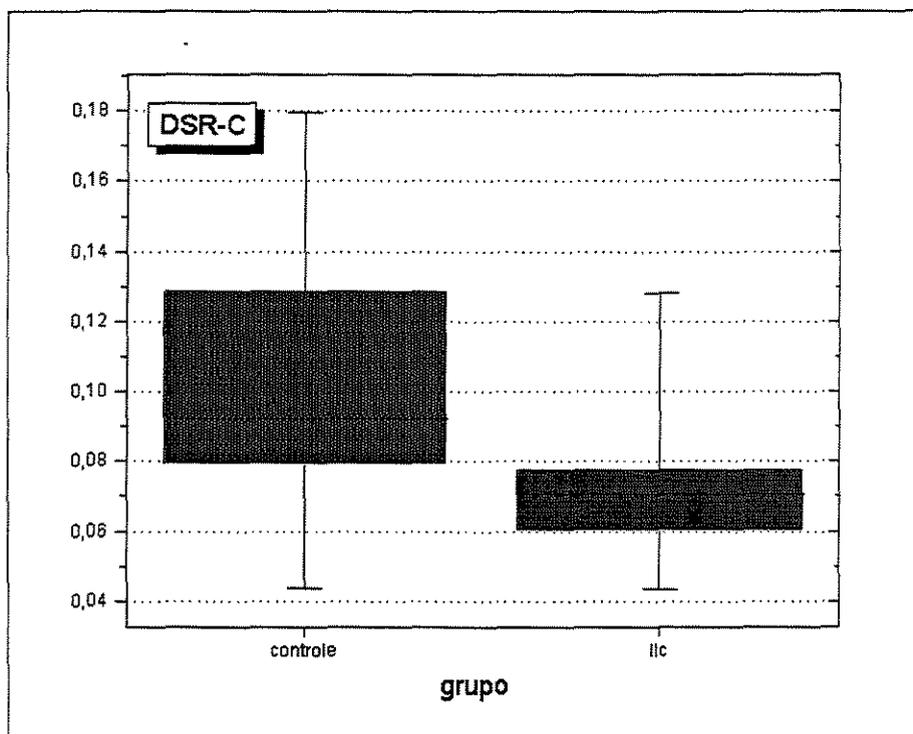


Figura 60. *Box-plot* para a Distância de Simetria Radial de Contorno (DSR-C) medida para as AgNORs dos casos Controle e LLC.

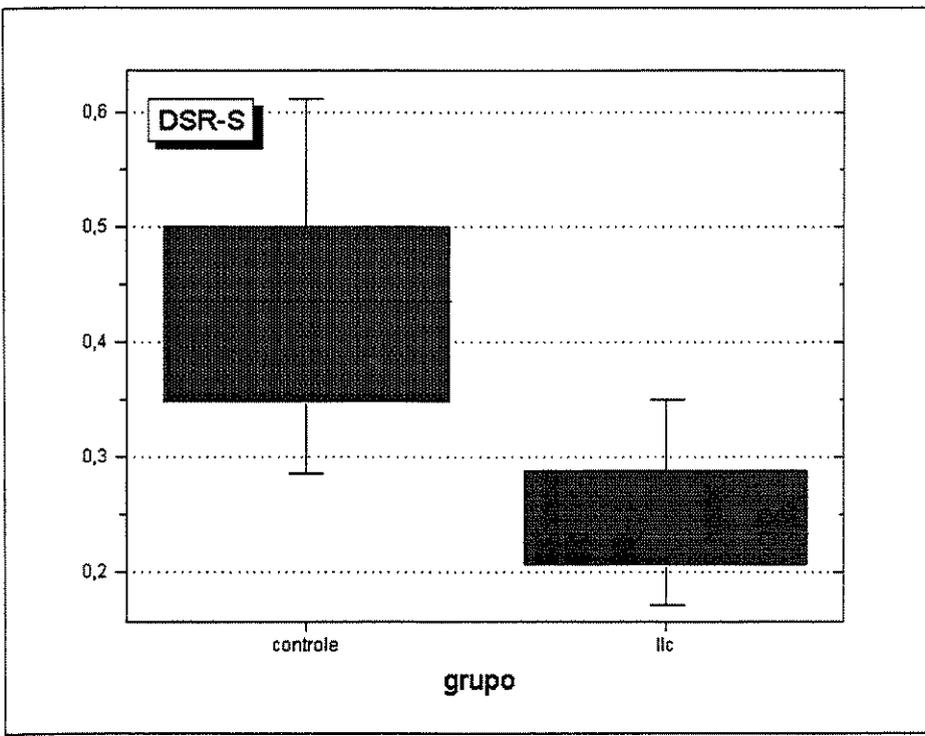


Figura 61. *Box-plot* para a Distância de Simetria Radial de Superfície (DSR-S) medida para as AgNORs dos casos Controle e LLC.

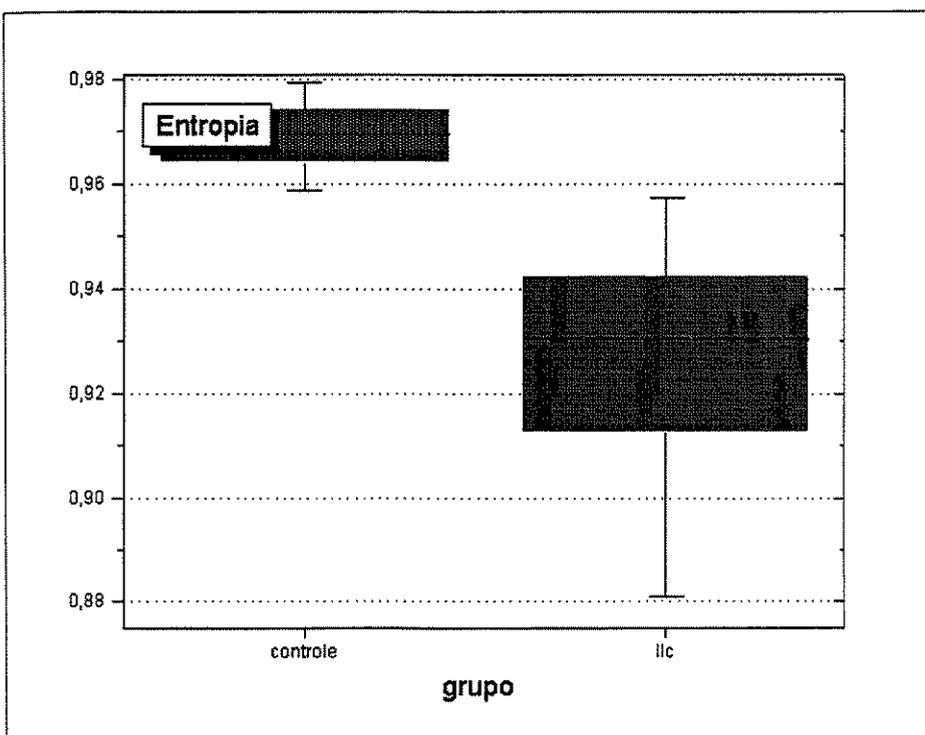


Figura 62. *Box-plot* para a Entropia medida para as AgNORs dos casos Controle e LLC.

4.2 Morfologia como equivalente de processos fisiológicos ou patológicos

Os parâmetros medidos para as estruturas AgNORs e núcleos podem servir como equivalentes de processos fisiológicos ou patológicos. Por exemplo, a análise quantitativa das AgNORs pode revelar a velocidade da proliferação celular ou a fração das células que entraram em ciclo celular [Lor98]. Toxinas podem influenciar a morfologia das AgNORs e conseqüentemente a análise das AgNORs pode revelar efeitos tóxicos.

Assim sendo, as ferramentas desenvolvidas neste trabalho podem constituir um conjunto para análise mais objetiva e detalhada com ampla aplicação nos campos da fisiologia, fisiopatologia e toxicologia.

Capítulo 5

Conclusão

Neste trabalho foram introduzidos novos parâmetros de forma que, considerando-se alguns testes preliminares, podem representar informações adicionais ao diagnóstico e prognóstico de vários tipos de neoplasias.

Como citado no capítulo 4, estes parâmetros podem ser aplicados em várias áreas, auxiliando na tentativa de análises mais precisas e menos subjetivas.

A segmentação que antecede o cálculo dos parâmetros das estruturas é realizada através de métodos semi-automáticos.

Aqui, a segmentação foi tratada em dois passos: a segmentação dos núcleos e das AgNORs.

Os núcleos foram segmentados normalmente por limiarização global dos níveis de cinza, auxiliada por um algoritmo simples de limiarização.

As AgNORs, em muitos casos, puderam ser segmentadas utilizando também a técnica de limiarização, sobre uma imagem contrastada da original, obtida do processo de simplificação da Árvore de Componentes. Em outros casos, o processo interativo de segmentação por atributos através da Árvore de Componentes fornece bons resultados.

Como resultado final, foi criado o sistema ImAgNOR que possibilita a aplicação das técnicas, aqui desenvolvidas, de forma amigável e transparente para o usuário final.

A possibilidade de aplicação destes parâmetros, em outras áreas, para compor um vetor discriminante, assim como a utilização da estrutura da Árvore de Componentes para extrair informações adicionais sobre as estruturas, constituem alguns exemplos de perspectivas futuras para este trabalho.

Melhorias no software ImAgNOR, a fim de elevar a interface a um grau amigável maior, como a automatização de alguns processos, também representam um bom ponto-de-partida para um trabalho posterior.

Concluindo, este trabalho disponibilizou técnicas, ainda não totalmente exploradas, para segmentação e extração de informações, para fins de análise, baseando-se em uma área específica – Patologia – mas deixando, entretanto, em aberto, a extensão de suas aplicações a outras áreas específicas.

Referências

- [Baa83] BAAK, J.P.A.; OORT J. *A Manual of Morphometry in Diagnostic Pathology*. Springer Verlag Berlin, 1983.
- [Bet97] BETAL, D.; ROBERTS, N.; WHITEHOUSE, G. H. *Segmentation and Numerical Analysis of Microcalcifications on Mamograms using Mathematical Morphology*. The British Journal of Radiology, vol. 70, pp. 903-917, September, 1997.
- [Beu92] BEUCHER, S.; MEYER, F. *The Morphological Approach to Segmentation: The watershed transform*. Mathematical Morphology in Image Processing, cap. 12, p. 433-481, Dogherty Ed., 1992.
- [Bru90] BRUGNEROTTO, Maria I. de B. *Análise Discriminante Baseada no Quociente das Matrizes de Correlações*. Tese de Mestrado. IMECC, UNICAMP, Dezembro 1990.
- [Cas79] CASTLEMAN, Kenneth R. *Digital Image Processing*. Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 1979.
- [Ebd98] EBDON, J. S. *Evaluation of Discriminant Analysis in Identification of Low- and High-Water Use Kentucky Bluegrass Cultivars*. Crop Science, vol. 38, pp.152-157, January-February, 1998.
- [Fis36] FISHER, R.A. *The Use of Multiple Measurements in Taxonomic problems*. Ann. Eugenics, vol 7, pp. 179-188, 1936.
- [Gon79] GONZALEZ, Rafael C. *Digital Image Processing*. Addison-Wesley Publishing Company, Inc., USA, 1979.

- [Gri92] GRIMAULD, M. *A New Measure of Contrast: the dynamics*. Proceedings of SPIE, Image Algebra and Morphological Image Processing III, v. 1769, p. 292-305, 1992.
- [Gro91] GROTTO, H.Z.W.; LORAND-METZE, I.; METZE, K.: *Nucleolar Organizer Regions in Normal Hematopoiesis. Relationship to Cellular Proliferation and Maturation*. Nouvelle Revue Française D' Hematologie 33 (1): 1 - 4, 1991
- [Gro93] GROTTO, H. Z. W.; METZE, K.; METZE, I. L. (1993) Pattern of Nucleolar Organizer Regions in Human Leukemic Cells. Analytical Cellular Pathology, 5:203-212.
- [Ham95] HAMILTON, P.W.; ALLEN CV (Eds) *Quantitative Clinical Pathology*. Blackwell Science Oxford, 1995.
- [Har87] HARALIK, Robert M.; STENBERG, Stanley R.; ZHUANG, Xinhua. *Image Analysis Using Mathematical Morphology*. IEEE Trans. Pattern Anal. Machine Intell., vol. PAMI-9, no. 4, pp 532-550, July 1987.
- [Jon97a] JONES, Ronald. *Component Trees for Image Filtering and Segmentation*. Proceedings of IEEE Workshop on Nonlinear Image and Signal Processing, Mackinac Island, September, 1997.
- [Jon97b] JONES, Ronald. *Attribute Signatures for Connected Filtering and Segmentation*. CSIRO, Mathematical and Information Sciences. Australia, 1997.
- [Lac68] LACHENBRUCH, P.A.; MICKEY, M.R. *Estimation of Error Rates in Discriminant Analysis*. Technometrics, vol 10(1), pp. 1-11.
- [Lor96] LORAND-METZE, I.; METZE, K. *Agnor Clusters as a Cell Kinetic Parameter in Chronic Lymphocytic Leukemia* . Journal of Clinical Pathology : Molecular Pathology 49 (6) 357 - 360 , 1996
- [Lor98] LORAND-METZE, I.; CARVALHO, M.A.; METZE, K. *Relationship Between Morphologic Analysis of Nucleolar Organizer Regions and Cell Proliferation in Acute Leukemia*. Cytometry , 1998 . 32 (1) : 51 - 56 , 1998

- [Mar94] MARCHEVSKY, Am; BARTELS, PH. *Image Analysis . A Primer for Pathologists*. Raven Press New York, 1994.
- [Met93] METZE, K.; LORAND-METZE, I. *Interpretation of the Agnor Pattern in Heamatologic Cytology*. *Acta Haematol* 89 (2) : 110 - 111, 1993 (correspondence),
- [Met95] METZE, K.; METZE, I. Lorand; GILBERTI, M. F. P. *Changes of Nucleolar Organizer Regions in Granulopoietic Precursors During the Course os Chronic Myeloid Leukemia*. *Ana Hematol* 71:275-279. 1995.
- [Met96] METZE, K.; METZE, I. Lorand. *AgNOR Clusters as a Parameter of Cell Kinetics in Chronic Lymphocytic Leukaemia*. *Journal of Clin. Pathology*, 49: M1-M5. 1996.
- [Met98] METZE, K.; NEDER, F. *Developmental Agnor Changes in Rat Cardiomyocytes*. *European Journal of Histochemistry* 42 (suppl 1), pag 22, 1998.
- [Met99a] METZE, K.; CHIARI, AC, ANDRADE FL, LORAND-METZE I. *Changes in AgNOR configuration during the evolution and treatment of chronic lymphocytic leukemia*. *Hematol Cell Ther* 41 : 1-8, 1999.
- [Met99b] METZE, K.; LORAND-METZE, I. *Methods for analyzing AgNORs (letter)* . *Journal of Clinical Pathology*, 52 : 550, 1999.
- [Met99c] METZE, K.; LORAND-METZE, I. *Age related decrease of AgNOR activity in acute and chronic lymphocytic leukemias*. *Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology* 52(1) : 52 (letter) , 1999.
- [Met99d] METZE, K.; TREVISAN, M. *The use of epithelila membrane antigen and silver-stained nucleolar organizer regions testing in the differential diagnosis of mesothelioma form benign reactive mesothelioses (letter)* . *Cancer*, 85 (1), 250, 1999.
- [Pit92] PITAS, I.; SIDIROPOULOS, N. D. *Pattern Recognition of Binary Image Objects Using Morphological Shape Decomposition*. *Computer Vision and Image Processing*, pp. 279-305, 1992.

- [Rus95] RUSS, J. C. *The Image Processing Handbook*. CRC Press, Inc., 2nd edition, USA, 1995.
- [Sch97] SCHENCK, U.; JUTTING, U.; RODENACKER, K. *Modeling, Definition and Applications of Histogram Based on DNA Values Weighed by Sine Functions*. Analytical and Quantitative Cytology and Histology. February, 1997.
- [Ser82] SERRA, Jean. *Image Analysis and Mathematical Morphology*. Academic Press, Inc., Orlando, Florida, 1982.
- [Ser92] SERRA, Jean. *Image Analysis and Mathematical Morphology*. Volume 2: Theoretical Advances. Academic Press, Inc., Orlando, Florida, 1992.
- [Vac95] VACHIER, C. *Extraction de Caractéristiques, Segmentation D'Image et Morphologie Mathématique*. These de Doctorat. CMM-ENSMP, Fontainebleau, December 1995.
- [Zab95] ZABRODSKY, H.; PELEG, S.; AVNIR, D. *Symmetry as a Continuous Feature*. IEEE Trans. Pattern Anal. Machine Intell., vol. 17, no. 12, pp 1154-1165, December 1995.
- [Zim97] ZIMMER, Y.; TEPPER, R.; AKSELROD, S. *An Improved Method to Compute the Convex Hull of a Shape in a Binary Image*. Pattern Recognition, vol. 30, no. 3, pp. 397-402, 1997.