

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INFORMÁTICA

THALLYS PEREIRA DE ALMEIDA

**SEGMENTAÇÃO DE IMAGENS DE ENXERTOS ÓSSEOS
UTILIZANDO WATERSHED E K-MÉDIAS**

João Pessoa, 2011

THALLYS PEREIRA DE ALMEIDA

**SEGMENTAÇÃO DE IMAGENS DE ENXERTOS ÓSSEOS
UTILIZANDO WATERSHED E K-MÉDIAS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Informática, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Informática.

Área de concentração: Sinais, Sistemas Digitais e Gráficos (Processamento Digital de Imagens).

ORIENTADOR: Prof. Dr. Leonardo Vidal Batista

João Pessoa, 2011

*A447s Almeida, Thallys Pereira de.
Segmentação de imagens de enxertos ósseos utilizando watershed e k-médias / Thallys Pereira de Almeida.-- João Pessoa, 2011.
62f. : il.
Orientador: Leonardo Vidal Batista
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCEN
1. Informática. 2. Processamento Digital de Imagens.
2. Biomateriais. 3. Segmentação. 4. Watershed. 5. K-médias.*

UFPB/BC

CDU: 004(043)

1
2

Ata da Sessão Pública de Defesa de Dissertação de Mestrado de Thallys Pereira de Almeida, candidato ao Título de Mestre em Informática na Área de Sistemas de Computação, realizada em 20 de setembro de 2011.

3
4

5 Aos vinte dias do mês de setembro do ano dois mil e onze, às dez horas, no Auditório do
6 CCEN - da Universidade Federal da Paraíba, reuniram-se os membros da Banca
7 Examinadora constituída para examinar o candidato ao grau de Mestre em Informática, na
8 área de “*Sistemas de Computação*”, na linha de pesquisa “*Sinais, Sistemas Digitais e*
9 *Gráficos*”, o Sr. Thallys Pereira de Almeida. A comissão examinadora foi composta pelos
10 professores doutores: Leonardo Vidal Batista (DI-UFPB), Orientador e Presidente da Banca
11 Examinadora, Natasha Correia Queiroz Lino (DI-UFPB) e Francisco Limeira Júnior
12 (PPGO-UFPB), como examinadores internos e George Darmiton da Cunha Cavalcanti
13 (UFPE), como examinador externo. Dando início aos trabalhos, o Prof. Leonardo Vidal
14 Batista, cumprimentou os presentes, comunicou aos mesmos a finalidade da reunião e
15 passou a palavra ao candidato para que o mesmo fizesse, oralmente, a exposição do
16 trabalho de dissertação intitulado “*SEGMENTAÇÃO DE IMAGENS DE ENXERTOS*
17 *ÓSSEOS UTILIZANDO WATERSHED E K-MÉDIAS*”. Concluída a exposição, o candidato
18 foi argüido pela Banca Examinadora que emitiu o seguinte parecer: “*aprovado*”. Assim
19 sendo, deve a Universidade Federal da Paraíba expedir o respectivo diploma de Mestre em
20 Informática na forma da lei e, para constar, eu, professora Tatiana Aires Tavares,
21 Coordenadora deste Programa, servindo de secretária lavrei a presente ata que vai
22 assinada por mim mesmo e pelos membros da Banca Examinadora. João Pessoa, 20 de
23 setembro de 2011.

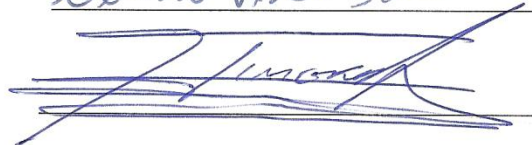
24
25


Tatiana Aires Tavares

Prof. Dr. Leonardo Vidal Batista
Orientador (DI-UFPB)



Prof. Dr. Francisco Limeira Júnior
Examinador Interno (PPGO-UFPB)



Profa. Dra. Natasha Correia Queiroz Lino
Examinadora Interna (DI-UFPB)



Prof. Dr. George Darmiton da Cunha
Cavalcanti
Examinador Externo (UFPE)



26

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, por ter me concedido o dom da vida, a sabedoria e a inspiração necessários para a realização deste trabalho.

À minha família, pelo apoio, paciência e compreensão em todos os momentos em que este trabalho estava sendo desenvolvido. Aos meus pais e ao meu irmão, que sempre me deram força nos momentos em que eu mais precisei.

Ao meu orientador, Professor Leonardo Vidal Batista, pela paciência, amizade, confiança, por ter acreditado em mim e ter me orientado por todos esses anos de pesquisa desde o meu ingresso no Programa de Educação Tutorial (PET), no início da minha graduação. E também por ter se tornado para mim um referencial de pesquisador.

Ao Professor Francisco de Assis Limeira Júnior, pela colaboração na avaliação das imagens e nas dicas do que poderia ser melhorado. E aos seus orientandos: Andréa Queiroga, Álvaro Cardoso e Lílian Paz, que forneceram as imagens dos enxertos ósseos.

Ao amigo Jonathas Barbosa, que iniciou esta pesquisa e me indicou os passos para que eu pudesse continuá-la.

Aos amigos, pelo incentivo e apoio durante todo o tempo do mestrado. Em especial os integrantes do Programa de Educação Tutorial (PET) e do grupo de pesquisa do Professor Leonardo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Informática da UFPB, o PPGI, seus professores e funcionários.

RESUMO

A aplicação de enxertos ósseos na recuperação de tecidos ósseos é uma área que vem sendo bastante estudada e está em constante evolução. Nos últimos anos, diversas técnicas de aplicação desses enxertos vêm sendo desenvolvidas. Com isso, surge a necessidade da criação de um método de análise automático, objetivo, imparcial e eficiente de avaliação dos resultados dessas técnicas. Diversas pesquisas utilizando segmentação de imagens vêm sendo realizadas nas mais diversas áreas. Entre elas, podemos citar a área médica, onde as segmentações podem ser aplicadas para delimitar na imagem regiões como tumores, células, glândulas, órgãos, tecidos celulares, entre outros. Diversos métodos de segmentação podem ser desenvolvidos especificamente para delimitar cada um desses elementos. Segmentações dessa natureza eram realizadas tradicionalmente de forma manual, ou então, tentava-se detectar os objetos na imagem de forma meramente visual, sem nenhum dado numérico que pudesse avaliar de forma precisa o tamanho ou as demais propriedades de estudo na imagem. Avaliações desse tipo acabam ficando sujeitas à interpretação de cada pesquisador, podendo trazer resultados imparciais e tendenciosos. Dessa forma, a utilização de um método computacional torna-se essencial para a realização deste tipo de análise. O presente trabalho apresenta um método de avaliação morfométrica para análise da neoformação óssea sobre enxertos ósseos aplicados a cobaias que receberam implantes de biomateriais. A técnica emprega a combinação entre os algoritmos de segmentação *k*-médias e *watershed* a fim de realizar uma segmentação baseada na cor representada pelo sistema $L^*a^*b^*$. Para identificar a região que corresponde à neoformação óssea, foi realizada uma análise através do sistema de cores HSL. Diversos experimentos foram realizados com um grande número de imagens e foram obtidos resultados satisfatórios. O desempenho do método de segmentação sobre imagens de ossos de roedores foi bem avaliado por especialistas, que consideraram o processo eficiente e os resultados compatíveis aos obtidos por especialistas na área.

Palavras-chave: Processamento Digital de Imagens, Biomateriais, Segmentação, Watershed , K-médias.

ABSTRACT

The applicability of bone grafts in the recovery of bone tissue is an area that has been extensively studied and is constantly evolving. In the last years, several techniques for applying these grafts have been developed. Thus, there is a need of creating an automated method of analysis, objective, impartial and efficient evaluation of the results of these techniques. Several studies using image segmentation have been conducted in several areas. Among them we can cite the medical field, where the segmentation can be applied to define the image regions such as tumors, cells, glands, organs, tissue, cells, among others. Several segmentation methods were developed specifically to detect each one of these elements. Segmentations like these were traditionally performed manually. In some cases, the objects in an image were detected of a purely visual method, and no numerical data could accurately determinate the size or other properties of the picture. Evaluations like this become subjective to the interpretation of each researcher, and could bring impartial and unbiased results. Thus, the use of a computational method for carrying out this type of analysis is essential. This work presents a morphometric analysis method of the bone formation on bone grafts applied to mice that received implants of biomaterials. The technique employs a combination of segmentation algorithms k-means, and watershed in order to perform a segmentation based on the color represented by the $L^*a^*b^*$. For identification of the region that corresponds to new bone formation, an analysis was performed using the HSL color system. Several experiments were performed with a large number of images and satisfactory results were obtained. The performance of the segmentation method on images of bones of rodents has been thoroughly evaluated by researches, who considered the process efficient and compatible with results obtained by experts.

Keywords: Digital Image Processing, Biomaterials, Segmentation, K-means, Watershed.

SUMÁRIO

Índice de Figuras	v
Índice de Tabelas	vi
Índice de Equações	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Motivação	4
1.2. Objetivos	5
1.3. Trabalhos relacionados	5
1.4. Organização da Dissertação.....	7
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	8
2.1. Reparação Óssea.....	8
2.2. Enxertos ósseos	10
2.3. Sistema de cores	11
2.3.1. Sistema $L^*a^*b^*$	11
2.3.2. Sistema HSL.....	13
2.4. Gradiente de Canny	14
2.5. Watershed.....	17
2.6. K-médias	20
2.7. Método de Otsu	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Aplicação do enxerto	24
3.2. O método de segmentação proposto	25
3.2.1. Mudança no espaço de cores	26
3.2.2. Segmentação Inicial.....	27
3.2.3. Agrupamento	28
3.2.4. Escolha da classe	30
3.2.5. Binarização.....	31
3.2.6. Contagem dos <i>pixels</i> e estimativa de área	31
3.2.7. Cálculo da área real	33
3.3. Imagens utilizadas	33
3.4. Métrica utilizada para avaliação da segmentação.....	34
3.5. Implementação	35
4. RESULTADOS.....	37
4.1. Seleção da classe correta	37
4.1. Segmentação com seis classes	40
4.2. Segmentação com três classes	43
4.3. Segmentação sem a etapa do <i>watershed</i>	46
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	47
5.1. Trabalhos Futuros	49
6. REFERÊNCIAS	50

Índice de Figuras

Figura 1: Imagens das estruturas ósseas [CEZAR, 2002]	9
Figura 2: As três bandas do sistema $L^*a^*b^*$	12
Figura 3: Modelo cônico do Sistema HSL	13
Figura 4: Imagem inicial. [GONZALEZ, 2001b].....	18
Figura 5: Superfície topográfica [GONZALEZ, 2001b]	18
Figura 6: Linhas de <i>watershed</i> em vermelho [GONZALEZ, 2001b].....	19
Figura 7: Divisão dos grupos com base na posição dos centróides.	21
Figura 8: O ponto médio de cada região é recalculado e o centróide é movido.	21
Figura 9: Etapas da iteração do algoritmo K-médias.....	21
Figura 10: Esquema do método de segmentação proposto.....	26
Figura 11: Enxerto ósseo com 15 dias de maturação usando o corante Picro-sírius.	37
Figura 12: Microfotografia da escala.....	38
Figura 13: Classe 1 da Figura 11	39
Figura 14: Classe 2 da Figura 11	39
Figura 15: Classe 3 da Figura 11	39
Figura 16: Classe 4 da Figura 11	39
Figura 17: Classe 5 da Figura 11	39
Figura 18: Classe 6 da Figura 11	39
Figura 19: Enxerto ósseo com 15 dias de maturação usando o corante Picro-sírius.	40
Figura 20: Classe referente à neoformação óssea após a segmentação em seis classes da Figura 19.	40
Figura 21: Enxerto ósseo com 15 dias de maturação usando o corante Picro-sírius em parafina.....	41
Figura 22: Classe referente à neoformação óssea após a segmentação em seis classes da Figura 21.	41
Figura 23: Enxerto ósseo com 30 dias de maturação usando o corante Picro-sírius em parafina.....	41
Figura 24: Classe referente à neoformação óssea após a segmentação em seis classes da Figura 23.	41
Figura 25: Enxerto ósseo com 30 dias de maturação usando o corante Picro-sírius em parafina.....	42
Figura 26: Classe referente à neoformação óssea após a segmentação em seis classes da Figura 25.	42
Figura 27: Enxerto ósseo com 45 dias de maturação usando o corante Picro-sírius em parafina.....	42
Figura 28: Classe referente à neoformação óssea após a segmentação em seis classes da Figura 27.	42
Figura 29: Enxerto ósseo usando o corante Picro-sírius.....	43
Figura 30: Classe referente à neoformação óssea após a segmentação em três classes da Figura 29.....	43
Figura 31: Enxerto ósseo com 30 dias de maturação usando o corante Picro-sírius.	44
Figura 32: Classe referente à neoformação óssea após a segmentação em três classes da Figura 31.....	44
Figura 33: Classe (sem aplicação do <i>watershed</i>) correspondente à Figura 31.	46
Figura 34: Classe (com a aplicação do <i>watershed</i>) correspondente à Figura 31.	46

Índice de Tabelas

Tabela 1: Fator μ_k em cada classe	39
Tabela 2: Tempo de processamento.	44
Tabela 3: Área calculada de cada região.	45
Tabela 4: Percentagem de pixels classificados corretamente.	45

Índice de Equações

Equação 1: Conversão do RGB para o CIE 1931 XYZ.....	12
Equação 2: Cálculo da banda L*, a partir do sistema CIE XYZ	13
Equação 3: Cálculo da banda a*, a partir do sistema CIE XYZ	13
Equação 4: Cálculo da banda b*, a partir do sistema CIE XYZ.....	13
Equação 5: Distribuição de Gauss	15
Equação 6: Distribuição de Gauss em duas dimensões	15
Equação 7: Filtro gaussiano 5x5, com desvio-padrão $\sigma = 1,4$	16
Equação 8: Detecção de bordas na vertical	16
Equação 9: Detecção de bordas na horizontal	16
Equação 10: Intensidade do gradiente de Canny	17
Equação 11: Direção do gradiente de Canny.....	17
Equação 12: Função quadrada de erro.....	20
Equação 13: Cálculo do ponto-médio μ_j	20
Equação 14: Cálculo da variação entre as duas classes	22
Equação 15: Cálculo do grau de matiz e saturação da imagem	30
Equação 16: Cálculo da distância real	33
Equação 17: Cálculo da percentagem de <i>pixels</i> classificados corretamente.....	35

1. INTRODUÇÃO

A ciência de biomateriais é a área de estudo que compreende a interação de materiais, naturais ou artificiais, com os sistemas biológicos. Nas últimas décadas, os biomateriais passaram a ser amplamente utilizados em diversas áreas da saúde, principalmente na medicina, odontologia e biotecnologia [RATNER, 2004]. Sua principal finalidade é possibilitar a recuperação ou o aperfeiçoamento de alguma função natural executada por algum órgão ou tecido celular. Alguns dos mais conhecidos exemplos de biomateriais são próteses dentárias, marcapassos, válvulas cardíacas, lentes de contato e implantes.

No estudo dos biomateriais, destaca-se o emprego de enxertos ósseos, onde o especialista retira material ósseo de um doador para aplicá-lo em algum outro local do paciente. Esse procedimento é utilizado para acelerar o processo de regeneração do tecido ósseo que foi desgastado ou sofreu alguma perda estrutural.

O osso que recebe a aplicação do enxerto é regenerado dentro de algumas semanas ou meses. Durante esse tempo, surge um novo tecido ósseo no organismo do paciente em volta do material transplantado que dará sustentação a esse material.

A utilização de biomateriais em clínicas odontológicas foi uma das áreas da ciência que obtiveram um extraordinário desenvolvimento nos últimos anos e que, alicerçada em base científica forte, vem crescendo a cada dia. Os biomateriais disponíveis representam um instrumento auxiliar poderoso para aqueles profissionais que atuam cirurgicamente em nível do tecido ósseo nas áreas de Cirurgia Bucomaxilofacial, Cirurgia Ortognática, Periodontia, Cirurgia Paraendodôntica, Implantodontia e Cirurgia Plástica Corretiva [TAGA, 1996].

A utilização de enxertos na reconstrução de defeitos ósseos de diversas etiologias também é relatada por vários autores [QUEIROGA, 2008], [ANDEREGG, 1991], [BECKER, 1995], [DUALIBI, 1993], [KELLY, 2001], [LIMEIRA JUNIOR, 2003a], [LIMEIRA JUNIOR, 2003b], [LOCKHART, 2001], [RABIE, 2000], [RIOS, 1996].

Para que um pesquisador da área de saúde possa verificar o sucesso da sua técnica de enxerto ósseo, ele precisa fazer uma análise da região onde ocorreu a

neoformação óssea. Esta análise é realizada através de um estudo morfológico do tecido ósseo para que se possa identificar e analisar de forma isolada a região de interesse. Em seguida, deve ser realizada uma análise morfométrica, para que se possa quantificar a neoformação óssea, mensurando a região que foi regenerada [LIMEIRA JUNIOR, 2003b]. A partir daí, pode-se verificar se o enxerto atuou da forma como era esperada.

Uma das principais dificuldades encontradas nessa análise é delimitar a região que foi regenerada. A análise, que até então é realizada de forma subjetiva pelo pesquisador, permite que ocorram múltiplas conclusões sobre um mesmo resultado, já que depende da observação de cada examinador. É possível até que sejam criados resultados tendenciosos para beneficiar uma pesquisa. Para evitar elementos de subjetividade como estes, é necessário um tratamento objetivo para que se possa chegar aos resultados de forma imparcial.

Mesmo em caso de examinadores bem intencionados, procedimentos de forma manual permitem que as segmentações fiquem sujeitas também a erros, já que características humanas como coordenação motora, percepção, paciência e nível de conhecimento histológico sofrerão impacto na análise. Às vezes até alguns pequenos detalhes passam despercebidos durante a análise humana.

Outra grande desvantagem do método manual é que este, além de ser um trabalho enfadonho, certamente leva um grande tempo para ser realizado. Na maioria dos experimentos envolvendo enxertos ósseos, é preciso realizar testes com um grande número de cobaias, ocupando uma parcela de tempo significativa durante a pesquisa.

Todas essas características podem comprometer gravemente uma análise morfológica. Por isso, o método de avaliação dos efeitos dos enxertos ósseos mais indicado é a análise das imagens por algum sistema computacional.

Em processamento digital de imagens, a operação de segmentação consiste em delimitar as regiões constituintes de uma imagem, de acordo com certos critérios de similaridade. A segmentação é um passo fundamental para a análise detalhada de imagens por seres humanos ou computadores. Este procedimento possibilita o uso de modelos matemáticos na descrição, análise e classificação das estruturas de interesse na imagem.

Existem diversos métodos de segmentação, que podem ser agrupados em métodos supervisionados e métodos não-supervisionados. Os métodos supervisionados exigem que se tenha um conhecimento prévio do que se deseja segmentar para que o algoritmo possa ser treinado para resolver aquele dado problema. O método não-supervisionado, não requer nenhuma informação anterior. Nele, os pixels são agrupados de acordo com medidas de semelhança.

Entre os principais algoritmos de segmentação, podem-se citar, como exemplo, os métodos baseados em limiarização, redes neurais, métodos estatísticos, crescimento de regiões e os algoritmos de agrupamento.

Nos métodos de limiarização, também conhecido como *thresholding*, é calculado um valor que servirá como limite entre as duas regiões que se queira separar. Se o valor do pixel for maior do que este limite, o pixel será classificado numa região. Caso contrário, ele será atribuído à outra região. Este valor também pode ser adaptativo, podendo ser calculado dependendo da sua posição na imagem. Este método apresenta melhores resultados em segmentações onde é necessário separar apenas regiões claras e escuras, ou realizar alguma separação simples entre a imagem e o fundo, usando o valor de uma ou mais cores específicas.

Nos métodos utilizando redes neurais artificiais [ZHANG, 2010], a segmentação é realizada de forma semelhante ao aprendizado feito por um cérebro humano. O sistema irá adquirir conhecimento conforme o seu aprendizado. Para isto, é necessária uma etapa inicial de treinamento para que se possam formar as sinapses na rede neural. Algumas implementações deste método podem exigir maior quantidade de processamento e de armazenamento caso o número de camadas e de neurônios seja muito elevado.

Os métodos estatísticos utilizam-se das teorias probabilísticas para classificar os pixels da imagem. Pode ser verificada, por exemplo, a frequência de ocorrência de um dado pixel na imagem, ou pode-se utilizar mineração de dados para obter informações que podem servir de auxílio ao algoritmo durante as tomadas de decisão. Algumas implementações de métodos estatísticos podem requerer uma etapa de treinamento, em que se efetua uma análise prévia de um conjunto de imagens para que sirva de auxílio para as próximas segmentações.

Nos métodos de crescimento de regiões, são selecionados pontos iniciais na imagem conforme algum critério pré-determinado e estes pontos vão sendo ligados com os seus vizinhos, conforme uma análise da sua vizinhança. As ligações vão sendo feitas seguindo alguma heurística até formar a região segmentada.

O algoritmo *watershed* é um caso particular do método de crescimento de regiões, onde os pontos iniciais são (de acordo com a terminologia adotada na literatura) os *vales das bacias hidrográficas*, e o crescimento é feito de modo semelhante a uma inundação em uma área cercada por barragens. Este algoritmo é descrito de forma mais detalhada na seção 2.5.

Dentre os métodos de agrupamento pode-se destacar o k-médias, onde as regiões são inicialmente divididas de forma arbitrária e, em seguida, são realizadas diversas iterações, em que os pixels são reagrupados seguindo algum critério de similaridade até que se verifique algum critério de convergência. O k-médias é descrito em maiores detalhes na seção 2.6.

1.1. Motivação

Até então a segmentação dessas imagens ósseas era realizada de forma manual pelos professores do Departamento de Morfologia da Universidade Federal da Paraíba. Os pesquisadores utilizavam o *mouse* para delimitar os contornos da região de interesse para que outro *software* pudesse realizar o cálculo da área da região óssea.

Para fins de pesquisa, quando se estuda o efeito de determinada variável do ponto de vista histológico, a segmentação automática por computador permite uma análise mais precisa, já que minimiza os problemas existentes na delimitação manual da imagem. Dessa forma, acaba reduzindo muitos erros de avaliação.

Segmentação de imagens com a presença de vários elementos com texturas diferentes, como esta, é uma das mais difíceis tarefas em processamento de imagens. O nível de exatidão da segmentação determina um eventual sucesso ou falha dos procedimentos da análise computacional.

1.2. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é investigar a aplicabilidade da segmentação computacional em imagens histológicas e desenvolver um método para visualizar e calcular a área da neoformação óssea em cobaias que sofreram algum tipo de desgaste em seu material ósseo. Mais especificamente, a segmentação deve ser realizada em um tempo aceitável e deve ser comparável à de um profissional para que este método venha mesmo a substituir a segmentação manual que é realizada atualmente.

Para atingir esse objetivo geral, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Desenvolvimento de um método computacional para efetuar a segmentação de imagens de enxertos ósseos para selecionar a região que representa a neoformação óssea;
- Investigar a aplicabilidade dos algoritmos k-médias e *watershed* ao desenvolvimento desse novo método de segmentação;
- Investigar a aplicabilidade do sistema de cores HSL para a identificação da região de interesse após a etapa de segmentação;
- Testar a empregabilidade do método em diversas imagens para avaliar o potencial do segmentador.

1.3. Trabalhos relacionados

Diversos métodos de segmentação de imagens histológicas foram desenvolvidos nos últimos anos [WANG, 2007], [ANTA, 2007], [WIEGELL, 2003], [PETUSHI, 2005], [FERNANDEZ-GONZALEZ, 2005].

O método de segmentação de Wiegell (2003) é usado em imagens de ressonância magnética cerebral para delimitar a região central do tálamo no encéfalo. O algoritmo k-médias é aplicado em imagens de várias fatias contíguas obtidas através da ressonância. O número de classes do k-médias foi definido de forma empírica como sendo igual a 14. Este método exige uma delimitação prévia de algumas partes definidas do tálamo para que o algoritmo possa delimitar a região central. Os resultados foram

satisfatórios, comparáveis aos de outras pesquisas que também envolvem a segmentação de tálamo cerebral. Por outro lado, este método é vulnerável a resultados imprecisos caso alguma característica da glândula, como posição e formato, apresentem uma discrepância muito alta em relação aos valores de uma glândula normal. Dessa forma, este segmentador não seria útil, por exemplo, em casos onde fosse necessário segmentar um conjunto de tálamos de pacientes que apresentassem alguma anormalidade. Isso acaba limitando o potencial do segmentador.

Já em [PETUSHI, 2004], é usado um método supervisionado. Algumas imagens são usadas para o treinamento e a informação extraída desse conjunto de imagens é organizada na forma de uma árvore binária para serem posteriormente analisados e comparados durante a etapa de segmentação. O algoritmo encontra valores ótimos de *threshold* a partir do histograma da imagem e das comparações com as imagens previamente analisadas. Este método foi testado para segmentar os diferentes tipos de tecido celular, atingindo a taxa de 89% de acerto. Sem a presença da etapa de treinamento, com a mera análise do histograma, a margem de acerto cai para 54%. Esta pesquisa apresentou bons resultados, mas ainda tem a limitação de conseguir boas taxas de acerto exclusivamente com a presença de um banco de imagens previamente segmentadas, para que possa ser comparado com as novas imagens fornecidas. Isso faz com que os resultados fiquem dependendo da qualidade do banco de imagens utilizado.

No método de [FERNANDEZ-GONZALEZ, 2004], são utilizados os algoritmos Fast-Marching e, em seguida, o resultado produzido é refinado utilizando o algoritmo Level-Set para segmentar as estruturas histológicas do tecido mamário. Para a realização da segmentação são utilizadas várias imagens de seções transversais da mama. Este método apresentou excelentes resultados. No entanto, é exigido grande processamento computacional para a execução da segmentação, o que acaba restringindo o potencial do segmentador a imagens de pequeno tamanho e com baixa resolução. Segmentações de estruturas mais complexas exigem ainda mais do sistema, o que pode deixar ainda mais lenta a execução do algoritmo.

Em [WANG, 2007], é investigado um método de segmentação de tecido epitelial escamoso nas vértebras da coluna cervical. Este método utiliza uma segmentação baseada na textura, realizada com o auxílio de uma transformada *wavelet* bidimensional. Os testes foram realizados com 20 amostras, sendo possível obter um

ótimo resultado. Durante os experimentos, chegou-se a alcançar até 96% de acerto dentro da área correspondente ao tecido epitelial escamoso. Mesmo com imagens maiores e contendo estruturas mais complexas, ainda foi possível manter a precisão do segmentador. Mas, em alguns casos, o segmentador apresentou problemas de super-segmentação.

Já em [ANTA, 2007], é usado um algoritmo de crescimento de regiões a partir de *thresholds* automaticamente calculados a partir de uma análise da imagem. Este método foi testado para delimitar ovócitos em imagens histológicas de peixe. O experimento foi realizado com oito imagens, cada uma contendo dezenas de ovócitos. A partir da análise dos resultados, pode-se perceber uma boa taxa de acertos na delimitação da região de cada ovócito, que ficou em torno de 82% da área correta. Mas essa taxa não foi tão boa quanto [PETUSHI, 2004] e [WANG, 2007]. Por outro lado, apresentou uma vantagem sobre este último em produzir um número muito pequeno de casos com super-segmentação.

1.4. Organização da Dissertação

Esta dissertação está organizada em seis capítulos. Os tópicos a serem abordados em cada um dos capítulos estão organizados da seguinte forma: Neste primeiro capítulo é apresentada uma breve descrição do problema abordado, a motivação para a realização deste trabalho, os objetivos específicos necessários para alcançar o objetivo geral, e os principais trabalhos relacionados ao tema desta dissertação. O Capítulo 2 apresenta a fundamentação teórica, onde são abordados os principais assuntos que foram utilizados neste trabalho. O Capítulo 3 descreve a metodologia empregada na obtenção das imagens dos enxertos ósseos e no processo de realização das segmentações. O Capítulo 4 apresenta os resultados obtidos neste trabalho. O Capítulo 5 apresenta a conclusão, discute os resultados obtidos e propõe trabalhos futuros. Por fim, no Capítulo 6, é apresentada a bibliografia utilizada nesta dissertação.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Ao longo desta dissertação serão utilizados conceitos fundamentais de Reparação Óssea, Sistemas de Cores e Segmentação de Imagens. Esses conceitos são explicados neste capítulo.

2.1. Reparação Óssea

Reparação óssea é a capacidade que o tecido ósseo possui de repor as suas estruturas lesadas. Um tecido lesado pode ser reparado de duas formas distintas: regeneração e cicatrização. Regeneração é a reposição das estruturas lesadas por células com funcionalidades morfológicas semelhante às que existiam anteriormente. Já no processo de cicatrização, ocorre a reposição das estruturas lesadas por um tecido conjuntivo fibroso, conhecido como tecido cicatricial. [JUNQUEIRA, 1999] [SCHENK, 1996]

O tecido ósseo possui um enorme potencial de regeneração. Tanto na recuperação da sua estrutura original, quanto nas suas propriedades mecânicas. Porém, alguns fatores podem impedir ou dificultar o processo de recuperação óssea [ALMEIDA, 2006]:

- Falha de vascularização;
- Instabilidade mecânica;
- Defeito crítico;
- Infecções.

Quando o tecido ósseo é lesado, ocorre o rompimento de algumas estruturas presentes no osso, como a medula e o periósteo, este último é uma membrana bastante vascularizada que envolve o osso. Com isso, ocorre um sangramento originado a partir das margens do tecido ósseo lesado e dos tecidos moles vizinhos, formando um hematoma ou um coágulo sanguíneo.

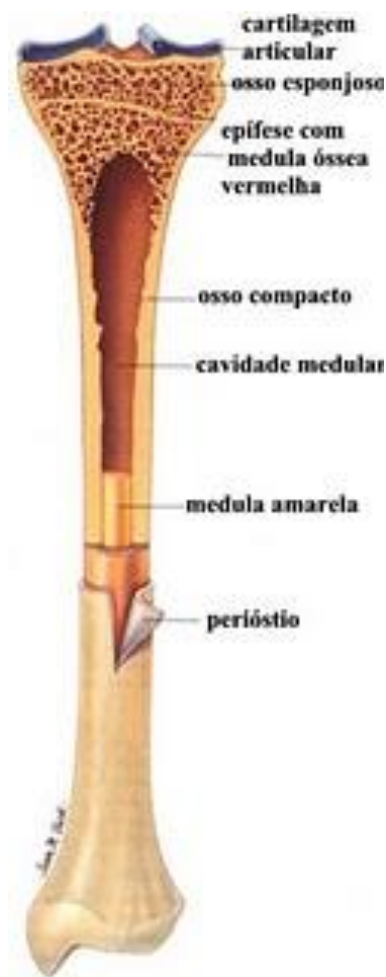


Figura 1: Imagens das estruturas ósseas [CEZAR, 2002]

Enquanto ocorre o coágulo, o tecido imediatamente vizinho à fratura estimula uma resposta inflamatória caracterizada por vasodilatação e deposição de leucócitos e plasma.

Por volta do terceiro ao quinto dia, o perióstio apresenta uma intensa proliferação de células osteoprogenitoras, que são as células responsáveis pela síntese de componentes orgânicos como o colágeno e as glicoproteínas adesivas, que irão preencher a lacuna aberta pela fratura.

Após algum tempo, esse processo evolui e aparece o calo ósseo, no qual é constituído de tecido ósseo imaturo, que se formou de maneira desordenada pelas fibras colágenas. Em seguida, ocorre a remodelação óssea, no qual o calo é naturalmente reabsorvido pelo organismo. [ANDIA, 2006]

Pode-se então resumir o processo de reparação óssea em quatro etapas:

- Inflamação;
- Calo ósseo imaturo;
- Calo ósseo duro;
- Remodelação.

2.2. Enxertos ósseos

Perdas ósseas significativas podem ocorrer por diversos motivos: acidentes, perdas dentárias, patologias ou tumores. Dependendo da gravidade dessa perda óssea, o organismo consegue regenerar este tecido ósseo. No entanto, em defeitos ósseos extensos, o organismo consegue recuperar apenas uma parte do tecido afetado. Ao longo dos últimos anos, foram desenvolvidas várias técnicas para o tratamento desses defeitos utilizando enxertos com materiais biológicos ou sintéticos.

Os critérios para a seleção dos materiais para enxerto é determinado de acordo com as características próprias de cada tipo de osso. Dentre os materiais para a realização do enxerto, incluem-se:

- Enxerto autógeno: Pode ser obtido a partir de áreas como o osso ilíaco (bacia), a calota craniana ou a mandíbula. O osso autógeno é o que apresenta o padrão mais próximo do ideal para a reconstrução de defeitos ósseos [BECKTOR, 2008];
- Enxerto alógeno: É um tecido ósseo transplantado de um doador da mesma espécie. O substrato orgânico transferido contém as proteínas e minerais que atuarão posteriormente na formação do novo tecido ósseo;
- Enxerto aloplástico: São as cerâmicas biocompatíveis com o tecido hospedeiro. Podendo ser de diversos materiais de origem mineral inorgânica;
- Enxerto xenógeno: São obtidos a partir de animais e passam por um processo químico onde é eliminado todo o material orgânico ou inorgânico, dependendo do método utilizado, restando apenas a porção que atuará na recuperação óssea.

2.3. Sistema de cores

O sistema de cores é um modelo matemático abstrato que define um conjunto de atributos que identificam de forma única a cor. Cada sistema de cor deve possuir um sistema de coordenadas (ou componentes) que delimitará um espaço que contém um conjunto de todas as cores possíveis de representar nesse determinado sistema. Cada cor será representada por um único ponto nesse espaço. Dessa forma, é possível utilizar recursos matemáticos para visualizar, medir e efetuar operações com as cores.

Existe uma variedade de sistemas de cores, onde cada um pode ser mais apropriado para certos propósitos do que outros. A escolha do espaço de cores é fundamental para o desempenho de um sistema de detecção ou segmentação.

2.3.1. Sistema L*a*b*

O sistema mais comum de representação de cores é o RGB. Neste sistema, cada ponto da imagem está representado por três valores correspondentes a cada uma das bandas de cor básica da luz (vermelho, verde e azul).

O sistema RGB é ideal para ser utilizado por aparelhos eletrônicos, já que a luz visível pode ser decomposta em suas três componentes básicas, e recombinadas através de um processo inverso. Além disso, essas mesmas componentes possuem faixas de frequência bem distintas, o que permite ao dispositivo eletrônico de captura identificar facilmente uma cor.

Porém, o sistema RGB não reproduz de fato a forma como os seres humanos interpretam as cores. Apesar de possuir células na retina do globo ocular chamadas de cones que são sensíveis a determinados comprimentos de onda do espectro visível, o cérebro compreende melhor a cor através de atributos como matiz, saturação e luminosidade.

O sistema L*a*b* [CIE, 1986a] foi criado em 1976 com o objetivo de linearizar a relação entre a variação matemática dos valores de cores e a variação correspondente

percebida pelo sistema visual humano. Assim, este sistema apresenta uma relação mais próxima da forma como o ser humano percebe as cores.

Essa característica, em adição ao desacoplamento entre informação de intensidade e cromaticidade, faz do sistema L*a*b* um dos mais utilizados para análise computacional de imagens.

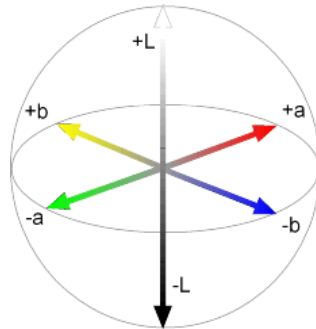


Figura 2: As três bandas do sistema L*a*b*

Por conter um espaço de cores muito maior do que o RGB e o CMYK, os bitmaps representados no sistema L*a*b* requerem muito mais bits por *pixel* para representar uma mesma imagem em RGB ou CMYK. Isto requer maior consumo de memória e maior tempo de processamento para este tipo de imagem. Este é um dos principais motivos pelo qual o L*a*b* não é um sistema muito utilizado atualmente.

Não há equação direta para transformar uma imagem do sistema RGB para o sistema L*a*b*, já que as cores do RGB são dependentes de fatores intrínsecos do dispositivo que está exibindo a imagem. A forma mais comum de conversão do RGB para o L*a*b* é utilizando como intermediário o sistema de cor CIE 1931 XYZ [CIE, 1986b], também conhecido como CIE 1931. A conversão para o CIE XYZ é feita através da Equação 1.

$$\begin{bmatrix} X \\ Y \\ Z \end{bmatrix} = \frac{1}{b_{21}} \begin{bmatrix} b_{11} & b_{12} & b_{13} \\ b_{21} & b_{22} & b_{23} \\ b_{31} & b_{32} & b_{33} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} R \\ G \\ B \end{bmatrix} = \frac{1}{0,17697} \begin{bmatrix} 0,49 & 0,31 & 0,2 \\ 0,17697 & 0,8124 & 0,01063 \\ 0 & 0,01 & 0,99 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} R \\ G \\ B \end{bmatrix}$$

Equação 1: Conversão do RGB para o CIE 1931 XYZ

Os valores da matriz de conversão são padronizados pela CIE e, foram calculados a partir das medições da intensidade de uma luz branca tomada como referencial pela própria CIE. Após ser feita a passagem para um sistema de cor absoluto,

como o CIE XYZ, pode-se iniciar o processo de conversão para $L^*a^*b^*$. A transformação do sistema CIE XYZ para o $L^*a^*b^*$ é feita seguindo as equações 2, 3 e 4.

$$L^* = 116 f(Y/Y_n) - 16$$

Equação 2: Cálculo da banda L^* , a partir do sistema CIE XYZ

$$a^* = 500[f(X/X_n) - f(Y/Y_n)]$$

Equação 3: Cálculo da banda a^* , a partir do sistema CIE XYZ

$$b^* = 200[f(Y/Y_n) - f(Z/Z_n)]$$

Equação 4: Cálculo da banda b^* , a partir do sistema CIE XYZ

onde: $f(t) = t^{1/3}$, para $t > 0,008856$;

$f(t) = 7,787t + 16/116$, caso contrário.

2.3.2. Sistema HSL

Outro sistema muito usado em processamento de imagens é o HSL. Nele, as três componentes são a matiz (H), a saturação (S) e a luminosidade (L). Criado por Alvy Ray Smith em 1974 [SMITH, 1978], este sistema é muito usado em processamentos onde existe a necessidade de utilização de um desses componentes.

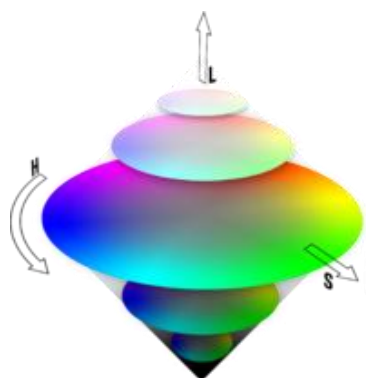


Figura 3: Modelo cônico do Sistema HSL

A matiz possui a informação de cromaticidade, que representa a cor, de fato. É esta componente que indica se a cor será amarela, vermelha, azul, verde, etc. O seu

valor numérico é proporcional à posição das cores na faixa de frequências do espectro visível, onde o vermelho assume o menor valor e o violeta possui o valor mais alto.

Na componente de saturação, é mostrada a pureza de uma cor representada pela matriz. Um valor alto de saturação indica uma cor bem viva, na forma mais próxima de como ela é conhecida. Já em uma saturação baixa, a cor se torna mais próxima de um tom acinzentado, ocultando a informação de crominância.

A luminosidade fornece uma relação mais ampla de como a cor pode se aproximar mais da cor branca (clara) ou da cor preta (escuro). Um valor mais alto de luminosidade indica que a cor está mais próxima do branco, e um valor mais baixo indica que ela se aproxima mais do preto.

Enquanto que o sistema L^*a^*b só permite extrair as informações de matiz (crominância) e luminosidade, o sistema HSL permite extrair uma componente de informação a mais: a saturação. Essa componente é importante para identificar elementos na imagem que possuem uma cor de maior destaque, ou seja, que possuem cores mais vivas.

No entanto, o sistema L^*a^*b possui uma informação de crominância mais detalhada, já que apresenta duas componentes para este fim, mostrando melhor a relação entre o azul e o amarelo, e também entre o vermelho e o verde. Isto não ocorre com tantos detalhes no HSL, que possui sua informação de crominância numa única componente: a matiz.

2.4. Gradiente de Canny

O gradiente de Canny [CANNY, 1986] é um operador gaussiano que detecta bordas em uma imagem. Este algoritmo baseia-se na resolução de três problemas que, segundo Canny, todo algoritmo de detecção de bordas deve resolver:

- Taxa de erros: O detector de bordas deve encontrar apenas bordas, e deve achar todas elas, sem exceções;
- Localização: A distância entre o *pixel* da borda e o *pixel* encontrado pelo detector deve ser a menor possível;

- Resposta: O detector não pode identificar muitos *pixels* na borda, onde só exista uma única borda.

A detecção de bordas procura regiões na imagem que apresentam uma grande variação de intensidade luminosa, o que indica indícios de descontinuidade, caracterizando os limites do objeto a ser detectado na imagem. Como a forma mais comum de uso do gradiente de Canny é a aplicação em imagens em níveis de cinza, isso representa destacar variações bruscas nos tons de cinza nas regiões da imagem.

O gradiente de Canny trabalha melhor com imagens mais suaves. Se for aplicado diretamente sobre uma imagem ruidosa, ou seja, com uma grande variação na intensidade luminosa dos *pixels*, pode gerar uma super-detecção de bordas.

Dessa forma, o primeiro passo do algoritmo é aplicar um filtro Gaussiano na imagem de entrada, isso faz com que sejam removidos quaisquer ruídos presentes que possam prejudicar a detecção das bordas.

A distribuição de Gauss (ou gaussiana) unidimensional é dada pela Equação 5.

$$G(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{\left(-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}\right)}$$

Equação 5: Distribuição de Gauss

onde: x é a variável aleatória; σ é o desvio-padrão e μ é a média.

Em duas dimensões, a distribuição pode ser obtida a partir do produto entre as dimensões x e y .

$$G(x, y) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} e^{\left(-\frac{x^2+y^2}{2\sigma^2}\right)}$$

Equação 6: Distribuição de Gauss em duas dimensões

Já que a imagem é uma representação discreta em um conjunto de *pixels*, é preciso fazer uma aproximação da função gaussiana em uma máscara de convolução para que o filtro possa ser aplicado.

A Equação 7 é um exemplo de um filtro Gaussiano 5x5, com um desvio-padrão $\sigma = 1,4$.

$$B = \frac{1}{159} \begin{bmatrix} 2 & 4 & 5 & 4 & 2 \\ 4 & 9 & 12 & 9 & 4 \\ 5 & 12 & 15 & 12 & 5 \\ 4 & 9 & 12 & 9 & 4 \\ 2 & 4 & 5 & 4 & 2 \end{bmatrix} * A$$

Equação 7: Filtro gaussiano 5x5, com desvio-padrão $\sigma = 1,4$

onde: A é a matriz de entrada; B é a matriz de saída.

A variação do tamanho do filtro Gaussiano pode gerar diferentes resultados. Filtros maiores, com uma matriz de ordem maior, causam uma suavização maior da imagem. Isto faz com que seja detectada uma quantidade menor de bordas na imagem. Em filtros menores, com uma dimensão menor, ocorre o contrário.

A escolha de um melhor tamanho para este filtro pode ser feita de forma empírica, através de diversos testes, observando o melhor resultado encontrado. As dimensões da imagem também devem ser levadas em consideração. O filtro de grau cinco, como apresentado na Equação 7, geralmente apresenta bons resultados para a maioria das imagens.

O algoritmo de Canny é dividido em duas partes. Primeiro é encontrada a intensidade do gradiente. Em seguida, é encontrada a direção do vetor gradiente. Esses dois valores são encontrados para cada *pixel*.

O cálculo do gradiente pode ser feito através de uma máscara G que desliza sobre a matriz resultante da aplicação da gaussiana. Esta máscara G pode ser dividida nas componentes horizontal (G_x) e vertical (G_y), onde detectam, respectivamente, bordas na horizontal e na vertical. Estas podem ser observadas nas equações 8 e 9.

$$G_x = \begin{bmatrix} -1 & 1 \\ -1 & 1 \end{bmatrix}$$

Equação 8: Detecção de bordas na vertical

$$G_y = \begin{bmatrix} 1 & 1 \\ -1 & -1 \end{bmatrix}$$

Equação 9: Detecção de bordas na horizontal

A intensidade G do gradiente de Canny em um dado *pixel* pode ser obtida a partir do resultado da aplicação destas duas máscaras, conforme visto na Equação 10.

$$G = \sqrt{G_x^2 + G_y^2}$$

Equação 10: Intensidade do gradiente de Canny

Analisando a relação entre os valores de G_x e G_y , pode-se encontrar a direção que mais se destaca. Desta forma, o ângulo do vetor gradiente formado com a horizontal pode ser encontrado através do arco-tangente entre as duas componentes de G .

Caso o valor do G_y seja maior do que G_x , significa que a direção do vetor está mais próxima da vertical. Caso contrário, a direção aponta para a horizontal.

$$\theta = \tan^{-1}\left(\frac{G_y}{G_x}\right)$$

Equação 11: Direção do gradiente de Canny

onde: θ é o ângulo com a horizontal.

2.5. Watershed

O algoritmo *watershed* [BEUCHER, 1979] parte do princípio de que toda imagem representada em níveis de cinza pode ser considerada uma superfície topográfica. Isto pode ser feito se pensarmos em uma visualização tridimensional de uma imagem bidimensional, cuja intensidade de cada *pixel* representaria a terceira dimensão [GONZALEZ, 2001a].

Ao inundar diferentes mínimos locais, pode-se detectar o encontro das águas vindas de diferentes regiões. Desta forma, ocorre a formação de bacias hidrográficas delimitadas por linhas divisoras de águas, as chamadas *watersheds*.

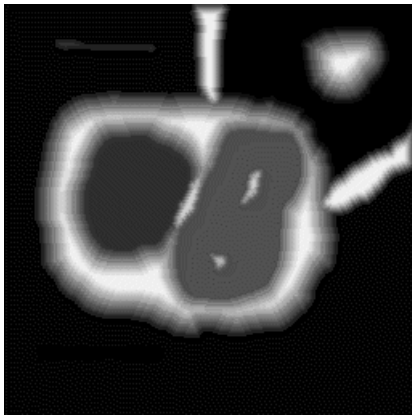


Figura 4: Imagem inicial. [GONZALEZ, 2001b]



Figura 5: Superfície topográfica [GONZALEZ, 2001b]

Uma gota d'água que caia de um lado da linha de *watershed* irá alcançar um mínimo local de uma região diferente da que se tivesse caído do outro lado da linha.

Este algoritmo é geralmente utilizado após a aplicação de algum gradiente em uma imagem já que, aplicado dessa forma, ele é ideal para localizar regiões mais escuras na imagem que são rodeadas por *pixels* mais claros. Nesse contexto, os *pixels* mais escuros seriam as regiões a serem segmentadas. Os *pixels* mais claros corresponderiam às bordas da imagem, que seriam as linhas de *watershed*.

Uma das principais versões do algoritmo *watershed* está presente na implementação de Vincent e Soille [VINCENT; SOILLE, 1991], que é baseada na ideia de simulação de imersão. A superfície topográfica começa a encher a partir do ponto de menor altitude até que todos os *pixels* sejam inundados.

Este algoritmo possui basicamente dois passos: ordenação e inundação. No primeiro passo, os *pixels* são ordenados pela sua intensidade, que representam a sua altitude. Em seguida, começa a inundação seguindo a ordenação dos *pixels* do menor para o de maior intensidade. Formando assim as bacias hidrográficas.

Durante o processo de inundação, cada bacia hidrográfica recebe um rótulo, um número de identificação único, que diferencie ela das demais. Toda vez que ocorrer a inundação de dois *pixels* vizinhos com rótulos diferentes é construída uma barragem, que é a linha de *watershed*.

Passos do algoritmo da versão do *watershed* de Vincent e Soille:

1. Ordena todos os *pixels* da imagem de entrada em ordem crescente com base no seu nível de cinza.
2. Percorre todos os níveis de cinza (de 0 a 255).
 - 2.1. Adiciona os *pixels* do nível selecionado em uma fila.
 - 2.2. Remove o primeiro elemento da fila.
 - 2.3. Verifica se é um mínimo local, ou se é vizinho de algum. Caso seja, ele recebe um rótulo único que identifique sua bacia hidrográfica.
 - 2.4. Caso seja um novo mínimo local, um novo rótulo é atribuído.
 - 2.5. Volta para o passo (2.2) até que a fila seja esvaziada.

Ao final do algoritmo, tem-se uma matriz com vários rótulos. Cada região é formada por um conjunto de rótulos que possuem os mesmos valores. Cada uma dessas regiões define uma bacia que foi inundada. Deve-se ter cuidado para que esses rótulos sejam únicos para cada região, de modo que não haja inconsistências na identificação das bacias.



Figura 6: Linhas de *watershed* em vermelho [GONZALEZ, 2001b]

Para encontrar as linhas de *watershed*, basta percorrer toda a matriz encontrando os *pixels* vizinhos que possuem diferentes valores de rótulo, os pixels de fronteira.

Dessa forma, pode-se construir uma matriz com todas as linhas de *watershed* marcadas. As linhas não devem apresentar descontinuidades, já que uma ruptura da linha significaria que ambas as regiões fariam parte de uma mesma bacia hidrográfica.

2.6. K-médias

O K-médias [MACQUEEN, 1967] é um algoritmo de agrupamento de dados em um número definido de grupos a partir de um atributo espacial. Cada um desses grupos recebe o nome de classe ou *cluster*. Uma classe é, portanto, uma coleção de objetos que são similares entre si e não-similares com relação aos objetos das outras classes.

Para a classificação são utilizados métodos estatísticos e medidas de similaridade. O objetivo é tentar alcançar a menor distorção dos agrupamentos de pontos no plano gaussiano. Matematicamente, significa encontrar a minimização da função quadrada de erro da Equação 12.

$$V = \sum_{i=1}^k \sum_{x_j \in S_i} |x_j - \mu_i|^2$$

Equação 12: Função quadrada de erro

onde: k – número de classes ; x_j – cada ponto da classe S_i ; μ_i – ponto médio de todos os pontos x_j pertencentes à classe S_i .

Na Equação 12, μ_j é a média de todos os pontos da classe S_j , sendo definido pela Equação 13.

$$\mu_j = \frac{1}{N_j} \sum_{n \in S_j} x_n$$

Equação 13: Cálculo do ponto-médio μ_j

onde: N_j – número de pontos x_n na classe S_j .

O k-médias é um dos mais simples algoritmos não-supervisionados usados para solucionar problemas de segmentação. Por isso, tem grande utilidade na computação, principalmente na área de processamento digital de imagens.

A princípio, definem-se aleatoriamente k pontos no plano, um para cada agrupamento (classe). Cada um desses pontos é chamado de centróide. A fim de otimizar o cálculo e obter resultados mais satisfatórios, os pontos k_i devem ser distribuídos de forma que fiquem separados uns dos outros.

Para começar a agrupar as classes, cada ponto x_j do plano deve encontrar o centróide mais próximo, ou seja, o ponto k_i mais próximo. Dessa forma, surge um primeiro esboço da divisão dos grupos.

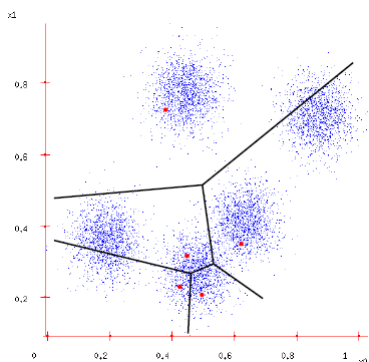


Figura 7: Divisão dos grupos com base na posição dos centróides.

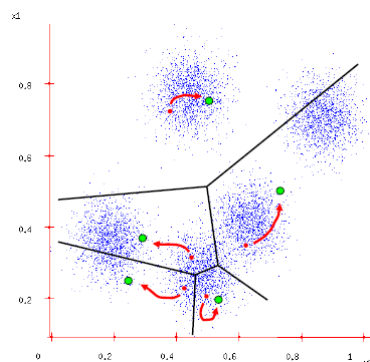


Figura 8: O ponto médio de cada região é recalculado e o centróide é movido.

Os pontos k_i são então movidos para a posição μ_i calculada a partir do ponto-médio de todos os pontos x_j que se ligaram anteriormente ao ponto k_i . Então, novamente as classes são reagrupadas com base na posição dos pontos x_j e o processo é repetido até que os pontos k_i parem de se mover. Nesse momento, a distorção das classes é cessada.

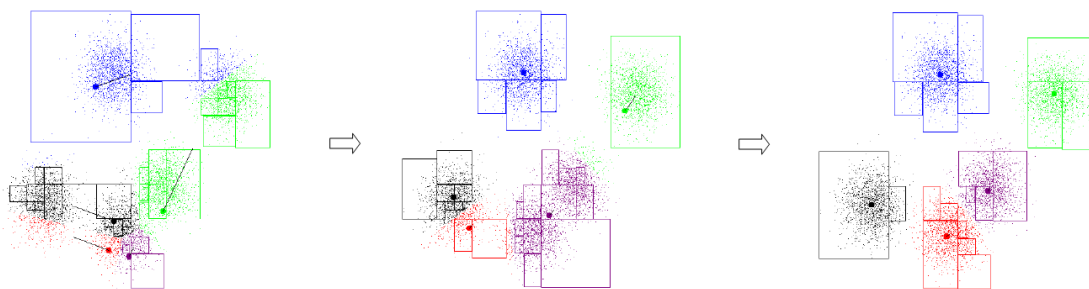


Figura 9: Etapas da iteração do algoritmo K-médias.

Na Figura 9, é possível entender melhor os passos do algoritmo. Na imagem à esquerda, é mostrado um primeiro esboço das regiões formado após a escolha aleatória dos centróides. Em seguida, na imagem central, são realizadas sucessivas iterações para movimentar os centróides. Por fim, na imagem à direita, os centróides param e o algoritmo é finalizado.

O algoritmo pode ser resumido em seis passos:

1. Definir o número k de classes;
2. Atribuir k pontos aleatórios no plano. Estes pontos representam os centróides iniciais do grupo;
3. Agrupar os pontos em classes de acordo com o ponto k mais próximo;
4. Recalcular o centróide da nova classe;
5. Mover o ponto k para o centróide dos pontos da classe;
6. Repetir os passos 3, 4 e 5 até que o centróide pare de se mover.

2.7. Método de Otsu

A binarização é uma forma de segmentação de imagens em duas classes a partir de uma imagem em tons de cinza. A separação entre esses dois níveis é feita a partir de um limiar chamado *threshold* que geralmente é o ponto médio da faixa de valores dos *pixels* da imagem. A imagem resultante terá apenas dois tons (preto e branco). Este tipo de segmentação é importante para que se possa identificar um objeto, separando-o das partes que não o compõem, como por exemplo, o fundo da imagem ou outros objetos que não são alvo da análise realizada pela segmentação.

O método de Otsu baseia-se na simples ideia de realizar a binarização escolhendo o melhor valor de *threshold* de modo que a variação entre as duas classes seja mínima. Esta variação é definida como mostra a Equação 14.

$$\sigma_{\omega}^2(T) = \sigma_1^2(T) \sum_{i=0}^{T-1} p_1(i) + \sigma_2^2(T) \sum_{i=T}^{N-1} p_2(i)$$

Equação 14: Cálculo da variação entre as duas classes

onde: T – valor de *threshold*; $\sigma_1^2(T)$ e $\sigma_2^2(T)$ são as variações do background (abaixo ou igual ao limiar T) e do foreground (acima do limiar T), respectivamente; $p_1(i)$ e $p_2(i)$ indicam a razão entre a ocorrência de *pixels* de valor i pelo número total de *pixels* na imagem.

A variação é calculada para todos os possíveis valores de T. Para uma imagem com 256 níveis de cinza, esses valores são de 0 a 255. O valor de *threshold* que produzir a menor variação será o escolhido.

Este método requer grande poder computacional para ser executado já que requer um número elevado de iterações para encontrar o valor ideal de *threshold*. Implementações mais rápidas deste método já foram criadas e podem ser facilmente encontradas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo apresenta os materiais utilizados e a metodologia empregada no desenvolvimento deste trabalho. Para isto, é realizada uma descrição do processo de obtenção das imagens dos enxertos ósseos, das etapas de segmentação e escolha da classe que representa a região de interesse.

3.1. Aplicação do enxerto

Para a realização desta pesquisa foi necessária a obtenção de imagens de enxertos ósseos que tenham sido regenerados. As imagens utilizadas neste trabalho foram obtidas por pesquisadores do Departamento de Morfologia do Centro de Ciências da Saúde da UFPB que realizam pesquisas usando enxertos ósseos em ratos.

Para o processo de aplicação de enxertos, é necessário obter cobaias vivas que tenham material ósseo fraturado ou com algum desgaste. A fim de obter o material para a realização deste tipo de pesquisa, esses defeitos são criados artificialmente em um procedimento controlado.

Os ratos inicialmente recebem a aplicação de anestesia e são preparados para a realização da cirurgia. Uma broca cirúrgica é utilizada para produzir o defeito ósseo na superfície lateral do fêmur com uma dimensão total de cerca de 3mm³. Nesse defeito é aplicado algum dos diferentes tipos de enxertos ósseos que o pesquisador pretende estudar na recuperação do tecido ósseo.

Ao final da cirurgia, o rato recebe a aplicação de ponto cirúrgico. Eles continuam sob observação enquanto se recuperam no pós-operatório. Neste experimento foram utilizados ratos *Wistar albinus*, jovens, adultos, e de ambos os gêneros.

Os ratos usados no experimento são divididos em grupos de controle. Para cada grupo é estabelecido um tempo de regeneração diferente, para que o pesquisador possa analisar a evolução da aplicação do seu enxerto ao longo do tempo de maturação. Nestes testes, foram criados os grupos de 15, 30 e 45 dias.

Após o tempo definido em cada grupo de controle, o rato é sacrificado para extração do material ósseo onde foi aplicado o enxerto. Nestes testes, o enxerto foi aplicado no fêmur do roedor.

Para melhor visualizar a área que foi regenerada, são aplicados alguns corantes que reagem com os tecidos, apresentando uma coloração diferente que a faz destacar-se das demais regiões. Os principais corantes são o picrossírius e a hematoxilina-eosina (H&E). O picrossírius produz um vermelho intenso, enquanto que a H&E produz uma coloração mais próxima do violeta. Este procedimento é fundamental para a segmentação já que esta é baseada na coloração das regiões da imagem.

O osso é então fatiado em seções transversais utilizando uma laminadora própria para este fim para que se possa analisar melhor a neoformação óssea.

As seções são preparadas em uma lâmina e levadas ao microscópio óptico onde são realizadas as capturas fotográficas com uma câmera acoplada. Uma escala também é fotografada com o mesmo fator de ampliação para que seja possível medir a área da imagem posteriormente.

3.2. O método de segmentação proposto

O método de segmentação proposto neste trabalho baseia-se na observação de que a aplicação do algoritmo k-médias em imagens de enxertos ósseos apresenta resultados satisfatórios. A fim de alcançar melhores resultados, foi analisada a combinação de outras etapas junto ao k-médias, como a mudança no sistema de cores e a realização de alguma etapa de pré-processamento.

Assim considera-se de interesse investigar a aplicação de uma etapa de segmentação utilizando o *watershed* e o k-médias, e uma mudança para o sistema de cores $L^*a^*b^*$, já que a segmentação deverá ser baseada na pigmentação apresentada pelo corante.

O método proposto consiste na realização de uma super-segmentação, aplicando o algoritmo *watershed* à imagem de enxerto ósseo. Para que, em seguida, seja realizado

um agrupamento dessas regiões, utilizando o algoritmo k-médias, a fim de reduzir o efeito causado anteriormente pela super-segmentação.

Após as etapas de segmentação, é realizada uma análise na matiz e na luminosidade através do sistema de cores HSL para identificar a classe que corresponde à região da neoformação óssea.

Por fim, é realizada uma binarização na classe escolhida para selecionar os pixels correspondentes à região que ela define. Essa etapa é importante pois permite uma melhor avaliação visual da área correspondente à região segmentada. Em seguida, é realizada uma contagem de pixels e cálculo da área para que o especialista possa analisar o sucesso do seu enxerto ósseo.

Um esquema genérico do método empregado pode ser observado na Figura 10.

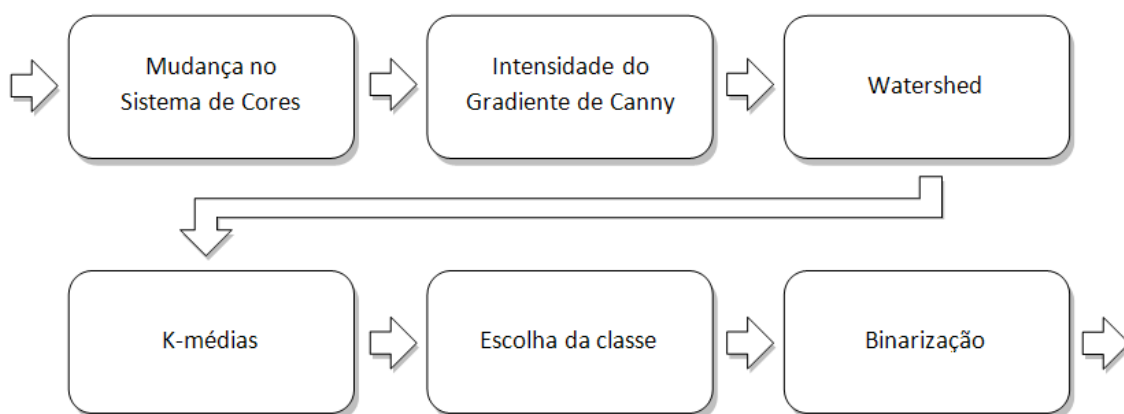


Figura 10: Esquema do método de segmentação proposto

3.2.1. Mudança no espaço de cores

O procedimento de captura e digitalização de imagens provenientes de microscópios óticos produz fotografias digitais cuja informação de cor é representada no espaço RGB. Contudo, apesar do sistema RGB representar de forma simplificada o modo como o olho humano detecta a radiação eletromagnética, em muitas situações é mais importante utilizar um sistema que permita representar a informação da cor de uma maneira mais próxima de como o nosso cérebro percebe e interpreta as cores, tal como o

sistema HSL (*hue, saturation, luminosity*), o YCrCb (onde Y representa a intensidade e Cr e Cb representam, respectivamente, os valores de crominância R e B) e o $L^*a^*b^*$.

Este último objetiva linearizar a relação entre a variação matemática dos valores de cores e a variação correspondente percebida pelo sistema visual humano. Assim, o sistema $L^*a^*b^*$ apresenta uma relação mais próxima da forma como o ser humano percebe as cores no meio ambiente. Por este motivo, ele foi escolhido para a realização desta segmentação já que os tecidos ósseos apresentam uma variação de cores que é facilmente percebida pelo ser humano. Neste caso, o pesquisador que realiza a análise sobre o enxerto ósseo.

A segmentação das regiões de interesse no presente trabalho é realizada de forma automática utilizando a transformação do espaço de cores RGB para o espaço de cores $L^*a^*b^*$. Após essa conversão, a banda L, que representa a luminosidade, é descartada para se conseguir um melhor resultado, já que esta banda representa o brilho contido na imagem e não é uma variável que está associada com a cor de uma dada região.

Descartando essa variável, é possível que a captura realizada no microscópio se torne independente da iluminação presente no local. Isso é uma grande vantagem já que não é preciso ajustar uma iluminação ideal para a realização da segmentação, basta apenas que a imagem capturada apresente uma boa qualidade e uma resolução suficientemente adequada para representar as regiões de neoformação óssea.

3.2.2. Segmentação Inicial

De posse das bandas 'a' e 'b' da imagem, é aplicado o algoritmo *watershed* para realizar a primeira etapa da segmentação nas imagens. Por ser ideal para detectar regiões mais escuras numa imagem cercadas por regiões mais claras, o *watershed* é geralmente aplicado após o uso de algum operador de detecção de bordas. Isto faz com que ele consiga realizar uma segmentação baseando-se nas fronteiras encontradas pelo detector.

Foi observado que a simples utilização do k-médias, sem a combinação com o *watershed* produzia muito ruído que, em algumas vezes, acabava dificultando a identificação da região de interesse. Por outro lado, uma simples utilização do *watershed* produziria uma super-segmentação que iria muito além do número de regiões que se pretendia segmentar. Dessa forma, a melhor maneira encontrada foi a segmentação pelo *watershed*, seguida do k-médias.

Neste trabalho foi utilizado o gradiente de Canny, antes do *watershed*, para destacar as bordas na imagem. Este gradiente produz uma matriz de vetores, cada um com intensidade e direção. Mas apenas a intensidade foi utilizada como atributo durante esta etapa de segmentação.

Como o gradiente de Canny é aplicado sobre imagens monocromáticas, é preciso que cada *pixel* da imagem possua um valor único. Este valor é calculado pela média das bandas ‘a’ e ‘b’ de cada *pixel*.

Este gradiente trabalha melhor com imagens mais suaves, sem variações bruscas na intensidade de pixels vizinhos. Dessa forma, ele utiliza um filtro Gaussiano para remover qualquer ruído na imagem que possa gerar uma super-deteção de bordas.

A segmentação com o algoritmo *watershed* possui a característica de provocar uma super-segmentação na imagem, que acaba criando um grande número de pequenas regiões. Cada uma dessas regiões agrupa *pixels* com características semelhantes.

Neste trabalho foi utilizada a versão de Vincent & Soille do *watershed* [VINCENT; SOILLE, 1991]. Este algoritmo realiza um procedimento de ordenação e inundação dos pixels conforme descrito na seção 2.5.

3.2.3. Agrupamento

Em seguida, é utilizado o algoritmo de segmentação não-supervisionado k-médias sobre as regiões formadas pela etapa de *watershed*. Seu objetivo é minimizar a super-segmentação.

O algoritmo k-médias serve para agrupar um conjunto de pontos em um determinado número de classes que possuem características em comum, através da

realização de um número indeterminado de iterações. Neste trabalho, os *pixels* da imagem serão agrupados conforme a sua coloração e à dos demais *pixels* na imagem.

Nesta etapa da segmentação, cada ponto é representado por um par ordenado utilizando as coordenadas 'a' e 'b', obtidas a partir da imagem inicial representada pelo espaço de cores $L*a*b^*$.

Cada ponto a ser agrupado pelo k-médias representa uma região resultante da segmentação previamente realizada pelo *watershed*. As coordenadas destes pontos são calculadas a partir da média das componentes 'a' e 'b' de todos os pixels de suas respectivas regiões.

Nesta etapa, as regiões resultantes da segmentação do *watershed* são agrupadas em regiões maiores. Durante a execução do algoritmo, é possível notar que essas regiões maiores, que estão sendo formadas, irão coincidir com os elementos da estrutura óssea observados na imagem.

A segmentação foi realizada com um variado número de classes para que o profissional da área de morfologia pudesse chegar à conclusão de qual a melhor quantidade de classes necessárias para realizar a segmentação.

Através da realização de diversos testes, foi possível observar que de 5 a 10 classes são suficientes para produzir uma segmentação de ótima qualidade, já que é a quantidade necessária para representar os elementos que compõem a estrutura óssea presente na imagem.

Chegou-se ao consenso, junto aos pesquisadores do Departamento de Morfologia, de que a segmentação com seis classes é o número que mais se aproxima do resultado desejado. Portanto, este foi o número de classes utilizado nas segmentações que foram realizadas.

A partir desse ponto, qualquer aumento no número de classes iria criar mais um grupo que só iria conter pequenas regiões que representam resquícios de ossos antigos, vasos sanguíneos ou material exógeno. Esse aumento não traria nenhuma vantagem para a segmentação da região de interesse. Uma diminuição no número de classes poderia fazer com que a região desejada ficasse distribuída nas demais classes, em algumas

imagens. Isso ocorreria porque o número de classes não seria suficiente para representar as estruturas histológicas presentes na imagem.

O agrupamento pelo k-médias é a etapa mais lenta do processo já que são necessárias várias iterações para se chegar a um resultado. Já que o algoritmo k-médias coloca os centróides de forma aleatória no plano gaussiano, ele pode apresentar variações diferentes na duração do algoritmo. Uma boa distribuição dos centróides dificilmente ocasionará resultados diferentes em mais de uma execução para uma mesma imagem.

O resultado do k-médias é um conjunto de classes, onde cada classe é composta pelos pontos ligados com seu centróide correspondente. Neste caso, cada centróide representa uma região que foi segmentada. Apenas uma dessas regiões corresponde à neoformação óssea.

3.2.4. Escolha da classe

A escolha da classe que representa a região de interesse é feita a partir de uma análise das componentes de matiz e saturação do espaço de cores HSL.

É sabido que a região correspondente ao tecido neoformado reage ao corante aplicado para a detecção da mesma, apresentando uma coloração característica. Por este motivo, para cada imagem resultante do k-médias foi calculado um grau de matiz e saturação de forma que fosse destacada a classe que apresentasse um valor de matiz mais próximo do vermelho ou do roxo e com um alto valor relativo de saturação. Para o cálculo desse fator, foi utilizada a Equação 15.

$$\mu_k = \frac{1}{M \cdot N} \sum_{(i,j)} [|180 - \text{matiz}(f_k(i,j))| \cdot \text{satur}(f_k(i,j))]$$

Equação 15: Cálculo do grau de matiz e saturação da imagem

onde: M e N representam a largura e a altura da imagem;

f_k representa a imagem da classe k ;

matiz e satur representam as funções de matiz e saturação.

Em seguida, as classes são ordenadas por ordem deste grau de matiz e saturação para determinar a região de interesse. Em testes realizados com diversas imagens, a classe que apresenta maior valor de μ_k é a classe que corresponde à região de neoformação óssea.

3.2.5. Binarização

Apenas mostrar a região que apresenta neoformação óssea não é o suficiente para o pesquisador, ele precisa de dados numéricos para avaliar de forma ainda mais objetiva o resultado do seu experimento. Comparar duas regiões apenas olhando para elas pode estar sujeito a erros e resultados tendenciosos.

Para realizar a contagem dos *pixels* e estimar a área real da imagem, é feito um processo de separação entre os *pixels* que correspondem à área a ser analisada e os *pixels* que compõem o fundo da imagem (i.e., o *background*), que deve ser descartado.

A etapa de binarização é realizada utilizando o método de Otsu, descrito na seção 2.7, que não apenas leva em consideração o valor de um *pixel* da imagem, mas a sua relação com os demais *pixels*. Isto é importante já que as imagens ósseas coletadas nos laboratórios podem apresentar variações na iluminação, dependendo do dia e das condições que a captura das imagens foi realizada.

Este método de binarização tenta separar da melhor forma possível a região da imagem que foi selecionada no processo de segmentação se ajustando aos níveis de intensidade de luz que está presente na imagem capturada.

3.2.6. Contagem dos *pixels* e estimativa de área

Depois de realizado o processo de binarização, a imagem monocromática com dois níveis de cor é então submetida à contagem dos *pixels*. Nesse tipo de imagem binária, por convenção, a cor branca é representada por “1” e a cor preta por “0”. A cor branca representa a área do objeto desejado, enquanto a região de cor preta representa o background e não deve entrar no cálculo da área da região analisada.

O algoritmo mais comum para a contagem dos *pixels* se resume apenas à contagem dos *pixels* representados por “1”, ou seja, os *pixels* de cor branca. Apesar de ser uma forma mais intuitiva de se proceder, essa não é a forma que mais se aproxima de uma mensuração real da região selecionada.

Neste trabalho, a estimativa de área foi realizada utilizando diferentes padrões de análise nos *pixels* onde a área é obtida através da soma de uma estimativa de área em cada *pixel* branco da imagem. Em vez de simplesmente somar o número de *pixels* brancos como é feito na maioria das vezes.

A área de cada *pixel* é estimada individualmente através da análise da sua vizinhança. Para este método, são selecionadas regiões 2x2 na vizinhança do *pixel* analisado onde em cada região o *pixel* está incluso. Para cada *pixel* há, portanto, quatro regiões diferentes na sua vizinhança.

A análise de cada uma dessas regiões deve se enquadrar em seis diferentes padrões onde para cada um terá um valor correspondente à estimativa de área. Esses seis padrões e seus respectivos valores de área estão listados a seguir:

- Zero em todos os *pixels* (área = 0).
- Apenas um *pixel* “1” na região (área = 1/4).
- Dois *pixels* “1” adjacentes na região (área = 1/2).
- Dois *pixels* na diagonal (área = 3/4).
- Três *pixels* “1” na região (área = 7/8).
- Todos os quatro *pixels* “1” (área = 1).

O cálculo final para o *pixel* individualmente será a soma das áreas estimadas de cada uma das quatro regiões.

Por exemplo, se tiver um *pixel* “1” cercado de *pixels* “0”, ele terá área igual a um. Isso acontece porque ele terá, de fato, as quatro regiões com área igual a 1/4.

3.2.7. Cálculo da área real

Após a contagem dos *pixels* da região selecionada da imagem, é feito um cálculo para mensurar a área real da imagem. Para que isto seja realmente possível, durante o processo de captura das imagens no microscópio, o pesquisador deve colocar um instrumento de medição, em geral uma régua, para que se possa obter uma escala para medir a área correspondente a um *pixel* na imagem. Se isto não fosse feito, seria impossível obter a área real da imagem.

A escala é obtida calculando o número de *pixels* que separa duas marcações distintas da régua. Com isso, se tem uma relação de um para um entre a unidade de medida métrica e a quantidade de *pixels* na imagem.

Esta escala é obtida utilizando a Equação 16.

$$E = \frac{D}{d}$$

Equação 16: Cálculo da distância real

onde: D é a distância real; e d é a distância em números de *pixels*.

Por exemplo, se entre dois traços da régua distantes um milímetro um do outro tiver 20 *pixels*, significa que um *pixel* contém 1/20 milímetros.

Como um *pixel* tem dimensão quadrada, isto significa que seus lados possuem o mesmo tamanho e, a partir do tamanho da sua lateral é calculada a sua área.

Apesar das distorções ópticas encontradas no microscópio, já que a região central se encontra levemente mais próxima da lente do que as vizinhanças, cada *pixel* apresenta aproximadamente a mesma área. Agora basta calcular o produto do número de *pixels* pela área de cada *pixel*, para encontrar a área total da região que foi observada.

3.3. Imagens utilizadas

Para a realização deste experimento foram utilizadas 67 imagens histológicas de roedores, utilizando diferentes técnicas de enxertos ósseos.

As imagens foram obtidas nos laboratórios de imagem biológica do CCS/UFPB, e todas elas possuem resolução entre 500x300 e 1200x900.

As imagens utilizadas estavam todas no formato bitmap, que é um formato sem perdas, já que um formato de compressão com perdas, como o JPEG, pode introduzir variações nos valores dos *pixels* da imagem que podem comprometer a segmentação.

Para visualizar a neoformação óssea foram utilizados os principais corantes que reagem com o osso e destacam a região de observação dos pesquisadores. Os corantes mais utilizados são o picro-sírus, que produz uma coloração avermelhada, e o hematoxilina-eosina, que produz uma coloração que varia do vermelho ao roxo. Sem estes corantes seria praticamente impossível de diferenciar os elementos histológicos na imagem.

3.4. Métrica utilizada para avaliação da segmentação

Para a avaliação dos resultados da segmentação foi utilizado um método empírico, com a ajuda de um especialista na área odontológica que avaliou as imagens resultantes e realizou uma comparação visual nos elementos da estrutura óssea que estavam presentes na classe correspondente à neoformação óssea.

Como a realização de uma segmentação manual poderia introduzir alguns dos problemas citados no Capítulo 1, principalmente pela exigência de precisão na utilização do *mouse* e por ser um trabalho enfadonho, a comparação com uma segmentação manual poderia não trazer tantos benefícios. Algumas estruturas menores poderiam não ser selecionadas corretamente, ou regiões com contornos irregulares poderiam ser selecionadas com pouca precisão. Principalmente ao realizar essa segmentação manual em diversas imagens para que se pudesse chegar a uma melhor avaliação com um número maior de amostras.

Para uma análise mais cuidadosa, foi utilizado um critério de avaliação visual, onde o especialista poderia dar uma nota de 0% a 100%, conforme sua avaliação da conformidade entre as estruturas presentes no enxerto ósseo e as estruturas presentes na classe resultante da sua respectiva segmentação, conforme a sua importância para a análise da evolução da neoformação óssea.

Foram enviadas quinze classes resultantes da segmentação, acompanhadas das imagens originais, para que o especialista pudesse avaliar. Em seguida foi aplicada uma métrica de avaliação para verificar o potencial do método de segmentação desenvolvido neste trabalho.

Foi utilizado o método de [ORTIZ, 2006] para calcular a taxa de acertos alcançada nas segmentações. Neste método de avaliação, é criada uma matriz de confusão C, onde cada elemento $C(i,j)$ contém o número de *pixels* da região i na imagem de original que estão presentes na região j da classe segmentada resultante. Para poder se adequar à avaliação realizada pelos especialistas, a análise pelo número de *pixels* foi substituída pelo percentual de estrutura óssea encontrada na classe resultante.

No contexto de classificação, a percentagem de *pixels* classificados corretamente fica mais fácil de ser obtido a partir de uma matriz de confusão. A matriz C possui a característica de ser quadrada e de ordem N. Onde N é o número de classes que se deseja avaliar.

Para a avaliação da segmentação deste trabalho, como a análise foi feita apenas na região segmentada da neoformação óssea, o número de classes contido na matriz de confusão é igual a dois. Ou seja, a estrutura poderia estar presente ou não na imagem resultante.

Dessa forma, a percentagem de *pixels* classificados corretamente é dada pela Equação 17.

$$M = \frac{\sum_{i=1}^N C_{ii}}{\sum_{i,j=1}^N C_{ij}}$$

Equação 17: Cálculo da percentagem de *pixels* classificados corretamente.

3.5. Implementação

Todos os cálculos, implementações e testes foram feitos no ambiente de programação científica MATLAB® 7.0, da MathWorks®.

O MATLAB® é um software de alto desempenho voltado para cálculos numéricos que permite uma grande eficiência na execução de cálculos de alta complexidade. Muito utilizado por engenheiros e pesquisadores nas indústrias, governo

e educação, esta ferramenta dispõe de uma imensa biblioteca de funções para as mais diversas áreas.

Por oferecer recursos de alto nível bastante intuitivos, ele permite uma fácil programação já que todo o código pode ser escrito em um número reduzido de linhas. Isto fez com que o MATLAB se tornasse uma ferramenta bastante utilizada até mesmo por pessoas que não seja da área da computação e com pouca prática em programação, como matemáticos e engenheiros.

Esta ferramenta foi criada no final dos anos 1970 por Cleve Moler, do departamento de Ciência da Computação da Universidade do Novo México. Durante a década de 80, após reescrever todas as bibliotecas deste software, foi fundada a MathWorks, que hoje é um dos principais nomes da computação voltada para os cálculos matemáticos.

O principal destaque dessa ferramenta é a sua alta velocidade de processamento que chega até a superar linguagens de mais baixo nível como C, C++ e Fortran. Isso é possível pelo fato do MATLAB utilizar, em suas bibliotecas pré-compiladas, um conjunto de instruções em baixo nível para processamento vetorial disponíveis na grande maioria dos processadores modernos. Além disso, a utilização de algoritmos otimizados e com baixa ordem de complexidade faz com que a execução de um comando seja feito de uma maneira extremamente rápida.

4. RESULTADOS

Este capítulo apresenta os resultados obtidos através da segmentação de diversas imagens com variados períodos de maturação e com a aplicação de diferentes corantes. São apresentadas as imagens originais e suas classes resultantes, com destaque para a classe que indica a região da neoformação óssea.

4.1. Seleção da classe correta

A Figura 11 ilustra um exemplo de imagem de enxerto ósseo após 15 dias de cirurgia. Para uma melhor visualização foi adicionado o corante Picro-sírius. Esta imagem foi obtida com o auxílio de um microscópio óptico.

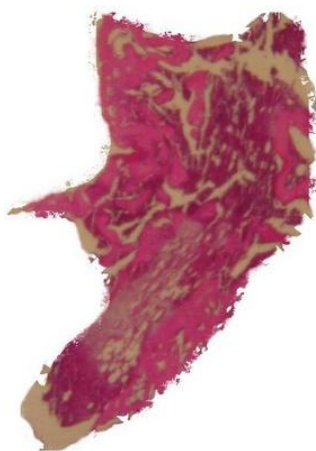


Figura 11: Enxerto ósseo com 15 dias de maturação usando o corante Picro-sírius.

A Figura 12 mostra uma microfotografia de uma escala graduada utilizada como referência para o cálculo da área real das imagens.

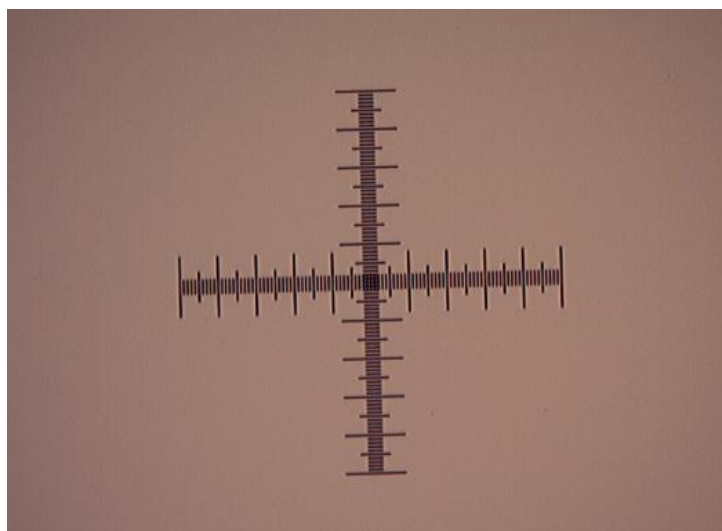


Figura 12: Microfotografia da escala

As Figuras 13 a 18 mostram as classes resultantes da segmentação em seis classes aplicada sobre a Figura 11.



Figura 13: Classe 1 da Figura 11



Figura 14: Classe 2 da Figura 11



Figura 15: Classe 3 da Figura 11



Figura 16: Classe 4 da Figura 11



Figura 17: Classe 5 da Figura 11



Figura 18: Classe 6 da Figura 11

A Tabela 1 mostra o fator de matiz e saturação (μ_k) em cada classe.

Classe (k)	Fator μ_k
k=1	2,518161
k=2	5,499934
k=3	7,807783
k=4	12,262734
k=5	19,170147
k=6	24,399013

Tabela 1: Fator μ_k em cada classe

4.1. Segmentação com seis classes

As Figuras 19, 21, 23, 25 e 27 são exemplos de imagens usadas para os testes com a segmentação utilizando seis classes. Para cada uma delas é apresentado o resultado da classe correspondente obtida. As imagens são apresentadas no sistema de cores RGB, com as cores originais da região, para uma visualização mais natural das estruturas histológicas e uma melhor comparação com a imagem original.



Figura 19: Enxerto ósseo com 15 dias de maturação usando o corante Picro-sírius.



Figura 20: Classe referente à neoformação óssea após a segmentação em seis classes da Figura 19.

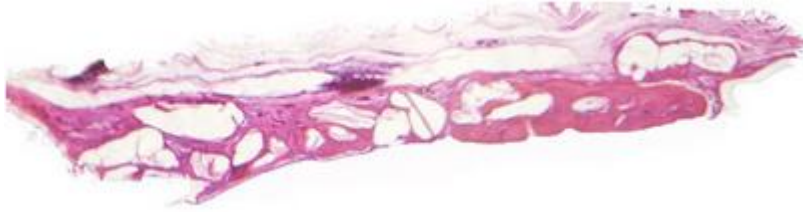


Figura 21: Enxerto ósseo com 15 dias de maturação usando o corante Picro-sírius em parafina.



Figura 22: Classe referente à neoformação óssea após a segmentação em seis classes da Figura 21.

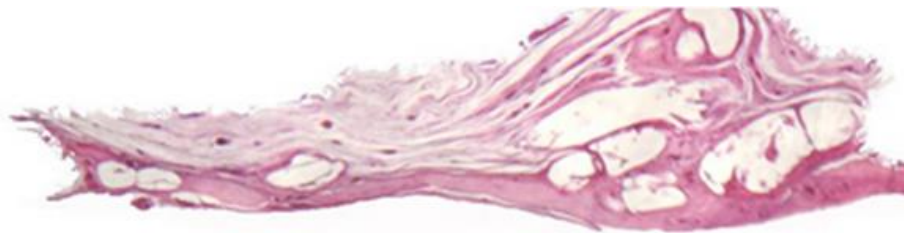


Figura 23: Enxerto ósseo com 30 dias de maturação usando o corante Picro-sírius em parafina.

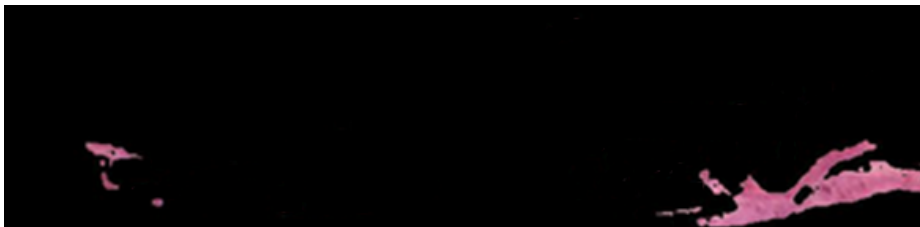


Figura 24: Classe referente à neoformação óssea após a segmentação em seis classes da Figura 23.

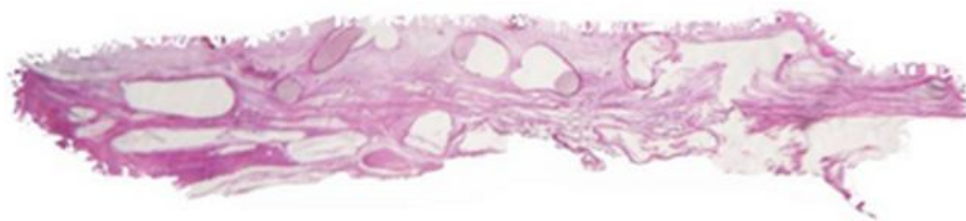


Figura 25: Enxerto ósseo com 30 dias de maturação usando o corante Picro-sírius em parafina.

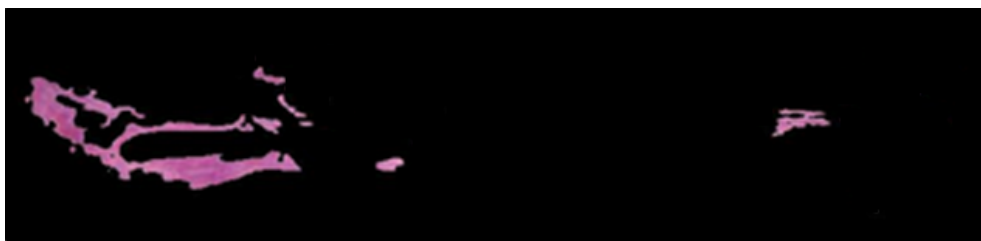


Figura 26: Classe referente à neoformação óssea após a segmentação em seis classes da Figura 25.

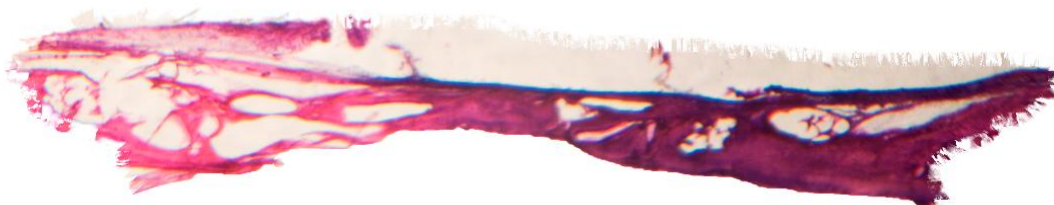


Figura 27: Enxerto ósseo com 45 dias de maturação usando o corante Picro-sírius em parafina.



Figura 28: Classe referente à neoformação óssea após a segmentação em seis classes da Figura 27.

4.2. Segmentação com três classes

Algumas imagens apresentaram bons resultados com uma segmentação utilizando apenas três classes.

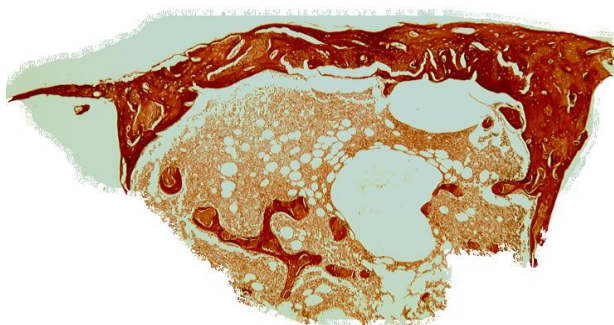


Figura 29: Enxerto ósseo usando o corante Picro-sírius.

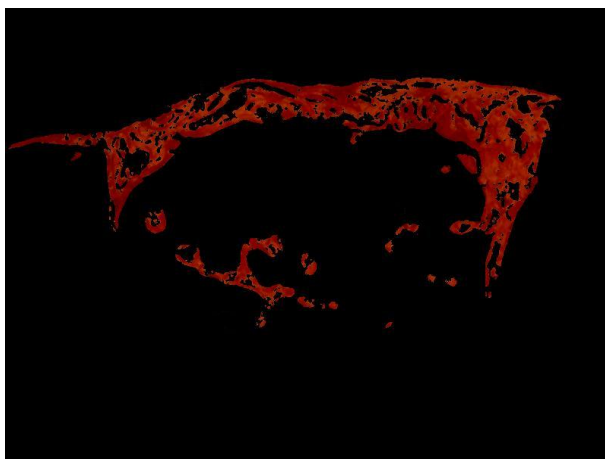


Figura 30: Classe referente à neoformação óssea após a segmentação em três classes da Figura 29.



Figura 31: Enxerto ósseo com 30 dias de maturação usando o corante Picro-sírius.



Figura 32: Classe referente à neoformação óssea após a segmentação em três classes da Figura 31.

A Tabela 2 apresenta os tempos de processamento de cada uma das imagens apresentadas neste capítulo.

Figura	Tempo de processamento
19	5 min, 26 seg
21	3 min, 09 seg
23	3 min, 38 seg
25	3 min, 27 seg
27	4 min, 02 seg
29	4 min, 38 seg
31	4 min, 57 seg

Tabela 2: Tempo de processamento.

Uma vez obtida a classe que representa a neoformação óssea, é feita uma contagem dos pixels e o cálculo da área a partir de uma régua usada como escala. A Tabela 3 apresenta a área de cada região segmentada nas imagens deste capítulo.

Figura	Área da neoformação óssea
20	280.270,56 μm^2
22	10.232,63 μm^2
24	15.700,12 μm^2
26	14.763,89 μm^2
28	28.613,43 μm^2
30	138.775,26 μm^2
31	190.017,80 μm^2

Tabela 3: Área calculada de cada região.

A Tabela 4 apresenta o resultado da percentagem de *pixels* classificados corretamente, conforme descrito na seção 3.4.

Figura	Pixels classificados corretamente
20	100%
22	90%
24	100%
26	90%
28	80%
30	100%
31	100%

Tabela 4: Percentagem de pixels classificados corretamente.

No grupo de quinze imagens segmentadas enviadas para a análise dos especialistas, a taxa de *pixels* classificados corretamente ficou em torno de 93,3%.

4.3. Segmentação sem a etapa do *watershed*

A Figura 33 apresenta um exemplo sem a utilização do *watershed*, apenas com a utilização do k-médias.

De acordo com o especialista, a imagem com menor nível de ruído se aproxima mais da região correspondente à neoformação óssea. Por isso, a etapa de segmentação do *watershed* foi importante para alcançar melhores resultados.



Figura 33: Classe (sem aplicação do *watershed*) correspondente à Figura 31.



Figura 34: Classe (com a aplicação do *watershed*) correspondente à Figura 31.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Neste trabalho foi apresentado um método de segmentação não-supervisionada de imagens que sofreram processo de regeneração óssea através da aplicação de enxertos ósseos, realizando a detecção e o cálculo da área da região de interesse, conforme descrito na seção 1.2.

A crescente utilização de métodos computacionais na área de saúde e a necessidade de automação do processo de delimitação de regiões de estudo em imagens médicas ajudaram a proporcionar a criação deste trabalho.

Para alcançar os objetivos propostos, foi feito um estudo com alguns dos principais algoritmos de segmentação a fim de encontrar uma melhor forma de isolar a região de interesse nas imagens usadas nesta pesquisa.

Foi então desenvolvido um novo método de segmentação que utiliza os algoritmos *watershed* e k-médias. Eles estão entre os mais bem conceituados segmentadores e apresentaram ótimos resultados nos testes realizados em imagens de enxertos ósseos.

Ao utilizar uma combinação desses dois algoritmos, pôde-se obter um melhor aproveitamento do que cada um tem de melhor. Foi possível usar o k-médias para agrupar as regiões resultantes do *watershed*, reduzindo assim o efeito de super-segmentação.

Além de segmentar, é importante também identificar a classe que representa a região de interesse, para isso foi realizada uma análise das imagens resultantes utilizando o sistema de cores HSL. Isso foi possível visto que a região óssea que foi regenerada apresenta-se com uma coloração característica devido às aplicações de corantes próprios para este fim.

Os resultados foram bem avaliados e aprovados por especialistas, que vêem nele uma ferramenta extremamente útil para trabalhos futuros na área de histologia que agora poderão avaliar quantitativamente os efeitos de diferentes substâncias e técnicas na aceleração da recuperação óssea.

Esta segmentação também proporcionou um ganho de tempo em relação ao método tradicional, já que agora pode ser executada em poucos minutos. Um tempo bem menor do que o método manual que poderia levar vários minutos, ou até horas em imagens mais complexas. Fato este que acaba promovendo um ganho de produtividade ao pesquisador que passa a obter o resultado de sua pesquisa em menos tempo.

A segmentação foi testada em todo o banco de 67 imagens fornecido pelos pesquisadores, que continham imagens de enxertos ósseos de vários períodos de maturação e com a aplicação dos principais tipos de corantes, e foi possível segmentar e identificar em todas elas a região esperada.

Desse modo, o método de segmentação deste presente trabalho conseguiu alcançar os objetivos específicos propostos na seção 1.2, como forma de chegar ao objetivo inicialmente proposto.

Esse método de segmentação de imagens proporcionou as seguintes vantagens:

1. Separação automática baseada na cor entre o osso neoformado e os demais elementos como osso antigo e material exógeno;
2. Segmentação realizada de forma menos subjetiva;
3. Resultado comparável à de um pesquisador;
4. Alta velocidade de segmentação em comparação ao tempo gasto na segmentação manual.

O método proposto permite uma análise mais precisa e imparcial dos resultados, uma vez que a segmentação correspondente aos diferentes elementos da imagem dispensa totalmente o método manual, que era tradicionalmente realizada pelo pesquisador ou avaliador. Portanto, os erros inerentes às interferências humanas no processo são minimizados.

A contagem de *pixels* nas imagens para o cálculo da área possibilita mensurar a evolução da área óssea neoformada de uma forma exata, em vez da simples avaliação visual. Isto torna a avaliação dos resultados da pesquisa ainda menos subjetiva.

5.1. Trabalhos Futuros

Apesar dos testes realizados já tiverem alcançado o seu objetivo geral, ainda é possível melhorar a segmentação da região de interesse encontrando de forma automática o número ideal de classes em cada segmentação. Nesta pesquisa este valor foi encontrado dentro de um intervalo entre cinco e dez, onde os valores seis e sete foram os mais bem avaliados.

Já que este valor pode variar dependendo de cada imagem, a escolha de um número de classes com base na análise automática da imagem faria com que o segmentador pudesse atingir um grau de eficiência ainda maior.

Como uma forma de fazer com que este método seja amplamente utilizado também é proposta a criação de uma ferramenta completa para que os pesquisadores possam visualizar a neoformação óssea no momento da captura pelo microscópio no próprio laboratório.

6. REFERÊNCIAS

- [ALMEIDA, 2006] Almeida, J.; et al. Estudo do efeito do plumbum matellicum 30ch na reparação óssea em mandíbula de ratos sem barreira mecânica. *Ciênc. Odontol. Bras.*, São José dos Campos, v. 9, n. 1, p. 69-76, 2006.
- [ANDEREGG, 1991] Anderegg, C. R.; et al. "Clinical evaluation of the use of decalcified freeze-dried bone allograft with guided tissue regeneration in the treatment of molar furcation invasions", *J. Periodontol.*, v. 62, n. 4, p. 264-268, Apr. 1991.
- [ANDIA, 2006] Andia, D. C.; Cerri, P. S.; Spolidorio, L. C. "Tecido Ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos". *Revista de Odontologia da UNESP, São Paulo*, v. 35, n. 2, p. 191-198, 2006.
- [ANTA, 2007] P. Anta, P. Carrión and A. Formella. "Combining Region and Edge Information to Extract Fish Oocytes in Histological Images". *The Seventh IASTED*, 2007.
- [BECKER, 1995] Becker, W.; et al. "Human demineralized freeze-dried bone: inadequate induced bone formation in athymic mice", A preliminary report. *J. Periodontol.*, v. 66, n. 9, p. 822-828, Sept. 1995.
- [BECKTOR, 2008] Becktor, J. P.; et al. "The use of particulate bone grafts from the mandible for maxillary sinus floor augmentation before placement of surface-modified implants: results from bone grafting to delivery of the final fixed prosthesis", *J Oral Maxillofac Surg, Philadelphia*, v. 66, n. 4, p. 780-786, 2008.
- [BEUCHER, 1979] Beucher, S.; Lantuéjoul, C. Use of watersheds in contour detection. In *International workshop on image processing, real-time edge and motion detection*, 1979.
- [CANNY, 1986] Canny, J. "A computational approach to edge detection", *IEEE Transaction on Pattern Anal. Machine. Intell.*, vol PAMI-8, pp. 679-698, Mar. 1986.
- [CEZAR, 2002] Júnior César, S.; Sasson S. "Biologia – Seres vivos, estruturas e função", Editora Saraiva, vol. 2, p. 47-48, 2002.

- [CIE, 1986a] CIE. Calorimetry. CIE Pub. 15.2, 2nd Ed., Commission International de L'Eclairage, Vienna, pp. 29-30, 1986.
- [CIE, 1986b] CIE. Calorimetry. CIE Pub. 15.2, 2nd Ed., Commission International de L'Eclairage, Vienna, pp. 56-58, 1986.
- [DUALIBI, 1993] Dualibi, S. E.; Moretti, F. F.; Issas, G. A. "Reconstrução óssea com o complexo bicerâmica-colágeno", Estudo clínico em 128 pacientes. Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent. v. 47, n. 3, 1043-1047, maio/jun. 1993.
- [FERNANDEZ-GONZALEZ, 2004] Fernandez-Gonzalez, R.; Deschamps, T.; Idica, A. K.; Malladi, R.; Solorzano, C. O. "Automatic segmentation of histological structures in mammary gland tissue sections". Journal of Biomedical, pp. 444, 2004.
- [GONZALEZ, 2001a] Gonzalez, R. C.; Woods, R. E. "Digital Image Processing", Prentice Hall. ISBN: 0-201-18075-8, pp. 617-626, 2001.
- [GONZALEZ, 2001b] Gonzalez, R. C.; Woods, R. E. "Digital Image Processing", Prentice Hall. ISBN: 0-201-18075-8, pp. 619, 2001.
- [JUNQUEIRA, 1999] Junqueira, L. C. U.; Carneiro, J. "Histologia Básica", Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p. 427.
- [KELLY, 2001] Kelly, C. M.; et al. "The use of a surgical grade calcium sulfate as a bone graft substitute: results of a multicenter trial. Clin. Orthop", v. 382, p. 42-50, Jan. 2001.
- [LIMEIRA JUNIOR, 2003a] Limeira Júnior, F. A.; et al. "Assessment of Bone Repair following the use of Anorganic Bone Graft and Membrane associated or not to 830nm Laser Light", Proc. SPIE, v. 4950, p.30-36, June 2003.
- [LIMEIRA JUNIOR, 2003b] Limeira Júnior, F. A.; et al. "Effect of bovine bone grafts on the bone healing process – an experimental study", R. Bras. Ciênc. Saúde, v. 7, n. 2, p44, 2003.
- [LOCKHART, 2001] Lockhart, R.; Ceccaldi, J.; Bertrand, J. C. "Postoperative maxillary cyst following sinus bone graft: a case report of a case", Int. J. Oral Maxillofac. Implants, v. 15, n. 4, p. 583-586, July/Aug. 2001.

- [MACQUEEN, 1967] MacQueen, J. B. Some methods for classification and analysis of multivariate observations. *Proceedings of the Fifth Symposium on Math, Statistics, and Probability*, p. 281-297, Berkeley, CA: University of California Press, 1967.
- [NAVON, 2005] Navon, E.; Miller, O.; Averbuch, A. “Color image segmentation based on adaptive local thresholds”, *Image and Vision Computing*. Elsevier. ISSN: 0262-8856. vol 23, pp. 69-85, Jan. 2005.
- [ORTIZ, 2006] Ortiz, A.; Oliver, G., “On the use of the overlapping area matrix for image segmentation evaluation: A survey and new performance measures”, *Pattern Recognition Letters*, v. 27, pp. 1916-1926, 2006.
- [PETUSHI, 2004] Petushi, S.; Katsinis, C.; Coward, C.; Garcia, F.; Tozeren, A. “Automated Identification of Microstructures on Histology Slides”. *Biomedical Imaging: Nano to Macro, 2004. IEEE International Symposium*, pp. 424-427, Mar. 2004.
- [QUEIROGA, 2008] Queiroga, A. S.; Sousa, F. B.; Araújo, J. M. S.; Santos, S. D.; Sousa, C. D.; Quintans, T. C.; Almeida, T. P.; Nonaka, C. F. W.; Batista, L. V.; Limeira Júnior, F. A. “Evaluation of the Bone Repair in Femur of Rats Submitted To Laser Therapy in Different Wavelengths and Images”. *Laser Physics Letters*, v. 9, p. 71-79, 2008.
- [RABIE, 2000] RABIE, A. B. M. “Clinical applications of composite intramembranous bone grafts”, *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.*, v. 117, n.4, 375-383, Apr. 2000.
- [RATNER, 2004] RATNER, B. D.; et al. “Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine”, Elsevier Academic Press. ISBN: 0-12-582463-7, pp. 10, 2004.
- [RIOS, 1996] RIOS, A. L. B. B.; et al. “Comportamento biológico de implantes de osso bovino anorgânico em arco zigomático de ratos”, *Estudo histológico. Rev. Odontol. Univ. Est. São Paulo, São Paulo*, v. 25, n. esp., p. 87-101, 1996.
- [SCHENK, 1996] Schenk, R. K. *Regeneração Óssea: Bases Biológicas*. In: BUSER, D.; DAHLIN, C; et al. “Regeneração Óssea Guiada na Implantodontia”, Hong Kong: Quintessence, 1996. *Regeneração Óssea: Bases Biológicas*, v.1, p. 269.

- [SMITH, 1978] Smith, A. R. “Color Gamut Transform Pairs”, *Computer Graphics* 12, pp. 12-19, vol 3, Ago. 1978.
- [TABESH, 2007] Tabesh, A.; Teverovskiy, M.; Pang, H.; et al. “Multifeature Prostate Cancer Diagnosis and Gleason Grading of Histological Images”. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, vol. 26, n. 10, Out. 2007.
- [TAGA, 1996] Taga, R.; Mulatinho, J. “Aplicação de osseobond e biohapatita em caso de colocação imediata de implante de titânio. Estudo clínico e histológico”, *Revista Brasileira de Implantodontia, Brasil*, n. 4, p. 11-15, 1996.
- [VINCENT; SOILLE, 1991] Vincent, L.; Soille, P. “Watershed in digital space: an efficient algorithm based on immersion simulation”, *IEEE Trans. Pattern Anal. Machine. Intell.*, vol 13, pp. 583-598, Jun. 1991.
- [WANG, 2007] Wang, Y.; Tuner, R.; et al. “Investigation of Methodologies for the Segmentation of Squamous Epithelium from Cervical Histological Virtual Slides”. *IMVIP 2007*, pp. 83-90, 2007.
- [WIEGELL, 2003] Wiegell, M. R.; Tuch, D. S.; Larsson, H. B. W.; Wedeen, V. J. “Automatic segmentation of thalamic nuclei from diffusion tensor magnetic resonance imaging”. *Neuroimage*, 2003.
- [ZHANG, 2010] Zhang, L.; Deng, X. “The Research of Image Segmentation Based on Improved Neural Network Algorithm”, *2010 Sixth International Conference on Semantics*, p. 395-397, 2010.