

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE SANTA
CATARINA
CÂMPUS FLORIANÓPOLIS
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE METAL MECÂNICA
BACHARELADO EM ENGENHARIA MECATRÔNICA

FERNANDO HENRIQUE DE ALMEIDA GOMES

**Desenvolvimento de um sistema de software
para contagem de vasos em pesquisa de angiogênese**

Florianópolis, 2019

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE SANTA
CATARINA
CÂMPUS FLORIANÓPOLIS
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE METAL MECÂNICA
BACHARELADO EM ENGENHARIA MECATRÔNICA

FERNANDO HENRIQUE DE ALMEIDA GOMES

**Desenvolvimento de um sistema de software
para contagem de vasos em pesquisa de angiogênese**

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido ao Instituto Federal de
Educação, Ciência e Tecnologia de Santa
Catarina como parte dos requisitos para
obtenção do título de Bacharel em
Engenharia Mecatrônica.

Professor Orientador: Maurício Edgar
Stivanello, Dr. Eng.

Florianópolis, 2019

Ficha de identificação de obra elaborada pelo autor.

Gomes, Fernando Henrique de Almeida
Desenvolvimento de um sistema de software para contagem de vasos em pesquisa de angiogênese / Fernando Henrique de Almeida Gomes; Orientação de Maurício Edgar Stivanello. – Florianópolis, SC, 2019.
60 p.
Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina, Campus Florianópolis. Bacharelado em Engenharia Mecatrônica. Departamento Acadêmico de Metal Mecânica.
Inclui Referências.
1. Sistema de visão computacional. 2. Inspeção automatizada. 3. Angiogênese. 4. Esqueletonização.
I. Stivanello, Maurício Edgar. II. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina. III. Desenvolvimento de um sistema de software para contagem de vasos em pesquisa de angiogênese

DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE SOFTWARE PARA CONTAGEM DE VASOS NA PESQUISA DE ANGIOGÊNESE

FERNANDO HENRIQUE DE ALMEIDA GOMES

Este trabalho foi julgado adequado para a obtenção do Título de Bacharel em Engenharia Mecatrônica e aprovado na sua forma final pela banca examinadora do Curso de Bacharelado em Engenharia Mecatrônica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina.

Florianópolis, 3 de julho de 2019

Banca Examinadora:

Maurício Edgar Stivanello, Dr. Eng. (orientador)

Francisco Edson Nogueira de Melo, Me. Eng.

Valdir Noll, Dr. Eng.

Leandra Formentão, Bióloga, M.Sc.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE SANTA CATARINA
CAMPUS FLORIANÓPOLIS

DECLARAÇÃO DE FINALIZAÇÃO DE CURSO

Declaro que o estudante **FERNANDO HENRIQUE DE ALMEIDA GOMES**, matrícula nº 1420013360, do curso de Engenharia Mecatrônica, defendeu o trabalho intitulado **DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE SOFTWARE PARA CONTAGEM DE VASOS EM PESQUISA DE ANGIOGÊNESE**, o qual está apto a fazer parte do banco de dados da Biblioteca Hercílio Luz do Instituto Federal de Santa Catarina, Câmpus Florianópolis.

Florianópolis, 13 de agosto de 2019.



.Prof. Orientador do TCC: Maurício Edgar Stivanello

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e familiares, em especial Ricardo Henrique Nader Gomes, Adriana Kivel Vasconcelos e Roberta Patrícia Garcia de Almeida, por me ajudarem a me tornar quem sou hoje e sempre me apoiarem e incentivarem a crescer. Sem suas cobranças e ensinamentos eu não poderia estar aqui agora.

Agradeço também à minha namorada Florencia, pelo apoio nas horas de dificuldade e por sempre estar ao meu lado quando mais preciso dela e por ser esta pessoa incrível. Obrigado por fazer parte da minha vida.

Aos meus amigos Matheus Golfetto Bento e Henrique Silveira Steinmetz, por me distraírem com jogos e conversas divertidas, mantendo minha sanidade durante todo este tempo. Vocês são loucos.

Aos meus amigos e colegas da engenharia mecatrônica, que viraram muitas noites comigo estudando. Em especial ao Diego Pasquali Romani e Gustavo Fernandes, por me aturarem por todos estes 5 anos todos os dias. Deixando de ficar com amigos e familiares para estudarem comigo.

Ao professor Mauricio Edgar Stivanello, por tudo que me ensinou durante o curso e pela oportunidade de ser seu orientado. Graças ao senhor pude crescer muito, tanto como acadêmico, como profissional e como pessoa.

Ao Professor Paulo Fernando Dias pela oportunidade e toda a ajuda e suporte que me deu durante todo o percurso. Sem o senhor, este projeto jamais teria chego onde chegou. Agradeço pela bondade e a ajuda mesmo que fosse de última hora. Sempre com um sorriso e bom humor, o senhor salvou este projeto mais vezes do que posso contar.

À Leandra Formentão por criar a ponte entre os cursos, permitindo que este trabalho exista. Além de fazer parte da banca avaliadora.

Agradeço também à Profa. Dra. Evelise Maria Nazari por emprestar o laboratório para a aquisição das fotos originais.

Por fim agradeço a todos os professores e funcionários do IFSC que contribuíram com a minha formação.

“Ninguém existe por um propósito. Ninguém pertence a lugar nenhum. Todo mundo vai morrer ... Venha assistir TV”

(Morty Smith – Rick e morty)

RESUMO

Novos fármacos devem passar por testes que verificam seus efeitos sobre o desenvolvimento do sistema vascular. Para realizar tais testes, é comum que estes fármacos sejam postos em um *pellet* e então sejam inseridos em um ovo de galinha fecundado. Neste ovo são testados os efeitos dos fármacos sobre o desenvolvimento do embrião. Para verificar a receptibilidade e efeitos do fármaco, é aberta uma pequena janela no ovo e então ele é posto em um microscópio especializado para que sejam contados manualmente todos os vasos sanguíneos que se conectaram ao *pellet*. Porém, esta tarefa se mostra laboriosa e improdutiva. Diante deste cenário, é proposto o desenvolvimento de um sistema empregando visão computacional capaz de, a partir de fotos tiradas do microscópio, automatizar a rotina de análise das imagens adquiridas das amostras adquiridas. Para tal foi desenvolvido um método de esqueletonização e contado os vasos em torno do pellet assim como a densidade de vasos e o número de vasos por milímetro no pellet. Assim foi feito um sistema que conseguiu contabilizar de forma confiável os dados requisitados.

Palavras-chave: Engenharia Mecatrônica, Angiogênese, Visão Computacional, Programação.

ABSTRACT

New drugs must undergo tests that verify their effects on the development of the vascular system. To perform such tests, it is common for these drugs to be placed in a pellet and then inserted into a fertilized chicken egg. In this egg the effects of the drugs on embryo development are tested. To check for drug receptivity and effects, a small window is opened in the egg and then placed under a specialized microscope to manually count all blood vessels that have connected to the pellet. However, this task is laborious and unproductive. Given this scenario, it is proposed to develop a system employing computer vision capable of automating the routine of analysis of acquired images from acquired samples. For this, a skeletonization method was developed and the vessels around the pellet counted as well as the vessel density and the number of vessels per millimeter in the pellet. Thus was made a system that could reliably count the requested data.

Key-words: Mechatronics Engineering, Angiogenesis, Computational Vision, Programming.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração de angiogênese	4
Figura 2 – Tipos de células durante a angiogênese	5
Figura 3 - Diferença entre intussuscepção e angiogênese	6
Figura 4 - Exemplo de intussuscepção e angiogênese em embrião de galinha.....	6
Figura 5 – Representação de uma imagem digital	7
Figura 6 - Exemplo de cores em diferentes espaços	8
Figura 7 - Gráfico da binarização	9
Figura 8 - Gráfico de truncagem.....	10
Figura 9 - Exemplo de aplicação de métodos de limiarização simples	10
Figura 10 - Comparativo de técnicas de limiarização adaptativa	11
Figura 11 - Exemplo de erosão	13
Figura 12 - Exemplo de dilatação.....	14
Figura 13 - Exemplo de Esqueletonização	14
Figura 14 - Algoritmo de contabilização de vasos no perímetro do pellet	18
Figura 15 - Exemplo de imagem binarizada	19
Figura 16 - Limiarização adaptativa simples	20
Figura 17 - Limiarização adaptativa gaussiana	21
Figura 18 - Resultado da variação do número de iterações da esqueletonização	22
Figura 19 - Algoritmo de calculo da concentração de vermelho.....	22
Figura 20 – Janela principal da aplicação	24
Figura 21 - Interface de aquisição de dados	24
Figura 22 – Janela de visualização	26
Figura 23 - Configurações de esqueletonização	27
Figura 24 - Estatísticas adicionais sobre a amostra analisada.....	28
Figura 25 - Configuração de ROI	29

Figura 26 - Realização dos cálculos e exibição dos resultados	29
Figura 27 - Equipamento de aquisição de imagens do laboratório LRDA/CCB/UFSC	31
Figura 28 - Incubadora e ovos com abertura de visualização do desenvolvimento embrionário	32
Figura 29 – Microscópio e ovo com janela expandida.....	33
Figura 30 - Amostra de dado original	34
Figura 31 – Resultados de limiarização	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Operação Lógica E.....	12
Tabela 2 - Operação Lógica OU.....	13
Tabela 3 - Operação Lógica NÃO	13
Tabela 4 - Lista de equipamentos	30
Tabela 5 - Comparativo de amostragem para vasos no perímetro do pellet	35
Tabela 6 - Comparativo de amostragem para densidade de vasos em uma imagem	36
Tabela 7 - Requisitos funcionais	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BEG	Departamento de biologia celular embriologia e genética
CCB	Centro de Ciências Biológicas
CI	Circuito integrado
CMYK	<i>Cian, Magenta, Yellow and Black</i>
IFSC	Instituto federal de Santa Catarina
LEBIMA	Laboratório de Estudos em Bioatividade e Morfogênese Animal
LRDA	Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal
MDI	<i>multiple document interface</i>
RGB	<i>Red, Green, Blue</i>
ROI	<i>region of interest</i>
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UI	<i>User Interface</i>

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Fórmula do processo de binarização	9
Equação 2 - Formula do processo de truncagem.....	10
Equação 3 - Limiarização adaptativa simples	11
Equação 4 – Cálculo da concentração de vermelho	23
Equação 5 - Cálculo de Vasos por milímetro	23
Equação 6 – Definição de variável C	27
Equação 7 - Cálculo de densidade de vasos pelo ImageJ.....	35
Equação 8 - Calculo do erro normalizado	37

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	2
2.1.	OBJETIVO PRINCIPAL	2
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
3.	REFERENCIAL TEÓRICO	3
3.1.	EMBRIOLOGIA	3
3.1.1.	Angiogênese	4
3.1.2.	Intussuscepção	5
3.2.	PROCESSAMENTO DE IMAGEM	7
3.2.1.	Imagem digital	7
3.2.2.	Representação das cores	8
3.2.3.	Limiarização	9
3.2.3.1	Limiarização simples	9
3.2.3.2	Limiarização adaptativa	11
3.2.4	Operações básicas de imagem	12
3.2.4.1	Operações lógicas	12
3.2.5	Operações morfológicas	13
3.2.5.1	Erosão	13
3.2.5.2	Dilatação	14
3.2.5.3	Esqueletonização	14
3.3	TRABALHOS CORRELATOS	15
4	DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA PROPOSTO	16
4.1	REQUISITOS FUNCIONAIS E NÃO FUNCIONAIS	16
4.2	DESCRIÇÃO DAS MÉTRICAS IMPLEMENTADAS NO SISTEMA	17
4.2.1	Contabilização dos vasos no perímetro do pellet	17
4.2.2	Cálculo da concentração de vermelho	22
4.2.3	Cálculo do número de vasos por milímetro de perímetro do pellet	23
4.3	INTERFACE GRÁFICA	23
4.3.1	Telas de configuração e aquisição de dados	24
4.3.1.1	Janela de visualização	25
4.3.1.2	Configuração de processamento	26
4.3.1.3	Dados adicionais sobre a amostra analisada	28
4.3.1.4	Interface de usuário responsável pela configuração de ROI	29
4.3.1.5	Realização dos cálculos e exibição dos resultados	29
5	RESULTADO EXPERIMENTAIS	30
5.1	AQUISIÇÃO DE DADOS	30
5.2	RESULTADOS DO CÁLCULO AUTOMATIZADO DAS MÉTRICAS SELECIONADAS	34

5.3	DISCUSSÃO GERAL DOS RESULTADOS	36
5.3.1	Possíveis melhorias.....	40
6	CONCLUSÃO.....	41
7	REFERÊNCIAS.....	42

1. INTRODUÇÃO

A comunidade acadêmica busca desenvolver equipamentos e softwares inovadores para atender as necessidades tecnológicas do mundo contemporâneo. Sendo assim, faz-se necessário a busca de bons produtos que venham a qualificar os resultados.

Com este objetivo, e a necessidade de mensurar resultados mais fidedignos nas suas atividades laboratoriais, o Laboratório de Estudos em Bioatividade e Morfogênese Animal (LEBIMA) do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) levantou a importância do desenvolvimento de um software de visão computacional. O desafio proposto consiste em automatizar a contagem de vasos sanguíneos no perímetro de um *pellet*. Um *pellet* pode ser definido como um pequeno disco de uma substância polimérica que se dilua em meios aquosos liberando um fármaco compactado em seu meio.

A pesquisa realizada pelo laboratório LEBIMA atualmente consiste em desenvolver um método de contabilização de vasos sanguíneos em ovos de galinha fecundados. Nestes ovos são abertas janelas e inseridos os *pellets* com o intuito de estudar a formação de novos vasos sanguíneos no embrião para compreender a receptibilidade do fármaco.

Para realizar a mensuração dos dados era utilizado um método manual considerado improdutivo e muito laborioso. Desta forma, existe a necessidade de equipamentos e softwares mais eficazes, onde é possível mensurar numericamente os dados. Tendo em vista o acima descrito, propõe-se desenvolver um sistema computacional capaz de automatizar a rotina de análise das imagens adquiridas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo principal

Desenvolver um sistema de computador que automatize atividades de avaliação de amostras biológicas no contexto da pesquisa de angiogênese.

2.2. Objetivos específicos

- a) Desenvolver um algoritmo capaz de contabilizar os vasos sanguíneos no perímetro do *pellet*;
- b) Quantificar a densidade de vasos sanguíneos próximos do *pellet*;
- c) Desenvolver uma metodologia para a captura das imagens utilizadas para fins de padronização.
- d) Desenvolver uma Interface gráfica para usuário intuitiva e simples.

3. Referencial teórico

Para melhor entendimento do desenvolvimento e apresentação dos resultados é importante compreender alguns conceitos específicos. Esta seção tem como intenção sanar alguma possível dúvida conceitual antes de se iniciar o desenvolvimento em si. Na sequência são apresentadas as seções de Embriologia (3.1) e Processamento de imagem (3.2).

3.1. Embriologia

Embriologia é um ramo da biologia que estuda a formação de um embrião animal após a fecundação até a formação completa do indivíduo. A formação do indivíduo passa pelas fases de mórula, blástula e gástrula.

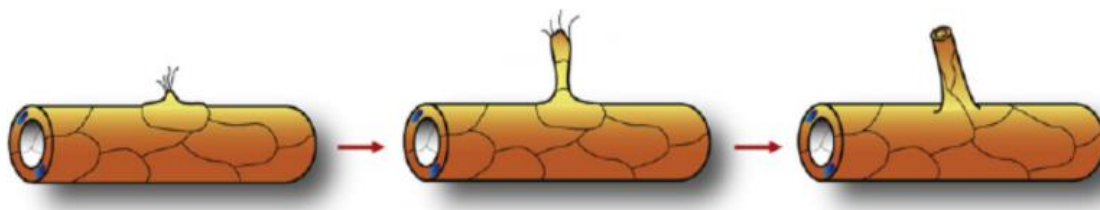
Durante o desenvolvimento do embrião são criados novos vasos sanguíneos que futuramente se tornarão veias e artérias. Estes vasos podem ser definidos como estruturas constituídas basicamente de uma monocamada de células endoteliais, as quais se interconectam para formar tubos que viabilizam o fluxo do sangue e a perfusão tecidual no organismo (Tobelem, 1990; Sweeney, 1998). Na sequência são apresentados mais detalhes sobre os dois processos (Angiogênese e Intussuscepção).

3.1.1. Angiogênese

O termo angiogênese, também conhecido como “brotamento”, foi adotado em 1935 inicialmente, para descrever a formação de vasos sanguíneos presentes na placenta (HERTIG, 1935). É um termo utilizado atualmente para descrever o mecanismo de crescimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos já existentes criados por outra angiogênese ou uma vasculogênese.

Na eventual causalidade de uma hipóxia (falta de oxigênio em alguma região do corpo) é então iniciando um processo de angiogênese, onde há o crescimento de um novo capilar e este se estende até a região obstruída. A Figura 1 é uma ilustração que exemplifica o crescimento destes vasos.

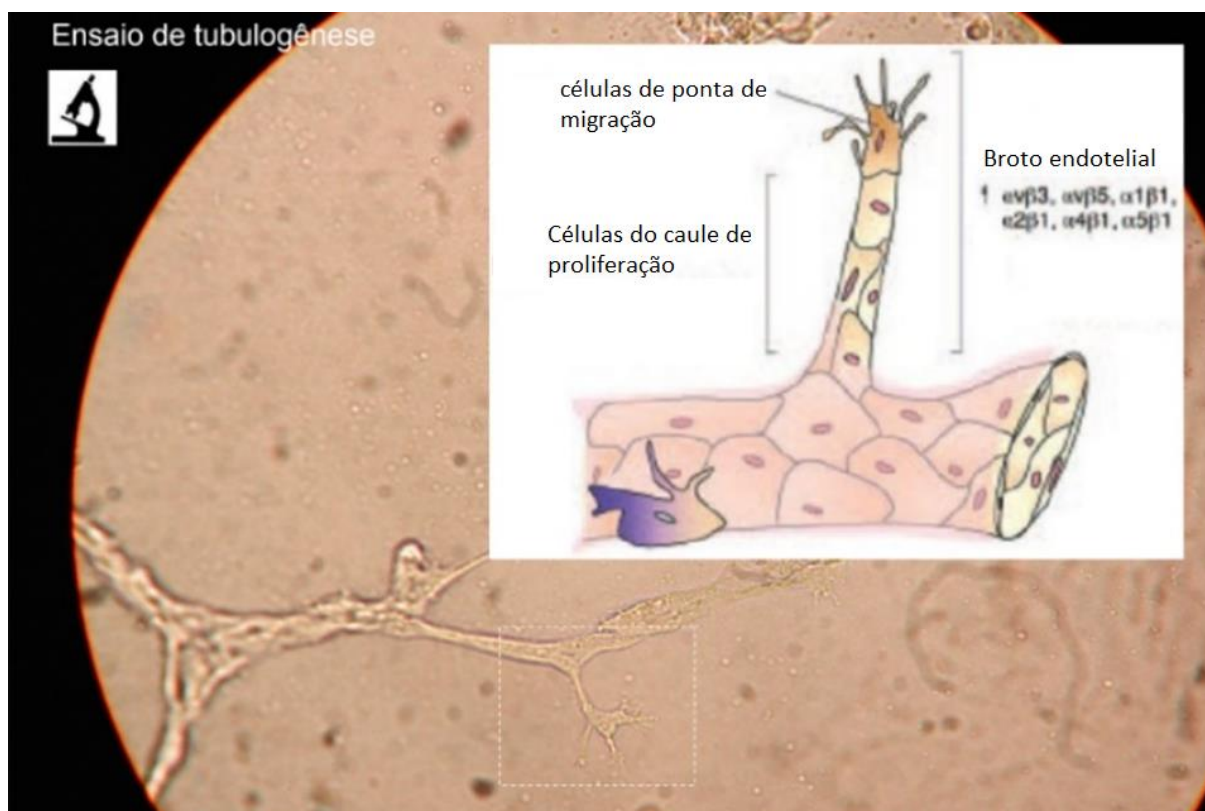
Figura 1 - Ilustração de angiogênese



Fonte: Notas de aula do Prof. Dr. Paulo Fernando Dias

Como visto no modelo este processo possui duas regiões diferentes: a “ponta”, célula de ponta de migração, e o “corpo” do vaso, células de Deiters ou células falangeais. Estas partes podem ser mais facilmente vistas na Figura 2 junto de um exemplo visto em microscópio:

Figura 2 – Tipos de células durante a angiogênese



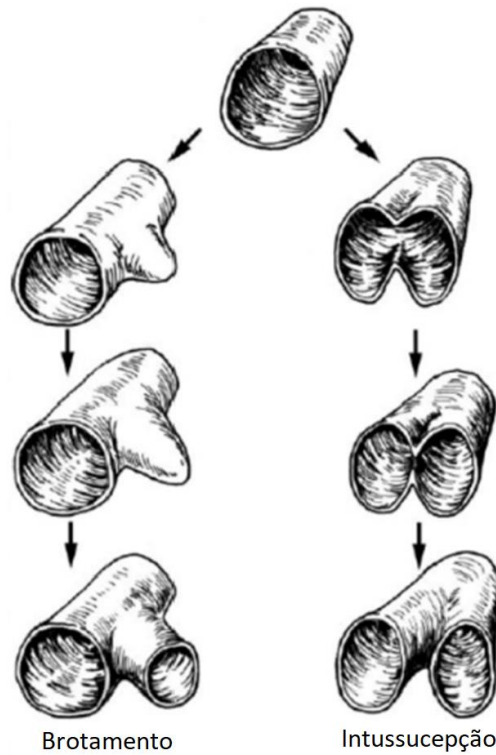
Fonte: Editada das notas de aula do Prof. Dr. Paulo Fernando Dias

Estes métodos de proliferação dos vasos não são os únicos existentes, apenas os mais importantes para este trabalho. Um último processo importante é a Intussuscepção.

3.1.2. Intussuscepção

A intussuscepção é a divisão de um vaso sanguíneo graças ao atrito do sangue dividindo uma capilaridade em duas que saem inicialmente em paralelo. Mais abaixo pode-se ver na Figura 3 os processos de angiogênese e intussuscepção que serão os mais abordados no trabalho.

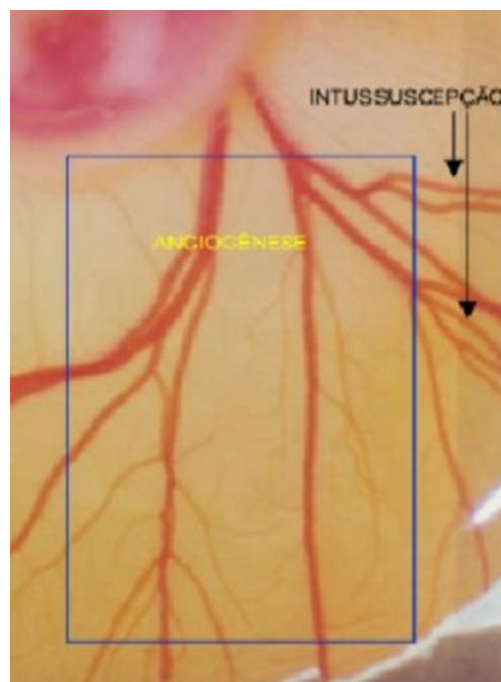
Figura 3 - Diferença entre intussuscepção e angiogênese



Fonte: Editada de Prior, Yang, & Terjung (1985)

Na Figura 4 pode-se ver os dois processos em um caso real de um embrião de galinha:

Figura 4 - Exemplo de intussuscepção e angiogênese em embrião de galinha



Fonte: Notas de aula do Prof. Dr. Paulo Fernando Dias

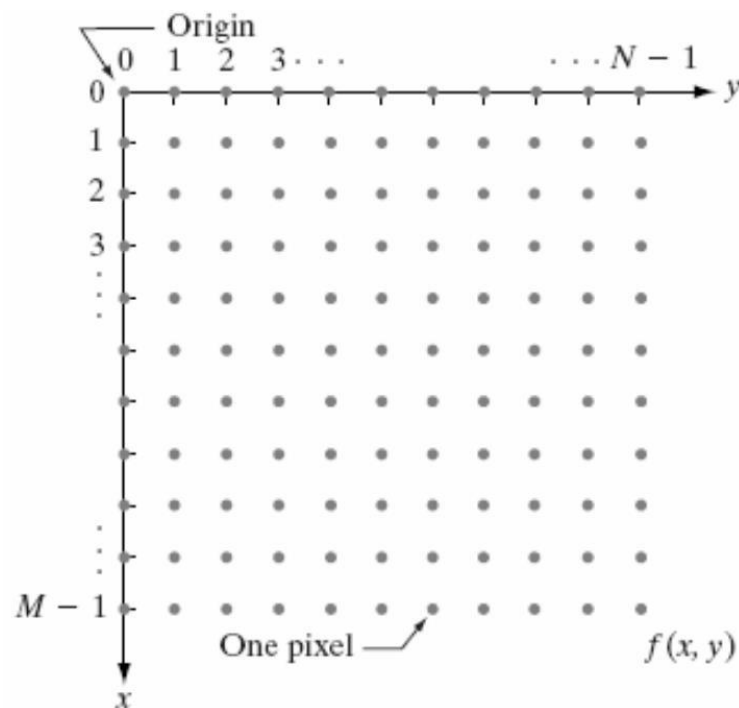
3.2. Processamento de imagem

Para que se obtenha melhor entendimento do trabalho em si é necessário compreender conceitos básicos relacionados a imagens digitais, como são representadas e como são realizados os processamentos sobre as mesmas.

3.2.1. Imagem digital

Uma imagem digital pode ser descrita como uma função $f(x,y)$ onde cada par (x,y) é chamado de pixel e possui seu conjunto de características, uma imagem bidimensional feita a partir de números binários (valor de 0 ou 1 chamado de bit) codificados de tal forma para garantir sua transferência, impressão, armazenamento e visualização. Pode-se ver, na Figura 5, um exemplo de como a imagem digital pode ser representada.

Figura 5 - Representação de uma imagem digital



Fonte: Santiago (2009)

A imagem digital pode ser representada através de dois tipos distintos: matricial ou vetorial. O tipo vetorial é baseado em uma representação matemática e parâmetros que formam cada objeto. A matricial funciona, como o nome dá a entender, como uma matriz. Os bits se organizam de forma a gerar uma matriz, onde cada intervalo regular de bits separa um pixel. Cada pixel pode ser representado na

forma de um conjunto variado e bits, dependendo do método de representação das cores na imagem.

3.2.2. Representação das cores

Em uma imagem, as cores podem ser representadas de múltiplas formas variando o significado e ordem dos dados. Estas formas de representação são chamadas também por espaços de cor.

No espaço RGB (do inglês *Red*, *Green* e *Blue*, traduzindo, vermelho, verde e azul) é um modelo comumente utilizado onde cada pixel é separado em 3 bytes (8 bits) representando a intensidade das 3 cores. Neste formato cada cor é representada em valores que vão de zero (00000000), representando a ausência daquela cor, a 255 (11111111) representando a totalidade da cor. Desta forma uma imagem com o formato [255, 0, 0], por exemplo, seria um vermelho “puro” e uma imagem com um valor [0, 0, 0], o preto. Desta forma é possível criar 16.777.216 ou 256^3 cores diferentes.

Existe um outro tipo de espaço, chamado de espaço de cor cinza, que é o de tons de cinza, onde cada pixel possui apenas um byte que representa o valor de cinza, onde 0 seria preto e 255 o branco. Este espaço é o mais utilizado para o processamento de imagem por ser mais simples e menor.

Além disto existem outros espaços de cores como o CMYK que seria equivalente ao RGB, mas com uma melhor definição de luminosidade, entre outros. Alguns exemplos destas cores e suas representações podem ser vistas na Figura 6.

Figura 6 - Exemplo de cores em diferentes espaços

GRAY = 1 SET OF DIGITS			'RGB' = 3 SETS OF DIGITS		
11111111	11100110	11001101	11111111	01100110	00110011
			00000000	01100110	11001100
			00000000	11111111	10011001
			11111111	11111111	00110011
			11111111	00000000	11001100
			01100110	11001100	11111111
			00110011	00110011	11111111
			00110011	00110011	10011001
			00000000	10011001	10011001

Fonte: Shutha (2019)

3.2.3. Limiarização

Limiarização é um algoritmo computacional que segmenta imagens em dois conjuntos distintos. Os processos de limiarização podem ser separados em simples e adaptativa.

3.2.3.1 Limiarização simples

Os processos de limiarização simples são utilizadas em imagens em tons de cinza. As mais comumente utilizadas neste trabalho são:

- Binarização
- Truncagem

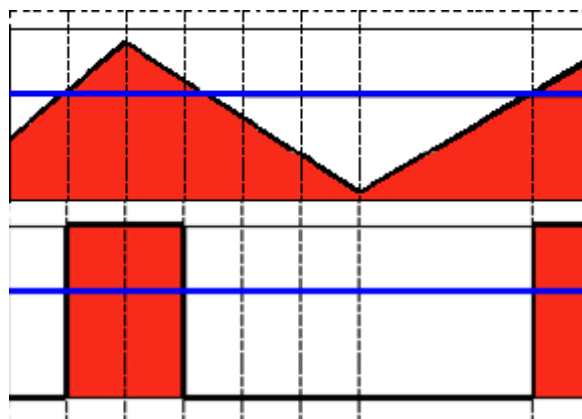
Cada um dos métodos tem como entrada a imagem de origem e um valor que serve como limiar de corte. O primeiro processo é o de Binarização que é descrito na Equação 1, gerando assim o gráfico da Figura 7.

Equação 1 - Fórmula do processo de binarização

$$Pixel_{destino} = \begin{cases} 255 & \text{se } Imagem_{original}(x, y) > LimiarDeCorte \\ 0 & \text{se não} \end{cases}$$

Fonte: Próprio autor

Figura 7 - Gráfico da binarização



Fonte: OpenCV (2019)

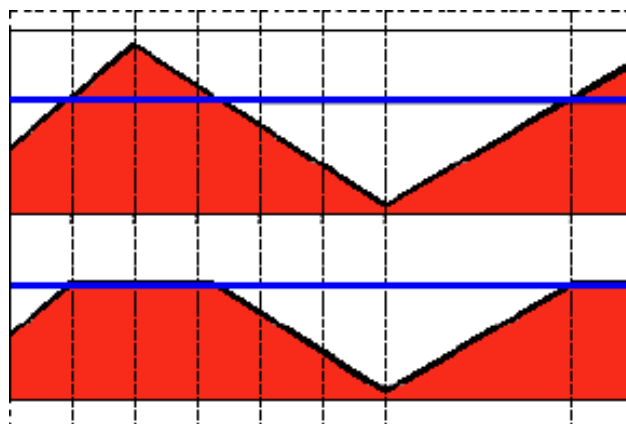
Desta forma a imagem tem um efeito preto e branco muito brusco, o que muitas vezes resulta em um efeito indesejado. Para tal problema foi criada a truncagem, cujo comportamento pode ser descrito de acordo com a Equação 2, gerando assim o gráfico da Figura 8.

Equação 2 - Formula do processo de truncagem

$$Pixel_{destino} = \begin{cases} ValorDeCorte & \text{se } Imagem_{original}(x,y) > LimiarDeCorte \\ Imagem_{origina} & \text{se não} \end{cases}$$

Fonte: Próprio autor

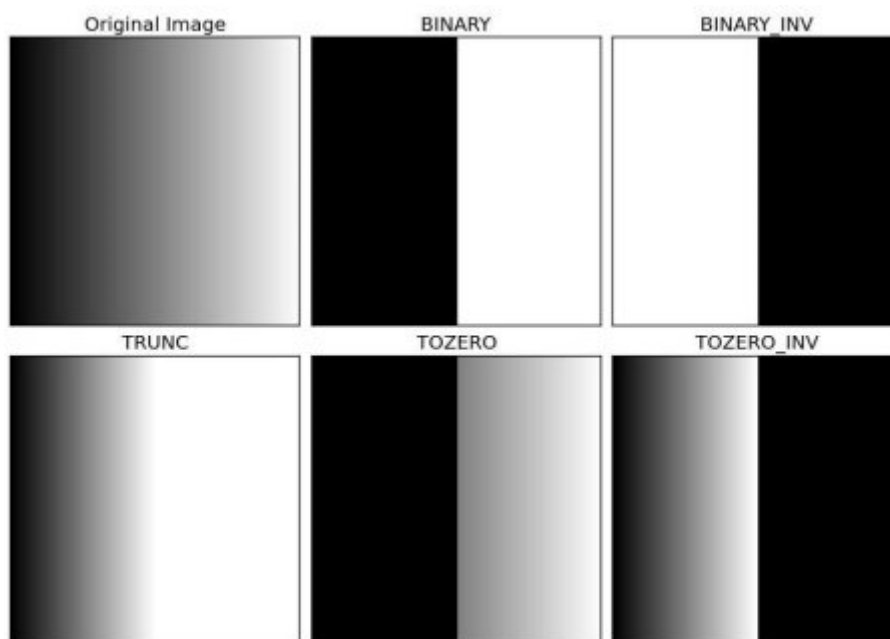
Figura 8 - Gráfico de truncagem



Fonte: OpenCV (2019)

Além dos que já foram descritos existem outros tipos de limiarização simples tais como o “ToZero” e versões invertidas dos métodos. Pode-se ver na Figura 9 o resultado da imagem original após ser submetida a estes métodos.

Figura 9 - Exemplo de aplicação de metodos de limiarização simples



Fonte: OpenCV (2019)

3.2.3.2 Limiarização adaptativa

Estes métodos, diferente dos métodos anteriores, não utilizam um limiar para calcular seus processos, mas uma área para definir o valor de cada pixel a partir de funções mais complexas.

Para tais processos geralmente utiliza-se dois tipos principais de limiarização adaptativa: a comum e a gaussiana. A limiarização adaptativa comum recebe como parâmetros uma imagem em branco e preto, o tamanho da janela e uma constante C. É então calculada para cada pixel a média dos valores de cinza dentro da janela próxima ao pixel e o valor é então reduzido em C. Desta forma o valor do pixel pode ser definido de acordo com a Equação 3.

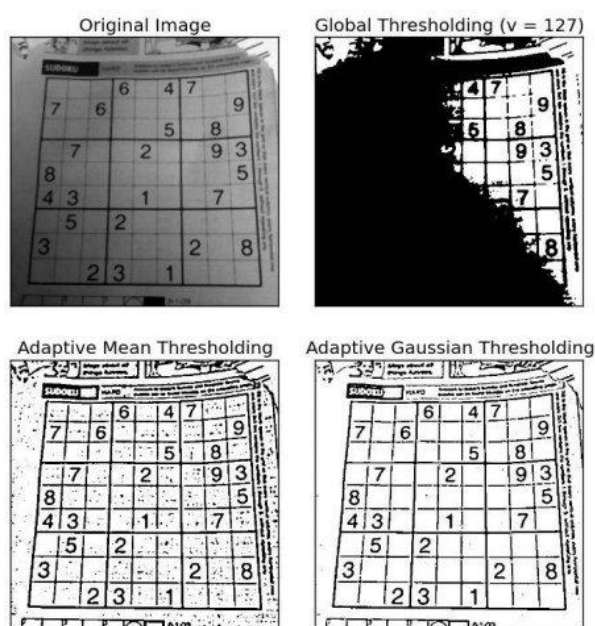
Equação 3 - Limiarização adaptativa simples

$$Pixel_{novo} = \begin{cases} 0, & Pixel_{antigo} < Média da caixa de pixels vizinhos - C \\ 255, & Pixel_{antigo} \geq Média da caixa de pixels vizinhos - C \end{cases}$$

Fonte: Próprio autor

O método gaussiano é similar, porém não é calculada a média, mas sim a soma de pesos utilizando uma curva gaussiana com centro no pixel do tamanho da janela. Na Figura 10 pode-se ver um exemplo de três limiarizações: binarizado, adaptativo comum e adaptativo gaussiano.

Figura 10 - Comparativo de técnicas de limiarização adaptativa



Fonte: OpenCV (2019)

3.2.4 Operações básicas de imagem

Sobre uma imagem binária, que possui apenas valores binários 1 ou 0, é possível utilizar operações básicas para criar o que é comumente chamado de ROI (“região de interesse”, traduzindo do inglês, *Region Of Interest*).

ROI são as regiões que realmente interessam na imagem, São recortes para eliminar os dados desnecessários. Por exemplo, na imagem do sudoku (Figura 10) pode-se desejar adquirir apenas as células dos números para então fazer um processamento destas células, descartando possíveis partes da imagem como o texto de rodapé ou o título. Para conseguir estas áreas temos como auxílio uma miríade de funções pré-existentes análogas às funções comuns das portas lógicas de CIs como “E”, “OU” e “NÃO”.

3.2.4.1 Operações lógicas

As operações lógicas, análogas às operações lógicas utilizadas em CIs, podem ser representadas como multiplicação ou soma de números binários (0 ou 1), por exemplo:

- Operação E: representada por multiplicação (*) abaixo pode-se ver na Tabela 1 a tabela-verdade da porta E.

Tabela 1 - Operação Lógica E

A	B	Resultado
0	0	0
0	1	0
1	0	0
1	1	1

Fonte: Próprio autor

- Operação OU: representada por soma (+) abaixo pode-se ver na Tabela 2 a tabela-verdade da porta OU.

Tabela 2 - Operação Lógica OU

A	B	Resultado
0	0	0
0	1	1
1	0	1
1	1	1

Fonte: Próprio autor

- Operação NÃO: Representada pela exclamação (!) abaixo, na Tabela 3, pode-se ver sua tabela-verdade.

Tabela 3 - Operação Lógica NÃO

A	Resultado
0	1
1	0

Fonte: Próprio autor

Existem ainda algumas outras operações, mas estas são as mais comuns e as que serão utilizadas no decorrer do processo.

3.2.5 Operações morfológicas

São algoritmos baseadas na alteração do formato da imagem com base em seu formato original.

3.2.5.1 Erosão

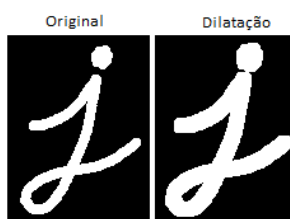
O processo de erosão é análogo à erosão do solo. Neste processo a imagem vai perdendo as bordas a cada iteração. Isso acaba afinando a forma do objeto, porém gera descontinuidades que não interessam. Pode-se ver na Figura 11 um exemplo deste processo.

Figura 11 - Exemplo de erosão*Fonte: OpenCV (2019)*

3.2.5.2 Dilatação

Dilatação seria o inverso da erosão. Neste o objeto se expande a partir de suas bordas. Este método é útil para unir regiões antes separadas. Pode-se ver a Figura 12 um exemplo deste processo.

Figura 12 - Exemplo de dilatação



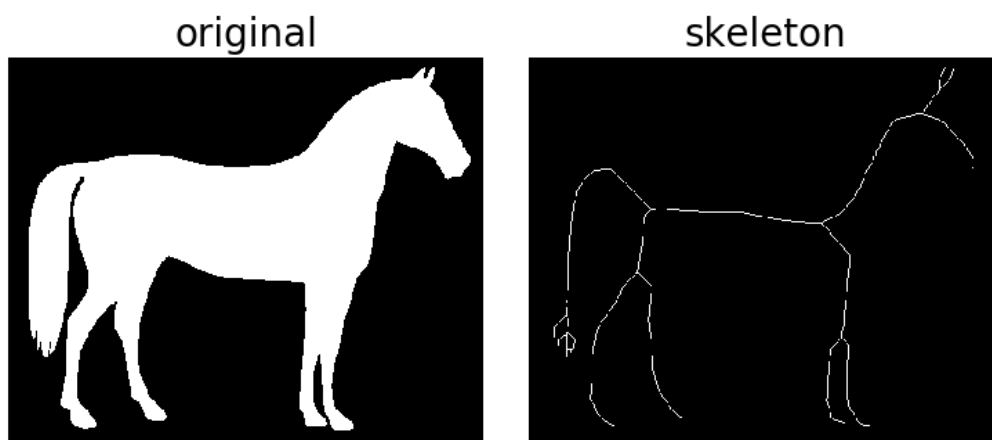
Fonte: OpenCV (2019)

3.2.5.3 Esqueletonização

O processo de esqueletonização parte de uma ROI de uma imagem binarizada passando por variados processos como: erosão, dilatação, subtração, dentre outros, com o objetivo de formar uma imagem contendo apenas um esqueleto da imagem original.

O resultado da esqueletonização é um conjunto de linhas de 1 pixel de espessura que se conectam para formar uma imagem que possa representar, através de linhas básicas ou esqueleto, o formato dos objetos na imagem. Um exemplo pode ser visto na Figura 13.

Figura 13 - Exemplo de Esqueletonização



Fonte: scikit image (2019)

3.3 Trabalhos correlatos

Com o intuito de estudar a viabilidade, assim como ter material de base e uma referência dos resultados adquiridos, foi realizada uma busca na literatura de processamento de imagens realizando esqueletonização de vasos sanguíneos. Esta seção relaciona alguns dos trabalhos encontrados.

No trabalho de Doukas e colaboradores (2006) foi desenvolvido um método de contagem do comprimento, densidade e número de ramificações existentes em uma imagem. Para tal fora realizado um processo de esqueletonização e adquiridos os dados. Os resultados das 25 amostras foram comparados com a contagem de especialistas e foi adquirido uma média de erro de 5% em comparação com o resultado humano de 7% de erro.

Meiburger e colaboradores (2016) criaram um sistema utilizando imagens acústica. Fora criado um sistema de esqueletonização tridimensional para então serem adquiridas uma sequência de métricas diferentes. O objetivo do trabalho é aquisição de dados para prevenção de canceres malignos, focando na vantagem do processo ser não-intrusivo.

No trabalho de Babin e colaboradores (2017) foi desenvolvida uma técnica, partindo de dados tridimensionais, com o intuito de adquirir dados sobre a malformação arteriovenosa cerebral detectando, em imagens, os nódulos de malformações.

Lasso e colaboradores (2014) implementaram em Matlab transformadas de Fourier e Gabor de duas dimensões para esqueletonização de gráficos de retina com a intenção de permitir a detecção precoce de doenças como a Retinopatia Diabética.

No trabalho de Croasmun (2012) Foi desenvolvido um método de esqueletonização rápido e confiável criado especialmente para esqueletonização de córneas oculares. Neste trabalho sua principal métrica foi o tempo de processamento utilizado.

4 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA PROPOSTO

Nesta seção será discutido o desenvolvimento do trabalho proposto, sendo também expostos os requisitos e uma visão geral do sistema implementado.

4.1 Requisitos funcionais e não funcionais

O programa desenvolvido é voltado a aplicações de contabilização automatizada de vasos sanguíneos realizado em colaboração com o laboratório LEBIMA - UFSC sob a tutela do Prof. Dr. Paulo Fernando Dias. Atualmente são realizados experimentos de análise de químicos no desenvolvimento de um embrião, onde é inserido um *pellet* com o fármaco. Então, como métrica do experimento, é adquirido o número de vasos que entra em contato com este composto, de forma manual, em diferentes momentos para que seja possível avaliar alterações nestes.

Em função disso foi realizada uma análise de recursos e possíveis métricas necessárias para o programa. Os requisitos definidos foram divididos entre funcionais e não funcionais e orientaram o desenvolvimento do presente trabalho. Os requisitos funcionais, que são aqueles que definem as funções que o sistema deve ter. Foram estabelecidos os seguintes:

- A. Deve ser capaz de contar as métricas;
- B. Gravar os resultados em arquivo para Excel.

Os requisitos não funcionais, que por sua vez dizem respeito a como o sistema cumprirá suas funções foram definidos como sendo os seguintes:

- A. Ser expansível: Possibilidade de expansão do programa para adição de futuras novas métricas;
- B. Ser de fácil utilização: o sistema deve ser amigável, permitindo a utilização em laboratório sem a necessidade de conhecimentos técnicos mais avançados.

Uma vez que os requisitos foram definidos, deu-se início ao projeto do sistema, buscando-se atingir todos os requisitos fixados.

4.2 Descrição das métricas implementadas no sistema

Nesta seção serão descritas as métricas que serão adquiridas assim como uma explicação das mesmas e o seu respectivo método de captura. As métricas são: contabilização dos vasos no perímetro do *pellet*, cálculo da densidade de vasos no perímetro do *pellet* e cálculo no número de vasos por milímetro de perímetro do *pellet*.

4.2.1 Contabilização dos vasos no perímetro do *pellet*

Esta métrica é importante de se obter pois determina se ocorreu aumento ou redução na formação de vasos sanguíneos, e, conseqüentemente, o efeito do fármaco sobre o indivíduo.

Para calcular tal métrica foi criado um algoritmo que, a partir de uma imagem original da amostra, processa a imagem através de uma técnica conhecida como esqueletonização, amplamente utilizada na indústria, de forma que os vasos presentes na mesma sejam destacados. Em seguida, é calculado o número de vasos que intersectam uma região de interesse circular coincidente com o posicionamento do *pellet*. O processo foi montado em um fluxograma que pode ser visto na Figura 14.

Figura 14 - Algoritmo de contabilização de vasos no perímetro do pellet



Fonte: Próprio autor

Como pode ser visto no fluxograma da Figura 14, o primeiro processo realizado é a transformação da imagem original para cinza. Embora existam algumas variantes neste processo elas não são de grande influência para o resultado final. A seguir vem o processo de segmentação por limiarização.

O processo de limiarização parte de uma imagem em cinza, ou seja, com os pixels variando do preto ao branco numa escala de 256 valores indo de 0 a 255. Esta imagem então é comparada pixel a pixel de acordo com o limiar. Se este for maior que limiar, então o novo valor do pixel será 255, caso contrário será 0.

Este método é utilizado para realizar uma binarização uniforme em toda a imagem, porém imagens naturais, como as adquiridas para este trabalho, possuem iluminação variada. Um exemplo do resultado da limiarização é apresentado na Figura 15. O fato de existir uma área de maior luminosidade faz com que a binarização não fique uniforme, resultando em regiões muito saturadas e regiões que ficaram escuras.

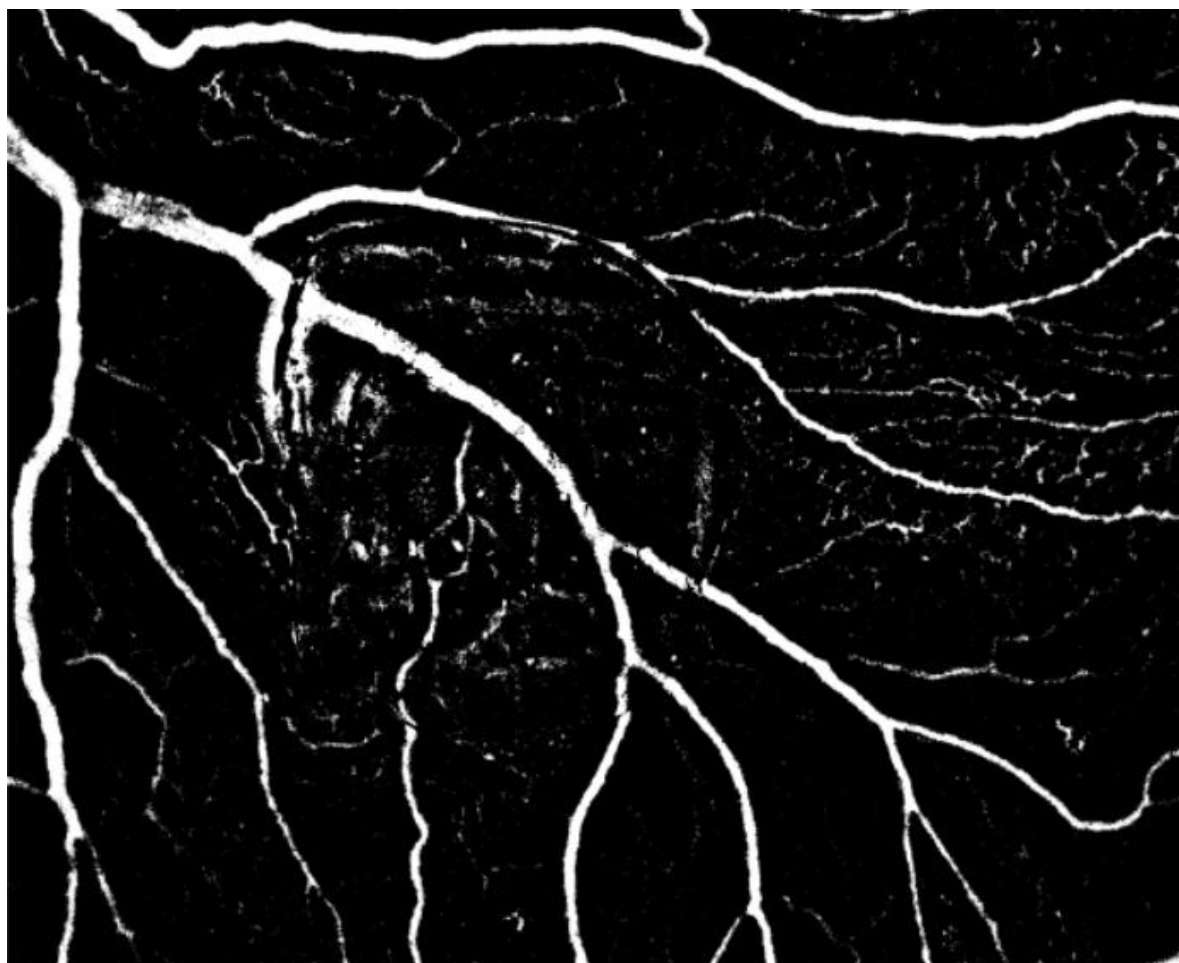
Figura 15 - Exemplo de imagem binarizada



Fonte: Próprio autor

Para resolver este tipo de problema foi utilizado um método de limiarização adaptativo, onde o limiar de uma área específica é calculado e utilizado apenas para aquela área. Esta função recebe como parâmetros a imagem no espaço de cor cinza, o método de limiarização, assim como o método de cálculo do limiar, e uma variável de subtração do valor de média. Utilizando este método a qualidade da imagem melhora consideravelmente, como pode-se ver na Figura 16.

Figura 16 - Limiarização adaptativa simples



Fonte: Próprio autor

Embora este resultado possa ser considerado bom, principalmente se comparados com uma simples binarização, ainda existe uma forma diferente de se calcular o limiar. Este método faz uma média de pesos correlacionados com a curva gaussiana. Dessa forma os pixels mais próximos ao pixel origem tem maior influência do que pixels que estão mais longe. Abaixo pode-se ver, na Figura 17, um exemplo com o mesmo limiar e imagem que a anterior, porém agora utilizando a limiarização adaptativa gaussiana.

Figura 17 - Linearização adaptativa gaussiana

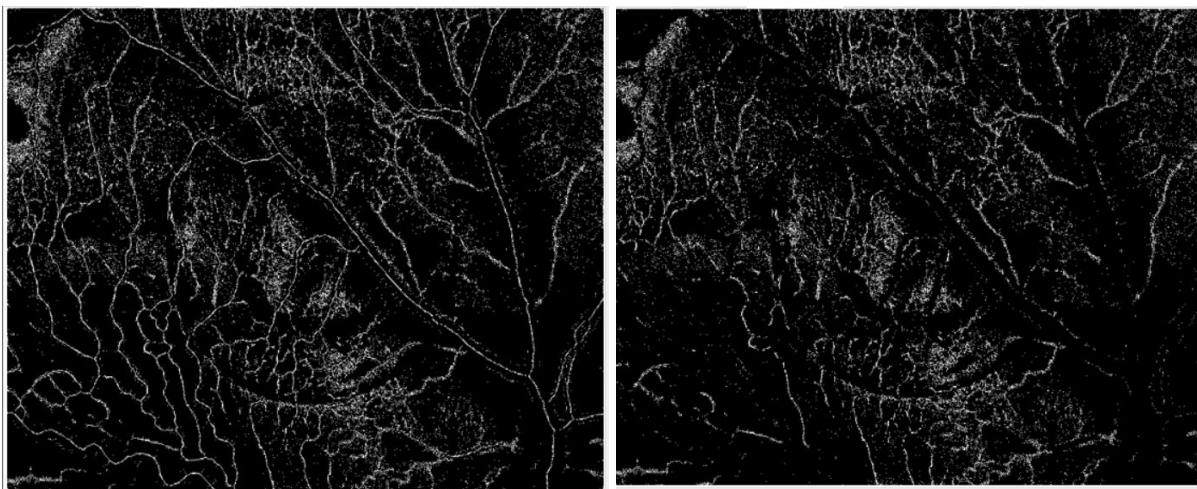


Fonte: Próprio autor

Uma vez definido a linearização é então passado à parte de esqueletonização. Embora em alguns métodos possam existir outras variáveis, neste apenas o número de iterações pode ser alterado. Na Figura 18 pode-se ver o resultado de uma esqueletonização tanto para 1000 iterações (direita) quanto para duas iterações (esquerda). O número de iterações está relacionado com a esqueletonização dos vasos mais calibrosos, como visto no canto direito inferior das imagens.

Figura 18 - Resultado da variação do número de iterações da esqueletonização

(Esquerda: 1000 iterações - Direita: 2 iterações)



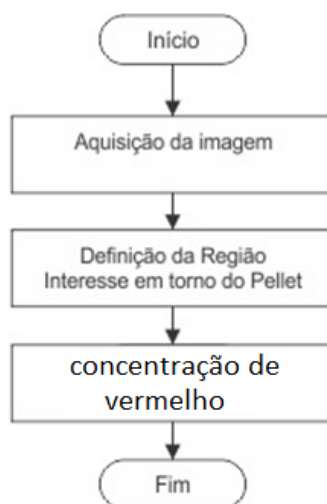
Fonte: Próprio autor

Concluída a etapa de esqueletonização faz-se necessário que o usuário defina iterativamente a região de interesse, que coincide com a localização do *pellet* na imagem.

4.2.2 Cálculo da concentração de vermelho

O cálculo da concentração de vermelho é uma nova métrica complementar à de contabilização dos vasos no perímetro do *pellet* para a determinação de um aumento ou redução de endotélio vascular. O processo foi montado em um fluxograma que pode ser visto na Figura 19.

Figura 19 - Algoritmo de calculo da concentração de vermelho



Fonte: Próprio autor

Análogo à contabilização dos vasos no perímetro do *pellet* este processo adquire a imagem original no espaço de cor RGB, captura a ROI pelo usuário e então adquire uma média de todos os valores vermelhos na ROI. Pode-se ver na Equação 4, logo abaixo, como ela é calculada.

Equação 4 – Cálculo da concentração de vermelho

$$\text{Concentração}_{\text{vermelho}} = \frac{\text{Média do valor vermelho dos pixels}}{255} * 100 \%$$

Fonte: Próprio autor

4.2.3 Cálculo do número de vasos por milímetro de perímetro do *pellet*

Complementarmente à contabilização dos vasos no perímetro do *pellet*, o cálculo do número de vasos por milímetro é uma das métricas importante. Com o decorrer do tempo em que o *pellet* se encontra em contato com o espécime, o *pellet* pode variar o seu tamanho de forma inconstante. Assim sendo, para fins de comparação, esta métrica se mostra mais adequada.

Seguindo o mesmo processo de esqueletonização e realizando a intersecção com a ROI utilizado na métrica de contabilização dos vasos no perímetro do *pellet*, é então calculada a métrica de acordo com a Equação 5.

Equação 5 - Cálculo de Vasos por milímetro

$$\text{Vasos/mm} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de vasos}}{\pi * \text{Diâmetro do pellet}}$$

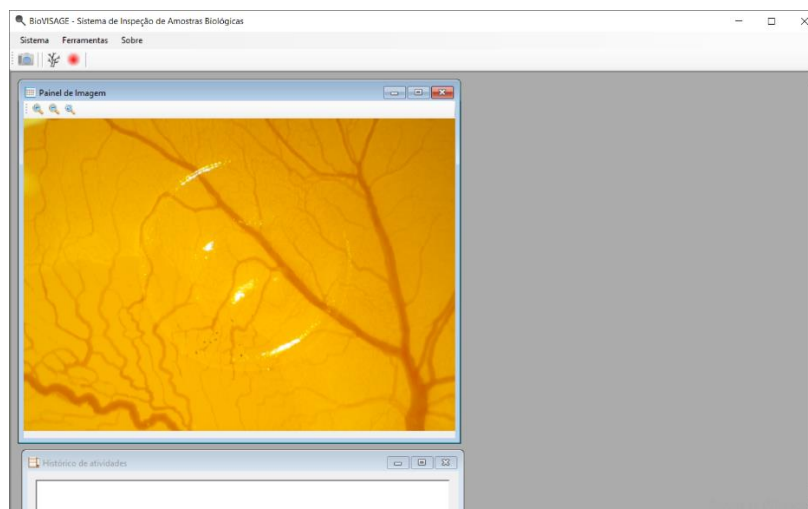
Fonte: Próprio autor

4.3 Interface gráfica

O programa desenvolvido, denominado “BioVisage”, foi implementado em C++ utilizando o ambiente de desenvolvimento Visual Studio 2017 e a biblioteca de processamento de imagens OpenCV.

Esta segue o modelo de interface MDI. Este modelo é um método de organização de aplicações gráficas em janelas que residem em uma única chamada de janela principal da aplicação que pode ser vista na Figura 20.

Figura 20 – Janela principal da aplicação

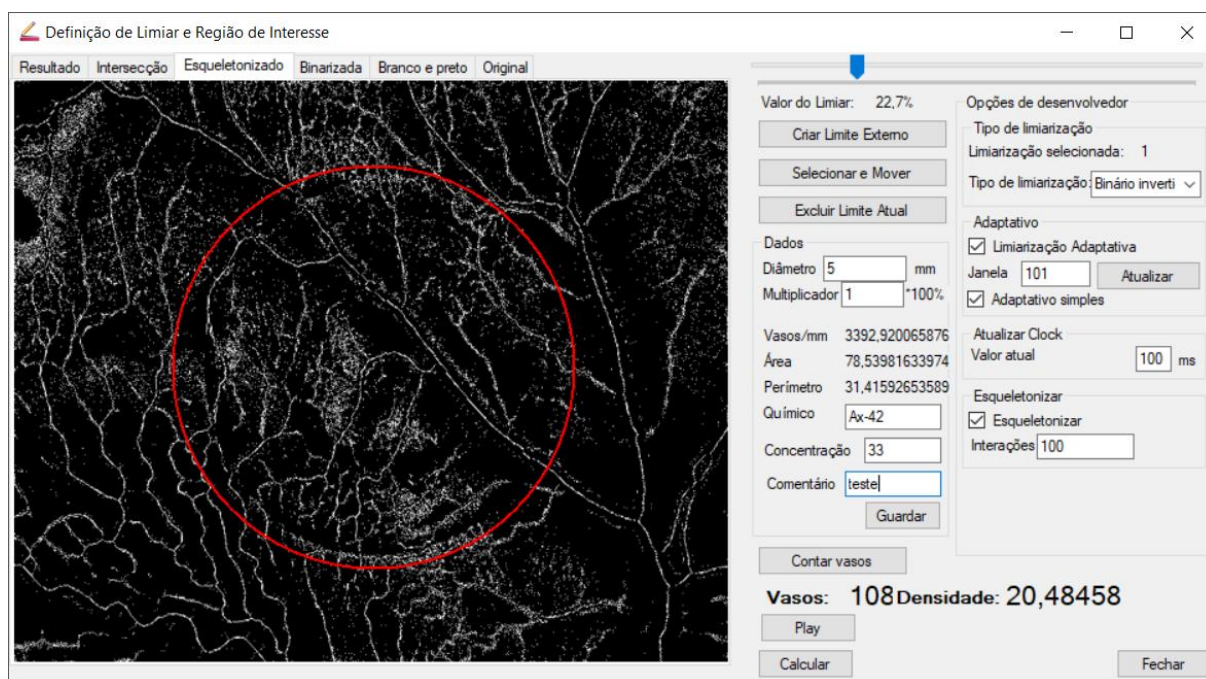


Fonte: Próprio autor

4.3.1 Telas de configuração e aquisição de dados

O sistema foi criado de tal forma que possam ser alterados os parâmetros dos processos de acordo com as necessidades dos usuários a partir da interface gráfica. Contém, assim, vários campos de edição que podem ser vistos na Figura 21.

Figura 21 - Interface de aquisição de dados



Fonte: Próprio autor

Para que esta flexibilidade seja possível foi criado um conjunto de componentes da interface que permite que o usuário altere partes do processo. Mais

à frente serão descrito estas partes específicas, assim como uma explicação de suas funcionalidades.

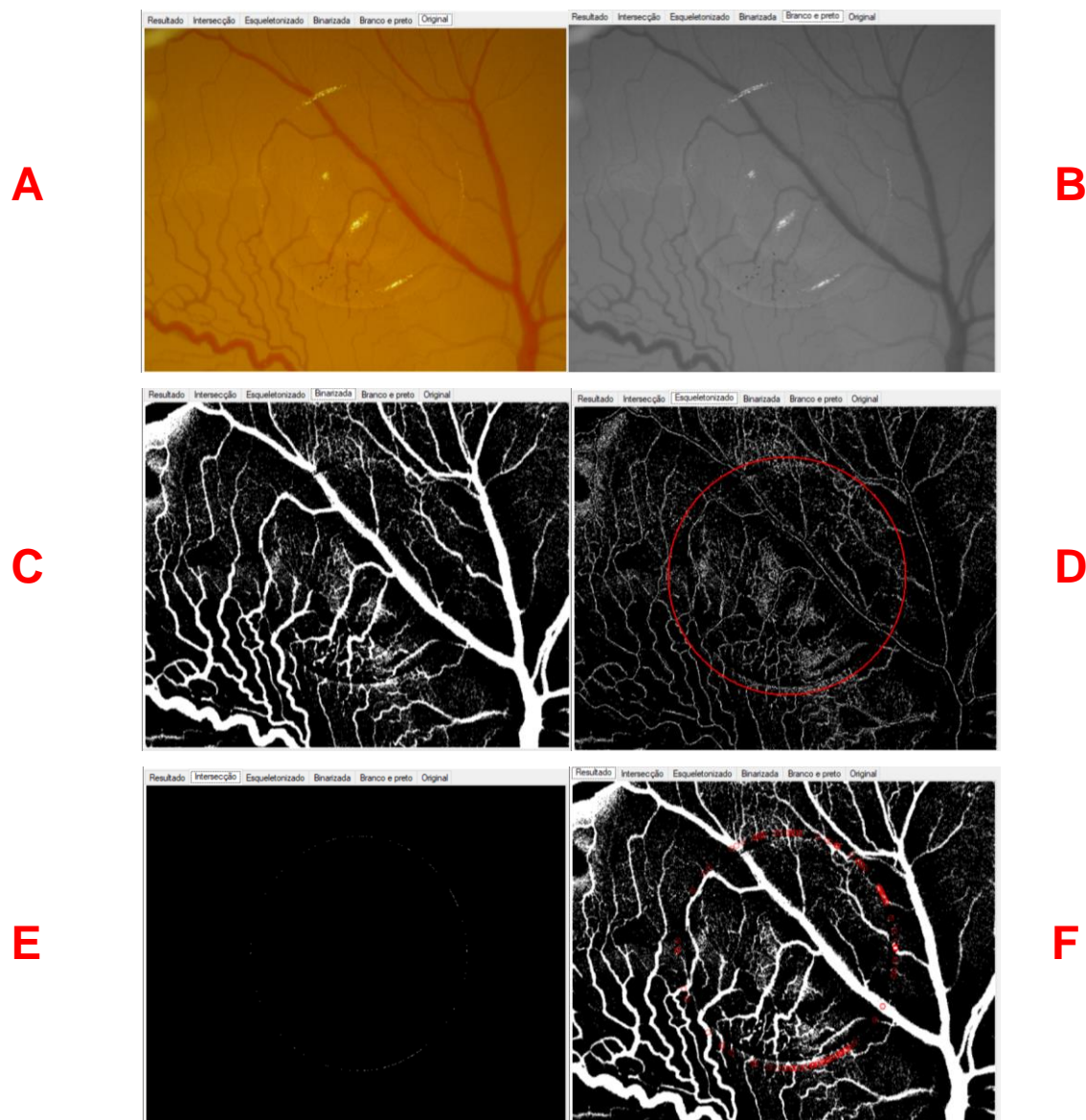
4.3.1.1 *Janela de visualização*

Esta seção tem como objetivo mostrar os passos da aquisição das métricas para o usuário assim como permitir ao usuário selecionar a ROI desejada, sendo separada em 6 abas:

- A. Imagem original;
- B. Imagem no espaço cinza;
- C. Imagem binarizada;
- D. Imagem esqueletonizada;
- E. Imagem mostrando a intersecção entre a ROI e a esqueletonização;
- F. Imagem mostrando quais vasos foram detectados.

Na Figura 22, pode-se ver melhor esta seção e seus componentes.

Figura 22 – Janela de visualização



Fonte: Próprio autor

4.3.1.2 Configuração de processamento

Nesta seção pode-se configurar o processamento de forma que a esqueletonização varie de acordo com os parâmetros inseridos pelo usuário. Na Figura 23, pode-se ver melhor esta seção e seus componentes, que pode ser separada em 4 partes distintas: limiar, tipo de limiarização, *clock* e esqueletonização.

Figura 23 - Configurações de eskeletonização

Fonte: Próprio autor

O limiar é a barra no canto superior, que serve como valor base do limiar quando se utiliza os métodos comuns de limiarização como explicados na seção 3.2.3.1. Também é utilizada como variável C de acordo com a Equação 6, como explicado na seção 3.2.3.2.

Equação 6 – Definição de variável C

$$C = 50 - \text{Valor do limiar}$$

Fonte: Próprio autor

A seção de limiarização é utilizada para definir o método de limiarização que será utilizado, sendo binarização comum, ToZero ou outros modelos previamente abordados na seção 3.2.3.1. Também é possível selecionar o modo de limiarização

adaptativa, configurar o tamanho do quadrado de pixels que será utilizado, assim como o método de limiarização adaptativa, conforme visto na seção 3.2.3.2. Prosseguindo, é possível também configurar o número de iterações da esqueletonização, que pode influenciar na melhoria da imagem e no tempo de processamento, conforme visto na Figura 18.

Uma última configuração é relacionada ao Intervalo de Atualização do programa. Para encontrar um valor do limiar ideal exige-se que tenham sido realizados alguns testes. Por esta razão foi adicionado um botão de *Play/Pause*, que servirá de gatilho para que o processo de esqueletonização seja executado a cada intervalo de tempo.

4.3.1.3 *Dados adicionais sobre a amostra analisada*

Esta seção tem como objetivo permitir ao usuário inserir alguns dados para fins de cálculos no experimento e no uso futuro. Possui também a capacidade de armazenar os resultados adquiridos em um arquivo utilizável por outros programas de estatística como Excel, por exemplo. Na Figura 24 pode-se ver melhor esta seção e seus componentes.

Figura 24 - Estatísticas adicionais sobre a amostra analisada

Dados

Diâmetro mm

Multiplicador *100%

Vasos/mm NaN

Área NaN

Perímetro NaN

Químico

Concentração

Comentário

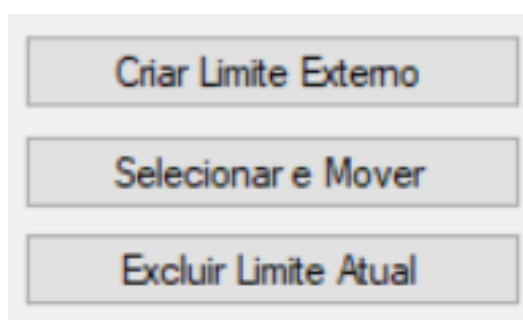
Fonte: Próprio autor

Nesta seção pode-se inserir o diâmetro do *pellet* assim como um multiplicador desejado. Este multiplicador será inserido no cálculo de vasos na periferia do *pellet*.

4.3.1.4 Interface de usuário responsável pela configuração de ROI

Esta seção tem como objetivo permitir ao usuário criar uma ROI e todas as funções relacionadas a ele: posicionar, mover, redimensionar e excluir. Na Figura 25 pode-se ver melhor esta seção e seus componentes.

Figura 25 - Configuração de ROI



Fonte: Próprio autor

4.3.1.5 Realização dos cálculos e exibição dos resultados

Por fim existem os botões do sistema que são as ações realizadas pelo programa, desde o cálculo da esqueletonização, a contagem dos vasos, iniciar um modo de cálculo constante da esqueletonização ou então o botão de fechar a tela. Além disso nesta sessão também é onde são mostradas as métricas calculadas. Esta sessão e seus componentes podem ser vistos na Figura 26.

Figura 26 - Realização dos cálculos e exibição dos resultados



Fonte: Próprio autor

5 RESULTADO EXPERIMENTAIS

Este capítulo trata sobre os testes realizados e a coleta dos dados, assim como uma avaliação do programa como um todo.

5.1 Aquisição de dados

Como primeiro passo deve-se definir como as imagens originais devem ser adquiridas, buscando sempre evitar alguns problemas como múltiplas áreas com nível de luminosidade diferente, fotos desfocadas ou baixa qualidade da imagem.

Levando isto em consideração, foram analisados os equipamentos e locais de aquisição disponíveis, fazendo uma busca nos laboratórios do Centro de Ciências Biológicas (CCB) que contivessem um equipamento de captura de imagem. Foi então encontrado no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (LRDA) o equipamento visto na Tabela 4.

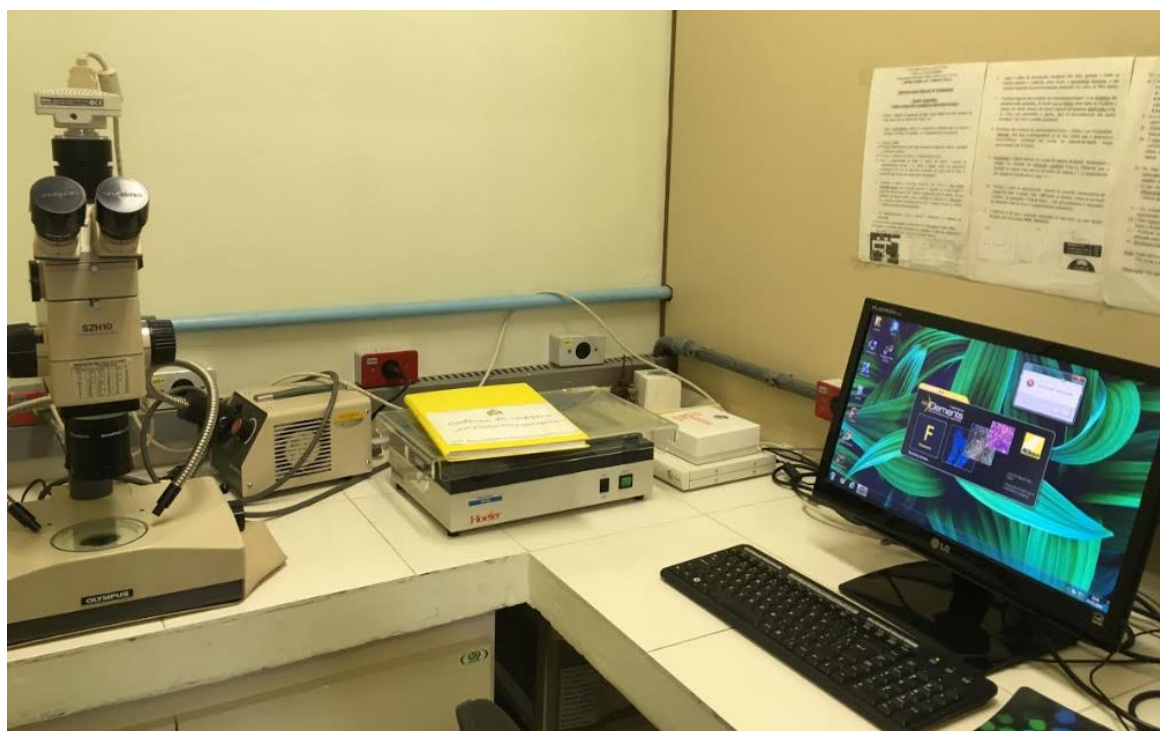
Tabela 4 - Lista de equipamentos

Equipamento	Marca	Modelo
Estereomicroscópio	Olympus	SZH10
Câmera fotográfica digital	Nikon	D5-Fi2
Software de captura de imagem	Nikon	NIS-Elements (Freeware, 32 bit)

Fonte: Próprio autor

Este equipamento foi escolhido para a aquisição das imagens originais principalmente pela sua qualidade de captura, disponibilidade e se localizar em um ambiente que permita a padronização das fotos. Uma imagem do laboratório pode ser vista na Figura 27.

Figura 27 - Equipamento de aquisição de imagens do laboratório LRDA/CCB/UFSC



Fonte: Próprio autor

Uma vez que foi obtida a permissão para utilizar o espaço e as ferramentas de captura foi então realizado o processo de preparação dos espécimes. Para tal processo foi utilizado um grupo de ovos de galinha (*Gallus gallus*) fecundados e depositados em uma incubadora, na temperatura aproximada de 38°C, localizada no departamento de Biologia celular Embriologia e Genética (BEG) por um período de 2 a 4 dias até que se desenvolvessem. Após este período foi realizada a abertura de uma janela na casca do ovo para possibilitar o acesso ao interior do mesmo e inserido um *pellet*. Os ovos previamente citados, assim como a incubadora, podem ser vistos na Figura 28.

Figura 28 - Incubadora e ovos com abertura de visualização do desenvolvimento embrionário



Fonte: Próprio autor

Após a inserção do *pellet* a janela de abertura dos ovos é então expandida para facilitar a visualização do mesmo utilizando uma câmera acoplada a um microscópio óptico. O microscópio, assim como o ovo com a janela expandida, podem ser vistos na Figura 29.

Figura 29 – Microscópio e ovo com janela expandida

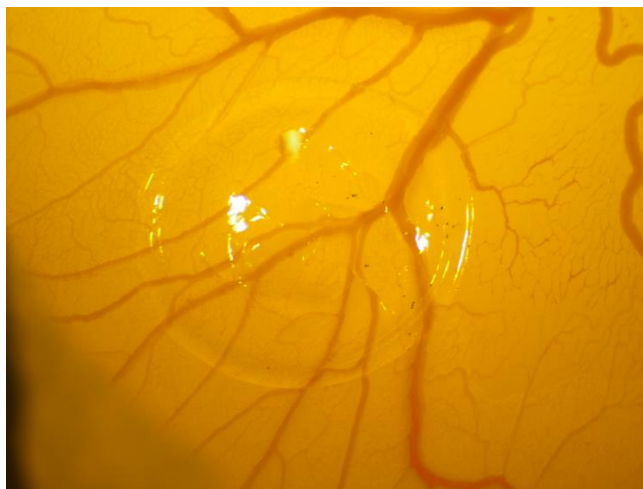


Fonte: Próprio autor

Como este experimento tinha como finalidade apenas gerar imagens para que o trabalho possa ocorrer, foram capturadas as fotos de testes sem esperar um período para que os espécimes interagissem com o fármaco.

Após a aquisição de oito imagens os espécimes foram descartados seguindo a norma oficial de eutanásia aceita pela CEUA nº 6290100717. Uma amostra das imagens originais adquiridos pode ser vista na Figura 30.

Figura 30 - Amostra de dado original



Fonte: Próprio autor

5.2 Resultados do Cálculo Automatizado das Métricas Seleccionadas

Nesta seção os resultados foram analisados e comparados com trabalhos ou sistemas correlatos. Para tal fim foi pesquisado na comunidade científica outros métodos de se adquirir estas métricas.

Para as métricas de “Vasos no perímetro do *pellet*” e “Concentração de vermelho” foram encontrados dois dois métodos distintos que se aproximavam das métricas utilizadas neste trabalho. Visto que a contabilização dos “Vasos por milímetro de perímetro do *pellet*” é uma métrica nova, não foi encontrada em outros trabalhos, portanto, é impossível de se comparar.

Para fins de comparação na métrica de “Vasos no perímetro do *pellet*” fora adquirida a mesma métrica com a técnica padrão utilizada atualmente. Nesta técnica um especialista munido de um contador posiciona o ovo fecundado de tal forma que o marcador em formato de cruz do microscópio fique sob um dos vasos sanguíneos. Após este processo são então contabilizados, com o auxílio de um contador mecânico, todos os vasos visíveis seguindo de forma horária ou anti-horária pelo perímetro do círculo.

É importante ressaltar que este método demanda tempo e também possui uma variação em relação a quem realiza assim como a disposição da pessoa que

aplica o método. Pode-se ver um comparativo das 8 amostras adquiridas assim como os valores dos mesmos na Tabela 5, tanto pelo especialista quanto pelo programa.

Tabela 5 - Comparativo de amostragem para vasos no perímetro do pellet

AMOSTRAS	ESPECIALISTA	BIOVISAGE	DIFERENÇA	ERRO (%)
1	146	151	5	3.42
2	135	141	6	4.44
3	105	98	7	6.66
4	130	138	8	6.14
5	142	140	2	1.41
6	112	121	9	8.03
7	89	79	10	11.23
8	114	114	0	0
MÉDIA	123.89	122.44	7.67	6.31

Fonte: Próprio autor

Para análise da métrica “Concentração de vermelho” não foi encontrado na literatura um método com o mesmo resultado métrico. Porém foi encontrada uma ferramenta consolidada no mercado, chamada ImageJ, capaz de fazer algo análogo. Diferente da “Concentração de tons de vermelho” esta ferramenta possui um *plugin*, ou seja, uma função adicional criada por terceiros capaz de calcular a densidade de vasos em uma imagem. A fórmula utilizada pode ser vista na Equação 7.

Equação 7 - Cálculo de densidade de vasos pelo ImageJ

$$\text{Densidade de vasos} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ pixels brancos}}{\text{N}^{\circ} \text{ de pixels}}$$

Fonte: Nivetha Govindaraju (2019)

O ImageJ é um software de domínio público em linguagem Java destinado ao processamento de imagem. O ImageJ foi desenvolvido para ser um programa de arquitetura aberta que pode ser expandido via *plugins* e macros de terceiros. (Nivetha Govindaraju, 2019)

Podendo adaptar o programa para realizar a mesma tarefa, foram realizados testes utilizando as duas ferramentas para fins de comparação da métrica. O resultado pode ser visto na Tabela 6.

Tabela 6 - Comparativo de amostragem para densidade de vasos em uma imagem

AMOSTRAS	IMAGEJ (%)	BIOVISAGE (%)	DIFERENÇA	ERRO (%)
1	21.67	22.38	0.71	3.27
2	16.70	16.37	0.33	1.97
3	21.75	21.73	0.02	0.09
4	24.77	22.66	2.11	8.52
5	12.76	16.69	3.93	30.8
6	18.91	18.60	0.31	1.64
7	12.56	13.41	0.85	6.77
8	17.64	16.14	1.5	8.50
MÉDIA	18.34	18.50	1.22	6.88

Fonte: Próprio autor

Para a última métrica de “vasos no perímetro do *pellet*” não há com quem comparar já que não foi encontrado na bibliografia alguém que utilize uma métrica equivalente.

5.3 Discussão geral dos resultados

Nesta seção foram discutidos os resultados adquiridos assim como os motivos que levaram à existência dos erros, possíveis melhorias e futuras implementações.

Partindo dos dados e cálculos adquiridos na Tabela 5 sobre a aquisição da métrica “Vasos no perímetro do pellet”, pode-se observar que ocorreu um erro médio de 6,31% considerando o especialista como correto, caso considere o erro do mesmo então a taxa de erro encontrada é de 13,31%. Este erro é advindo principalmente da configuração utilizada e da falta de métodos de remoção de ruído na imagem. Isso fez com que alguns pixels que deveriam ser pretos se tornaram brancos e, conseqüentemente, interferindo na contagem.

Apesar dos fatos apresentados acima, a contagem pode ser utilizada em laboratório sem grandes influências negativas advindas do erro principalmente se munida de ferramentas estatísticas. É importante destacar que este erro é menor que a taxa de erro humano, que é de 7% (Doukas, Maglogiannis, Chatziioannou, & Papapetropoulos, 2006).

Utilizando o dado apresentado a cima pode-se calcular o erro normalizado. O Erro Normalizado testa a compatibilidade dos resultados das medições do laboratório com respeito ao valor de referência, muito utilizado pelo Imetro de acordo com a regra ISO/IEC 17043:2010. Nesta formula é calculada a tendência e então dividida pelo erro provável, como pode ser visto na Equação 8.

Equação 8 - Calculo do erro normalizado

$$Erro_{Normalizado} = \frac{|Média_{Especialista} - Média_{BioVisage}|}{\sqrt{Erro_{Especialista}^2 + Erro_{BioVisage}^2}}$$

Fonte: Próprio autor

Calculando este valor foi encontrado um valor de aproximadamente 0.15 que por ser menor que 1, de acordo com a regra citada a cima, está compatível em relação ao valor de referência.

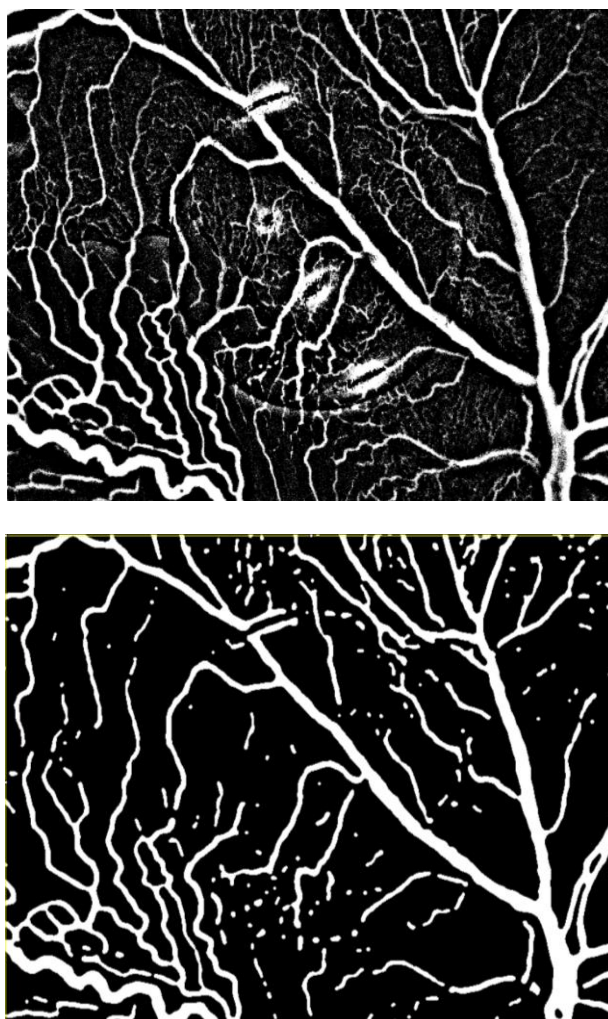
Além disto é importante ressaltar também que a contagem é realizada em uma foto, estática no tempo. Diferente da contagem realizada atualmente em laboratório onde o espécime é exposto a intempéries, como frio ou pouca humidade, que podem acabar por variar o número de vasos visíveis, principalmente quando se trata de pequenas capilaridades que estão em processo de formação.

Partindo agora dos dados e cálculos adquiridos na Tabela 6 sobre a aquisição da métrica “Concentração de vasos”, foi encontrado um erro médio de 6.88%. Este erro pode ser dado pela diferença dos métodos de limiarização utilizados no processo. Na Figura 31, observa-se a comparação entre os resultados de limiarização obtidos. O resultado do programa pode ser visto acima e do ImageJ abaixo, lembrando ainda que o programa é capaz de alterar o método de limiarização, diferente do *plugin* do ImageJ.

É importante também ressaltar que, para o programa, é imprescindível que seja adquirido o maior número de detalhes possíveis nas imagens processadas, já que se pretende detectar o maior número de vasos.

Figura 31 – Resultados de limiarização

(Acima: BioVisage - Abaixo: ImageJ)



Fonte: Próprio autor

Como visto na Figura 31, no método de limiarização utilizado pelo software ImageJ os vasos menores são eliminados. Esse resultado pode não ser adequado para alguns tipos de análise como os aplicados neste trabalho, de forma que não é ideal para esta aplicação.

Também comparou-se o resultado adquirido com o trabalho de Doukas e colaboradores (2006) previamente comentado na seção 3.3. Para esta comparação não foi possível utilizar a mesma base de imagens que foram utilizadas no projeto. Porém foi possível comparar as médias de erros finais na métrica de concentração. No trabalho de Doukas foi alcançada uma taxa de erro médio de 5%, muito próxima à encontrada no presente trabalho de 6,88%. Esta variação é devida à diferença dos métodos administrados assim como das imagens que foram utilizadas.

Por fim, foram analisados os requisitos do projeto, verificando se estes foram atendidos. Pode-se ver na tabela 7 os requisitos funcionais, explicitando se foram ou não concluídas.

Tabela 7 - Requisitos funcionais

REQUISITOS	REALIZADO	EXPLICAÇÃO
AQUISIÇÃO DA MÉTRICA “VASOS NO PERIMETRO”	Sim	Foi possível desenvolver um método de aquisição.
AQUISIÇÃO DA MÉTRICA “DENSIDADE DE VASOS”	Sim	Foi possível desenvolver um método de aquisição.
AQUISIÇÃO DA MÉTRICA “VASOS/MM”	Sim	Foi possível desenvolver um método de aquisição.
GRAVAÇÃO DOS RESULTADOS EM ARQUIVO PARA EXCEL	Sim	Foi desenvolvido um método capaz de capturar os dados para grava-los em Excel

Fonte: Próprio autor

Também foi analisado se todos os requisitos não funcionais foram atingidos. O sistema atingiu o objetivo de ser expansível, sendo desenvolvido empregando ferramentas gratuitas e de ampla utilização para que seja de fácil expansão na aquisição de novas métricas ou de métodos diferentes de aquisição.

Da mesma forma foi atingido o objetivo de desenvolver um programa de fácil utilização, criando-se um sistema interativo de configuração simples e prático. Mesmo para indivíduos sem conhecimentos técnicos avançados.

5.3.1 Possíveis melhorias

Pode-se considerar que o programa desenvolvido atingiu seu objetivo ao adquirir as métricas necessárias de forma confiável. Porém ainda existem algumas ações que podem ser realizadas para a melhoria da aquisição e processamento das imagens.

Uma das melhorias seria a utilização de um sistema de remoção de ruído entre as fases de limiarização e esqueletonização, assim como após a fase de esqueletonização. Desta forma reduzir-se-ia de forma considerável os desvios encontrados.

Outra possível melhoria seria a adição de outros algoritmos de esqueletonização. O algoritmo de esqueletonização utilizado para este programa não é o único existente e nem fora estabelecido uma versão superior na comunidade de desenvolvimento, de forma que existem muitos métodos para se adquirir a esqueletonização da imagem. Desta forma, o desenvolvimento de outros métodos de esqueletonização assim como de limiarização e contabilização podem por acarretar em melhorias para o programa.

Por fim, outra possível melhoria para este trabalho seria a utilização de outros métodos para a aquisição das métricas a partir da utilização de inteligências artificiais, pois tais técnicas têm se mostrado promissoras para diversas aplicações de reconhecimento de imagem, padrões e contagens.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi desenvolvido um sistema de computador que automatiza atividades de avaliação de amostras biológicas no contexto da pesquisa de angiogênese. O sistema desenvolvido foi capaz de utilizar os métodos de processamento de imagens para extrair informações relevantes ao domínio da aplicação como, por exemplo, contagem e densidade dos vasos sanguíneos presentes nas amostras.

Os resultados obtidos pela ferramenta desenvolvida foram positivos, principalmente tendo em vista que a taxa de erro adquirida nos estudos foi próxima às de outras fontes bibliográficas e abaixo da taxa de erro humano. Dessa forma, a ferramenta atendeu os requisitos que orientaram seu desenvolvimento e seu uso mostrou-se promissor em rotinas laboratoriais.

Algumas melhorias possíveis não foram concluídas em tempo hábil. Por exemplo, na etapa de limiarização o usuário deve inserir limiar manualmente, o que reduz a usabilidade do programa. Sabe-se que existem outros métodos de limiarização como o método de Otsu que estima o limiar a ser utilizado a partir de um cálculo de todos os valores dos pixels. Da mesma forma existe a possibilidade da inclusão de filtros para eliminação de artefatos indesejados nas imagens.

Como visto anteriormente o programa fora desenvolvido utilizando um modelo de interface orientado a janelas. Sendo assim, é possível a adição de novas funcionalidades com relativa facilidade. Além disso, o fluxo de processamento de imagem foi desenvolvido de forma linear, podendo-se alterar e adicionar novos processos sem ser necessária a reformulação completa do programa.

Portanto, o trabalho desenvolvido provou-se útil, transformando-se numa ferramenta facilitadora de aquisição de dados precisos e confiáveis que pode ser aplicada no âmbito das pesquisas laboratoriais. Neste trabalho também foi possível estreitar os laços entre as comunidades acadêmicas IFSC – UFSC, abrindo, assim, a possibilidade de trabalhos futuros para este e outros projetos.

7 REFERÊNCIAS

- Babin, D., Pizurica, A., Velicki, L., Matic, V., Galić, I., Leventić, H., . . . Philips, W. (11 de December de 2017). Skeletonization method for vessel delineation of arteriovenous malformation. *Computers in Biology and Medicine*, p. 93.
- Bibby, M., Jurjees, H., S.D., S., M., B., J.A., D., R., B., & G.C., J. (2004). Quantitative angiogenesis assays in vivo – a review. *Kluwer Academic Publisher*, 16.
- Croasmun, A. (December de 2012). *Fast skeletonization of blood vessels*. Pennsylvania, USA: Pennsylvania state universiti.
- Cui, Z., Xu, J., Feng, D., & Wu, J. (16 de August de 2009). Robust Dynamic Skeleton Extraction for Blood Vessels Based on the Level Set Method. *2009 Sixth International Conference on Fuzzy Systems and Knowledge Discovery*, p. 146.
- Daniel Banke, M. E. (s.d.). *Desenvolvimento de um Sistema para Contagem Automática de Celulas Sanguíneas Atraves de Visão Computacional*. Instituto federal de Santa Catarina (IFSC), Centro universitário Leonardo da Vinci (UNIASSELVI), Gaspar.
- Doukas, C., Maglogiannis, I., Chatziioannou, A., & Papapetropoulos, A. (2006). Automated Angiogenesis Quantification through advanced Image. *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, p. 4.
- Embriologia - conheça as fases do desenvolvimento embrionário*. (s.d.). Acesso em 09 de Fevereiro de 2019, disponível em UOL: <https://educacao.uol.com.br/disciplinas/biologia/embriologia-conheca-as-fases-do-desenvolvimento-embrionario.htm>
- Folkman, J. (2007). Is angiogenesis an organizing principle in biology and medicine? *Journal of Pediatric Surgery*, 11.
- Gray, H. V.-H. (1918). *Anatomy of the Human Body*.
- Lasso, W., Morales, Y., & Torres, C. (19 de September de 2014). Image segmentation blood vessel of retinal using conventional filters, Gabor Transform and skeletonization. *2014 XIX Symposium on Image, Signal Processing and Artificial Vision*.

- Meiburger, K., Nam, S., Chung, E., Suggs, L., Emelianov, S., & Molinari, F. (25 de October de 2016). Skeletonization algorithm-based blood vessel quantification using in vivo 3D photoacoustic imaging. *Physics in Medicine & Biology*.
- Montanari, T. (Julho de 2013). Embriologia: texto, atlas e roteiro de aulas práticas. (edição do autor). (ufrgs, Ed.) Porto Alegre, Brasil. Acesso em 09 de Fevereiro de 2019, disponível em <http://professor.ufrgs.br/tatianamontanari/files/livroembrio2013.pdf>
- Nivetha Govindaraju, M. f. (13 de Junho de 2019). *Vessel Analysis*. Fonte: ImageJ: https://imagej.net/Vessel_Analysis
- OpenCV. (10 de 05 de 2019). *Basic Thresholding Operations*. Fonte: OpenCV Documentation: <https://docs.opencv.org/2.4/doc/tutorials/imgproc/threshold/threshold.html#what-is-thresholding>
- OpenCV. (01 de 05 de 2019). *Transformações Morfológicas*. Fonte: OpenCV Documentation: https://docs.opencv.org/3.0-beta/doc/py_tutorials/py_imgproc/py_morphological_ops/py_morphological_ops.html
- OpenCV. (10 de 05 de 2019). *tutorial py thresholding*. Fonte: OpenCV Documentation: https://docs.opencv.org/3.4/d7/d4d/tutorial_py_thresholding.html
- Palágyi, K. (29 de 05 de 2019). *Skeletonization*. Fonte: infu szeged: <http://www.inf.u-szeged.hu/~palagyi/skel/skel.html#Top>
- Prior, B., Yang, H., & Terjung, R. (September de 1985). What makes vessels grow with exercise training? *J Appl Physiol*, p. 97.
- Santiago, D. (2009). Otimização e eficiência de algoritmos de rotulação de componentes conexos em imagens binárias. UFPE.
- scikit image. (10 de 05 de 2019). *Skeletonize*. Fonte: scikit image: https://scikit-image.org/docs/dev/auto_examples/edges/plot_skeleton.html
- Shutha. (10 de 05 de 2019). *Image Pixels*. Fonte: Shutha: <http://shutha.org/node/789>
- Sweeney, L. (1998). Hematopoietic System. *Basic Concepts in Embryology*. New York: McGraw-hill.

Tobelem, G. (1990). Endothelial cell growth: Biology and Pharmacology in relation to angiogenesis. Blood Coag Fibrinol.