

MAURÍCIO RAFAEL MAURER

**RECONSTRUÇÃO TRIDIMENSIONAL DE IMAGENS DE  
MICROSCOPIA DE LUZ**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
à obtenção do grau de Mestre. Programa  
de Pós-Graduação em Informática, Setor de  
Ciências Exatas, Universidade Federal do  
Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Hélio Pedrini

CURITIBA

2005



Ministério da Educação  
Universidade Federal do Paraná  
Mestrado em Informática

## PARECER

Nós, abaixo assinados, membros da Banca Examinadora da defesa Dissertação de Mestrado em Informática, do aluno *Mauricio Rafael Maurer*, avaliamos trabalho intitulado, “*RECONSTRUÇÃO TRIDIMENSIONAL DE IMAGENS DE MICROSCOPIA LUZ*”, cuja defesa foi realizada no dia 29 de março de 2005, às treze e trinta horas, no Auditório do Departamento de Informática do Setor de Ciências Exatas da Universidade Federal do Paraná. Após a avaliação, decidimos pela aprovação do candidato.

Curitiba, 29 de março de 2005.

Prof. Dr. Hélio Pedrini  
DINF/UFPR – Orientador

Prof. Dr. Edemir Martinez Bruno  
USP – Membro Externo

Prof. Dr. Klaus de Geus  
DINF/UFPR – Membro Interno



## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a

**Marcos Daniel Maurer**, acadêmico de Medicina, UFPR - pela sugestão do trabalho, **Maria Helena da Cunha Pimentel de Meira**, Departamento de Biologia Celular, Setor de Biologia, UFPR - pelo apoio, **Herculano Salviano dos Reis Filho**, Departamento de Biologia, Setor de Ciências Biológicas, UFPR - pela série da cebola, **Dalton Luiz Schiessel**, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, UFPR - pela série do feto de rato, **Maria Cecília de Chiara Moço**, Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas, UFPR - pela série da semente.

Agradeço especialmente a

**Marco Antonio Ferreira Randi**, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, UFPR - pelo interesse e ajuda, **Cássio Augusto Rúbio**, COPEL - pelo código fonte do visualizador tridimensional, de sua autoria, **CNPq** - pela concessão da bolsa de mestrado.

## SUMÁRIO

<b>LISTAS DE FIGURAS</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>vii</b>
<b>RESUMO</b>	<b>viii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 Microscópio Óptico . . . . .	1
1.2 Interpretação dos Cortes . . . . .	4
1.3 Outros Tipos de Microscópio . . . . .	5
1.4 Objetivos e Contribuições . . . . .	7
1.5 Organização do Trabalho . . . . .	8
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>9</b>
2.1 Aquisição . . . . .	10
2.1.1 Obtenção das lâminas . . . . .	10
2.1.2 Corte do tecido . . . . .	11
2.1.3 Coloração e Montagem . . . . .	12
2.1.3.1 Artefatos . . . . .	13
2.1.4 Aquisição digital . . . . .	14
2.1.5 Qualidade da aquisição . . . . .	16
2.2 Pré-processamento . . . . .	17
2.2.1 Métodos no Domínio Espacial . . . . .	17
2.2.2 Retificação de Imagens . . . . .	23
2.3 Segmentação . . . . .	23
2.3.1 Limiarização . . . . .	25
2.3.2 Morfologia Matemática . . . . .	28
2.3.2.1 Dilatação . . . . .	28
2.3.2.2 Erosão . . . . .	29
2.3.2.3 Abertura e Fechamento . . . . .	30
2.4 Registro . . . . .	30
2.4.1 Comparação por Sobreposição . . . . .	32
2.5 Visualização Volumétrica . . . . .	33
2.5.1 Visualização por Extração de Superfícies . . . . .	33
2.5.2 Visualização Direta de Volumes . . . . .	34
2.5.2.1 Reamostragem . . . . .	37

2.5.2.2	Classificação . . . . .	37
2.5.2.3	Detecção de Superfícies . . . . .	39
2.5.2.4	Iluminação . . . . .	40
2.5.2.5	Composição . . . . .	43
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA EMPREGADA</b>	<b>46</b>
3.1	Aquisição . . . . .	46
3.2	Pré-processamento . . . . .	47
3.3	Segmentação . . . . .	51
3.4	Registro . . . . .	54
3.5	Visualização Volumétrica . . . . .	55
3.5.1	Parâmetros de Visualização . . . . .	56
3.5.1.1	Parâmetros . . . . .	56
3.5.1.2	Estrutura do Arquivo de Parâmetros . . . . .	58
3.5.2	Visualização Volumétrica . . . . .	59
3.5.2.1	Sistema de Coordenadas . . . . .	60
3.5.2.2	Escala e Rotação . . . . .	60
3.5.2.3	Envoltório Geométrico . . . . .	61
3.5.2.4	Lançamento dos Raios . . . . .	62
3.5.2.5	Reconstrução e reamostragem . . . . .	62
3.5.2.6	Classificação . . . . .	63
3.5.2.7	Detecção de Superfícies . . . . .	65
3.5.2.8	Iluminação . . . . .	65
3.5.2.9	Composição . . . . .	66
<b>4</b>	<b>RESULTADOS EXPERIMENTAIS</b>	<b>67</b>
4.1	Estudo de Caso 1 . . . . .	67
4.2	Estudo de Caso 2 . . . . .	71
4.3	Estudo de Caso 3 . . . . .	76
4.4	Discussão dos Resultados Obtidos . . . . .	80
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS</b>	<b>82</b>
5.1	Trabalhos Futuros . . . . .	82
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>85</b>
	<b>APÊNDICE A FORMATO DAS IMAGENS</b>	<b>91</b>
	<b>APÊNDICE B PARÂMETROS DE VISUALIZAÇÃO</b>	<b>94</b>

## LISTA DE FIGURAS

1.1	Esquema de um microscópio óptico. . . . .	2
1.2	Comparação entre objetivas de aberturas numéricas diferentes. Fonte: [35]. . .	3
1.3	Aberrações cromáticas. Fonte: [35]. . . . .	4
1.4	Aberrações esféricas. Fonte: [35]. . . . .	4
1.5	Noções obtidas dos cortes feitos em um ovo cozido. . . . .	5
1.6	Imagem de um vaso sanguíneo seccionado e uma possível reconstrução tridimensional. . . . .	6
2.1	Artefatos mais comuns em lâminas preparadas para microscopia de luz. . . . .	14
2.2	Duas fatias subseqüentes de uma série. . . . .	15
2.3	Processo de amostragem e quantização. . . . .	15
2.4	Imagens de microscopia de baixo contraste. . . . .	18
2.5	Alargamento de contraste. (a) Função típica de alargamento de contraste. (b) Imagem original. (c) Resultado do processamento da imagem em (b) por uma função de alargamento de constraste. . . . .	19
2.6	Histogramas de quatro tipos característicos de imagens. . . . .	20
2.7	Resultado da equalização do histograma. (a) Imagem original e (b) seu histograma. (c) Resultado da equalização do histograma de (a) e (d) histograma da imagem final. . . . .	21
2.8	Máscara genérica $3 \times 3$ . . . . .	21
2.9	Filtro da mediana. . . . .	22
2.10	Transmissão de luz através de materiais com densidades ópticas diferentes no eixo das lentes do microscópio. . . . .	25
2.11	Histogramas de níveis de cinza que podem ser particionados por um limiar único. . . . .	26
2.12	Dilatação de um conjunto. . . . .	29
2.13	Erosão de um conjunto. . . . .	29
2.14	Abertura e fechamento. . . . .	31
2.15	Esquema do algoritmo <i>Ray Casting</i> . Fonte: [40]. . . . .	35
2.16	Seqüência de etapas necessárias para a obtenção da Visualização Volumétrica ( <i>Pipeline</i> ). . . . .	36
2.17	Interpolação trilinear. Fonte: [40]. . . . .	37
2.18	Classificação probabilística. Fonte: [16]. . . . .	38
2.19	Cálculo das opacidades para contornos de superfícies com isovalor. Fonte: [36]. . . . .	39
2.20	Reflexão difusa. . . . .	42
2.21	Reflexão especular. . . . .	43
2.22	Amostragem dos pontos em um raio. Fonte: [40]. . . . .	43

2.23	Amostragem dos pontos em um raio utilizando a equação 2.30. Fonte: [40]. . . . .	44
3.1	Processo global para visualização tridimensional de uma seqüência de imagens. . . . .	46
3.2	Microscópios utilizados para aquisição das imagens. . . . .	47
3.3	Regiões delimitadas pelo especialista em uma imagem de microscopia. . . . .	49
3.4	Funções de transformações das regiões delimitadas na figura 3.3. . . . .	50
3.5	Regiões da figura 3.3 transformadas de acordo com as funções da figura 3.4. . . . .	50
3.6	Várias imagens de um mesmo objeto adquiridas com o propósito de aumentar o campo de visão. . . . .	51
3.7	Resultado da retificação de várias imagens. . . . .	51
3.8	Limiarização da imagem no item (a) por diferentes técnicas. (b) Limiarização local de Niblack e (c) limiarização global. . . . .	53
3.9	(a) Resultado da aplicação dos operadores de abertura e fechamento na imagem da figura 3.8, item (c), e (b) composição do resultado com a imagem original. (c) Detalhe da imagem da figura 3.8 item (c). (d) Detalhe da imagem do item (a). . . . .	53
3.10	Corte das fatias alinhadas para redução do volume. . . . .	55
3.11	Arquivo de parâmetros usado para a geração da figura 4.7, item (a), do capítulo 4. . . . .	59
3.12	Tela do programa para manipulação dos arquivos de parâmetros. . . . .	59
3.13	Funções de densidade e opacidade em função dos níveis de cinza. . . . .	64
4.1	Fatias da série 1. A seqüência está ordenada da esquerda para direita e de cima para baixo. . . . .	69
4.2	Visualização tridimensional da série 1. Os núcleos celulares estão coloridos de vermelho e visualizados com material semi-transparente em (a). Em (b) a visualização apresenta os núcleos em amarelo e o restante dos componentes celulares e ar em azul. . . . .	70
4.3	Visualização tridimensional da série 1. Nas duas imagens os núcleos celulares estão coloridos de vermelho, o citoplasma está colorido de verde claro e o restante das tonalidades de cinza das imagens originais estão corados de cinza escuro. (a) Imagem gerada com luz incidente constante. (b) Imagem gerada com atenuação da luz incidente. . . . .	72
4.4	Visualização tridimensional da série 1 com os núcleos corados de vermelho e opacos. . . . .	73
4.5	Fatias da série 2. A seqüência está ordenada da esquerda para direita e de cima para baixo. . . . .	74
4.6	Visualização tridimensional da série 2. Os núcleos celulares estão coloridos de vermelho e os outros componentes celulares de verde. Item (a) sem atenuação da luz incidente e item (b) com atenuação. . . . .	75

4.7	Visualização tridimensional da série 2 com segmentação de tecidos. O tecido da parede uterina está colorido de amarelo. A imagem do item (a) é a visualização com a classificação probabilística de Drebin. O item (b) corresponde à mesma visualização, mas com atenuação luminosa. A classificação utilizada em (c) é a proposta na seção 3.5.2.6. . . . . .	76
4.8	Visualização tridimensional da série 2 com segmentação de tecidos. A classificação empregada é a proposta por Levoy [36]. . . . . .	77
4.9	Fatias da série 3. A seqüência está ordenada da esquerda para direita e de cima para baixo. Cada linha representa uma única lâmina e as imagens foram combinadas para formar cada uma das 5 fatias. . . . . .	78
4.10	Visualização tridimensional da série 3. Os tecidos, do mais opaco ao mais transparente, foram coloridos na seguinte ordem: vermelho, verde, amarelo e azul. . . . . .	79
4.11	Visualização tridimensional da série 3. . . . . .	80
4.12	Visualização tridimensional da série 3. . . . . .	81
A.1	Arquivo PGM. . . . . .	92
A.2	Imagem gerada pelo arquivo da figura A.1. . . . . .	92
A.3	Arquivo PPM. . . . . .	93
A.4	Imagem gerada pelo arquivo da figura A.3. . . . . .	93

## LISTA DE TABELAS

2.1	Principais unidades de medidas usadas na Histologia. . . . .	11
3.1	Relação de região-opacidade da figura 3.3. . . . .	49
3.2	Formato do arquivo de parâmetros . . . . .	58
4.1	Dados da Série do Caso 1. . . . .	67
4.2	Dados da Série do Caso 2. . . . .	71
4.3	Dados da Série do Caso 3. . . . .	77
4.4	Compressão das escalas de níveis de cinza das regiões detectadas nas imagens da série 3. . . . .	79

## RESUMO

Embora a compreensão tridimensional das lâminas preparadas para observação no microscópio de luz seja uma das tarefas mais difíceis, frustrantes e demoradas da Histologia [22], ainda há poucos trabalhos desenvolvidos para realizar a reconstrução de uma seqüência de lâminas com esse tipo de microscópio. Em contrapartida, inúmeras técnicas de Processamento de Imagens e Computação Gráfica têm sido empregadas com sucesso na reconstrução tridimensional de imagens obtidas a partir do microscópio eletrônico de transmissão. Técnicas utilizadas para a visualização de exames médicos, como Tomografia Computadorizada e Ressonância Magnética, também são bastante difundidas. Este trabalho propõe a utilização de técnicas para a reconstrução e visualização tridimensional de uma série de imagens de lâminas obtidas por meio de microscópios de luz, facilitando o estudo de estruturas microscópicas, visíveis com técnicas empregadas para a observação de espécimes em microscopia óptica. A ferramenta desenvolvida permite a alteração de parâmetros que regulam algumas características da visualização tridimensional, como cores de materiais, opacidade e coeficientes de iluminação. Este trabalho também propõe um novo tipo de classificação para os materiais encontrados nas amostras, particularmente interessante para a utilização na visualização volumétrica de imagens de microscopia. As técnicas de pré-processamento, segmentação e registro são aplicadas a três cortes seriados de teste, cedidos pelos departamentos de Biologia Celular e Botânica do setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os resultados finais são analisados em conjunto com especialistas responsáveis pelas séries fornecidas para os experimentos. Por fim, os resultados são discutidos, abordando as contribuições e os aspectos que podem ser melhorados em trabalhos futuros.

# CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO

A *Histologia*<sup>1</sup> é a ciência que estuda os tecidos, sejam eles animais ou vegetais. O termo *Histologia* designa o estudo anatômico (micro e macroscópico) dos órgãos e tem sido empregado com algumas restrições desde o estudo das funções dos órgãos até o funcionamento das organelas celulares [22].

O estudo macroscópico dos tecidos pode ser feito a olho nu, sem o uso de qualquer equipamento especial para a observação. Já o estudo microscópico necessita de equipamentos especiais, e a Histologia utiliza-se largamente do microscópio óptico. A invenção do microscópio eletrônico, embora tenha contribuído enormemente para o entendimento das estruturas celulares, não tornou obsoleto o microscópio de luz, que ainda é a ferramenta padrão para a análise de preparos teciduais [18].

Ainda que existam outros tipos de microscópios, a próxima seção detalha o funcionamento do microscópio óptico. A seção 1.2 discute a interpretação dos cortes vistos no microscópio óptico, a seção 1.3 mostra outros tipos de microscópios e as seções 1.4 e 1.5 apresentam os objetivos e a organização deste trabalho, respectivamente.

### 1.1 Microscópio Óptico

O olho humano, apesar de apresentar características complexas e sofisticadas, sofre de uma limitação física: é capaz de distinguir duas partículas próximas distantes de no máximo  $0,2mm$  [35]. Essa limitação se dá porque a *distância focal* do olho é de  $25cm$ . A distância focal é a distância entre a lente e a formação da imagem, onde os raios luminosos convergem. Esse ponto de convergência é chamado *foco*. Para aumentar a capacidade de distinção de partículas próximas deve-se reduzir a distância focal, o que pode ser feito empregando-se lentes de aumento, que possuem distâncias focais diferentes e permitem que os raios luminosos sejam corretamente focalizados pelo olho humano.

O microscópio óptico atual utiliza um conjunto de lentes para aumentar uma imagem e, devido a isso, é chamado de microscópio composto. A figura 1.1 esquematiza um microscópio óptico. Os raios luminosos originam-se no filamento de uma lâmpada de halogênio e são concentrados num feixe através da lente do condensador. Essa lente focaliza o feixe de luz no espécime. A luz que atravessa o preparado entra por uma das lentes objetivas do aparelho. Existem diversas lentes dispostas em um cilindro rotatório que permite a escolha de uma delas para observação. Essas lentes possuem aumentos que variam de 4 a 100 vezes. Os raios

---

<sup>1</sup>Do Grego, *histos* = tecido e *logia* = estudo de.

convergidos pela lente objetiva atingem a lente ocular, que promove mais um aumento na imagem e, finalmente, atingem o olho do observador.

A focalização do objeto em estudo é conseguida por meio de parafusos que sobem ou descem o suporte das lentes objetiva e ocular. O parafuso macrométrico movimenta o suporte em intervalos maiores do que o parafuso micrométrico, que serve para ajustes finos. A imagem resultante, vista pelo observador, é invertida da esquerda para a direita e de cima para baixo [22].

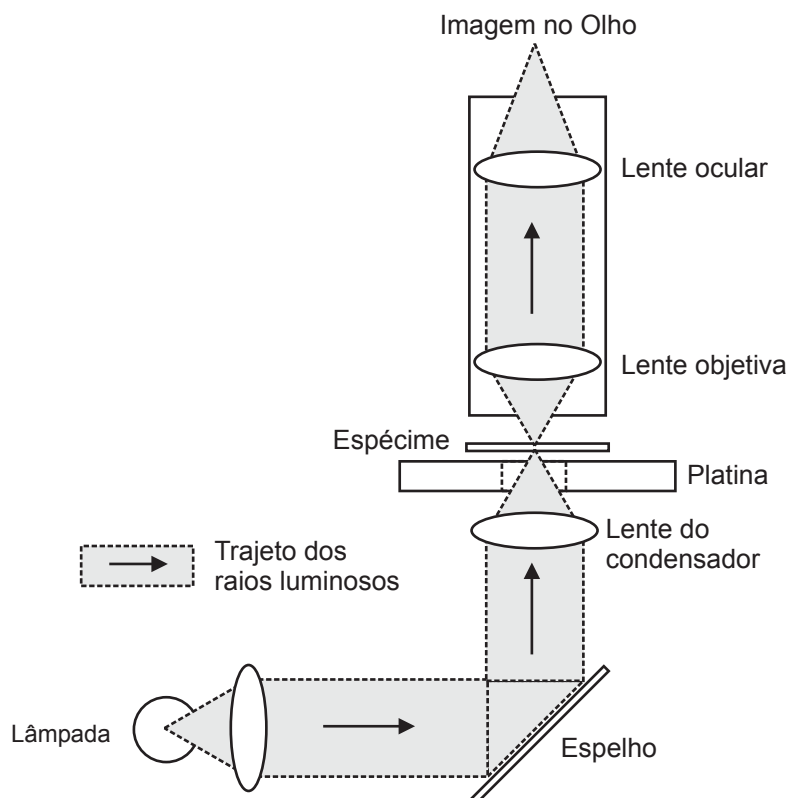


Figura 1.1: Esquema de um microscópio óptico.

O microscópio óptico, ainda que tenha sofrido avanços tecnológicos bastante acentuados desde sua invenção, sofre de limitações físicas similares àsquelas do olho humano. As objetivas, principais componentes de um microscópio de luz, possuem dois atributos principais que limitam as características desses microscópios, que são a *abertura numérica (NA)* e o *grau de correção para aberrações* [35].

A abertura numérica é o seno do ângulo de abertura da objetiva. A figura 1.2 mostra um esquema da medição desse ângulo, que é a medida do eixo axial da lente até sua abertura. Quanto maior o ângulo de abertura da objetiva, maior o número de raios luminosos que são captados por ela e, conseqüentemente, transmitidos para a próxima lente. Na figura 1.2, as duas áreas hachuradas representam os raios luminosos captados e transmitidos a partir de cada uma das lentes. Nota-se claramente uma quantidade maior de raios sendo transmitidos pela objetiva de abertura numérica igual a 0,75.

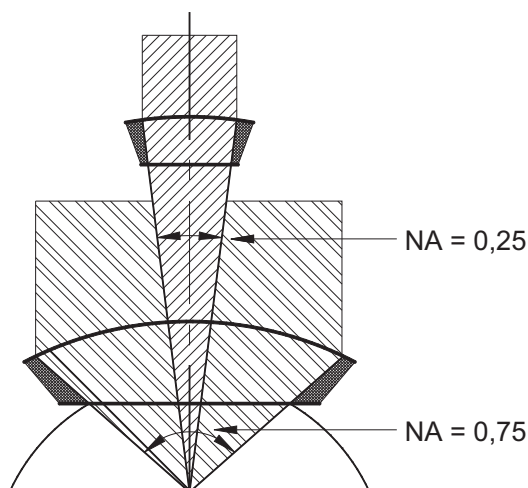


Figura 1.2: Comparação entre objetivas de aberturas numéricas diferentes. Fonte: [35].

O grau de correção para aberrações é um termo utilizado para designar quais aberrações e com qual eficácia um microscópio pode corrigi-las. Há basicamente dois tipos de aberrações: as *cromáticas* e as *esféricas*.

As aberrações cromáticas ocorrem em função da refração diferenciada entre raios com comprimentos de onda diferentes. Essas aberrações causam franjas coloridas nas imagens e ocorrem porque os raios luminosos com comprimento de onda no azul, por exemplo, apresentam distâncias focais menores do que os raios com comprimento de onda no verde. A figura 1.3 mostra os diferentes tipos de lentes que corrigem as aberrações cromáticas. O item (1) da figura 1.3 é uma objetiva sem correção. Nesse caso, os raios luminosos com comprimentos de onda diferentes têm distâncias focais distintas. O item (2) é uma objetiva *acromática*, que corrige a distância focal dos raios com comprimento de onda no azul e no vermelho. O item (3) esquematiza uma objetiva *semi-apocromática* que corrige os raios com comprimento de onda no azul, vermelho e verde e o item (4) mostra uma lente *apocromática* que corrige todas as aberrações cromáticas.

As aberrações esféricas são causadas porque os raios luminosos que atingem a borda da lente possuem uma distância focal diferente dos raios que atingem a lente em uma região mais central, no caso uma distância focal menor. A figura 1.4 esquematiza a diferença da distância focal entre os raios periféricos e axiais. Essas aberrações podem ser corrigidas com a associação de vários tipos de lentes com diferentes planos de convexidade.

A abertura numérica, porém, introduz uma limitação física inexorável. A resolução de um microscópio de luz é dada pela fórmula:

$$D = \frac{\lambda}{2 NA}$$

onde  $D$  é a distância entre dois pontos,  $\lambda$  é o comprimento de onda e  $NA$  é a abertura numérica da lente. O espectro de luz visível tem comprimento de onda entre  $400$  e  $800nm$  ( $0,4$  e  $0,8\mu m$

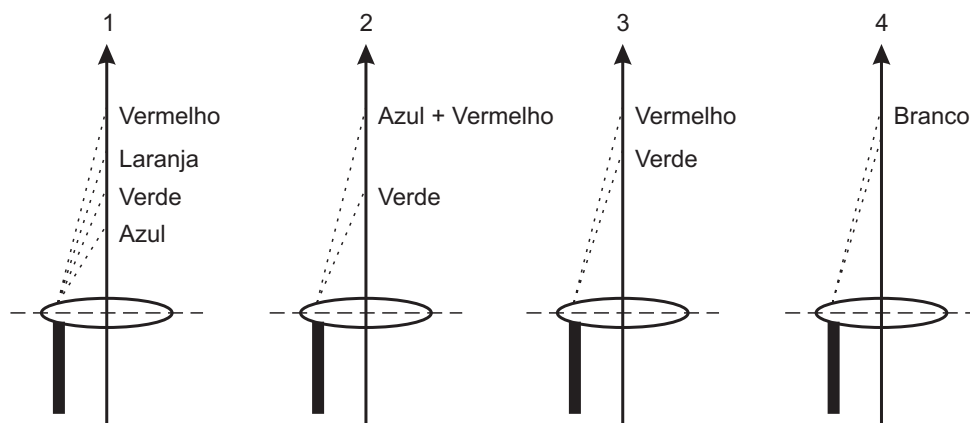


Figura 1.3: Aberrações cromáticas. Fonte: [35].

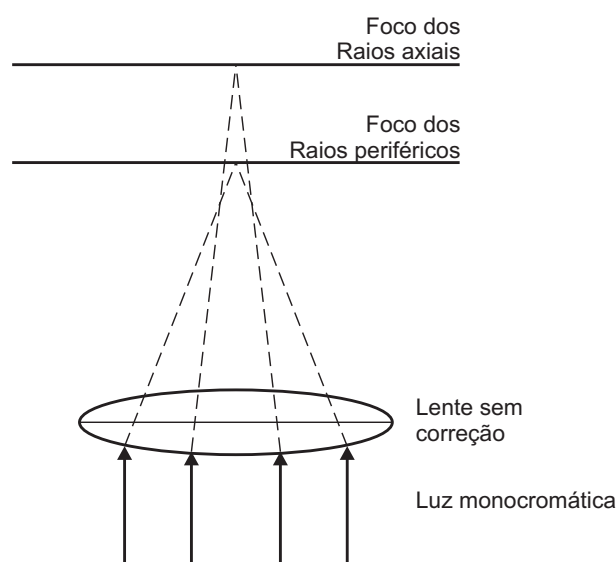


Figura 1.4: Aberrações esféricas. Fonte: [35].

respectivamente) e a abertura numérica usual é 1. Dessa forma, a resolução máxima obtida é de  $200nm$  ( $0,2\mu m$ ). A membrana celular, a título de comparação, possui de  $7,5$  a  $10nm$  e, por isso, o estudo desse elemento celular é impossível com um microscópio óptico. A resolução aumenta com o aumento da ampliação até praticamente 1400 vezes, limitando a ampliação máxima útil do microscópio óptico [14].

## 1.2 Interpretação dos Cortes

Infelizmente, a delgada espessura dos cortes dificulta a compreensão tridimensional do tecido intacto, antes dos cortes. Esta é uma das tarefas mais difíceis, frustrantes e demoradas da Histologia [22]. Dependendo de como um ovo cozido fosse seccionado, como exemplifica a figura 1.5, diferentes noções do formato do ovo inteiro seriam obtidas com base na localização

e posição do corte.

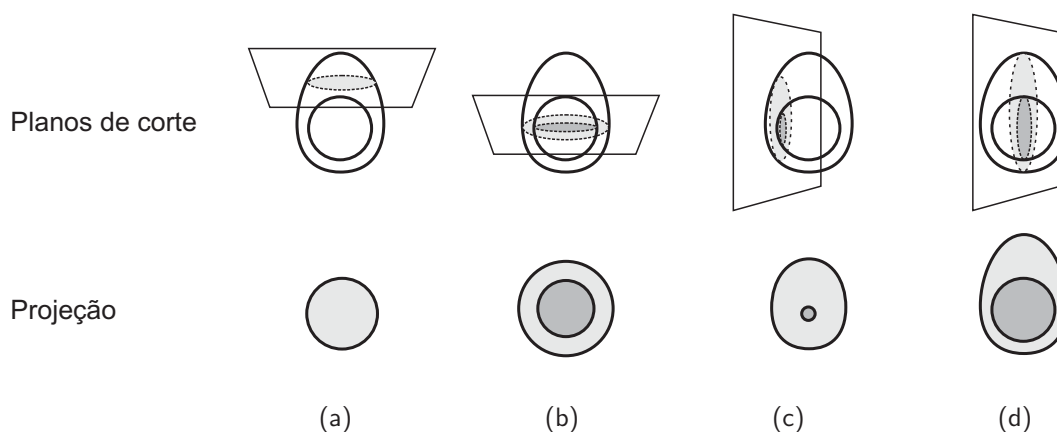


Figura 1.5: Noções obtidas dos cortes feitos em um ovo cozido.

Se o corte fosse realizado como no esquema (a) da figura 1.5, a impressão seria de que o ovo é esférico, com apenas um tipo de tecido. Já se o corte fosse realizado como na figura 1.5 (b), a idéia seria de que o ovo é formado por duas esferas concêntricas. No esquema 1.5 (c), o formato do ovo é distorcido pela posição tangencial do corte, fazendo parecer que a gema é bem menor do que a realidade. Somente o último corte, representado em (d) na figura 1.5, representa de forma mais adequada o ovo cozido, dando a impressão correta das dimensões da clara e da gema, bem como de seus formatos. É imprescindível notar que, mesmo sendo a melhor representação do ovo, o item (d) da figura 1.5 não fornece informações suficientes para que sua reconstrução tridimensional seja realizada.

Estruturas microscópicas são ainda mais complexas de ser descritas baseando-se apenas em cortes histológicos. São necessárias inúmeras imagens e a prática de um especialista para que uma estrutura seja corretamente representada. A figura 1.6 (a) mostra a imagem de um vaso sanguíneo seccionado. Círculos representando o diâmetro do vaso foram sobrepostos à imagem e mostrados em (b) como uma possível reconstrução tridimensional do vaso. A estilização tridimensional do vaso é mostrada em (c), em que os círculos de (b) foram conectados formando um duto semi-transparente. É possível notar que a idealização mental perfeita desse vaso antes de um corte é difícil porque inúmeras soluções podem se encaixar na projeção do corte.

### 1.3 Outros Tipos de Microscópio

Para extrair mais informações de um preparo tecidual ou ainda possibilitar a visualização de outras características e expandir as fronteiras impostas pelo microscópio de luz, existem outros tipos de microscópios que são utilizados na Histologia. Dentre eles destacam-se o *microscópio eletrônico de transmissão* (MET) e o *microscópio eletrônico de varredura* (MEV).

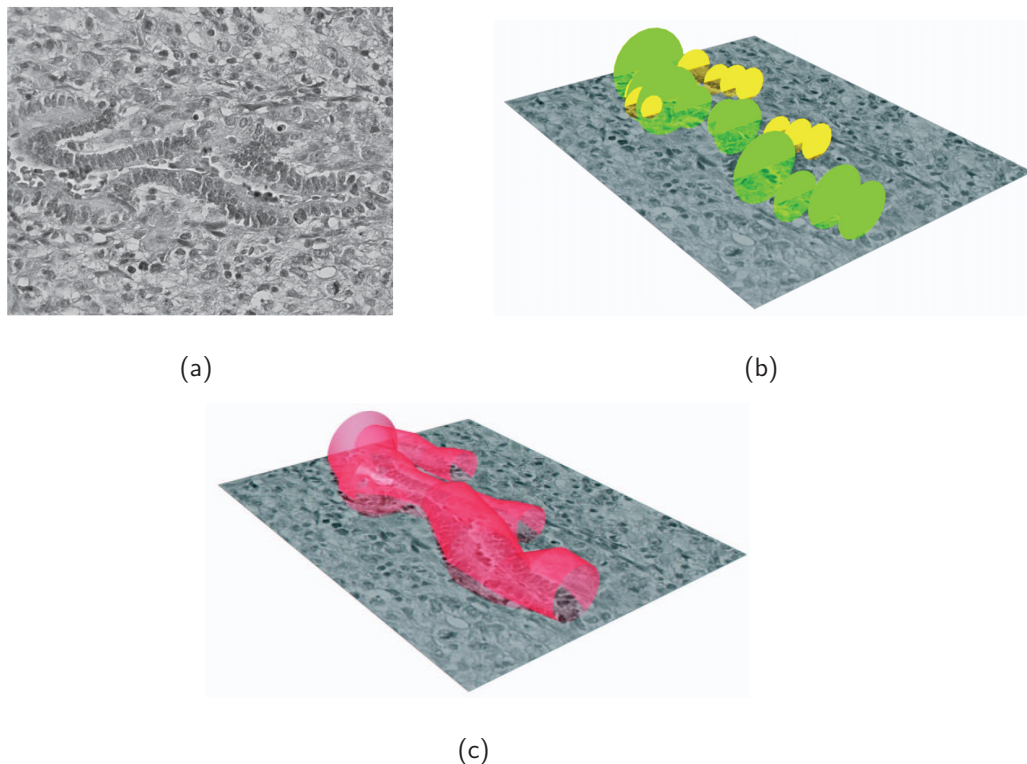


Figura 1.6: Imagem de um vaso sanguíneo seccionado e uma possível reconstrução tridimensional.

O microscópio eletrônico de transmissão segue o princípio do microscópio de luz, mas utiliza um feixe de elétrons gerado por um filamento de tungstênio no lugar de um feixe luminoso gerado por uma lâmpada halógena. Outra diferença bastante grande são as lentes que, no caso do microscópio eletrônico de transmissão, são eletromagnéticas. Alguns elétrons que passam através do material têm suas velocidades e direções alteradas e formam a imagem final, sensibilizando uma tela fosforescente ou impressionando um filme especial.

No microscópio eletrônico de varredura, o material não precisa ser fatiado como na microscopia de luz ou quando observado no microscópio eletrônico de transmissão. O choque dos elétrons com o material produz uma série de raios refratados. Detectores coletam esses raios e processam as informações, mostrando o resultado final em um monitor.

Do comprimento de onda dos elétrons, que é bem pequeno, é que provém a alta resolução desses tipos de microscópios. Há ainda outros tipos de microscópios que são utilizados na Histologia. Os mais comuns são:

- **Microscópio de Campo Escuro** - No microscópio de campo escuro, os raios luminosos, que na microscopia de campo claro atingem diretamente o material, são bloqueados. Somente os raios luminosos desviados pelo objeto examinado são captados pela objetiva, possibilitando contrastar os detalhes do espécime, que aparecem claros contra um fundo escuro. [35]
- **Microscópio de Contraste de Fase** - A observação de tecidos vivos é difícil, uma vez

que seus componentes são incolores ou transparentes. O microscópio de contraste de fase permite o estudo de tecidos vivos, já que o preparado não necessita de coloração. Como os elementos celulares possuem diferentes índices de refração, as ondas que atravessam estes elementos sofrem atrasos, criando uma diferença de fase entre eles. Este tipo de equipamento utiliza dispositivos que transformam as diferenças de fase dos raios luminosos em diferentes amplitudes, criando um contraste visível pelo olho humano.

- **Microscópio de Polarização** - A luz é uma forma de onda eletromagnética, que geralmente é irradiada para todos os lados com diferentes ângulos. É possível filtrar esses raios com filtros polaróides, fazendo com que os feixes vibrem todos em uma mesma direção. O microscópio de polarização possui dois filtros, um no condensador, chamado *polarizador*, e outro entre a objetiva e a ocular, chamado *analisador*. Quando os dois filtros estão com seus eixos perpendiculares, o campo do microscópio aparece escuro. Nesse caso, apenas as estruturas *anisotrópicas (birrefringentes)* são visíveis, porque alteram a direção de vibração do feixe de luz.
- **Microscópio de Fluorescência** - Este tipo de microscópio emite luz *ultravioleta*. Filtros são utilizados para bloquear os comprimentos de onda indesejados. Como os raios *ultravioleta* são prejudiciais à visão humana, um filtro é colocado antes da lente ocular, protegendo o observador e fazendo com que o objeto pareça brilhante sobre um fundo escuro. Uma solução fluorescente é adicionada ao preparado, fazendo com que algumas estruturas absorvam essa solução e, quando atingidas pelos raios ultravioletas, emitam luz fluorescente.
- **Microscópio Confocal** - Neste microscópio, o preparado é iluminado por um fino feixe de laser que varre o corte, possibilitando a criação de cortes como em uma tomografia computadorizada ou ressonância magnética. O tecido precisa ser tratado com um composto fluorescente antes da visualização nesse tipo de equipamento. A luz excitada pelo raio laser é captada por sensores e os dados são processados por um computador. Como resultado são obtidas imagens digitais em planos paralelos.

## 1.4 Objetivos e Contribuições

Como foi mostrada na seção 1.2, a reconstrução tridimensional dos cortes histológicos é extremamente difícil. As representações esquemáticas presentes em livros acadêmicos de Histologia, mostrando a estrutura tridimensional do tecido, foram feitas com base em inúmeras observações de cortes histológicos e com diferentes técnicas de preparo.

O objetivo deste trabalho é empregar técnicas de Processamento de Imagens e de Computação Gráfica visando reconstruir tridimensionalmente uma seqüência de imagens de microscopia obtidas com o microscópio de luz. Embora o intuito seja possibilitar a visualização

das microestruturas observadas no microscópio óptico de forma tridimensional, a pretensão deste trabalho não é criar visualizações foto-realistas, mas sim possibilitar o entendimento das micro-estruturas no espaço.

Ainda que esse tipo de microscópio seja utilizado corriqueiramente e esteja presente na maioria dos laboratórios histológicos do mundo, o esforço em reconstruir tridimensionalmente imagens de microscopia foi quase totalmente voltado a imagens adquiridas com o microscópio confocal e com o microscópio eletrônico, existindo pouca pesquisa relacionada diretamente a este trabalho [26, 32].

O desenvolvimento dessas técnicas para o uso com imagens obtidas por meio de microscópios de luz podem facilitar o estudo de microestruturas. Dentre as funções de uma ferramenta de visualização tridimensional de lâminas de microscopia de luz, podem-se citar duas, provenientes da aplicação da Visualização Científica em Medicina [15]:

- aumentar o grau de compreensão dos dados em relação ao modo tradicional, o qual consiste em analisar separadamente cada fatia de dados do volume;
- desobrigar o observador da tarefa de realizar inferências mentais para obter uma noção razoável das relações tridimensionais entre as várias estruturas.

Um novo tipo de classificação é proposto para determinar a densidade e opacidade dos materiais presentes nas amostras. Imagens microscópicas são observadas por transparência e a densidade óptica dos constituintes celulares é fator crucial no entendimento das lâminas observadas no microscópio. Assim, este trabalho utiliza-se dessa característica para melhorar os resultados da visualização tridimensional das imagens de microscopia. Além disso, todas as técnicas e adaptações propostas são incorporadas na ferramenta de visualização utilizada neste trabalho.

Além dessas funções, obtidas diretamente da utilização da ferramenta, outras contribuições indiretas são descritas na conclusão do trabalho, bem como trabalhos que podem ser desenvolvidos com a técnica apresentada neste trabalho.

## **1.5 Organização do Trabalho**

O próximo capítulo apresenta as técnicas utilizadas por este trabalho, descrevendo cada uma em detalhes. O capítulo 3 descreve as soluções adotadas para o problema proposto. Os resultados experimentais são mostrados no capítulo 4 e as conclusões e os possíveis trabalhos futuros são descritos no capítulo 5.

## CAPÍTULO 2

### FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A Visualização Científica é uma área da Computação Gráfica que permite a análise visual de dados provenientes da natureza ou de processamentos científicos. Antes mesmo da utilização dos computadores, a visualização científica sempre representou um papel importantíssimo para o entendimento de grandes quantidades de informação [9].

A Visualização Volumétrica, um ramo da Visualização Científica, desenvolveu técnicas específicas para a visualização de entidades tridimensionais. A Visualização Volumétrica é um método, ou um conjunto de técnicas, de extração de informações de conjuntos de dados tridimensionais por meio de imagens e gráficos e está preocupada com a representação, manipulação e visualização dos dados [20, 55].

Diversas etapas são necessárias para criar a visualização tridimensional de dados volumétricos. Infelizmente, nenhum microscópio de luz atual gera dados que possam ser utilizados diretamente para a reconstrução tridimensional da seqüência de cortes. Por esse motivo, as imagens obtidas do microscópio precisam passar por etapas que preparem o conjunto de dados, utilizadas para a reconstrução tridimensional final.

A seqüência de passos necessários, desde a aquisição das imagens até o processamento final do volume, é a seguinte:

1. **Aquisição** - Um dispositivo físico transforma os raios luminosos captados em sinais elétricos para que possam ser reconhecidos por um computador. Esse dispositivo deve conter detectores sensíveis ao espectro de onda eletromagnética que se deseja captar (raios X, luz infravermelha ou o espectro de luz visível).
2. **Pré-processamento** - Raramente uma imagem possui as características desejáveis para realizar a segmentação dos objetos de interesse. O pré-processamento pode salientar informações ou remover detalhes indesejados que possam vir a auxiliar ou prejudicar o resultado esperado das próximas etapas. Há ainda o processo de retificação de imagens obtidas de uma mesma lâmina para aumentar o campo de visão. Esse processo alinha imagens que estejam no mesmo plano, permitindo que as estruturas de interesse sejam capturadas por completo.
3. **Segmentação** - O processo de segmentação da imagem tenta separar os objetos de interesse da imagem. No caso da visualização volumétrica, o interesse está voltado para as regiões limítrofes entre os materiais presentes nos dados.
4. **Registro** - A seqüência de imagens adquiridas no microscópio podem não estar alinhadas. As técnicas de registro têm por objetivo alinhar as imagens, tal que as características

delas coincidam se sobrepostas, permitindo uma percepção real do objeto tridimensional quando o volume é visualizado. O processo de segmentação, realizado antes do registro das imagens, evidencia regiões que auxiliam o especialista a detectar pontos característicos das imagens, facilitando o registro.

5. **Visualização Volumétrica** - Finalmente, os dados alinhados formam o conjunto que será reconstruído tridimensionalmente. Técnicas de classificação, interpolação, iluminação, composição, projeção, entre outras, são aplicadas diretamente ao volume para criar uma representação gráfica bidimensional dos dados.

As próximas seções discutem os trabalhos relacionados com cada uma das etapas, descrevendo técnicas de maior importância relacionadas ao trabalho proposto.

## 2.1 Aquisição

Inicialmente, as gravações de imagens obtidas por meio de microscópios de luz eram feitas com filmes fotográficos comuns. O processo, utilizado ainda hoje, consiste em colocar um filme fotográfico em um dispositivo acoplado ao microscópio, que possui todas as funções de uma máquina fotográfica. O negativo é sensibilizado ao comando do operador e o filme é revelado por um processo químico, igual aos utilizados em filmes de *35mm*. Tanto os negativos como as ampliações oriundas desse processo podem ser digitalizadas.

Atualmente, a obtenção dessas imagens é normalmente realizada por meio de câmeras digitais montadas sobre o microscópio e que permitem a visualização em tempo real da lâmina sendo observada em um monitor de computador ou em um televisor.

Diferente do processo de obtenção das imagens de exames médicos, como Ressonância Magnética, Tomografia Computadorizada, Ultrassonografia, Tomografia por Emissão de Pósitrons, entre outros, as imagens obtidas por meio de microscópios de luz e que são utilizadas para a reconstrução tridimensional não estão completamente preparadas para esse fim quando digitalizadas. Todo o processo de preparo das lâminas deve ser observado e realizado levando-se em consideração o objetivo final do trabalho, que é a reconstrução tridimensional.

Por esse motivo, a próxima seção detalha o processo de obtenção das lâminas, que é de fundamental importância para a determinação das técnicas empregadas nas etapas subsequentes da reconstrução tridimensional. Em seguida, as práticas mais comuns para a obtenção dessas imagens são mostradas, apontando as vantagens e desvantagens de cada uma.

### 2.1.1 Obtenção das lâminas

Na microscopia de luz transmitida, os objetos são examinados por transparência. Por esse motivo, os preparados devem ser suficientemente finos para que permitam a passagem da luz. Os raios luminosos, que se originam no filamento da lâmpada posicionada abaixo do objeto de

interesse, atravessam o corte, passam por uma série de lentes e atingem o olho do observador, como descreve a seção 1.1.

O processo de preparo da lâmina pode ser dividido em duas etapas: o corte do tecido e a coloração do corte. Cada uma delas é descrita nas seções 2.1.2 e 2.1.3, respectivamente.

## 2.1.2 Corte do tecido

Como explicado anteriormente, o tecido a ser analisado precisa ser cortado em fatias finas suficientemente para que possam ser observadas no microscópio. A espessura média de uma fatia preparada para o microscópio óptico é de 5 micrômetros ( $\mu m$ ). Um micrômetro representa um milésimo de milímetro ou um milionésimo de metro. A tabela 2.1 mostra as principais unidades de medidas usadas na Histologia.

Unidade	Representação	Equivalência em $mm$
micrômetro	$\mu m$	$10^{-3}mm$
nanômetro	$nm$	$10^{-6}mm$

Tabela 2.1: Principais unidades de medidas usadas na Histologia.

A consistência de grande parte dos tecidos animais é mole, como uma gelatina. Se cortados sem nenhum preparo, a estrutura do tecido não será mantida para o estudo no microscópio ou dificultará a montagem de uma lâmina sem artefatos<sup>1</sup>. Exceto tecidos duros, como o tecido ósseo, a maioria deles precisa ser embebida e envolvida por substâncias de consistência firme, geralmente parafina ou resinas plásticas. A técnica padrão de parafina, de maior utilização, envolve as seguintes etapas [14]:

1. **Amostra de tecido** - Uma pequena amostra de tecido, o *bloco de tecido*, é obtida por *biópsia* (amostragem diagnóstica), excisão cirúrgica ou dissecação *post-mortem*.
2. **Fixação** - Um banho químico, com um produto *fixador*, enrijece o tecido insolubilizando as proteínas, ou seja, impedindo que sejam deterioradas pelas próprias enzimas das células e, conseqüentemente, retardando o processo *post-mortem*. As proteínas são as principais responsáveis pela estrutura das células e, por isso, são elas o alvo do processo de fixação.
3. **Desidratação** - Para que o tecido fique com uma consistência firme, a água contida nas células precisa ser substituída por uma substância rija, mas que não dificulte, ou mesmo impeça, o corte do bloco. Essa substância, responsável pelo endurecimento do tecido, é geralmente a parafina. Entretanto, a parafina não é hidrossolúvel e, portanto, a água das células precisa ser retirada antes que possa ser substituída por parafina. A

<sup>1</sup>Veja seção 2.1.3.1

substituição da água é obtida com a imersão do tecido em soluções com concentrações crescentes de etanol - que é hidrossolúvel - iniciando com uma solução a 50% ou 70% até a solução de etanol puro.

4. **Diafanização** - A parafina, que deve penetrar por completo no tecido, também não é solúvel em álcool (etanol). Por esse motivo, o álcool impregnado no bloco é substituído por xilol ou benzol. Esse processo aumenta a transparência do tecido e, por isso, também é conhecido como *clarificação*.
5. **Inclusão** - Como a parafina fundida é facilmente solúvel em xilol, o bloco embebido nessa substância é mergulhado na parafina em uma estufa comumente a 60°C. Devido ao calor, o xilol ou benzol evapora e os espaços anteriormente ocupados por uma das duas substâncias são ocupados pela parafina.
6. **Microtomia** - Depois de aparados os excessos de parafina o bloco é levado a um aparelho capaz de cortar fatias na ordem de micrômetros, chamado de *micrótomo*. Essas fatias aderem-se umas às outras à medida que o corte é efetuado, formando uma fita. Cada um dos cortes pode ser facilmente separado dos outros e então levado à etapa de coloração do tecido.

### 2.1.3 Coloração e Montagem

Antes, porém, que o tecido possa ser examinado no microscópio, ele deve ser colorido. Muitos dos constituintes dos tecidos possuem a mesma densidade óptica, tornando a análise do tecido no microscópio muito difícil devido à falta de contraste entre seus componentes. Passando por processos que tornam as diferentes partes do tecido coloridas, o entendimento das estruturas do tecido e das células torna-se mais fácil [30].

Os corantes utilizados na Histologia são em sua maioria hidrossolúveis. Isso significa dizer que a fatia obtida na etapa anterior, embebida em parafina, precisa passar por processos que substituam a parafina por água. O corte passa então por banhos sucessivos de xilol e depois por soluções com concentrações decrescentes de etanol até o banho final por água. Nessa etapa, o corte pode finalmente ser corado.

Existem vários tipos de corantes. Cada um evidencia partes diferentes da célula ou do tecido e podem ser divididos em pelo menos três grupos: os que diferenciam elementos ácidos e básicos das células, corantes especiais que diferenciam os componentes fibrosos da matriz extracelular e sais metálicos, que se precipitam formando depósitos metálicos. Esses três tipos de corantes podem ser combinados, obtendo-se um resultado mais próximo do esperado.

A combinação de corantes mais utilizada é a *hematoxilina* e *eosina* (H&E). O primeiro é um corante básico, que tingem os elementos de uma cor roxa como os núcleos celulares e algumas regiões do citoplasma. O segundo é um corante ácido que tingem os componentes básicos da célula de um tom róseo.

Finalmente, o corte deve passar novamente por banhos de etanol (com concentrações crescentes) e, por fim, em um banho de xilol. O corte, colocado sobre uma lâmina, é montado com uma gota ou duas do meio de montagem, dissolvido em xilol, minimizando a refração da luz que atravessa o corte. Então, uma fina lamínula de vidro é colocada sobre o meio de montagem. O xilol depois evapora, deixando o corte corado firmemente unido à lâmina [14].

### 2.1.3.1 Artefatos

Artefato é um defeito causado durante a montagem da lâmina que altera ou distorce a aparência natural das células. Embora sejam muito comuns, os artefatos podem impossibilitar a reconstrução de uma série porque deterioram mais fatias do que o necessário para permitir uma visualização representativa. Os principais tipos de artefatos encontrados em microscopia de luz são:

- **Dobra do tecido** - Em alguns casos as regiões do tecido dobram como em um lençol. Ocorrem geralmente nos cantos dos cortes, mas podem acontecer também em partes internas da fatia;
- **Áreas fora de foco** - Algumas fatias podem apresentar ondulações que resultam em áreas fora de foco na imagem final. A *profundidade de campo*, ou a região em que os objetos ficam em foco, reduz com o aumento da ampliação. Uma ampliação de 10 vezes permite a visualização de uma fatia mais espessa, sem que objetos fiquem fora de foco, do que uma ampliação de 40 vezes;
- **Artefatos causados pela lâmina do micrótomo** - As lâminas utilizadas para o corte do tecido em fatias são ferramentas de precisão e mesmo um defeito na ordem de micrômetros pode ser detectado se observado no microscópio óptico;
- **Retração e expansão** - Durante o processo de coloração do tecido, as diferentes temperaturas dos produtos químicos responsáveis pela coloração causam a retração ou expansão dos tecidos, fazendo com que as células se dispersem, no caso da expansão, ou sejam espremidas, no caso da retração. Existe ainda o caso onde tecidos adjacentes separam-se por causa da retração ou expansão diferenciada de cada um, formando uma área vazia entre eles.

A figura 2.1 mostra os diferentes artefatos descritos em imagens obtidas para a realização dos testes deste trabalho. O item (a) mostra uma imagem onde a parte superior do tecido está dobrada. O item (b) mostra uma imagem em que uma grande área na parte interior do corte está fora de foco. O item (c) é um exemplo de artefatos introduzidos pela lâmina do micrótomo durante o corte do bloco de parafina. A linha segue da parte superior da imagem até a parte inferior. A seta indica a parte mais visível da linha. A expansão do tecido é

claramente visível no item (d) da figura. As setas indicam as áreas onde o tecido expandiu, criando regiões sem células.

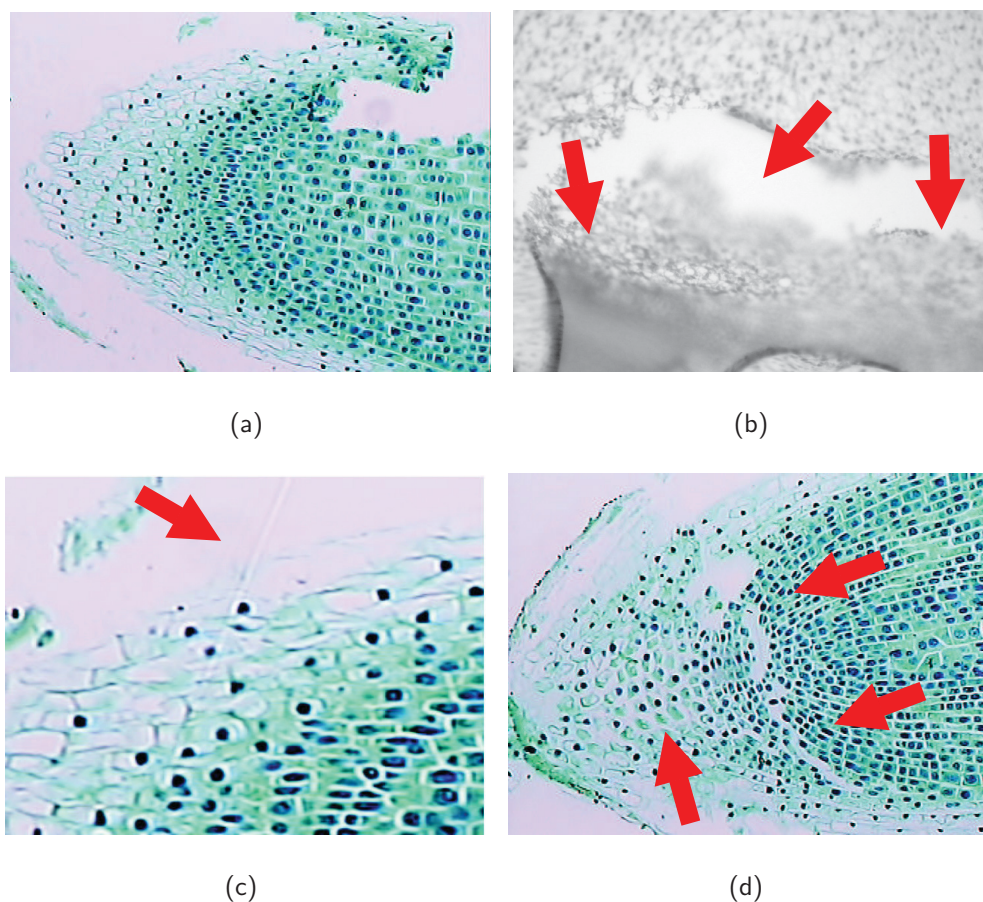


Figura 2.1: Artefatos mais comuns em lâminas preparadas para microscopia de luz.

Além de inutilizar uma série completa, os artefatos podem dificultar o registro dessas imagens. Os pontos de referência mais evidentes podem ser completamente perdidos ou os artefatos podem alterar o formato e a posição de um determinado corte, impedindo o alinhamento das fatias. A figura 2.2 mostra duas imagens de uma seqüência. O item (a) é a fatia número 35 e o item (b) é a fatia número 36. Devido à espessura das fatias existem poucos pontos de referência entre as duas imagens. Além disso, a fatia número 36 sofreu uma grande expansão do tecido durante a montagem da lâmina, o que torna o registro impraticável. Mesmo que a imagem possa ser transformada, inúmeras regiões necessitam de uma transformação local não linear para que ela possa ser sobreposta à fatia anterior.

#### 2.1.4 Aquisição digital

A aquisição de imagens digitais possui necessariamente dois dispositivos: um sensor que capta as ondas eletromagnéticas do espectro desejado e outro que transforma esses sinais em uma tensão proporcional à excitação do sensor. Esses dois equipamentos realizam a *amostragem* e

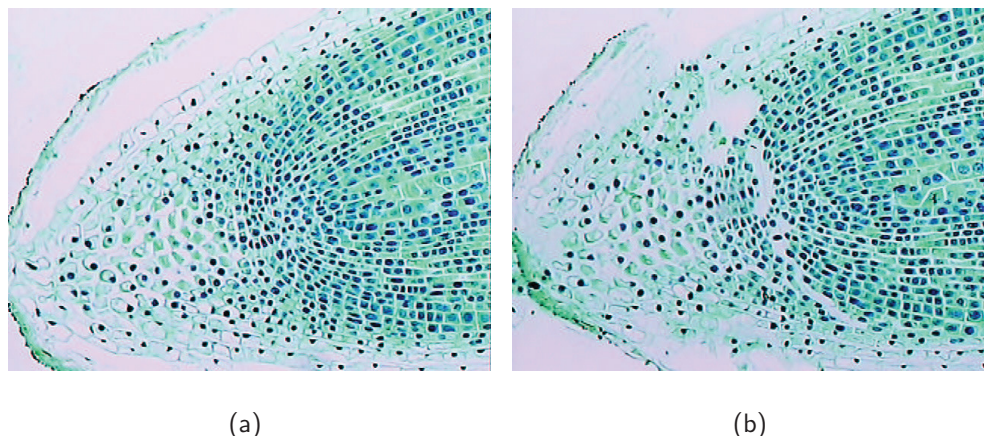


Figura 2.2: Duas fatias subsequentes de uma série.

*quantização*, respectivamente.

A amostragem é responsável por delimitar a porção que detecta as ondas eletromagnéticas, bem como seu formato. Ela também aloca o espaço individual dos sensores para que os menores elementos da imagem tenham dimensões desejadas.

O processo de quantização consiste em encontrar uma representação equivalente à excitação produzida pela ativação do sensor. No caso de câmeras eletrônicas monocromáticas, esse processo equivale a encontrar uma tensão de saída que represente a quantidade de iluminação incidente ao sensor.

A figura 2.3 esquematiza o processo de digitalização de uma provável cena de um jardim. Os raios refletidos pela flor produzem a imagem do item (a) que, por sua vez, são captados pela lente da câmera. Uma matriz de sensores é disposta numa área quadrada de 11 por 11 elementos, representada em (b) pela grade branca. Essa divisão em elementos menores é a amostragem. A quantização está representada pelo item (c), em que cada sensor emite um sinal representativo da luminosidade incidente. Como a imagem é colorida, existem 3 sensores para cada área delimitada em (b), um para cada componente de cor: vermelho, verde e azul.

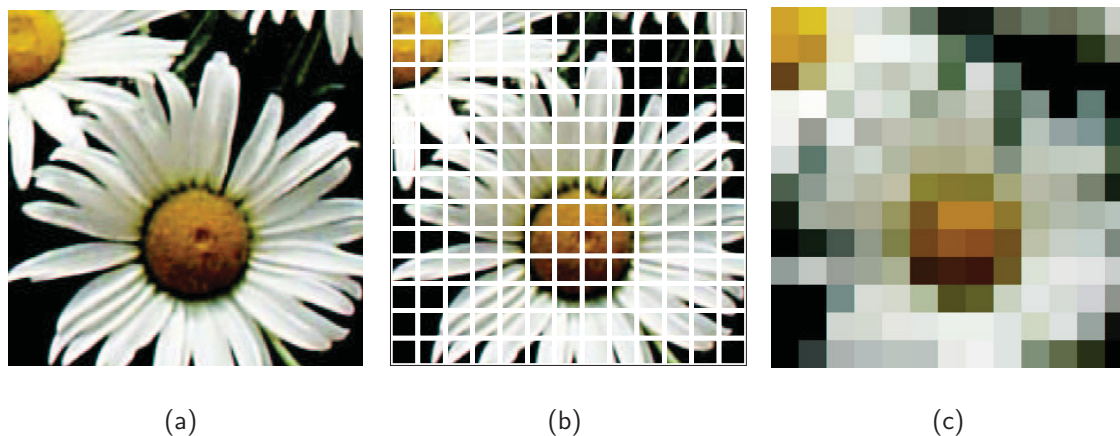


Figura 2.3: Processo de amostragem e quantização.

A saída de dispositivos fotográficos eletrônicos é geralmente digital e é reconhecida por um computador. O resultado da quantização é transformado em uma saída representada por 8, 16, 24, ou 32 bits por pixel, dependendo da natureza dos dados captados pelos sensores. Imagens monocromáticas geralmente possuem 8 ou 16 bits, que representam 256 ou 16536 tons de cinza diferentes para cada pixel, respectivamente. Imagens coloridas possuem 8 bits para cada espectro (vermelho, verde e azul) totalizando 24 bits. Algumas imagens coloridas possuem, além das três componentes de cor, uma quarta informação chamada *Canal Alfa*. Esse canal também é representado por 8 bits e indica a transparência do pixel. O valor 255 representa opacidade completa e 0 transparência total.

Atualmente existem dois sensores amplamente utilizados para a aquisição de imagens digitais: *CCD* e *CMOS*.

A tecnologia *CCD* (*charged-coupled device*) é utilizada em sensores de imageamento sólido, onde os sensores são compostos de elementos de imageamento de silício discretos chamados *fotossítios*, que têm uma tensão de saída proporcional à intensidade de luz incidente [23]. Nesse caso, a discretização do espaço amostral é bastante simples, bastando alocar os fotossítios de maneira a representar a discretização desejada. Uma câmera fotográfica pode ter uma matriz desses elementos, dispostos no tamanho e formato de um negativo comum. Durante a amostragem, basta verificar o nível de tensão de cada fotossítio e realizar a atribuição adequada de cada valor de intensidade ao pixel equivalente em posição espacial ao fotossítio, responsável pela medida.

A tecnologia *CMOS* (*complimentary metal oxide semiconductor*) é considerada de pior qualidade se comparada à *CCD*, principalmente porque capta menos luz. Em contrapartida, é um sensor mais barato porque é construído diretamente sobre uma pastilha de silício e sua fabricação utiliza técnicas bastante conhecidas, empregadas na fabricação de outros tipos de circuitos integrados. Essa tecnologia, ao contrário da utilizada na produção de sensores *CCD*, emprega métodos mais simples para realizar a leitura dos sensores, o que torna o sensor mais suscetível de ruídos. A tecnologia *CCD* aplica técnicas especiais para reduzir a quantidade de ruído durante a leitura dos sensores, o que a torna mais confiável e de maior qualidade.

### 2.1.5 Qualidade da aquisição

As imagens adquiridas por sensores eletrônicos não estão livres de defeitos e distorções [6]. As razões para o aparecimento desses defeitos são, em geral:

- Imprecisão na montagem da câmera;
- Impurezas ou defeitos das lentes e do sistema de alinhamento;
- Micro-falhas ou imprecisões no processo de fabricação das matrizes *CCD*;

- Distorção dos sinais analógicos na câmera ou no circuito do sistema de aquisição das imagens.

Infelizmente, os três primeiros itens podem ser corrigidos apenas durante o processo de construção das câmeras, o que deve ser feito pelo fabricante do dispositivo. As distorções causadas durante a leitura dos sensores pode ser contornada com a média de algumas imagens captadas pela câmera ou a aplicação de filtros espaciais passa-baixas. Essas técnicas serão descritas no próximo capítulo.

## 2.2 Pré-processamento

As técnicas de pré-processamento visam a preparar as imagens aumentando as chances de êxito nas etapas subseqüentes [23]. Essas técnicas são empregadas para aplicações específicas. Uma técnica de pré-processamento pode ser bastante útil para realçar os núcleos do tecido muscular a uma determinada ampliação, mas não ser necessariamente a melhor abordagem para aumentar o contraste dessas imagens com ampliações menores.

Tais técnicas podem ser aplicadas em dois domínios diferentes, o espacial e o de frequência. Este trabalho emprega técnicas de pré-processamento no domínio espacial e a próxima seção detalha as técnicas mais importantes para este trabalho.

### 2.2.1 Métodos no Domínio Espacial

O termo *domínio espacial* refere-se ao agregado de pixels que compõem uma imagem. O processamento neste domínio opera diretamente sobre os níveis de intensidade dos pixels e pode ser denotado como:

$$g(x, y) = T[f(x, y)] \quad (2.1)$$

em que  $T$  é a transformação sobre alguma vizinhança de  $(x, y)$  da imagem original  $f$ , e  $g$  é a imagem resultante. Transformações sobre um único pixel, sem considerar sua vizinhança, podem ser simplificadas, escrevendo-se:

$$s = T(r) \quad (2.2)$$

onde  $s$  é qualquer pixel da imagem resultado, mas espacialmente equivalente ao pixel  $r$  da imagem original.

Imagens de microscopia obtidas com equipamentos monocromáticos estão especialmente sujeitas a um baixo contraste, dependendo do corante utilizado no tecido. As imagens da figura 2.4 são dois exemplos de imagens de baixo contraste adquiridas com o microscópio de luz. O item (a), embora possua dois tipos de tecidos razoavelmente distintos, não tem contraste entre os núcleos e o citoplasma das células. O item (b) é um exemplo em que vários

tecidos se unem, mas o baixo contraste da imagem monocromática dificulta a localização das fronteiras entre os tecidos.

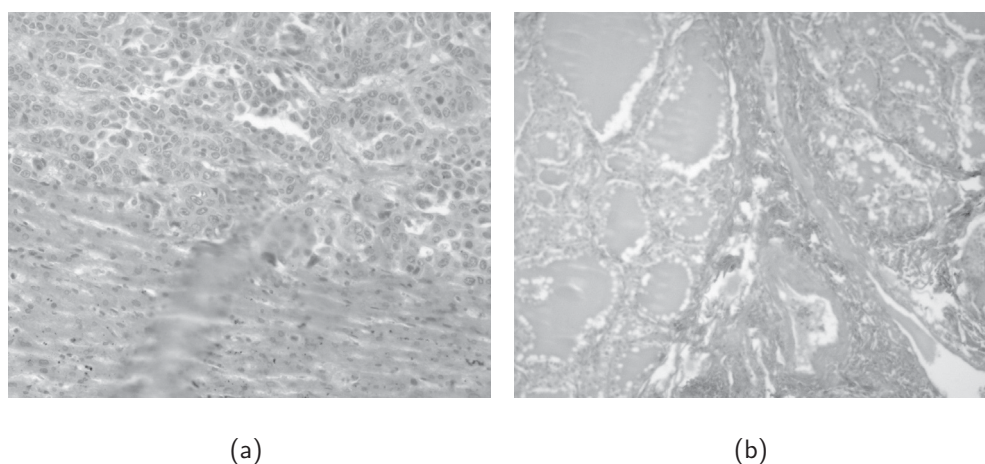


Figura 2.4: Imagens de microscopia de baixo contraste.

Para que maiores detalhes de uma imagem de baixo contraste sejam visíveis, quer seja para análise visual ou realce dos pontos importantes, técnicas que operam sobre um único pixel da imagem de cada vez são importantes para a análise visual do especialista. O *alargamento de contraste* é uma dessas técnicas.

O *alargamento de contraste* objetiva o aumento da escala dinâmica dos tons de cinza da imagem [23]. Utilizando uma função como a da figura 2.5 (a), o segmento  $(r_1, s_1)$   $(r_2, s_2)$  causa um espalhamento dos tons de cinza da imagem. A imagem na figura 2.5 (c) mostra a imagem original em (b) processada com alargamento de contraste. Pode-se notar o destaque dos núcleos em relação ao citoplasma das células.

Outros métodos que operam sobre um pixel apenas utilizam-se do histograma da imagem para realizar transformações. O histograma de uma imagem digital com níveis de cinza no intervalo  $[0, L - 1]$  é uma função discreta  $p(r_k) = n_k/n$ , em que  $r_k$  é o  $k$ -ésimo nível de cinza,  $n_k$  é o número de pixels na imagem com esse nível de cinza,  $n$  é o número total de pixels na imagem e  $k = 0, 1, 2, \dots, L - 1$ . Em termos gerais,  $p(r_k)$  dá uma estimativa da probabilidade de ocorrência do nível de cinza  $r_k$ . Um gráfico dessa função para todos os níveis de cinza da imagem fornece uma descrição global da aparência de uma imagem.

A figura 2.6 mostra os histogramas de quatro tipos de imagens características. O histograma da figura 2.6 (a) é de uma imagem escura, onde a maior quantidade de pixels está concentrada no lado esquerdo do gráfico, onde os níveis de cinza são mais próximos do preto. O histograma da figura 2.6 (b) é de uma imagem notadamente clara, onde a maioria dos pixels está na metade clara dos níveis de cinza. Uma imagem de baixo contraste tem pouca diversidade nos níveis de cinza, como mostra o histograma da figura 2.6(c). Já uma imagem bem contrastada tem uma distribuição uniforme por todos os níveis de cinza, como se pode notar na figura 2.6(d).

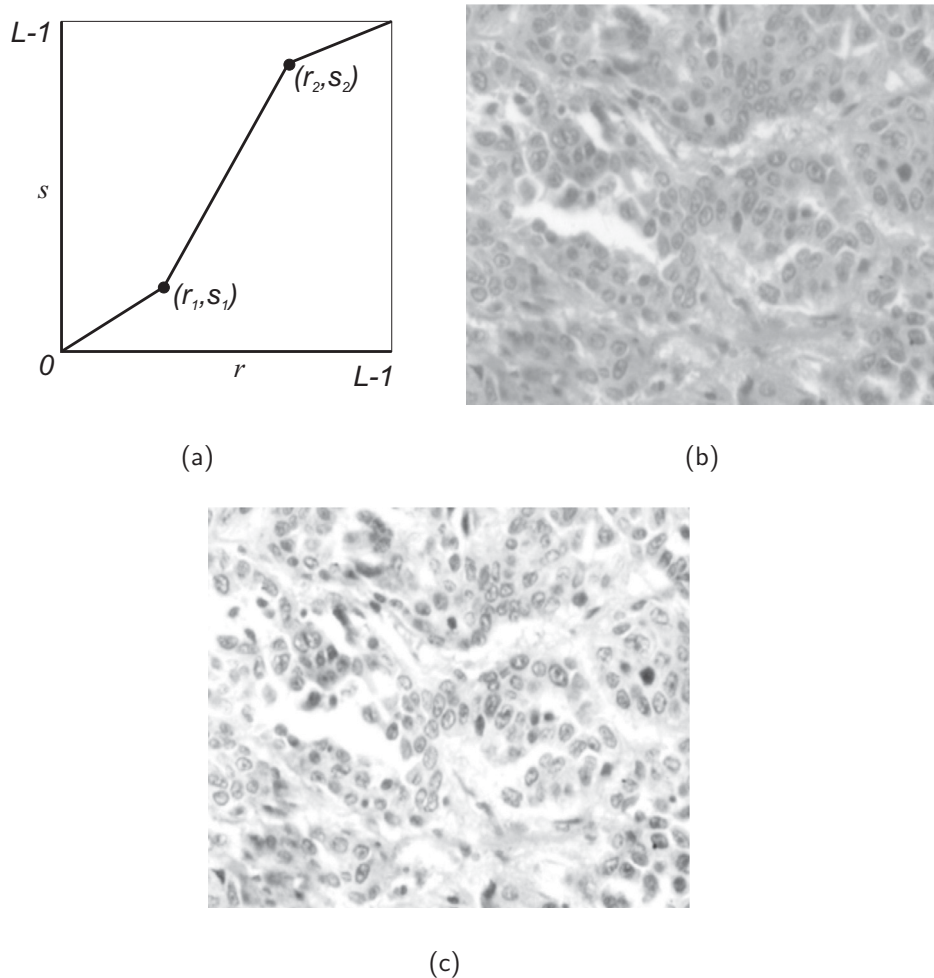


Figura 2.5: Alargamento de contraste. (a) Função típica de alargamento de contraste. (b) Imagem original. (c) Resultado do processamento da imagem em (b) por uma função de alargamento de constraste.

Um processo bastante conhecido e útil de pré-processamento é a *equalização do histograma* [23], que consiste em distribuir os pixels de maneira mais uniforme entre os níveis de cinza da imagem. A figura 2.7 mostra um exemplo da aplicação desse processamento em uma imagem de baixo constraste. A imagem na figura 2.7 (c) e seu histograma (d) foram obtidas através da equalização de histograma da imagem original na figura 2.7 (a). A figura 2.7 (b) mostra o histograma da imagem original, notadamente de uma imagem clara e de baixo constraste.

A equalização do histograma, embora bastante útil, pode não ser desejada em alguns casos. Isso porque gera apenas a aproximação de um histograma uniforme. A *especificação de histograma* [23] é interessante porque possibilita que formas particulares para realçar certas escalas de níveis de cinza da imagem sejam especificadas interativamente.

Os dois métodos de equalização de histograma anteriores são globais, pois operam sobre todos os níveis de cinza da imagem de forma equivalente. O *realce local* opera sobre uma vizinhança  $n \times n$  ou  $n \times m$ , ao mover o centro dessa vizinhança pixel-a-pixel. Em cada

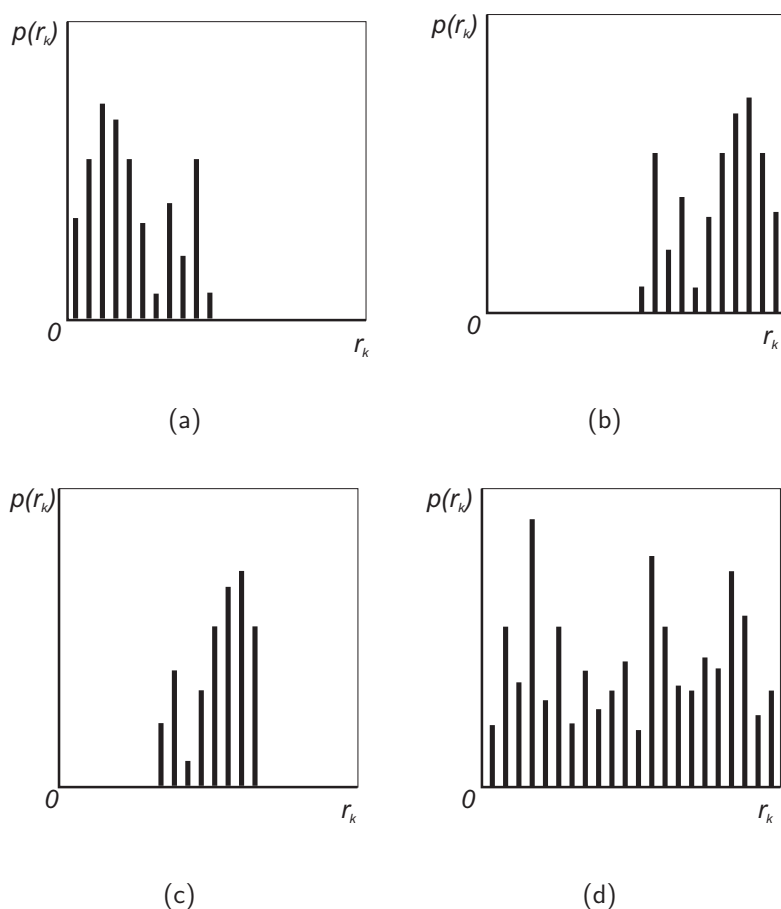


Figura 2.6: Histogramas de quatro tipos característicos de imagens.

posição, o histograma da vizinhança é calculado e então equalizado. Esta técnica permite também o uso de outras funções baseadas na intensidade dos pixels, como variância e média de intensidade.

Além das técnicas de realce ponto a ponto no domínio espacial, existem técnicas que utilizam máscaras espaciais para o processamento das imagens.

Uma máscara genérica  $3 \times 3$  é mostrada na figura 2.8. Considerando os níveis de cinza sob a máscara por  $z_1, z_2, \dots, z_9$ , o resultado de uma máscara é dado por:

$$R = w_1 z_1 + w_2 z_2 + w_3 z_3 + \dots + w_9 z_9 \quad (2.3)$$

A máscara percorre a imagem, deslocando seu centro e calculando  $R$  para cada pixel. O resultado  $R$  pode substituir o pixel original, bem como dar origem a uma nova imagem. As máscaras podem possuir vários tamanhos, mas são comumente quadradas, de tamanho  $n \times n$  onde  $n$  é um número natural ímpar.

Os filtros espaciais podem ser divididos em filtros de suavização e aguçamento. Os filtros espaciais podem ser ainda categorizados em filtros passa-baixa, passa-alta e passa-banda, servindo para suavizar uma imagem, aguçá-la ou restaurar imagens, respectivamente.

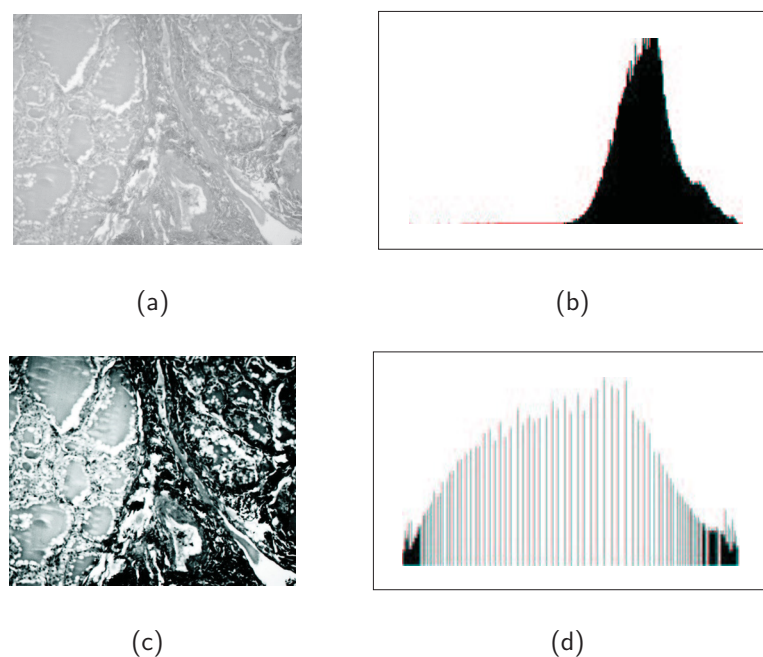


Figura 2.7: Resultado da equalização do histograma. (a) Imagem original e (b) seu histograma. (c) Resultado da equalização do histograma de (a) e (d) histograma da imagem final.

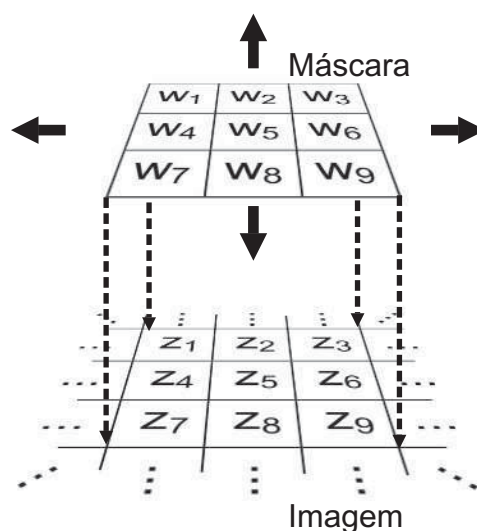


Figura 2.8: Máscara genérica  $3 \times 3$ .

Como descrito na seção 2.1.5, as imagens de microscopia são adquiridas em sua maioria por dispositivos de aquisição digitais com sensores CCD. Conseqüentemente, essas imagens possuem ruídos, oriundos do equipamento de aquisição ou da própria câmera digital.

Ruídos são removidos em sua maioria com a aplicação de filtros passa-baixas. Diferentes filtros possuem características distintas, desejáveis ou não para cada tipo de imagem. O filtro da *mediana* é bastante aconselhável nesse caso porque preserva detalhes da imagem original após o processamento.

O resultado da aplicação do filtro da mediana é bastante similar ao resultado obtido com a aplicação do filtro da média. Seguindo o modelo da equação 2.3, o filtro da média de vizinhança- $n$  pode ser escrito como:

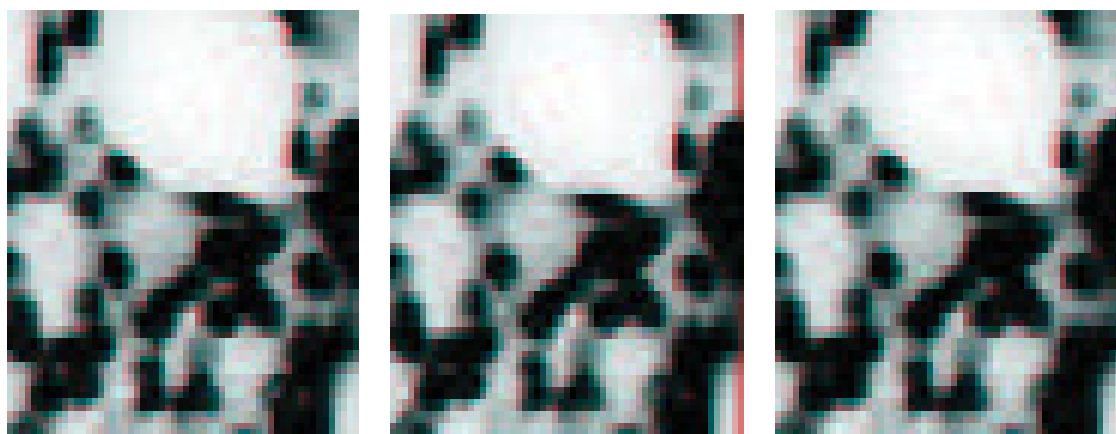
$$R = \frac{1}{n}(z_1 + z_2 + \dots + z_{n-1} + z_n) \quad (2.4)$$

Este filtro resulta na média das intensidades da vizinhança- $n$  calculada, o que causa um borramento na imagem [23]. A técnica da mediana não utiliza uma máscara, porém baseia-se na região próxima ao pixel calculado. O cômputo da mediana em uma vizinhança pode ser resumido nos seguintes passos:

1. Os valores da vizinhança- $n$  são colocados em ordem crescente, marcando-se a posição de cada valor com os índices  $1, 2 \dots (n \times n)$ ;
2. O valor que estiver na posição  $\lceil \frac{n}{2} \rceil$  é escolhido como o valor representativo da vizinhança. Se o número de posições for par, um dos valores nas posições  $\frac{n}{2}$  ou  $\frac{n}{2} + 1$  é escolhido.

O filtro da mediana possui duas vantagens em relação ao filtro da média:

- A mediana é uma estatística mais robusta porque um único pixel da vizinhança com valores muito diferentes dos outros não afetará a média significativamente;
- O valor da mediana será um valor de um dos pixels da vizinhança, logo, esse filtro não gera pixels com valores não-representativos quando o filtro calcula pixels próximos aos limites da imagem. Por esse motivo, o filtro da mediana é muito mais eficaz em preservar bordas salientes do que o filtro da média.



(a) Imagem Original

(b) Vizinhança-2

(c) Vizinhança-3

Figura 2.9: Filtro da mediana.

A figura 2.9 mostra o resultado da aplicação do filtro da mediana com vizinhanças de tamanho 2 e 3 na imagem original da figura 2.9 (a). Essa imagem foi adquirida com uma câmera CCD monocromática acoplada a um microscópio de luz e possui várias células com núcleos de formato circular e um círculo branco, que é um buraco no tecido. O resultado da aplicação do filtro com vizinhança-2 tem poucas melhorias, se comparada à imagem original. O resultado da aplicação do filtro com vizinhança-3 causa o preenchimento dos núcleos mais claros das células, bem como a redução das reentrâncias em alguns pontos do limite entre os núcleos e o citoplasma.

## 2.2.2 Retificação de Imagens

O processo de retificação de imagens consiste basicamente em corrigi-las da inclinação ocorrida no instante da tomada fotográfica. Para tanto, analiticamente, o processo preocupa-se em determinar os parâmetros de orientação exterior e posteriormente aplicá-las em todos os pixels para uma correção à nova posição na imagem retificada [25].

As imagens obtidas de uma mesma lâmina estão no mesmo plano de focalização da câmera, porém orientadas com ângulos diferentes. A escala também é igual para as duas imagens, a de referência e a capturada. Há também uma diferença de translação entre os pontos de referência das duas imagens. A transformação pode ser calculada com [10]:

$$\begin{pmatrix} u & v \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} x & y & 1 \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} sc & -ss \\ ss & sc \\ tx & ty \end{pmatrix} \quad (2.5)$$

$$sc = \sigma * \cos(\theta) \quad (2.6)$$

$$ss = \sigma * \text{sen}(\theta) \quad (2.7)$$

onde  $u$  e  $v$  são os valores dos pontos característicos na imagem de referência, selecionados pelo usuário e  $x$  e  $y$  são os pontos característicos na imagem capturada, também selecionados pelo usuário.  $\theta$  é o ângulo de rotação entre as imagens.  $\sigma$  é a escala entre as duas imagens, que pode ser considerada 1, já que as imagens não possuem diferença de tamanho entre si.  $tx$  e  $ty$  são as translações que a imagem capturada precisa sofrer para que seja corretamente alinhada com a imagem de referência. Existe a necessidade de que existam pelo menos dois pares de pontos característicos para que o sistema seja resolvido.

## 2.3 Segmentação

A segmentação de imagens consiste na extração ou identificação de objetos de interesse contidos na imagem, onde o objeto é toda região com conteúdo semântico relevante para a aplicação

desejada. Dentre as etapas de um sistema de processamento de imagens, a segmentação é uma das tarefas mais complexas e difíceis. Após a segmentação, cada objeto é descrito através de suas propriedades geométricas e topológicas. Por exemplo, atributos como área, forma e textura podem ser extraídos dos objetos e posteriormente utilizados no processo de análise.

Em geral, a segmentação de imagens pode ser realizada através das propriedades básicas de valores de níveis de cinza, detectando-se descontinuidades ou similaridades. Na primeira categoria, a abordagem é particionar a imagem com base em mudanças abruptas nos níveis de cinza. As principais áreas de interesse nessa categoria são a detecção de pontos isolados e detecção de linhas e bordas na imagem. As principais abordagens da segunda categoria baseiam-se na limiarização e crescimento de regiões. Na prática, a maneira mais comum de identificação de descontinuidades é através da varredura da imagem por uma máscara, como descrito na seção 2.2.1

Imagens de microscopia utilizadas na Histologia são bastante variadas. A combinação de diferentes ampliações, tipos de tecidos e corantes são enormes, podendo dar origem a inúmeros tipos de imagens. Mesmo o estudo de um único tipo de tecido, ou ainda de uma única lâmina, pode depender de imagens muito diferentes e, na maioria das vezes, pouco características e inadequadas para se utilizar uma técnica de segmentação genérica, que dê resultados ótimos com todas as imagens.

O uso de corantes aumenta o contraste entre os constituintes do tecido, facilitando a diferenciação entre os componentes diversos das células. Porém, as fatias devem ser finas o bastante para que possam ser examinadas no microscópio óptico, o que geralmente aumenta o valor representativo da tonalidade de cinza do pixel porque uma quantidade maior de raios luminosos atravessa o corte. Nesse caso, as áreas com menor densidade conseqüentemente ficarão mais claras do que áreas com maior densidade. Essa dedução, no entanto, não é sempre verdade. Se o acúmulo de um determinado material no eixo axial de disposição das lentes do microscópio for maior do que outro, mesmo que a densidade óptica do primeiro material seja menor do que o segundo, então o resultado final é uma região mais escura do que a preenchida pelo segundo material.

Uma esfera semi-transparente e oca, com a superfície espessa como a representada na figura 2.10 e observada tal que os raios luminosos sejam paralelos ao eixo axial dos olhos do observador, vindo por trás da esfera, é vista como representada na projeção superior da figura 2.10, em que a região periférica parece ser mais escura do que a região central. Esse efeito é particularmente evidente em imagens de microscopia, em que a membrana celular é corada de tal forma que fique menos evidente do que o núcleo da célula, mas causa regiões tão escuras quanto os núcleos.

Diversas técnicas foram desenvolvidas com o intuito de segmentar imagens de microscopia [4, 39, 42, 45, 56, 63, 66]. Tais técnicas, porém, são específicas e dependem do tecido, da ampliação, dos corantes aplicados e dos instrumentos utilizados na captura das imagens. A criação de um método genérico e ótimo é extremamente difícil. Por esse motivo, este tra-

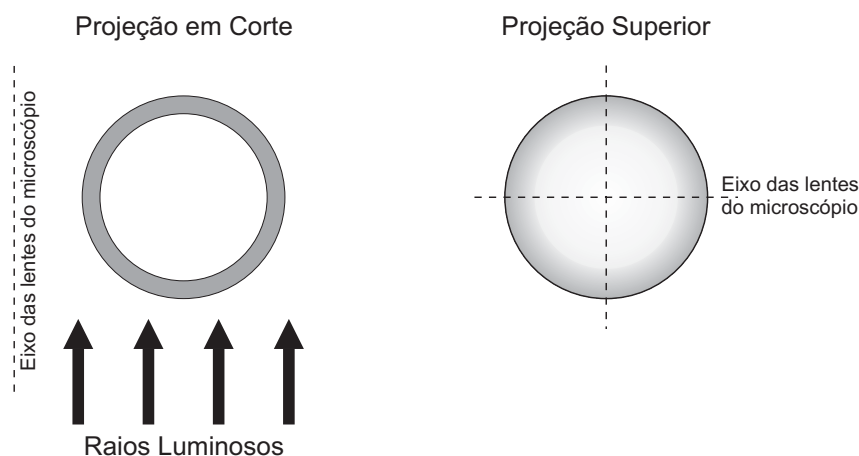


Figura 2.10: Transmissão de luz através de materiais com densidades ópticas diferentes no eixo das lentes do microscópio.

balho visa a empregar técnicas simples mas que tenham um bom resultado em vários tipos de imagens.

A técnica de segmentação mais freqüentemente utilizada para a segmentação de imagens de microscopia é a limiarização. Esse método, no entanto, não é eficaz por si só, e é empregada na maioria dos casos seguida de processos que visam a melhorar os resultados obtidos com a técnica do limiar. Neste trabalho os procedimentos aplicados depois da limiarização são a abertura e fechamento morfológicos, operadores da *Morfologia Matemática*.

Assim sendo, a próxima seção detalha a técnica de limiarização, de fundamental importância para este trabalho. A seção 2.3.2 introduz a morfologia matemática e alguns de seus operadores, empregados para melhorar o resultado obtido com a técnica de limiarização.

### 2.3.1 Limiarização

Supondo que o histograma de níveis de cinza mostrado na figura 2.11 seja de uma imagem  $f(x, y)$  composta por objetos claros sobre um fundo escuro e que seus pixels estejam agrupados em dois grupos distintos, os elementos que não pertencem ao fundo podem ser facilmente separados do fundo escolhendo-se um limiar  $T$  que divida os níveis de cinza em dois grupos.

Esse limiar  $T$  pertence ao intervalo dos tons de cinza da imagem e divide os pixels da imagem tal que se  $(x, y) > T$  então o pixel pertence aos objetos, e se  $(x, y) \leq T$  o pixel pertence ao fundo da imagem.

Uma imagem limiarizada  $g(x, y)$  é definida como:

$$g(x, y) = \begin{cases} 1 & \text{se } f(x, y) > T \\ 0 & \text{se } f(x, y) \leq T \end{cases}$$

Pixels rotulados como 1 (ou qualquer outro tom de cinza adequado) representam os objetos,

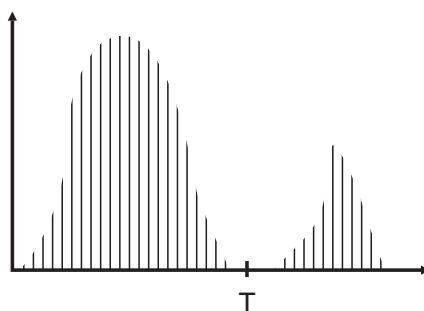


Figura 2.11: Histogramas de níveis de cinza que podem ser particionados por um limiar único.

enquanto que aqueles denominados como 0 representam o fundo.

Quando a imagem apresenta mais de dois grupos dominantes, o número de limiares pode ser maior do que 1. Esse tipo de técnica é chamada *limiarização multinível* e o mesmo procedimento pode ser aplicado a imagem, onde se  $T_1 < f(x, y) \leq T_2$  então o objeto pertence a classe definida entre os limiares  $T_1$  e  $T_2$ . Dependendo do número de limiares, que pode variar de 2 a  $n$ , existirão  $(n + 1)$  classes resultantes do processo de limiarização.

Este tipo de limiarização é chamada *global* porque opera sobre as características globais da imagem. Um único limiar é responsável pela segmentação de toda a imagem, o que pode não ser desejável em alguns casos. Problemas de iluminação podem tornar a tarefa de segmentação por limiar praticamente impossível. Nesses casos, técnicas de limiarização local, que consideram apenas uma pequena vizinhança ao redor de um pixel, podem ser aplicadas corrigindo-se o problema introduzido por uma iluminação pobre.

Assim como o processamento espacial de técnicas de pré-processamento, introduzidas na seção 2.2.1, as técnicas de limiarização locais podem ser aplicadas com uma máscara deslocada sobre todos os pixels. Duas técnicas de limiarização locais são bastante conhecidas, a de *Bernsen* e a de *Niblack*.

A técnica de Bernsen [3] calcula o limiar para cada pixel  $(x, y)$  como:

$$T(x, y) = \frac{z_{min} + z_{max}}{2} \quad (2.8)$$

onde  $z_{min}$  e  $z_{max}$  são os níveis de cinza mínimo e máximo, respectivamente, da vizinhança  $n \times n$  centrado no pixel  $(x, y)$ .

Na técnica de Niblack [47] o valor do limiar é calculado com base na variância e na média da vizinhança do pixel  $(x, y)$ :

$$T(x, y) = \mu(x, y) + k\sigma(x, y) \quad (2.9)$$

em que  $\mu(x, y)$  é a média dos tons de cinza da vizinhança,  $\sigma(x, y)$  é a variância da vizinhança e  $k$  é um fator de correção para ajuste conforme o tipo ou as características da imagem.

Outras técnicas de limiarização locais foram desenvolvidas para a aplicação em imagens de microscopia, como em [41, 67]. Infelizmente, tais técnicas são altamente específicas, produzindo bons resultados apenas com imagens nas quais estas técnicas foram aplicadas.

A escolha do limiar depende de cada aplicação e pode ser tanto automática quanto manual. Técnicas automáticas, como a de Otsu [52], encontram o limiar  $T$  em função do histograma da imagem. Essa técnica considera que o histograma é formado por dois grupos dominantes, como na figura 2.11. Cada classe possui suas características próprias como média, variância e desvio padrão.

O objetivo dessa técnica é maximizar a razão  $\eta(T)$  da variância entre as classes,  $\sigma_B^2$ , em relação à variância global,  $\sigma_T^2$ , para todos os valores possíveis de  $T$ , sendo:

$$\eta(T) = \frac{\sigma_B^2}{\sigma_T^2}$$

tal que

$$\begin{aligned} \sigma_T^2 &= \sum_{i=0}^{L-1} (i - \mu_T)^2 p_i & \mu_T &= \sum_{i=0}^{L-1} i p_i & \sigma_B^2 &= \omega_1 \omega_2 (\mu_1 \mu_2)^2 \\ \omega_1 &= \sum_{i=0}^T p_i & \omega_2 &= 1 - \omega_1 & \mu_1 &= \frac{\mu_S}{\omega_1} \\ \mu_2 &= \frac{\mu_T - \mu_S}{\omega_2} & \mu_S &= \sum_{i=0}^T i p_i & \sum_{i=0}^{L-1} p_i &= 1, \quad p_i = \frac{n_i}{n} \end{aligned}$$

em que  $n_i$  é o número de pixels com nível de cinza  $i$ ,  $n$  é o número total de pixels da imagem,  $p_i$  representa a probabilidade do nível de cinza  $i$  ser encontrado na imagem e  $L$  é o número de níveis de cinza da imagem.

Imagens de microscopia, no entanto, não possuem dois grupos distintos de pixels, agrupados como na figura 2.11. Mesmo que os núcleos sejam mais evidentes do que outros constituintes celulares, as imagens microscópicas sofrem de uma iluminação desigual ou do efeito descrito no início desta seção. O efeito resultante da limiarização em imagens microscópicas obtidas com o microscópio de luz é que, a partir de um certo limiar em que os núcleos começam a tomar forma, outros elementos são segmentados como se fossem os objetos de interesse, incluindo muito ruído a imagem segmentada. Para tentar eliminar esse problema, é dado um valor mais baixo ao limiar, o que acaba deixando áreas internas dos núcleos sem preenchimento.

Para solucionar esses problemas, algumas operações de *morfologia matemática* podem ser empregadas, reduzindo os elementos excedentes e completando os buracos da imagem. A próxima seção introduz a morfologia matemática, bem como alguns de seus operadores, utilizados neste trabalho.

## 2.3.2 Morfologia Matemática

A *morfologia matemática* é uma ferramenta que pode ser utilizada para extrair componentes de uma imagem que sejam úteis na representação e descrição da forma de uma região específica [23].

As operações de morfologia são geralmente aplicadas sobre imagens binárias, em que os conjuntos de pixels pretos representam a forma dos objetos. Tais conjuntos fazem parte do espaço bidimensional de números inteiros  $Z^2$ , em que cada elemento do conjunto é um vetor bidimensional de coordenadas  $(x, y)$ .

Para o perfeito entendimento das operações de morfologia, são necessárias algumas definições básicas. Sejam  $A$  e  $B$  conjuntos de  $Z^2$ , com componentes  $a = (a_1, a_2)$  e  $b = (b_1, b_2)$ , respectivamente. A *translação* de  $A$  por  $x = (x_1, x_2)$ , denotada por  $(A)_x$ , é definida como:

$$(A)_x = \{c \mid c = a + x, \text{ para } a \in A\}. \quad (2.10)$$

A *reflexão* de  $B$ , denotada por  $\hat{B}$ , é definida como:

$$\hat{B} = \{x \mid x = -b, \text{ para } b \in B\}. \quad (2.11)$$

O *complemento* do conjunto  $A$  é definido como

$$A^C = \{x \mid x \notin A\}. \quad (2.12)$$

Finalmente, a *diferença* entre dois conjuntos  $A$  e  $B$ , denotada por  $A - B$ , é definida como

$$A - B = \{x \mid x \in A, x \notin B\} = A \cap B^C. \quad (2.13)$$

Com essas definições é possível descrever as operações de *dilatação* e *erosão*.

### 2.3.2.1 Dilatação

Tomando-se  $A$  e  $B$  como conjuntos de  $Z^2$  e  $\emptyset$  como o conjunto vazio, define-se a dilatação de  $A$  por  $B$ , denotada por  $A \oplus B$ , como

$$A \oplus B = \left\{x \mid (\hat{B})_x \cap A \neq \emptyset\right\}. \quad (2.14)$$

Portanto o processo de dilatação começa na obtenção da reflexão de  $B$  em torno de sua origem, seguido de uma translação dessa reflexão por  $x$ . A dilatação de  $A$  por  $B$  é então o conjunto de todos os deslocamentos  $x$  tais que  $\hat{B}$  e  $A$  sobreponham-se em pelo menos um elemento não nulo. O conjunto  $B$  percorre todos os pontos do conjunto  $A$ , de uma maneira similar àquela descrita na seção 2.2.1. As coordenadas que fazem parte da interseção entre

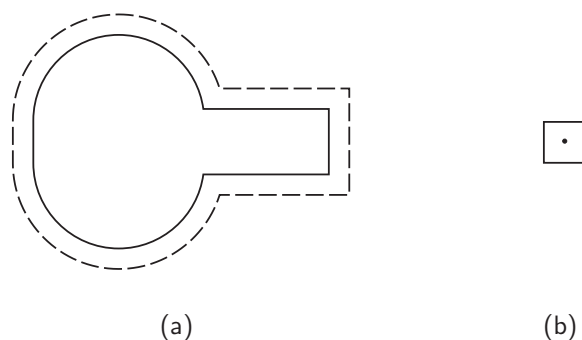


Figura 2.12: Dilatação de um conjunto.

os dois conjuntos são mantidas e as coordenadas pertencentes somente ao conjunto  $B$  são adicionadas ao conjunto original.

O conjunto  $B$  pode ser um conjunto da imagem original, mas é geralmente considerado um conjunto separado e chamado de *elemento estruturante* enquanto  $A$  faz parte da imagem original.

Um exemplo da aplicação da dilatação é mostrada na figura 2.12. O conjunto original  $A$  é mostrado no item (a), enquanto o item (b) é o conjunto  $B$  e o seu centro está indicado pelo círculo em negro no centro do quadrado. Depois de aplicada a dilatação, o conjunto resultante é mostrado em linhas tracejadas no item (a) da figura 2.12.

### 2.3.2.2 Erosão

Sendo  $A$  e  $B$  conjuntos em  $Z^2$ , a erosão de  $A$  por  $B$ , denotada por  $A \ominus B$ , é definida como:

$$A \ominus B = \{x \mid (B)_x \subseteq A\} \quad (2.15)$$

o que significa que a erosão de  $A$  por  $B$  é o conjunto de todos os pontos  $x$  tais que  $B$ , quando transladados por  $x$ , fiquem contidos em  $A$ .

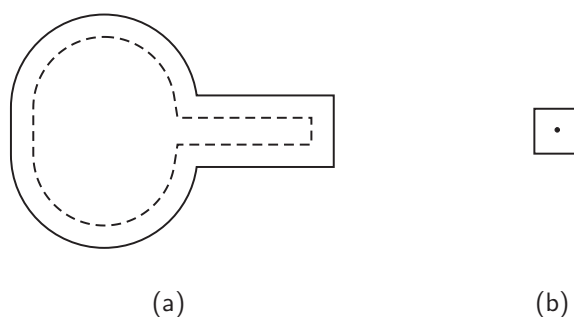


Figura 2.13: Erosão de um conjunto.

### 2.3.2.3 Abertura e Fechamento

As operações de dilatação e erosão podem ser combinadas com alguns resultados bastante úteis. Existem duas operações que utilizam a dilatação e a erosão como operações fundamentais, chamadas de *abertura* e *fechamento*. A primeira causa um estreitamento de regiões delgadas dos componentes da imagem, removendo pontas e separando objetos conectados por estreitamentos. A segunda tende a suavizar o contorno dos objetos, assim como a abertura, mas tende a fechar buracos e a preencher fendas de um contorno.

A abertura de um conjunto  $A$  por um elemento estruturante  $B$ , denotada como  $A \circ B$ , é definida como:

$$A \circ B = (A \ominus B) \oplus B \quad (2.16)$$

significando que a abertura de  $A$  por  $B$  é simplesmente a erosão de  $A$  por  $B$  seguida de uma dilatação de  $A$  por  $B$ .

O fechamento de um conjunto  $A$  por um elemento estruturante  $B$ , denotado como  $A \bullet B$ , é definido como:

$$A \bullet B = (A \oplus B) \ominus B \quad (2.17)$$

que significa que o fechamento é a dilatação de  $A$  por  $B$  seguida de uma erosão de  $A$  por  $B$ .

A figura 2.14 mostra dois exemplos, um de abertura e outro de fechamento dos conjuntos representados nos itens (a) e (g), respectivamente.

A erosão do conjunto em (a) pelo elemento estruturante em (b) é mostrada comparativamente no item (c), onde a linha tracejada representa o resultado da erosão. No conjunto resultante, em (d), é aplicada uma dilatação com o elemento estruturante em (b), que resulta no conjunto mostrado no item (f), que é a abertura do conjunto em (a) pelo elemento estruturante em (b).

A dilatação do conjunto em (a) pelo elemento estruturante em (b) resulta no conjunto (h). O item (g) mostra o resultado da dilatação comparada ao conjunto original. A erosão do conjunto em (h) resulta no fechamento do conjunto em (a) pelo elemento estruturante em (b), representado no item (j). O item (i) mostra o resultado do fechamento em comparação ao conjunto do item (h).

## 2.4 Registro

O alinhamento de imagens é uma tarefa de grande importância em Processamento de Imagens e na Reconstrução Tridimensional, usada para alinhar duas ou mais imagens obtidas de pontos de vistas diferentes, com alguma diferença de tempo entre as tomadas ou que foram adquiridas por sensores diferentes [10].

As aplicações de registro podem ser divididas em quatro grandes grupos [68]:

- Diferentes pontos de vista (análise multivisual)

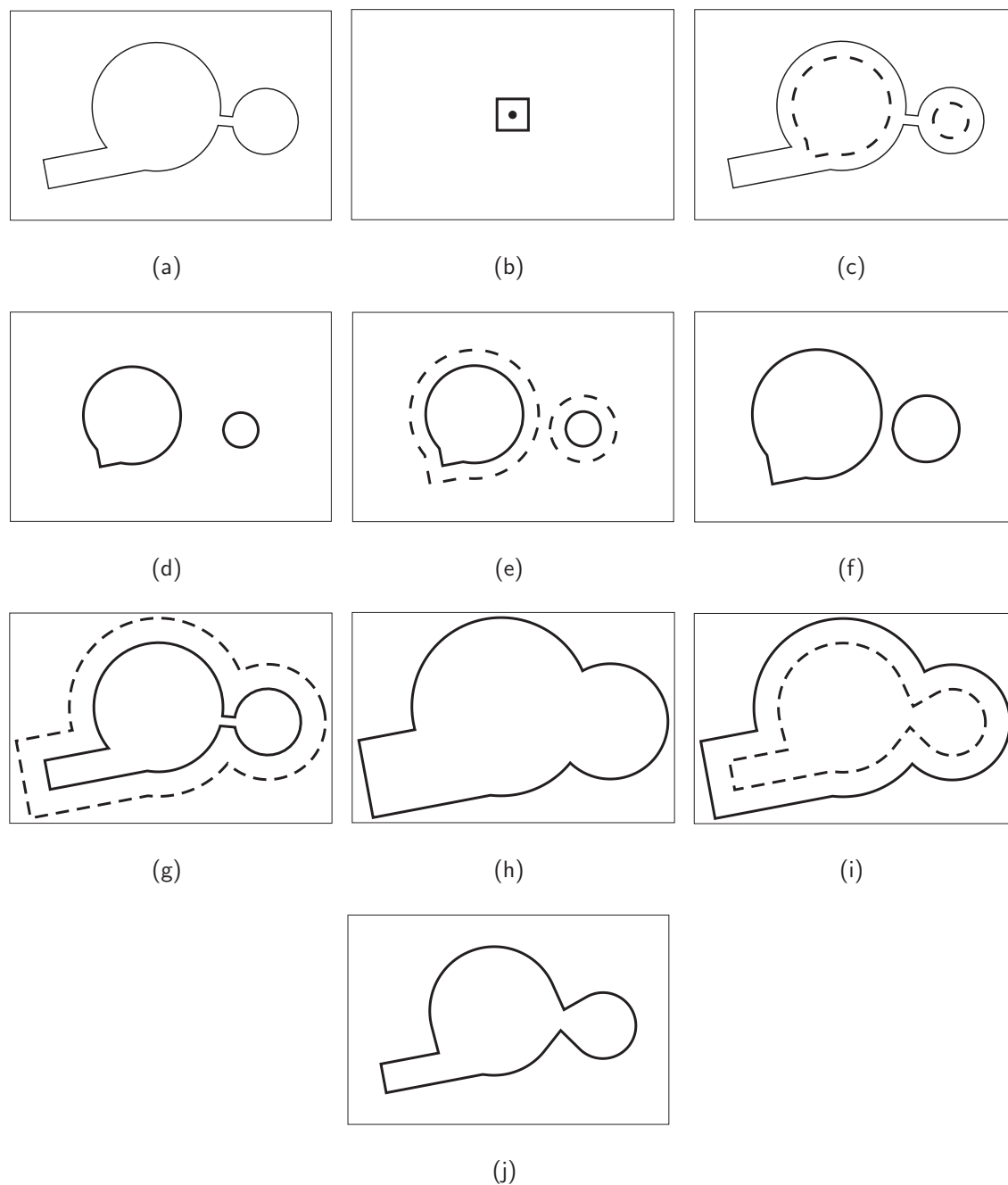


Figura 2.14: Abertura e fechamento.

- Épocas diferentes (análise multitemporal)
- Sensores diferentes (análise multimodal)
- Registro de cena em objetos tridimensionais

As imagens tratadas neste trabalho precisam ser alinhadas por dois motivos diferentes:

- Duas imagens do corte seriado precisam ser alinhadas para que a visualização tridimensional corresponda à estrutura tridimensional real do tecido antes de ser fatiado. Durante

o processo de preparo das lâminas, os cortes podem ser colocados no suporte de tal maneira que pareçam desalinhados, mesmo mantendo a orientação das lâminas constante. Para alinhar essas imagens, basta encontrar as transformações espaciais que orientam as imagens corretamente. Essas transformações são baseadas em pontos de controle, informadas pelo especialista;

- Duas imagens capturadas da mesma lâmina, adquiridas com o propósito de aumentar o campo de visão para que a estrutura de interesse esteja completamente visível, precisam ser alinhadas para que a estrutura seja remontada integralmente, sem que algumas de suas partes estejam faltando. Esse processo é conhecido como retificação de imagens e foi discutido na seção 2.2.2.

Quaisquer que sejam os métodos ou os motivos pelos quais duas imagens precisam ser alinhadas, o processo de registro consiste em [68]:

1. **Detecção de Características** - Características da imagem que serão utilizadas durante o processo de busca das transformações que alinharão as duas imagens. São apontadas manualmente ou selecionadas automaticamente.
2. **Equivalência de Características** - A correspondência entre as características detectadas nas imagens é estabelecida.
3. **Estimativa do Modelo de Transformação** - O tipo e os parâmetros das funções de mapeamento são estimados.
4. **Transformação e Ajuste da Imagem** - Finalmente, a imagem é transformada utilizando-se os parâmetros encontrados na etapa anterior. Os pixels com coordenadas não inteiras são interpolados por técnicas adequadas.

Alinhar as imagens provenientes de microscópios de luz é um processo extremamente difícil e altamente dependente do conhecimento do especialista. O tecido sofre deformações, podendo introduzir artefatos na lâmina a ser examinada. Esses artefatos podem dificultar a procura de características que possibilitem o alinhamento das imagens. A espessura das fatias também complica o processo já que, em alguns casos, os núcleos, utilizados como características de alinhamento não aparecem em duas fatias consecutivas.

A técnica de *comparação por sobreposição* é discutida no próximo capítulo, utilizada para o registro das imagens neste trabalho.

### 2.4.1 Comparação por Sobreposição

Devido à dificuldade em detectar características entre as fatias do corte seriado, o registro deve ser realizado pelo especialista com técnicas manuais, semelhante à técnica de comparação por

sobreposição (*Blink Comparator*) [11]. Essa técnica consiste em sobrepor as duas imagens, a imagem de controle e a imagem capturada, tal que a imagem de referência permaneça atrás da imagem capturada. A imagem capturada, por sua vez, é mostrada em períodos curtos, de 0,5 a 2 segundos e é removida pelo mesmo período. O especialista pode comparar alguns pontos característicos, transformando a imagem capturada até que todos esses pontos característicos se sobreponham. Ferramentas interativas permitem que o operador aplique uma rotação, mude a escala ou faça o deslocamento da imagem capturada.

## 2.5 Visualização Volumétrica

Como visto no início deste capítulo, a Visualização Volumétrica preocupa-se principalmente com técnicas de visualização de dados tridimensionais e é uma subárea da Visualização Científica.

De acordo com Kaufman [33], dados volumétricos são tipicamente um conjunto  $S$  de amostras  $(x, y, z, v)$ , onde  $v$  pode ser uma informação qualquer associada com os valores, ou posição espacial,  $(x, y, z)$ , como cor, temperatura, pressão ou densidade.

As amostras do conjunto  $S$  podem ser adquiridas aleatoriamente no espaço. Na maioria dos casos, porém, essas amostras são equidistantes ao longo dos três eixos e formam uma grade. Cada região uniforme delimitada pelos intervalos representa um elemento de volume, também conhecido como *voxel*. O conjunto, quando espaçado igualmente nos três eixos, é denominado *isotrópico*. Quando o volume não é igualmente espaçado ao longo dos três eixos,  $S$  é dito *anisotrópico*.

As amostras podem ser provenientes de três tipos de fontes: amostras de objetos ou fenômenos reais, dados calculados por uma simulação computadorizada e dados oriundos de um modelo geométrico [33]. Exemplos de aplicações que geram dados volumétricos são Ressonância Magnética, Tomografia Computadorizada e o Microscópio Confocal.

As técnicas de visualização volumétrica podem ser divididas em dois grandes grupos: visualização por extração de superfícies (*surface fitting*) e visualização direta de volumes (*volume rendering*) [54].

Embora a Visualização por Extração de Superfícies não seja apropriada para a reconstrução de uma seqüência de imagens obtidas por meio de microscópios de luz, a próxima seção trata do assunto e a seção 2.5.2 detalha o processo de Visualização Direta de Volumes.

### 2.5.1 Visualização por Extração de Superfícies

As primeiras abordagens na tentativa de representar conjuntos de dados volumétricos reduzem consideravelmente a quantidade de informação presente no conjunto tridimensional, considerando apenas o limite entre os diferentes materiais das amostras, ou seja, extraíndo a superfície dos objetos [16].

Diversas técnicas foram criadas e aperfeiçoadas tendo como objetivo extrair as superfícies da forma mais adequada do conjunto de dados: definir manualmente o contorno em cada fatia bidimensional [43] ou extrai-las automaticamente [64] e conectá-las com os contornos de fatias adjacentes formando faces triangulares [13, 19, 21, 34] ou superfícies de ordem superior [62].

Em comparação com o método de visualização direta de volumes, a extração de superfícies é mais rápida e ocupa muito menos espaço. Isso ocorre porque as superfícies são detectadas e representadas internamente por primitivas geométricas, como pontos, linhas e polígonos [57]. Muitas dessas primitivas possuem métodos de desenho implementadas em *hardware*, acelerando drasticamente o tempo de visualização de cenas formadas por essas primitivas. Depois de detectadas as superfícies, os dados volumétricos podem ser descartados (se não tiverem mais utilidade) e apenas as informações geométricas são armazenadas.

Em contrapartida, essa técnica tem suas desvantagens. Objetos muito pequenos podem ser detectados e, conseqüentemente, tornarem-se polígonos de proporções diminutas. Dependendo do tamanho desses objetos, eles não são visíveis, mas contribuem para o tempo de desenho da cena, além de ocuparem espaço de armazenamento. Outra desvantagem do método é a criação ocasional de falsos pedaços de superfície. Como as superfícies são extraídas das fatias, com base na densidade dos pixels, a rotulação de algumas regiões pode separar pequenas porções que mais tarde dão origem a superfícies que não deveriam existir [54].

Imagens de microscopia estão bastante sujeitas a ruído, principalmente porque os sensores de aquisição das imagens são propensos a incluírem ruído em suas imagens capturadas. Mesmo que técnicas de pré-processamento sejam utilizadas para reduzir a incidência de ruído nas etapas subseqüentes, freqüentemente partes de núcleos são detectadas na etapa de visualização, o que pode causar o aparecimento de inúmeros objetos minúsculos na imagem final, prejudicando o resultado.

## 2.5.2 Visualização Direta de Volumes

A visualização direta de volumes permite visualizar conjuntos de dados tridimensionais sem a necessidade de um passo intermediário. Além disso, essa técnica permite ver o interior, ou através do conjunto de dados e, conseqüentemente, muito mais detalhes do que a visualização por extração de superfícies [57].

Em muitos casos, os dados presentes no interior de um voxel contêm misturas de diversos materiais. Variações sutis que podem existir entre materiais, e variações locais em propriedades volumétricas, como absorção ou emissão de luz, são perdidas se o volume é simplesmente reduzido a superfícies [16].

A visualização direta de volumes é muito similar ao funcionamento de uma máquina de raios X, produzindo uma imagem bidimensional de dados tridimensionais. Os raios X são emitidos geralmente por uma fonte controlada e viajam paralelamente, atravessando o objeto de estudo. Alguns desses raios são totalmente absorvidos e nunca chegam a atravessar o

organismo, no caso dos seres humanos. Outros são desviados ao se chocar com algum tipo de matéria e muitos outros atravessam o corpo, atingindo um filme fotográfico, formando uma imagem bidimensional. A visualização direta de volumes utiliza-se da mesma técnica, lançando raios imaginários através do conjunto de dados. Cada *voxel* durante o percurso contribui para atenuar o raio ou alterá-lo com base nas leis da Física, tornando a visualização mais precisa. O conjunto desses raios forma uma imagem bidimensional no final do processo [40].

As técnicas de visualização volumétrica também podem ser classificadas segundo a ordem na qual os dados são processados. Os algoritmos baseados na *ordem dos objetos* percorrem a lista de objetos e determinam quais pixels são alterados para cada um. Os algoritmos baseados na *ordem da imagem* percorrem o espaço da imagem para determinar quais objetos afetam cada pixel [37].

A técnica mais popular de visualização direta e que se enquadra na ordem da imagem é o *ray casting* (lançamento de raios) proposto por Levoy [36]. A figura 2.15 mostra um esquema do algoritmo *ray casting*. Raios paralelos são lançados para cada pixel da imagem. Durante o trajeto do raio, os voxels atingidos contribuem para o processamento do pixel.

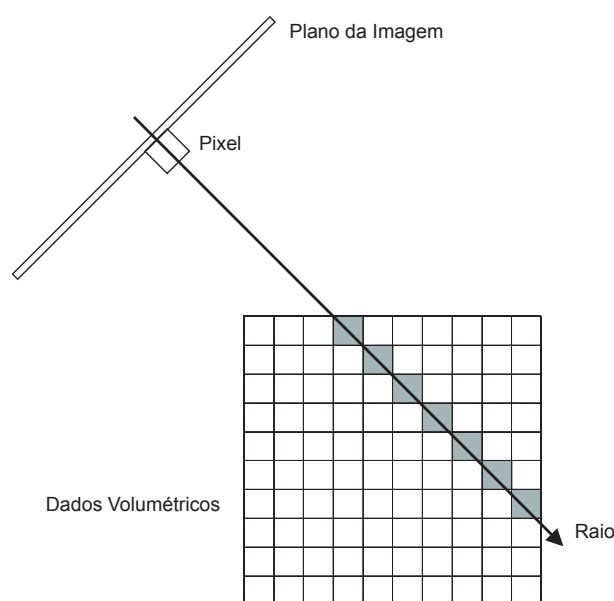


Figura 2.15: Esquema do algoritmo *Ray Casting*. Fonte: [40].

Essa técnica é bastante apropriada para aplicações onde a alta qualidade das imagens é prioridade. Melhorias foram propostas para tornar a visualização mais realista, como funções de reflexão [5] e radiação [31].

A Visualização Volumétrica é obtida por meio de uma seqüência de etapas, chamada *pipeline*. Quando uma etapa é finalizada, os dados são transferidos para a próxima operação (figura 2.16) [40]. Esse *pipeline* consiste na segmentação, computação do gradiente, reamostragem, classificação, iluminação e projeção.

Os métodos de segmentação adquirem dados que muitas vezes não podem ser diretamente

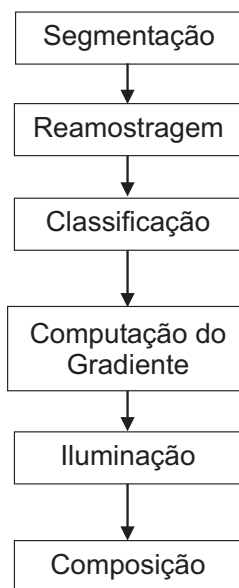


Figura 2.16: Seqüência de etapas necessárias para a obtenção da Visualização Volumétrica (*Pipeline*).

visualizados, como densidade, impedância acústica, magnetização do tecido, entre outros. A apresentação desses dados de forma a permitir uma interpretação visual dos dados requer que informações como luminância, cor e opacidade sejam atribuídos aos diferentes materiais da amostra. Essas tarefas são possíveis graças à segmentação e à rotulação dos voxels.

A segmentação é uma etapa de pré-processamento, se visualizada no contexto da Visualização Volumétrica, e é geralmente realizada antes de qualquer processamento volumétrico. O objetivo desse processo é detectar os diferentes materiais do volume, criando condições para que as amostras espaciais possam ser rotuladas corretamente. No entanto, é a etapa de classificação que caracteriza cada amostra, com informações de cor, opacidade e densidade. Em alguns casos, essa etapa é empregada em diferentes partes do *pipeline* da visualização volumétrica.

Durante a computação da visualização volumétrica, raramente um ponto amostrado no espaço de projeção coincide com um voxel no espaço do volume. Esse voxel, que é o resultado de um voxel original transformado por operações de escala, rotação e translação, é calculado fazendo-se uma reamostragem dos dados do volume.

A computação do gradiente tem por objetivo detectar a transição entre materiais, ou seja, encontrar a superfície entre dois materiais distintos. O gradiente é a medida da suavidade da transição entre dois materiais, bem como de sua direção. Como o gradiente se utiliza da densidade dos voxels, esta etapa deve ser aplicada depois da classificação.

A etapa de iluminação é utilizada para dar realismo a visualização, utilizando um *modelo de iluminação* para criar brilho ou sombra na visualização final.

Finalmente, cada pixel da imagem gerada representa inúmeros voxels alinhados, computa-

dos ao longo de um raio. A etapa de composição é responsável por acumular os valores de cor e opacidade e calcular o valor final, que será então atribuído ao pixel de onde o raio se originou.

Com exceção da etapa de segmentação, que foi discutida na seção 2.3, cada seção seguinte trata de cada uma das etapas da *pipeline* em detalhes: reamostragem, classificação, detecção de superfícies, iluminação e projeção.

### 2.5.2.1 Reamostragem

No lançamento dos raios, os pontos discretizados para o cálculo dos voxels raramente coincidem com os voxels do volume. Nesse caso, é necessária a reconstrução do volume que pode ser aproximada por meio de interpolação.

O tipo de interpolação mais frequentemente utilizado para a interpolação dos voxels é composto pelos oito voxels vizinhos ao voxel calculado, conhecido como trilinear. Essa técnica faz a amostragem nos três eixos,  $x$ ,  $y$  e  $z$  e por isso é chamada *interpolação trilinear*.

A figura 2.17 esquematiza o processo de interpolação do ponto marcado com um triângulo em (a). A interpolação no eixo  $x$  resulta nos pontos marcados com quadrados no item (b). Os pontos marcados com quadrados no item (c) marcam o resultado da interpolação no eixo  $y$ . A última interpolação é feita no eixo  $z$ , onde resulta o triângulo [40].

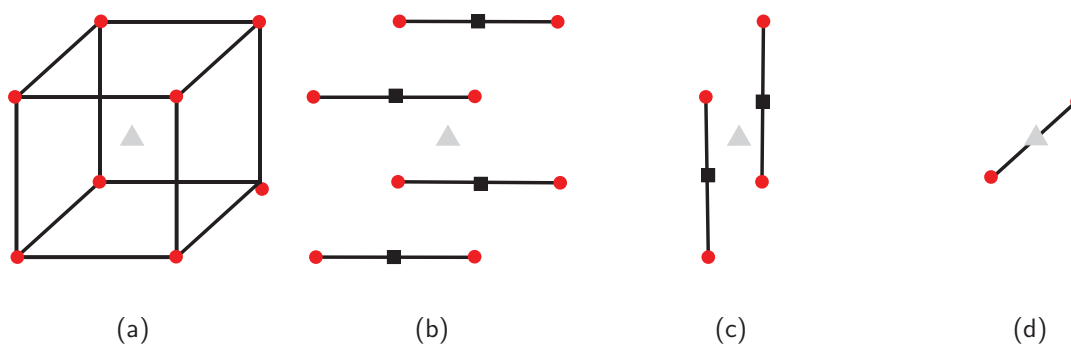


Figura 2.17: Interpolação trilinear. Fonte: [40].

### 2.5.2.2 Classificação

Como descrito anteriormente, a classificação é responsável por atribuir as características mais adequadas a cada voxel do volume. Nas etapas subseqüentes, essas informações são extensivamente utilizadas para possibilitar a computação dos valores finais de cada pixel da imagem.

Em imagens médicas de Tomografia Computadorizada e Ressonância Magnética, por exemplo, existem quatro tipos de materiais possíveis em uma amostra: ar, tecido, gordura e osso, cada qual com uma densidade diferente. Em alguns casos, uma amostra representa apenas um

material. No entanto, uma amostra pode representar vários materiais distintos. Esse efeito é causado pela amostragem, como discutido na seção 2.1.

Embora os constituintes celulares não sejam exatamente iguais aos registrados por exames médicos, este trabalho considera que existem quatro materiais importantes em imagens de microscopia: ar, membrana ou parede celular, citoplasma e núcleo. Esta seção, porém, limita-se a descrever as técnicas empregadas em exames médicos, que possibilitam o entendimento do mecanismo aplicado em imagens microscópicas.

O processo de classificação estima a probabilidade de ocorrência de um material em uma amostra em particular, ou seja, quanto do material existe no voxel. Esta é a chamada classificação probabilística [16].

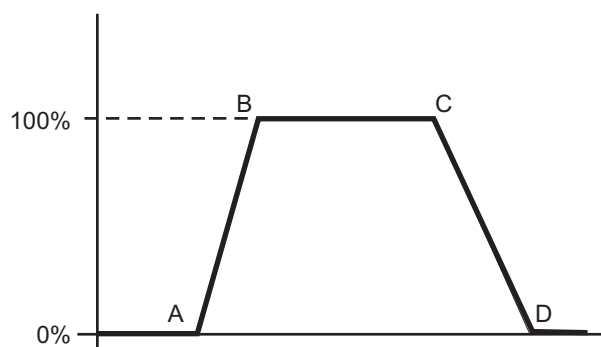


Figura 2.18: Classificação probabilística. Fonte: [16].

Drebin et al. [17] propuseram uma fórmula empírica para a estimação da probabilidade de ocorrência de um material em uma amostra, denominada classificação por trapézio, como mostra a figura 2.18. O ponto médio do segmento  $\overline{BC}$  é onde o material é melhor representado. O segmento  $\overline{BC}$  representa os valores de densidade que indicam 100% de probabilidade de ocorrência do material e os valores enquadrados nos segmentos  $\overline{AB}$  e  $\overline{CD}$  representam uma variação linear na probabilidade de ocorrências do material.

Um outro tipo de classificação, proposta por Levoy [36], propõe o cálculo da opacidade do voxel em função da magnitude do gradiente e da densidade do voxel.

Considerando  $\alpha_v$  a opacidade assinalada a um voxel com valor  $f_v$ , o mapeamento da opacidade em função do valor do voxel é dada por:

$$\alpha(x_i) = \begin{cases} 1 & \text{se } |\nabla f(x_i)| = 0 \text{ e } f(x_i) = f_v \\ 1 - \frac{1}{R} \frac{|f_v - f(x_i)|}{|\nabla f(x_i)|} & \text{se } |\nabla f(x_i)| > 0 \text{ e} \\ & f(x_i) - R|\nabla f(x_i)| \leq f_v \leq f(x_i) + R|\nabla f(x_i)| \\ 0 & \text{nos demais casos} \end{cases} \quad (2.18)$$

em que  $R$  é a espessura da transição entre materiais.

Essa função de classificação é particularmente útil porque suaviza e evidencia simultaneamente a transição entre materiais. Um gráfico de  $\alpha(x_i)$  em função de  $f(x_i)$  e  $|\nabla f(x_i)|$  para

valores típicos de  $f_v$ ,  $\alpha_v$  e  $R$  é mostrado na figura 2.19.

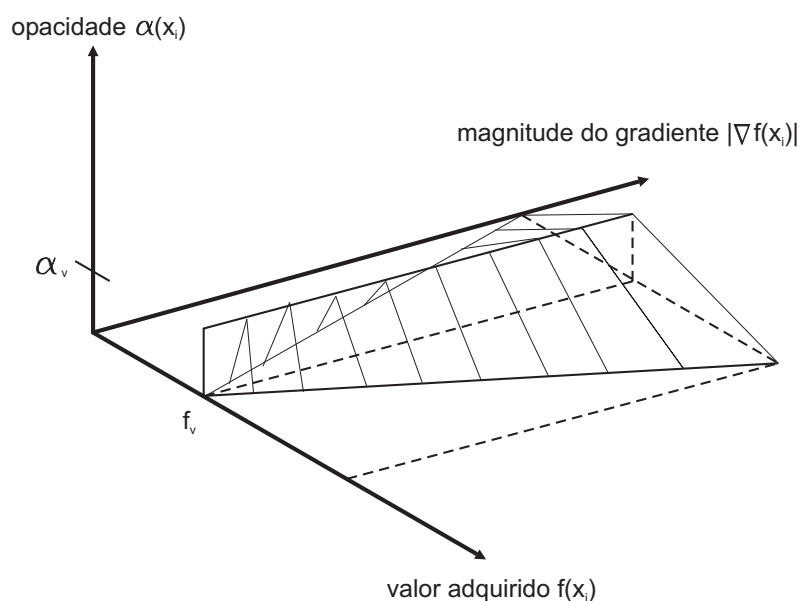


Figura 2.19: Cálculo das opacidades para contornos de superfícies com isovalor. Fonte: [36].

Quando existe mais de uma superfície a ser rotulada, a classificação pode ser calculada separadamente para cada uma e suas opacidades combinadas. Especificamente, dados os valores de  $f_{v_n} = 1, \dots, N$ ,  $N \geq 1$ , opacidades  $\alpha_{v_n}$  e as espessuras de transições de materiais  $r_n$ , pode-se utilizar a equação 2.18 para computar  $\alpha_n(x_i)$  e aplicar a relação:

$$\alpha_{tor}(x_i) = 1 - \prod_{n=1}^N (1 - \alpha_n(x_i)) \quad (2.19)$$

### 2.5.2.3 Detecção de Superfícies

A detecção de superfícies é realizada por meio do cálculo do gradiente ( $\nabla$ ). O gradiente é um vetor que representa o vetor normal à superfície, e sua magnitude a suavidade da transição entre dois materiais, no caso da visualização volumétrica. Esse cálculo é realizado com base na *densidade* do material, que é definida pelo especialista. A superfície só ocorre quando dois materiais com densidades diferentes ocorrem e o gradiente é sempre nulo quando materiais idênticos se encontram.

No caso de um volume de dados, o gradiente é um vetor tridimensional, com componentes  $(x, y, z)$  e representa a orientação da superfície. A magnitude do gradiente ( $|\nabla|$ ) é calculada como o comprimento desse vetor e representa a suavidade da transição - quanto maior o vetor, mais abrupta é a transição.

O cálculo da magnitude do gradiente pode ser definido como:

$$|\nabla| = \sqrt{x^2 + y^2 + z^2} \quad (2.20)$$

O gradiente deve ser normalizado para que possa ser utilizado no modelo de iluminação. Para isso, basta dividir cada componente pela sua magnitude. A operação de normalização, denotada como *norm*, pode ser escrita como:

$$\text{norm}(\nabla) = \frac{\nabla}{|\nabla|} \quad (2.21)$$

ou

$$\text{norm}(\nabla) = \left( \frac{x}{|\nabla|}, \frac{y}{|\nabla|}, \frac{z}{|\nabla|} \right) \quad (2.22)$$

A técnica mais utilizada para o cálculo do gradiente é a *diferença central*. Embora não seja a técnica mais precisa para o cálculo do gradiente, a diferença central é simples e rápida. O gradiente pode ser obtido com esse método com as equações:

$$\begin{aligned} D_x &= f(x-1, y, z) - f(x+1, y, z) \\ D_y &= f(x, y-1, z) - f(x, y+1, z) \\ D_z &= f(x, y, z-1) - f(x, y, z+1) \end{aligned} \quad (2.23)$$

onde  $f(x, y, z)$  é o valor de densidade do voxel na posição  $(x, y, z)$ .  $D_x$ ,  $D_y$ , e  $D_z$  são os componentes do vetor tridimensional do gradiente:

$$D = [D_x, D_y, D_z] \quad (2.24)$$

#### 2.5.2.4 Iluminação

O modelo de iluminação utilizado para realizar a visualização tridimensional do conjunto de dados é o principal componente da etapa de iluminação, que tem como propósito incluir brilho e sombra na imagem final, criando a sensação de tridimensionalidade.

Cada voxel atingido por um raio com intensidade  $I$  contribui para o valor do pixel emissor desse raio de acordo com os valores de opacidade e cor de ambos (voxel e raio), alterando a intensidade do raio para  $I'$  quando este deixa o voxel.

A cor refletida da superfície é função dos seguintes parâmetros:

- vetor normal à superfície;
- quantidade de superfície detectada;
- cor difusa da superfície;

- direção e cor da fonte de luz;
- posição do observador.

O modelo de iluminação freqüentemente usado é o proposto por Phong [53], o qual é um modelo de iluminação local, que considera apenas a interação entre o ponto da superfície e fonte de luz. Outros modelos utilizam raios refratados ou refletidos por pontos da superfície de outros objeto, contribuindo indiretamente para a iluminação do ponto onde o cálculo está sendo efetuado.

O algoritmo de Phong consiste basicamente no cálculo da intensidade da luz refletida em um ponto da superfície iluminada por uma fonte de luz pontual, a qual emite raios de luz uniformemente em todas as direções. As três componentes utilizadas para o cálculo da luz refletida são:

- luz ambiente;
- reflexão difusa;
- reflexão especular.

A *luz ambiente* consiste em uma luz constante em todo o ambiente vindo de todas as direções. Sua intensidade não varia em qualquer ponto e todos os pontos em qualquer superfície refletem a luz ambiente. É uma maneira simples de simular a luz indireta dentro de um modelo local de iluminação. O valor de sua intensidade é dado por:

$$I_g = I_a K_a \quad (2.25)$$

onde  $I_g$  é o valor da intensidade da luz ambiente,  $I_a$  é a intensidade da luz definida para a cena e  $K_g$  é a um coeficiente de atenuação da luz ambiente, definido no intervalo  $[0, 1]$ , denominado coeficiente de reflexão ambiente.

A *reflexão difusa* ocorre em superfícies foscas, como em uma parede. Isso acontece porque os raios luminosos são refletidos em todas as direções e, conseqüentemente, não dá a noção de brilho. O resultado dessa reflexão é função do vetor normal à superfície e da posição da luz pontual, como exemplifica a figura 2.20.

A reflexão difusa varia linearmente em função do ângulo entre o vetor normal da superfície e o vetor de incidência da luz. Esse vetor identifica o trajeto do raio luminoso da fonte luminosa até o ponto na superfície. A intensidade da reflexão difusa é dada por:

$$I_d = I_i K_d \cos(\Theta) \quad (2.26)$$

onde  $I_d$  é a intensidade da reflexão difusa,  $I_i$  é a intensidade da luz incidente,  $K_d$  é o coeficiente da reflexão difusa do material e é dependente do comprimento de onda da luz incidente e  $\Theta$  é

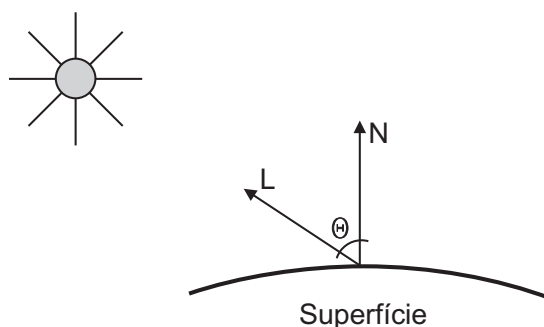


Figura 2.20: Reflexão difusa.

o ângulo entre os vetores  $L$  e  $N$ . O cosseno do ângulo entre dois vetores é encontrado com o *produto interno* dos dois vetores. Logo a equação 2.26 pode ser escrita como:

$$I_d = I_i K_d (L \cdot N) \quad (2.27)$$

A reflexão especular é percebida em superfícies lisas e brilhantes, como na pintura de um automóvel. O resultado desse tipo de reflexão é um halo da cor da fonte de luz nos objetos, já que a maioria dos raios luminosos incidentes são refletidos na mesma direção. Nesse caso, a reflexão depende não somente do vetor  $N$  e  $L$ , mostrados na figura 2.20, mas também da direção de reflexão dos raios luminosos, o vetor  $R$ , e a posição do observador, ou o vetor  $V$ , que indica a direção do ponto da superfície para o observador, como mostra a figura 2.21. A intensidade da reflexão especular é dada por:

$$I_s = I_i K_s (R \cdot V)^n \quad (2.28)$$

em que  $I_s$  é a intensidade da reflexão especular,  $I_i$  é a intensidade da luz incidente,  $K_s$  é o coeficiente da reflexão especular do material,  $R$  é o vetor de reflexão dos raios luminosos incidentes,  $V$  é o vetor que indica a direção do ponto da superfície até o observador e  $\Phi$  é o ângulo entre o vetor  $R$  e o vetor  $V$ . Mesmo uma superfície bastante brilhante não reflete todos os raios em uma direção e sim em uma pequena área. Por esse motivo, a luz refletida é vista na superfície como uma área brilhante. O valor de  $n$  regula o tamanho dessa área brilhante: quanto maior o valor de  $n$ , menor será a área brilhante.

A soma de todas essas componentes dá o resultado da luz refletida pelo ponto da superfície, que é dada por:

$$I_r = I_g + I_d + I_s = (I_a K_a) + (I_i K_d (L \cdot N)) + [I_i K_s (R \cdot V)^n] \quad (2.29)$$

No caso do cálculo de raios luminosos coloridos, basta utilizar a equação 2.29 para cada componente de cor: vermelho, verde e azul.

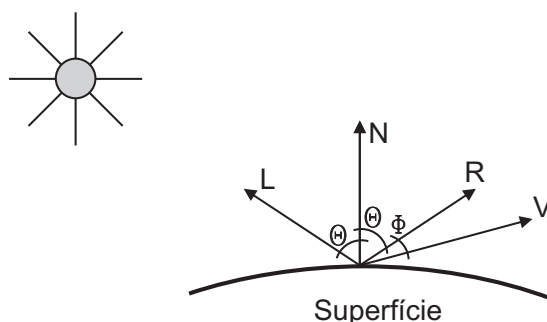


Figura 2.21: Reflexão especular.

### 2.5.2.5 Composição

Para cada pixel da imagem um raio é lançado em direção ao volume de dados. Cada raio, por sua vez, é amostrado em intervalos regulares e a cada amostragem os cálculos de classificação, gradiente, reamostragem e iluminação são realizados.

Durante o lançamento de um único raio, inúmeros voxels são atingidos e os valores de intensidade de cada um são combinados. A composição faz o cálculo do acúmulo dos resultados da cor e opacidade de cada voxel, resultando no valor final que é atribuído ao pixel de onde o raio se originou. No exemplo da figura 2.22, o raio lançado a partir do pixel foi amostrado em 7 pontos diferentes, entre os pontos *a* e *b*.

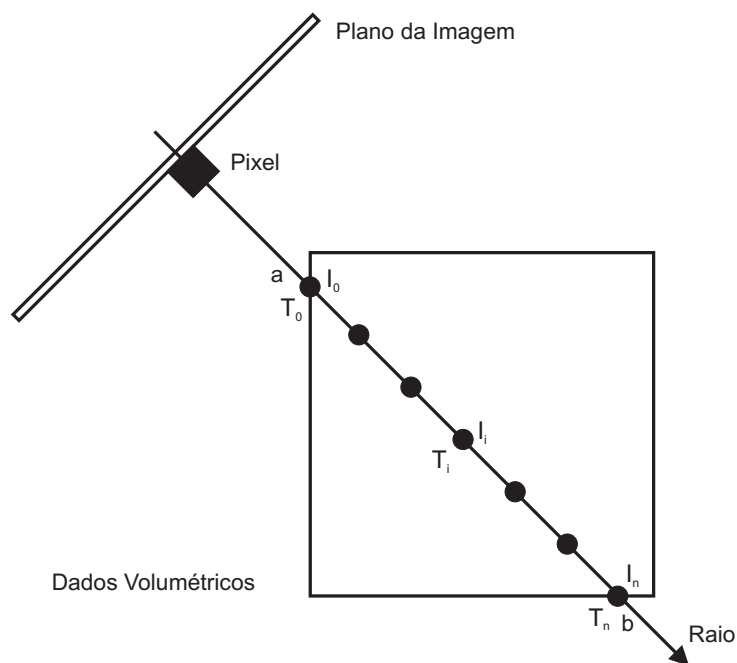


Figura 2.22: Amostragem dos pontos em um raio. Fonte: [40].

Sendo  $n$  o número de amostras do raio (voxels interpolados no lançamento do raio),  $I_i$  a intensidade total de luz em um ponto na posição  $i$  do raio e  $\alpha_j$  a opacidade do voxel na

posição  $j$ ,  $a$  é o primeiro e  $b$  é o último ponto de interseção do raio com o volume, o acúmulo dos valores calculados pode ser calculado com:

$$I(a, b) = \sum_{i=0}^n I_i \prod_{j=0}^{i-1} (1 - \alpha_j) \quad (2.30)$$

Então,  $I_i$  é alterado conforme o valor da intensidade de todos os pontos precedentes. A figura 2.23 mostra um raio sendo lançado e amostrado com pontos inicial  $a$  e final  $b$ . À esquerda a ampliação mostra o detalhe de um ponto, em que  $I_{in}$  e  $T_{in}$  são a intensidade e transparências calculados até esse ponto, desde o ponto inicial  $a$ . A intensidade  $I_i$  e transparência  $T_i$  do ponto  $i$  são então associadas com  $I_{in}$  e  $T_{in}$  resultando nos novos valores  $I_{out}$  e  $T_{out}$ .

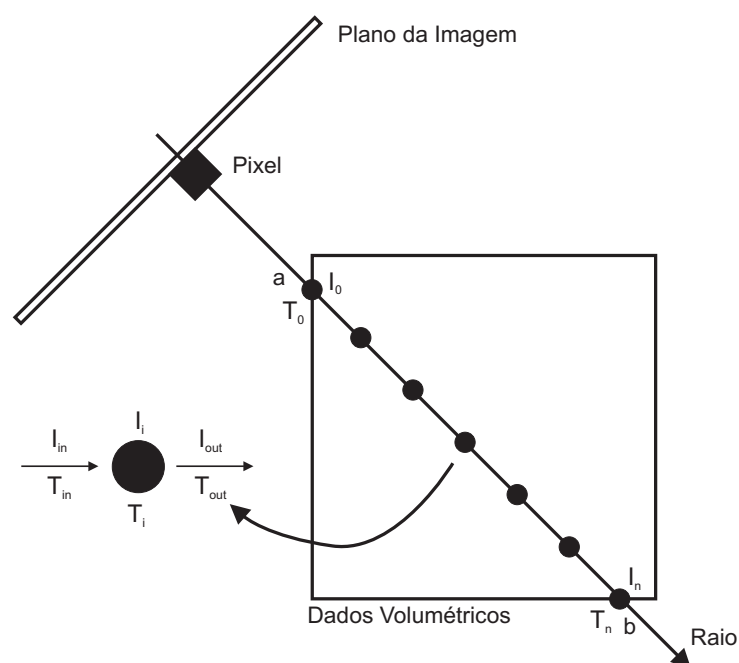


Figura 2.23: Amostragem dos pontos em um raio utilizando a equação 2.30. Fonte: [40].

A intensidade  $I_i$  não pode ser considerada como a cor do ponto amostrado. O correto é multiplicar cada componente da cor pela intensidade  $\alpha$ :

$$I_i = C_i \alpha_i \quad (2.31)$$

Para computar  $I(a, b)$  é necessário calcular recursivamente a fórmula de lançamento de

raios (equação 2.30). Basta reescrever a equação:

$$\sum_{i=0}^n I_i \prod_{j=0}^{i-1} (1 - \alpha_j) = I_0 + I_1(1 - \alpha_0) + I_2(1 - \alpha_0)(1 - \alpha_1) + \dots + I_n(1 - \alpha_0) \dots (1 - \alpha_{n-1}) \quad (2.32)$$

## CAPÍTULO 3

### METODOLOGIA EMPREGADA

As técnicas apresentadas no capítulo anterior são descritas neste capítulo com maiores detalhes, descrevendo as técnicas empregadas em cada etapa do processo de reconstrução. A figura 3.1 apresenta um esquema de todo o processo necessário à reconstrução de imagens obtidas por meio de microscópios de luz.

A obtenção da seqüência de imagens é realizada no passo (1), por meio de uma câmera CCD acoplada ao microscópio óptico. O realce das imagens é feito no passo (2) em que as características que facilitam a segmentação são evidenciadas. É nesse passo também que a retificação de imagens é realizada, se necessária. No passo (3), as imagens realçadas resultantes do passo 2 são segmentadas. O processo de registro (4) utiliza as imagens obtidas do passo (3) para extrair características que facilitem o alinhamento das imagens, obtendo os parâmetros das transformações que serão aplicadas sobre as imagens segmentadas, resultando na seqüência das imagens alinhadas. O último passo é o de visualização (5), que mostra a reconstrução tridimensional das lâminas.

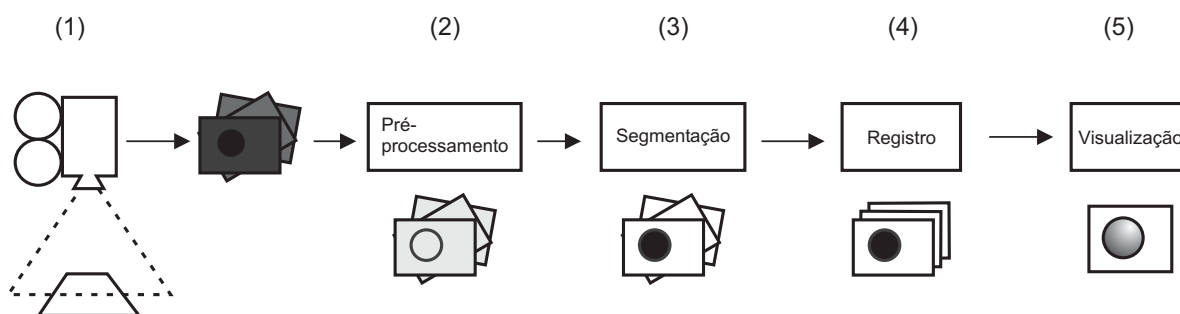


Figura 3.1: Processo global para visualização tridimensional de uma seqüência de imagens.

As próximas seções descrevem os processos mostrados no diagrama da figura 3.1: aquisição, pré-processamento, segmentação, registro e visualização volumétrica.

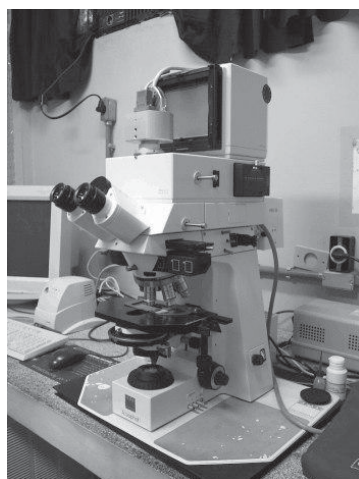
### 3.1 Aquisição

As séries adquiridas para testes neste trabalho foram capturadas com dois tipos de microscópios de luz, pertencentes aos departamentos de Biologia Celular (figura 3.2 (a)) e Zoologia (figura 3.2 (b)) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

O microscópio pertencente ao departamento de Zoologia é da marca Olympus, modelo BX51 [51]. A câmera CCD acoplada ao microscópio também é da marca Olympus, modelo

Oly-220 com saída de vídeo composto e resolução de  $640 \times 480$  pixels com sensor colorido. O *software* de aquisição é o Image Pro Express [44] da Media Cybernetics.

O microscópio pertencente ao departamento de Biologia Celular é da marca Carl Zeiss, modelo Zeiss Axiophot. O dispositivo de aquisição é da marca Applied Spectral Imaging [2], modelo SpectraView<sup>TM</sup> EXPO. A câmera CCD é monocromática e pode capturar imagens de até  $1280 \times 1024$  pixels. O *software* é padrão para o dispositivo de aquisição (*Spectral Aquisition*).



(a)



(b)

Figura 3.2: Microscópios utilizados para aquisição das imagens.

O processo de aquisição consiste em posicionar a lâmina sobre a platina do microscópio, escolher a objetiva de aumento adequado e localizar a área de interesse do corte. Quando a área está devidamente enquadrada, basta adquirir a imagem com o acionamento do *software* instalado no computador.

As imagens são capturadas no formato TIF (*Targa Interchangeable Format*) com tamanhos variados. As imagens coloridas, adquiridas com o microscópio da Zoologia, possuem dimensão de  $640 \times 480$  e 24 bits de cor, 8 bits para cada componente. As imagens monocromáticas, capturadas com o microscópio do departamento de Biologia Celular, são capturadas com dimensões de  $1280 \times 1024$  com 16 bits por pixel.

As imagens são adquiridas em série e nomeadas com uma numeração que identifica a seqüência do corte, bem como o nome da série. A espessura da fatia e ampliação são anotadas para uso posterior durante o processo de reconstrução.

## 3.2 Pré-processamento

Os algoritmos de pré-processamento são aplicados com o Matlab 6.5.0.180913a Release 13 [28] e com o Adobe Photoshop 7.0 [1]. A etapa de pré-processamento utiliza as imagens no padrão

TIF, que é o formato das imagens adquiridas com os programas de aquisição dos sistemas de captura instalados nos microscópios.

Todo o pré-processamento é realizado com imagens em tons de cinza. Por esse motivo, as imagens coloridas são convertidas para imagens monocromáticas. As imagens capturadas em tons de cinza não precisam ser convertidas.

Antes de serem processadas, no entanto, as imagens têm suas quantidades de bits por pixel reduzidas para 8. Essa conversão é necessária porque imagens em tons de cinza com mais de 8 bits não podem ser manipuladas no programa Photoshop.

O principal filtro utilizado para a redução de ruído nas imagens é o da mediana, descrito na seção 2.2, com máscaras de tamanho  $3 \times 3$  pixels. O emprego desse filtro é de extrema importância, já que as imagens de microscopia normalmente apresentam ruído. Todas as imagens capturadas são filtradas com esses parâmetros (filtro da mediana de vizinhança  $3 \times 3$ ). As imagens, depois de processadas, não têm seus nomes alterados.

Freqüentemente, as imagens de microscopia, ou as áreas de interesse de uma lâmina, contêm mais de um tecido. É interessante que o especialista possa diferenciar todos os tipos de tecidos presentes na amostra durante a visualização tridimensional. Para que esse efeito seja possível, a seguinte metodologia é proposta:

1. O especialista seleciona cada região diferente que deseja ressaltar na visualização tridimensional com ferramentas manuais;
2. Cada região é comprimida dinamicamente em uma faixa de tons de cinza, com a técnica descrita na seção 2.2, tantas quantas forem as regiões de interesse. Essa compressão utiliza uma função de transformação dos níveis de cinza da imagem original, podendo aumentar ou reduzir o contraste da imagem.

Como descrito na seção 2.1.1, os objetos são observados na microscopia de luz por transparência. Os cortes precisam ser finos o suficiente para que a luz atravesse o corte. As diferentes densidades de cada material da amostra deixam passar mais ou menos luz, formando a imagem que é observada pelo operador do microscópio.

Nesse caso, o especialista deve selecionar as faixas contenedoras das regiões de interesse, conforme a opacidade desejada àquela região. Para exemplificar o processo, a figura 3.3 mostra uma imagem com quatro tipos de tecidos, cada um numerado de 1 a 4.

A imagem da figura 3.3 possui 256 tons de cinza, sendo o preto representado por 0 e o branco por 255. Como existem 4 tecidos diferentes na amostra, o espaço de tons de cinza é dividido em 4 partes, cada qual com seus tons de cinza mapeados para uma faixa de igual tamanho, e todas contidas no intervalo  $[0, 255]$ . A divisão dos níveis de cinza possíveis pelas 4 regiões resulta em 64 tons de cinza para cada uma delas. O especialista definiu a relação região-opacidade conforme a tabela 3.1.

Desse modo, os tons de cinza das regiões, que possivelmente preenchem toda a faixa de tons de cinza de 0 a 255, são transformados linearmente conforme as funções da figura 3.4.

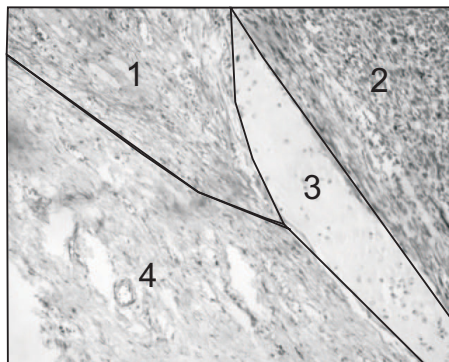


Figura 3.3: Regiões delimitadas pelo especialista em uma imagem de microscopia.

Região em ordem de opacidade	Opacidade relativa	Faixa de tons de cinza
2	Tecido mais opaco	0 - 63
1	Tecido relativamente opaco	64 - 127
4	Tecido relativamente transparente	128 - 191
3	Tecido bastante transparente	192 - 255

Tabela 3.1: Relação de região-opacidade da figura 3.3.

O eixo  $x$  dos gráficos representa os tons de cinza da imagem original e o eixo  $y$  os tons de cinza da imagem de saída.

O resultado da transformação dos níveis de cinza das regiões da figura 3.3 pelas transformações da figura 3.4 é mostrado na figura 3.5.

Para evitar que os níveis de cinza sejam compactados demais e que se percam no processo de transformação, o número de regiões e a quantidade de detalhes a serem visualizados devem ser considerados. Muitas regiões tendem a reduzir a quantidade dos níveis de cinza de cada região depois de aplicadas as transformações. Embora a quantidade de tons de cinza da imagem possa ser aumentada de forma a comportar todas as regiões, cada uma com o número de tons de cinza inicial da imagem, a ferramenta Photoshop não permite o processamento de imagens com mais de 8 bits por pixel.

Para que a imagem da figura 3.3 não apresentasse perda de informação dos níveis de cinza, cada região final tem de possuir 256 níveis de cinza, assim como a faixa de tons da imagem original. Nesse caso, a imagem final teria 1024 níveis de cinza diferentes (4 regiões  $\times$  256 níveis de cinza).

O pré-processamento engloba também a retificação de imagens, utilizada para aumentar o campo de visão das lâminas. Como descrito na seção 2.2.2, esse processo visa a aumentar a quantidade de estruturas microscópicas presentes na visualização volumétrica, permitindo que o especialista possa examinar uma quantidade maior de objetos.

A figura 3.6 mostra um exemplo do alinhamento utilizado para o aumento do campo de visão. Várias imagens são adquiridas de um mesmo objeto, de forma que toda a área de

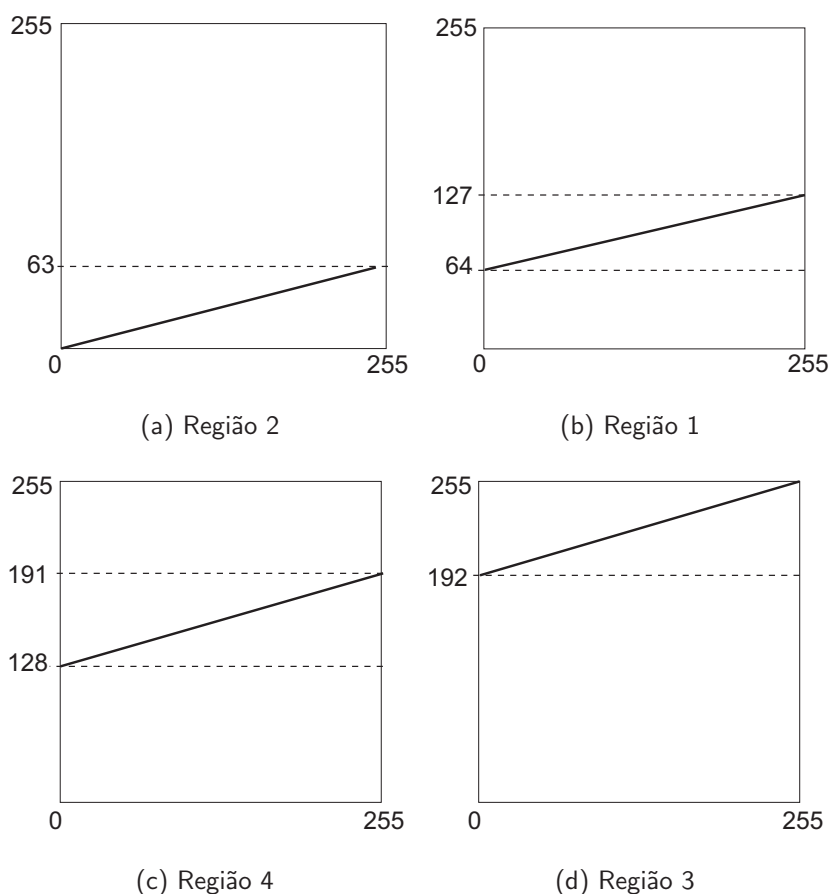


Figura 3.4: Funções de transformações das regiões delimitadas na figura 3.3.



Figura 3.5: Regiões da figura 3.3 transformadas de acordo com as funções da figura 3.4.

interesse seja coberta. Cada imagem é ajustada para que tenha alguma área em comum com as outras, permitindo que pontos característicos entre duas imagens possam ser assinalados. Na figura, as porções hachuradas são as áreas que se sobrepõem e que possibilitam ao operador determinar os pontos característicos entre as imagens.

Esse tipo de alinhamento é realizado neste trabalho com o Matlab 6.5 *Release* 13. A imagem de referência é carregada e comparada com cada imagem a ser transformada. Os pontos característicos são assinalados com o comando `cpselect`. Os pontos assinalados são gravados

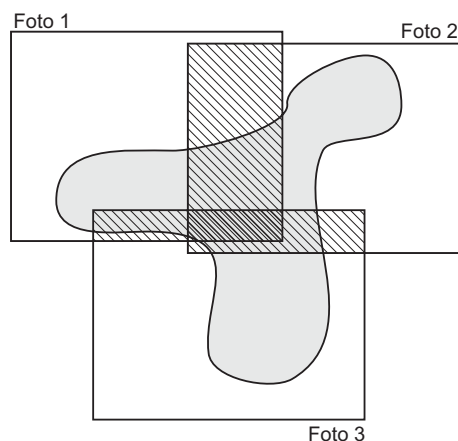


Figura 3.6: Várias imagens de um mesmo objeto adquiridas com o propósito de aumentar o campo de visão.

e utilizados pelo comando `cp2tform`, que determina os coeficientes da transformação. O tipo de transformação é linear, como a descrita na seção 2.2.2.

Um código de extensão foi implementado para calcular as dimensões da imagem final, baseando-se nos valores calculados pela função `cp2tform`. Os valores apresentados por esse código permitem que as imagens sejam alocadas em um espaço de tamanho ótimo e sem que haja a necessidade de correção na dimensão da imagem final.

A figura 3.7 mostra a retificação de várias imagens adquiridas de uma das séries utilizadas como teste neste trabalho. A sobreposição das imagens pode ser percebida pela diferença de tonalidade entre elas e pela borda irregular da imagem completa.

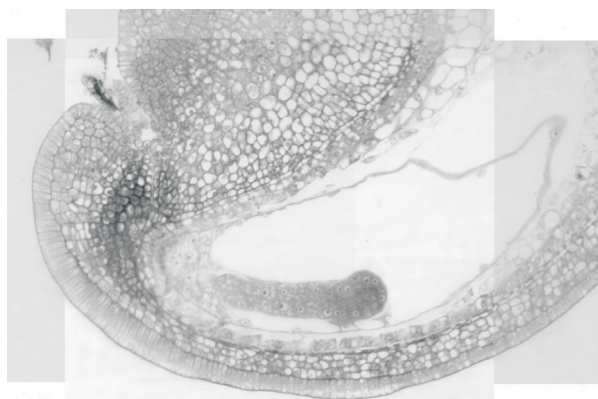


Figura 3.7: Resultado da retificação de várias imagens.

### 3.3 Segmentação

Segmentar imagens de microscopia é uma tarefa complexa. Nem todos os elementos celulares diferentes possuem densidades distintas quando adquiridos por câmeras CCD.

Como descrito na seção 2.3, mesmo materiais com densidades diferentes podem produzir áreas com a mesma aparência na imagem adquirida com o microscópio, dificultando uma abordagem simples para a segmentação. Quando o problema da segmentação é estendido a imagens de microscopia de diferentes tecidos, com ampliações diversas e corados com técnicas distintas, a obtenção de um resultado plausível torna-se ainda mais complexo.

O propósito da segmentação utilizada neste trabalho não é criar representações tridimensionais exatas das imagens, mas sim criar condições para que a visualização final possa ser interpretada facilmente pelo especialista. Por esse motivo, as técnicas empregadas têm por objetivo salientar características que possam vir a ajudar o entendimento da reconstrução tridimensional de forma simples e abrangente.

O fator preponderante para a escolha das técnicas descritas e utilizadas é o efeito do uso de corantes no preparo das lâminas, como descrito no início da seção 2.3.

A limiarização é uma das técnicas de segmentação que se baseia principalmente nessa característica, e é empregada de forma interativa. O limiar para cada série é definido pelo usuário especialista, alterando parâmetros que segmentam a imagem em tempo real. A determinação do limiar é realizada com a ferramenta Photoshop, que é então aplicado a todas as imagens da série, utilizando-se o comando `im2bw` do pacote de processamento de imagens do Matlab.

As técnicas de limiarização locais, embora mais eficazes quando empregadas em imagens com iluminação pobre, causam o aparecimento de inúmeras pequenas regiões que dificultam a separação dos núcleos dos demais constituintes celulares. Essas técnicas tendem a realizar uma segmentação mais uniforme, mas que segmentam regiões não necessariamente pertencentes aos núcleos das células. A figura 3.8 mostra o resultado da limiarização de uma imagem com técnicas diferentes.

A figura 3.8 (a) mostra a imagem original, da língua de um cachorro. A figura 3.8 (b) é a imagem limiarizada pelo método de Niblack [47], com  $k$  igual a 0,130. A imagem do item (c) mostra a limiarização global com limiar 160. Embora o resultado do item (b) pareça representar melhor a imagem do item (a), é difícil determinar qual dos elementos segmentados em (b) são núcleos. A imagem do item (c), embora não apresente componentes conexos totalmente preenchidos ou elementos que não tenham o contorno completo, essa segmentação facilita a diferenciação do que é e do que não é núcleo.

Assim sendo, a técnica de limiarização global é empregada para a segmentação dos núcleos celulares. Neste caso, algumas regiões são ainda segmentadas como se fizessem parte dos núcleos, mas que são na verdade áreas com maior densidade óptica. Para remover essas regiões e destacar as áreas sombreadas pelos verdadeiros núcleos, as operações de abertura e fechamento de morfologia matemática são empregadas na seqüência, removendo pequenos detalhes da imagem.

Essas operações de morfologia matemática removem grande parte dos elementos que não são representativos, como pontas e ligações estreitas entre núcleos. Mesmo assim, componentes pequenos, que possam vir a representar núcleos nas imagens originais, devem ser removidos

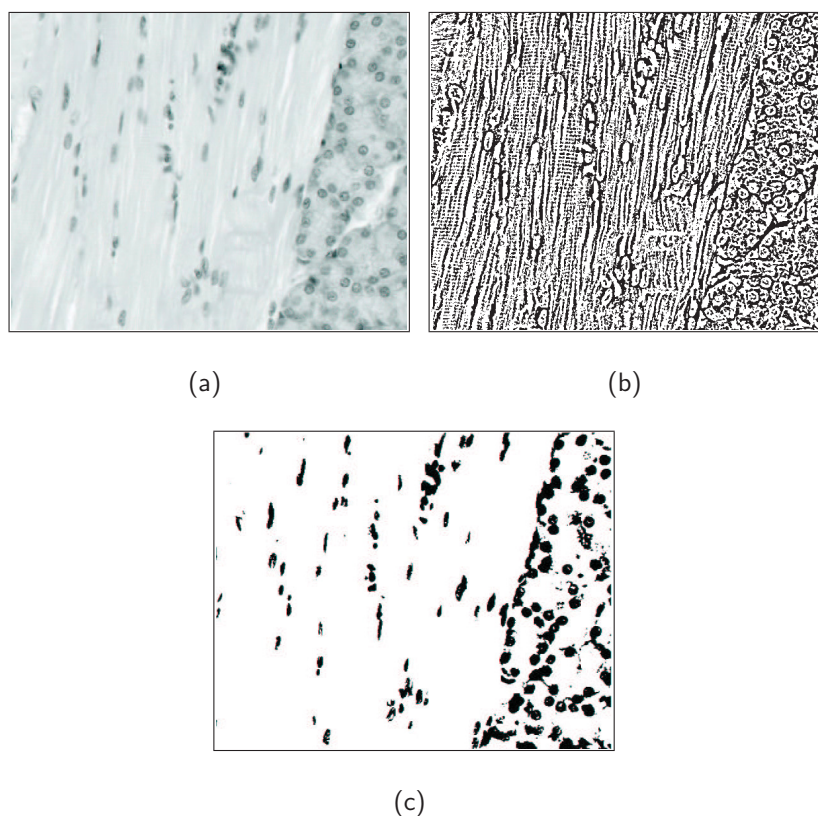


Figura 3.8: Limiarização da imagem no item (a) por diferentes técnicas. (b) Limiarização local de Niblack e (c) limiarização global.

para facilitar a compreensão da visualização tridimensional. Componentes conexos com menos de  $n$  pixels são removidos, restando apenas potenciais componentes conexos representativos dos núcleos celulares. O valor de  $n$  deve ser determinado empiricamente com o auxílio do especialista.

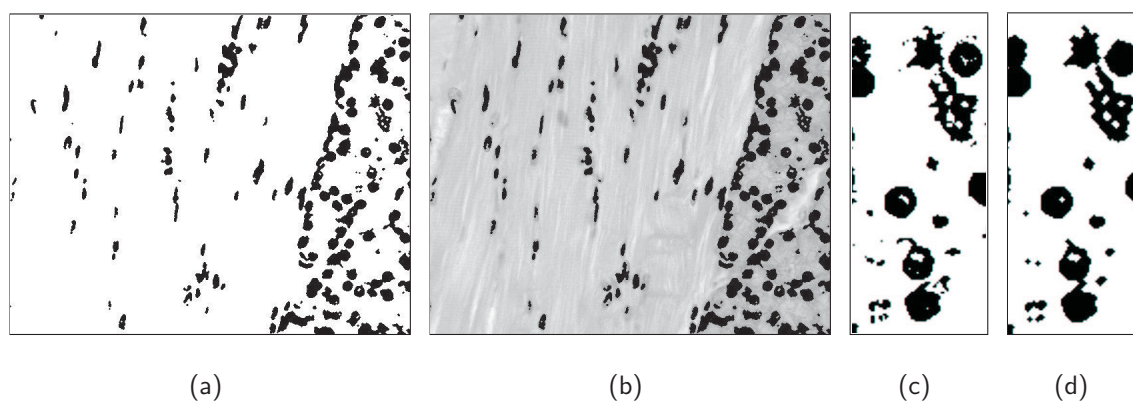


Figura 3.9: (a) Resultado da aplicação dos operadores de abertura e fechamento na imagem da figura 3.8, item (c), e (b) composição do resultado com a imagem original. (c) Detalhe da imagem da figura 3.8 item (c). (d) Detalhe da imagem do item (a).

O resultado dessa segmentação é então aplicado às imagens originais, aquelas adquiridas

com o microscópio. No caso das imagens em tons de cinza, os núcleos segmentados são coloridos com a tonalidade 0, ou seja, de preto. Em imagens coloridas, os núcleos são coloridos de vermelho ou amarelo, dependendo do número da imagem na série. As imagens são coloridas alternadamente para facilitar o registro, realizado na próxima etapa do processo de reconstrução.

A figura 3.9, item (a), mostra o resultado da abertura e do fechamento com um elemento estruturante circular de raio 1 aplicado sobre a imagem da figura 3.8, item (c). O item (b) da figura 3.9 mostra o resultado da composição da imagem original da figura 3.8 item (a) com o item (a) da figura 3.9. A imagem do item (c) da figura 3.9 é uma porção da imagem do item (c) da figura 3.8 ampliada e a imagem do item (d) é uma ampliação da mesma região da imagem do item (a) da figura 3.9. O preenchimento dos buracos em alguns componentes é claramente visível no item (d), bem como a redução dos pequenos componentes conexos que não são considerados núcleos.

### 3.4 Registro

As técnicas de registro são empregadas neste trabalho porque as imagens de uma série precisam ser alinhadas para a reconstrução tridimensional final, possibilitando uma visualização mais próxima da real.

O alinhamento da série de imagens é realizado com a ferramenta Photoshop 7. Cada imagem da seqüência é aberta em um nível (*layer*) e o alinhamento se inicia do nível de numeração menor para a maior. A imagem de referência, sempre a de nível inferior, é mantida fixa e com opacidade total. A transparência da imagem a ser alinhada, no nível superior, é reduzida, de forma que as áreas segmentadas anteriormente fiquem destacadas. O especialista, por meio de transformações de rotação, translação, escala e deformação ajusta a imagem até que alguns pontos de referência se sobreponham. Atingindo esse objetivo, a imagem tem sua transparência removida e passa a ser a imagem de referência. Sendo assim, a imagem no nível superior passa a ser a imagem manipulada e, assim recursivamente, até o último nível da imagem.

Antes, porém, que o usuário possa alinhar as imagens, as dimensões da imagem completa, com todas as fatias, devem ser ampliadas. Isso se deve ao fato de que imagens que sofreram rotação ocupam uma área maior se o retângulo envolvente estiver alinhado com os eixos cartesianos. Essa ampliação pode variar e só pode ser estabelecida durante o processo de alinhamento. O aumento das dimensões da imagem, no entanto, não altera a amostragem dos pixels, mas somente o número de pixels que compõem a imagem.

Quando o processo termina, parte da borda ao redor da imagem é perdida. Neste caso, a redução do tamanho da imagem, sem que haja o corte de áreas de interesse, é imprescindível. A figura 3.10 mostra o efeito da redução final na série de imagens alinhadas. A linha tracejada na imagem à esquerda delimita o corte, que não deve avançar sobre a borda do elemento de

interesse, representado pela forma sombreada.

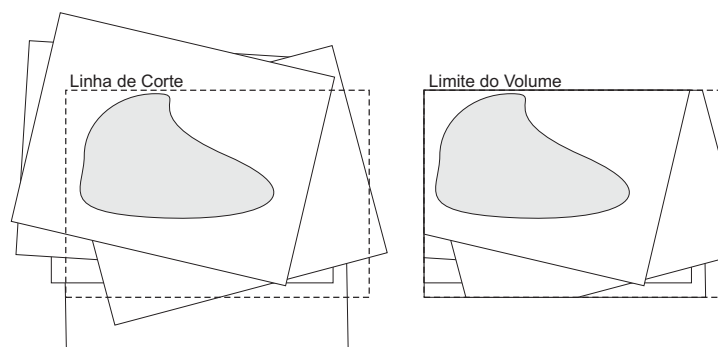


Figura 3.10: Corte das fatias alinhadas para redução do volume.

Cada nível é então exportado para uma imagem, que pode ser convertida no formato reconhecido pelo visualizador tridimensional. O formato desses arquivos e sua disposição são descritos na próxima seção.

### 3.5 Visualização Volumétrica

A ferramenta para realizar a Visualização Volumétrica das imagens foi implementada em ANSI C++ [61] e construída por Rúbio [54]. O compilador utilizado foi o Borland C++ 5.5.1 [7] para o sistema operacional *Microsoft Windows* de 32 bits. Esta ferramenta foi construída com o intuito de realizar a visualização volumétrica de fatias DICOM [46], provenientes de exames de Ressonância Magnética.

A interface gráfica foi implementada utilizando-se a biblioteca gráfica *Open Graphics Library* [60] (OpenGL), versão 1.1, e a biblioteca auxiliar *GL Utility Toolkit* (GLUT), versão 3.7, empregada para realizar o controle de eventos, criação de contextos e menus. Como nenhuma dessas bibliotecas incorpora funções para a interação com o usuário, foi empregada também a *GL User Interface Library* (GLUI), versão 2.0, que implementa componentes de interface, como botões, caixas de texto, listas, entre outros.

Para adaptar a plataforma para a utilização de imagens como entrada e aperfeiçoar o funcionamento do programa para gerar imagens de alta qualidade com as imagens de microscopia, quatro modificações foram introduzidas no aplicativo.

A primeira delas é a alteração da classe de leitura, que deve carregar arquivos de imagens. A segunda é a leitura de parâmetros de um arquivo texto ao invés da entrada manual pelo usuário e a gravação da imagem final em um arquivo. Existem poucos trabalhos na literatura que possam guiar a escolha dos parâmetros para a visualização [26, 32]. Por isso, inúmeros processamentos precisam ser realizados para fins de testes. Essa tarefa é enormemente agilizada se arquivos de parâmetros forem preparados para que o processamento possa ser feito em lotes, gravando as imagens resultantes com nomes relacionados aos arquivos de parâmetros.

No final da execução, basta comparar as imagens de saída. A terceira alteração diz respeito à rotulação dos materiais. Um novo tipo de classificação foi introduzido com base no método proposto por Levoy [36] e outro método de classificação proposto neste trabalho foi inserido para a realização dos testes. A quarta alteração é a inclusão da atenuação luminosa diretamente proporcional à distância entre o observador e o voxel amostrado. As séries microscópicas tendem a incluir e acumular muita informação, fazendo com que a percepção tridimensional seja perdida.

Para facilitar a depuração e a leitura das imagens de entrada do aplicativo de visualização, os arquivos das fatias do volume precisam estar no formato *Portable Graymap* (PGM). No entanto, para formar o volume com dimensões corretas, principalmente no eixo  $z$ , que é o eixo onde as fatias se estendem umas sobre as outras, esse formato foi alterado para incluir a informação sobre a relação entre a espessura da fatia e a distância entre os pixels. O arquivo de saída do programa é gravado no formato *Portable Pixmap* (PPM). O formato e o padrão desses arquivos podem ser encontrados no apêndice A.

A próxima seção mostra o padrão do arquivo de parâmetros, bem como a função de cada um deles. A seção 3.5.2 descreve as principais técnicas e métodos de cada uma das etapas do *pipeline* da visualização volumétrica implementadas no programa.

### 3.5.1 Parâmetros de Visualização

A visualização volumétrica realizada pelo aplicativo baseia-se em parâmetros que regulam fatores como iluminação, classificação dos materiais e posição do volume. A entrada dos parâmetros no aplicativo original, desenvolvido por Rúbio [54], é realizada por meio da interface gráfica. Os valores são digitados pelo operador para cada execução do aplicativo e não existe forma de gravar ou ler os parâmetros de um arquivo.

Para fins de testes, foi introduzida a leitura dos parâmetros de um arquivo texto. O nome do arquivo é passado ao aplicativo pela linha de comando. Neste caso, o aplicativo não mostra a interface gráfica, mas imprime os parâmetros lidos do arquivo texto, cria a visualização com base nesses parâmetros, grava a imagem de saída em um arquivo com nome igual ao do de parâmetros, incluindo a extensão apropriada (*.ppm*) e encerra a execução.

A próxima seção detalha os parâmetros utilizados pelo visualizador e a seção 3.5.1.2 mostra como o arquivo de parâmetros é formado.

#### 3.5.1.1 Parâmetros

Existe a possibilidade do operador do programa de visualização configurar alguns parâmetros, que têm efeito direto na imagem resultante. Esses parâmetros são:

- **Rotação do Volume** - A rotação do volume total é dada pelas rotações combinadas no eixo  $x$ ,  $y$  e  $z$ . Esses parâmetros permitem a visualização dos dados de diferentes

formas, facilitando o entendimento das estruturas tridimensionais. Os ângulos são em graus;

- **Posição do Observador** - A posição do observador é composta pela posição  $x$ ,  $y$  e  $z$ , dadas em unidades de comprimento;
- **Direção dos Raios Luminosos** - Os raios luminosos incidentes nos voxels do volume possuem uma direção, que é um vetor tridimensional. Cada componente representa o deslocamento nos eixos  $x$ ,  $y$  e  $z$ ;
- **Intensidade e Coeficientes da Luz Ambiente** - No modelo de iluminação de Phong, descrito na seção 2.5.2.4, esses são dois parâmetros indispensáveis. A intensidade da luz ambiente é o coeficiente  $I_a$  e o coeficiente de atenuação da luz ambiente é  $K_g$ , ambos da equação 2.25;
- **Intensidade da Luz Incidente** - É o coeficiente da luz incidente  $I_i$  das equações 2.26 e 2.28;
- **Coeficiente da reflexão especular** - É o expoente  $n$  da equação 2.28, que controla a quantidade de brilho da Reflexão Especular;
- **Cor do Plano de Fundo** - Controla a cor do plano de fundo;
- **Limiar do Gradiente** - Este parâmetro faz com que as superfícies com gradiente menor ou igual ao valor do limiar do gradiente sejam ignoradas, possibilitando a criação de uma visualização por membranas. Quando seu valor é zero, estabelece uma visualização por gel, considerando todas as superfícies detectadas, mesmo que o valor do gradiente. Seu valor deve estar no limite  $[0, 1]$  porque o vetor de gradiente é normalizado;
- **Término Antecipado do Raio** - O cálculo de composição pode ser interrompido antes que o valor da opacidade acumulada chegue a 1. Basta fornecer o valor deste parâmetro, definido no intervalo  $[0, 1]$ , que o cálculo da composição é interrompido quando o acúmulo da opacidade atingir o valor definido;
- **Tipo do Cálculo Alfa e Espessura da Transição entre Materiais** - Como descrito na seção 2.5.2.2, o usuário pode selecionar o tipo de cálculo alfa do aplicativo. Os dois tipos possíveis são os descritos em Drebin [16] e Levoy [36]. Quando o tipo do cálculo escolhido é o de *Isosurface*, é necessário especificar a espessura de transição entre materiais  $R$ , sendo esse valor maior do que zero;
- **Parâmetros do Material** - O especialista do programa de visualização pode definir tantos materiais quanto quiser, cada um com seus parâmetros de densidade, cor  $RGB\alpha$ , e limite inferior e superior do intervalo de ocorrência.

### 3.5.1.2 Estrutura do Arquivo de Parâmetros

Todos os parâmetros descritos na seção anterior são definidos em um arquivo texto, cada parâmetro sendo um número decimal no código ASCII e separado por um espaço antes e depois do valor.

A estrutura do arquivo de parâmetros é formada pela seqüência de valores, separados por um espaço em branco, conforme a tabela 3.2.

Número de seqüência	Significado
1	Rotação do volume no eixo $x$
2	Rotação do volume no eixo $y$
3	Rotação do volume no eixo $z$
4	Coordenada no eixo $x$ da posição do observador
5	Coordenada no eixo $y$ da posição do observador
6	Coordenada no eixo $z$ da posição do observador
7	Componente $x$ do vetor de direção da luz
8	Componente $y$ do vetor de direção da luz
9	Componente $z$ do vetor de direção da luz
10	Intensidade da luz ambiente $I_a$
11	Intensidade da luz incidente $I_i$
12	Coeficiente de atenuação da luz ambiente $K_a$
13	Coeficiente da reflexão especular
14	Brilho
15	Componente Vermelha da cor do plano de fundo
16	Componente Verde da cor do plano de fundo
17	Componente Azul da cor do plano de fundo
18	Limiar do gradiente
19	Terminação antecipada do raio
20	Quantidade de materiais
$m_d$	Densidade do material $n$
$m_v$	Componente vermelho da cor do material $n$
$m_{ve}$	Componente verde da cor do material $n$
$m_a$	Componente azul da cor do material $n$
$m_\alpha$	Opacidade da cor do material $n$
$m_{inf}$	Limite inferior do material $n$
$m_{sup}$	Limite superior do material $n$
21	Tipo do Cálculo Alfa
22	Espessura da Transição entre Materiais $R$

Tabela 3.2: Formato do arquivo de parâmetros

Os parâmetros  $m_d$ ,  $m_v$ ,  $m_{ve}$ ,  $m_a$ ,  $m_\alpha$ ,  $m_{inf}$  e  $m_{sup}$  repetem-se tantos quantos forem os materiais. Essa quantidade é definida pelo parâmetro de seqüência 20. A figura 3.11 mostra o arquivo de parâmetros usado para a geração da figura 4.7 do capítulo 4.

Para facilitar a manipulação dos arquivos de parâmetros, foi criada uma ferramenta gráfica para o ambiente *Microsoft Windows* com o compilador *Borland Delphi 7.0* [8]. A figura 3.12

0.0000 -45.0000 13.0000 0.0000 0.0000 1.0000 0.5770 0.5770 0.5770 2.0000  
 1.6000 0.5000 0.5000 8.0000 0 0 0 0.0000 0.9800 2 1.0000 255 255 0 0.1 0  
 50 0.5000 0 0 255 0.03 51 200 2 0.0000

Figura 3.11: Arquivo de parâmetros usado para a geração da figura 4.7, item (a), do capítulo 4.

mostra a tela do aplicativo para manipulação dos parâmetros.

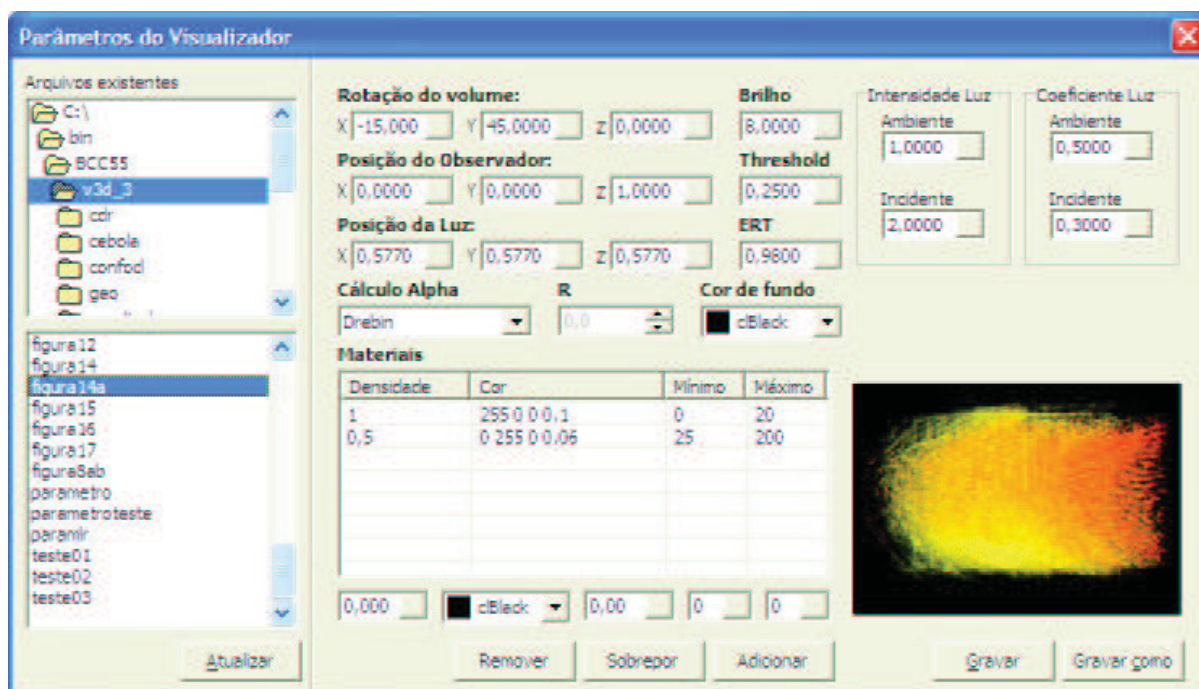


Figura 3.12: Tela do programa para manipulação dos arquivos de parâmetros..

A imagem no canto inferior direito da figura 3.12 é o resultado da geração da imagem com os parâmetros do arquivo. Os três botões com títulos *Remover*, *Sobrepôr* e *Adicionar* operam sobre a lista de materiais. Os botões *Gravar* e *Gravar como* gravam o arquivo de parâmetros sendo manipulado no momento.

### 3.5.2 Visualização Volumétrica

Após a definição dos parâmetros, a execução do aplicativo de visualização volumétrica se dá pela digitação da linha de comando:

```
V3DTumor.exe <Diretório das Fatias> <Arquivo de Parâmetros>
```

O arquivo de saída será criado com nome <Arquivo de Parâmetros>.ppm.

Antes, porém, que os raios possam ser lançados contra o volume e o *pipeline* seja executado, é necessário prover um contexto que permita a representação de entidades tridimensionais em

uma imagem bidimensional. Por esse motivo, as três próximas seções detalham o processo de obtenção de um envoltório geométrico necessário para o lançamento dos raios e a seção subsequente trata de cada etapa do *pipeline* do algoritmo de visualização volumétrica.

### 3.5.2.1 Sistema de Coordenadas

O lançamento dos raios é realizado com base em uma imagem bidimensional. O volume, contudo, pode sofrer mudança na orientação ou escala para tornar o volume *isotrópico*, ou seja, com as mesmas relações espaciais entre os três eixos de coordenadas. Essas transformações sobre os dados alteram o sistema de coordenadas do volume, que precisa ser relacionado de volta ao sistema de coordenadas da imagem.

Nesse caso, as coordenadas originais do volume são nomeadas  $u$  (eixo das abscissas),  $v$  (eixo das ordenadas) e  $w$  (eixo das cotas). O plano  $uv$  contém as amostras de cada fatia e o conjunto de fatias estende-se ao longo do eixo  $w$ . O plano da imagem está contido no espaço da visão, onde os eixos de coordenadas são nomeados  $x$ ,  $y$  e  $z$ .

### 3.5.2.2 Escala e Rotação

A relação entre as dimensões de um pixel e a espessura da fatia não é a mesma. Se as imagens forem simplesmente empilhadas, o volume é dito *anisotrópico* porque a distância entre fatias difere da distância entre pixels da imagem.

Para transformar o volume de dados de tal forma que suas dimensões correspondam às do objeto real, é necessário multiplicar os dados por fatores de escala. Para isso, utiliza-se uma matriz de escala:

$$\begin{pmatrix} E_u & 0 & 0 & 0 \\ 0 & E_v & 0 & 0 \\ 0 & 0 & E_w & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

onde  $E_u$ ,  $E_v$  e  $E_w$  representam os fatores de escala nos eixos  $u$ ,  $v$  e  $w$ , respectivamente. Estes fatores são determinados com base nos espaçamentos ao longo dos três eixos do sistema  $uvw$ . Portanto:

- $E_u$  é igual ao espaçamento no eixo  $u$ ;
- $E_v$  é igual ao espaçamento no eixo  $v$  e
- $E_w$  é igual ao espaçamento no eixo  $w$ .

Para normalizar esses três fatores, basta dividi-los por  $E_u$ .

A rotação de um ponto no espaço tridimensional é dada pela rotação nos três eixos de coordenadas. O volume, quando sofre rotação, deve ser multiplicado pelas matrizes de rotação, mostradas a seguir, nos três eixos:

$$R_x = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \cos \theta & \text{sen } \theta & 0 \\ 0 & -\text{sen } \theta & \cos \theta & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

$$R_y = \begin{pmatrix} \cos \theta & 0 & \text{sen } \theta & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ -\text{sen } \theta & 0 & \cos \theta & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

$$R_z = \begin{pmatrix} \cos \theta & \text{sen } \theta & 0 & 0 \\ -\text{sen } \theta & \cos \theta & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

As três matrizes podem ser combinadas entre si e com a matriz de escala. Durante o processo de reamostragem, o cálculo deve ser realizado com a inversa das matrizes de escala e rotação.

### 3.5.2.3 Envoltório Geométrico

O lançamento dos raios parte do plano da imagem em direção ao volume de dados. Os dados, por sua vez, não estão orientados corretamente com o plano da imagem, mas sim orientados conforme o espaço do objeto  $uvw$ .

Por esse motivo, é necessário criar um envoltório geométrico ortogonal ao redor do volume de dados que esteja alinhado ao plano da imagem, ou seja, o plano  $xyz$ . Os raios são então lançados perpendicularmente ao plano da imagem e, conseqüentemente, perpendiculares ao envoltório geométrico.

Esse envoltório geométrico é dado pelas coordenadas mínimas e máximas do volume no espaço  $uvw$ . Como a coordenada mínima está alocada sobre a origem desse espaço, seu valor é  $(0, 0, 0)$ . O ponto máximo é derivado das dimensões conhecidas do volume:  $u$  é o número de linhas,  $v$  é o número de colunas e  $w$  é o número de fatias.

Basta aplicar as transformações de escala e rotação sobre esses pontos para obtê-los no espaço  $xyz$ . Conhecidos seus valores, cada um é decrescido em 1 tendo como ponto inicial o ponto máximo. As transformações inversas de escala e rotação, aplicadas sobre cada ponto da iteração no espaço  $xyz$ , resultam no ponto amostrado no volume original, sem as trans-

formações. Basta então interpolar esses resultados para obter os valores amostrados nas fatias do volume.

### 3.5.2.4 Lançamento dos Raios

Depois de criado o contexto tridimensional com as etapas anteriores, o lançamento dos raios torna-se um processo simples, embora computacionalmente exigente.

Tendo o ponto máximo como ponto de partida, basta calcular a posição dos pixels da imagem decrementando 1 das coordenadas  $x$  e  $y$  do ponto inicial. Para cada pixel  $i$ , o processo se estende da coordenada  $(x_i, y_i, 0)$  até o ponto de coordenada  $(x_i, y_i, z_{max})$ , onde  $z_{max}$  é o número máximo de amostras no eixo  $z$  do envoltório geométrico, discutido na seção anterior. O cálculo do raio pode ser interrompido em um momento anterior, caso a opacidade atinja o valor 1 ou ultrapasse o limite estipulado pelo parâmetro de Término Antecipado do Raio (do inglês *Early Ray Termination* - ERT).

O *pipeline*, ou seqüência de etapas, da visualização volumétrica, como descrito na seção 2.5.2, é implementado no aplicativo de visualização com as seguintes fases:

1. Reconstrução e reamostragem;
2. Classificação;
3. Detecção de Superfícies;
4. Iluminação e
5. Composição.

As próximas seções descrevem as técnicas utilizadas pela ferramenta de visualização.

### 3.5.2.5 Reconstrução e reamostragem

Um ponto amostrado ao longo de um raio raramente coincide com um voxel no volume original. Na maioria dos casos, o valor amostrado fica entre os voxels, sem que seu valor seja conhecido.

A descoberta do valor real do ponto amostrado pode ser realizada por meio da interpolação linear ao longo dos três eixos de coordenadas, considerando os oito voxels vizinhos.

A interpolação implementada no programa é a linear. Embora contribua razoavelmente para a qualidade final da imagem, é uma das técnicas mais rápidas de interpolação. Outros tipos de interpolação são propostos em [24, 40, 65].

Embora seja uma técnica rápida de interpolação, ela possui desvantagens. Para volumes onde a relação da espessura da fatia e da distância entre pixels da imagem é muito grande, o resultado da visualização não tem um aspecto suave. Neste caso, a interpolação linear cria

artefatos na imagem, similares a uma "escadaria dentada". Ainda que possa contribuir negativamente para o resultado da visualização, esta técnica produz resultados bastante satisfatórios, visto que o corte do tecido cria artefatos semelhantes em escala muito maior.

### 3.5.2.6 Classificação

Três tipos de classificação são empregados no aplicativo de visualização: a proposta por Drebin [16] e por Levoy [36], descritas na seção 2.5.2.2, e uma terceira, elaborada para representar de forma mais verossímil as imagens de microscopia.

A primeira consiste na determinação probabilística da presença dos materiais em um voxel baseada em uma função trapezoidal. Esta classificação adota o princípio de que um voxel representa um único material em sua totalidade ou no máximo dois materiais diferentes. Isso porque em exames de Tomografia Computadorizada, principal alvo da técnica, um voxel freqüentemente representa apenas um material ou um percentual de dois materiais adjacentes, como osso e tecido. Quando dois materiais são detectados em um voxel, a soma de suas percentagens é igual a 1 (ou 100%).

A segunda técnica utiliza uma função para a determinação da opacidade do voxel com base no gradiente e na amostra do voxel. Na implementação do programa de visualização, a variável  $f_v$  é calculada como a média entre o limite inferior e o superior do material e  $R$  é definido pelo usuário.

A técnica proposta por esse trabalho baseia-se exclusivamente na densidade dos pixels das fatias constituintes do volume. Como descrito na seção 2.3 e 3.2, os níveis de cinza dos pixels das imagens adquiridas com as câmeras CCD acopladas ao microscópio representam, basicamente a densidade óptica do material analisado. Materiais menos densos tendem a possuir níveis de cinza mais próximos do limite superior, enquanto materiais mais densos possuem níveis de cinza mais próximos do limite inferior dos possíveis valores atribuídos a cada pixel.

Assim sendo, a classificação proposta baseia-se na densidade dos pixels, ou seja, nos níveis de cinza dos pixels das imagens para calcular a *densidade* e a *opacidade* de cada material. Como visto na seção 2.3, algumas áreas de interesse das imagens foram extraídas pela segmentação e atribuídas com nível 1, destacando-se do restante da imagem.

Aproveitando-se dessa característica e visando destacar esses objetos de interesse na visualização, a função para determinação da densidade mantém a densidade dos níveis de cinza abaixo de um limiar constante, referenciado como limiar inferior. A partir deste limiar, a densidade decresce linearmente em função do nível de cinza até o limiar superior. Esta função

pode ser escrita como:

$$d_i = \begin{cases} 1 & \text{se } f_i < L_{inf} \\ f_i \frac{(L_{sup} - f_i)}{|L_{sup} - L_{inf}|} & \text{se } L_{inf} \leq f_i < L_{sup} \\ 0 & \text{se } f_i \geq L_{sup} \end{cases} \quad (3.1)$$

onde  $d_i$  é a densidade do pixel  $i$ ,  $f_i$  é o nível de cinza do pixel  $i$  e  $L_{inf}$  é o limiar inferior e  $L_{sup}$  é o limiar superior.

A opacidade do voxel é calculada também com base no nível de cinza amostrado. Tendo em vista o mesmo objetivo almejado no cálculo da densidade, a opacidade dos objetos segmentados, ou seja, com nível de cinza igual a 1, são atribuídos com opacidade 1, sendo completamente opacos. Acima desse valor, a opacidade decresce com uma função gaussiana, iniciando com o valor da opacidade em 0,5 até um limiar. A função de opacidade pode ser definida como:

$$\alpha_i = \begin{cases} 1 & \text{se } f_i \leq 1 \\ \frac{e\left(\frac{-(f_i^2)}{\frac{L}{2}}\right)}{10} & \text{se } f_i > 1 \end{cases} \quad (3.2)$$

onde  $\alpha_i$  é a opacidade do pixel  $i$ ,  $f_i$  é o nível de cinza do pixel  $i$  e  $L$  é o limiar. A figura 3.13 mostra as funções de densidade e opacidade em função do nível de cinza dos pixels.

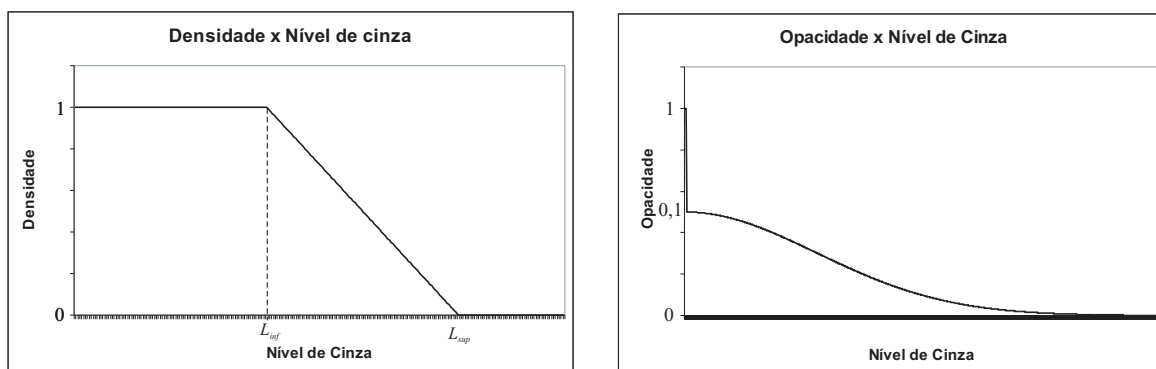


Figura 3.13: Funções de densidade e opacidade em função dos níveis de cinza.

As cores definidas na lista de materiais têm como principal propósito facilitar a identificação dos materiais na visualização. A coloração das regiões segmentadas facilita o entendimento da estrutura tridimensional. A compressão da escala dos níveis de cinza, por meio da técnica proposta na seção 3.2, faz com que as regiões mais densas tenham opacidade maior e pareçam mais evidentes na imagem final. A redução da opacidade das regiões favorece a compreensão da estrutura de todos os tecidos presentes na amostra.

Com todas as técnicas apresentadas, qualquer material presente no volume pode ser completamente oculto. Para isso basta definir uma opacidade bastante baixa ao material que se deseja remover. Opacidades relativamente baixas fazem com que o material fique transparente na visualização.

### 3.5.2.7 Detecção de Superfícies

A detecção de superfícies implementada no programa de visualização é conhecida como *diferença central*, descrita na seção 2.5.2.3.

Essa técnica é particularmente interessante para o cálculo do gradiente com imagens de microscopia porque suaviza transições bruscas entre materiais. Isso ocorre porque o cálculo considera os voxels vizinhos ao voxel em questão, no centro do cálculo. Transições pequenas, que ocorrem entre dois voxels consecutivos, são suavizadas pela diferença central porque ignoram pixels subsequentes, pelo uso de voxels intercalados.

### 3.5.2.8 Iluminação

Objetivando maximizar a sensação tridimensional da visualização, o modelo de iluminação implementado é o de Phong, descrito na seção 2.5.2.4.

Utilizando-se dos coeficientes de luz ambiente, atenuação da luz ambiente, luz incidente, coeficiente de reflexão especular e brilho, é possível obter imagens bastante realísticas, ou suficientemente realísticas para prover a sensação tridimensional desejada.

Porém, a visualização de várias fatias, evidenciando principalmente os núcleos dos tecidos, dificulta a compreensão do objeto tridimensional. O acúmulo de núcleos opacos acaba reduzindo a característica tridimensional desejada da visualização.

Por esse motivo, este trabalho implementa também a atenuação da luz incidente, tanto na luz ambiente quanto nas reflexões especular e difusa. Para tanto, a luz incidente é atenuada proporcionalmente à distância do observador ao voxel iluminado. Esta atenuação é linear<sup>1</sup>, e pode ser definida como:

$$I_i^a = I_i \frac{e^{-(d^2)}}{10000} \quad (3.3)$$

onde  $I_i^a$  é a intensidade da luz incidente atenuada,  $I_i$  é a intensidade da luz incidente e  $d$  é a distância entre o observador e o voxel iluminado. A constante 10000 é obtida empiricamente, com a realização de testes com as séries descritas no capítulo 4.

<sup>1</sup>O olho humano percebe as variações de intensidade numa escala logarítmica e, por isso, a função de atenuação é gaussiana.

### 3.5.2.9 Composição

O acúmulo de cores e opacidades resultando na cor de cada pixel, a técnica de composição descrita na seção 2.5.2.5 foi implementada no programa de visualização.

No início do processo, todos os pixels são inicializados com ausência completa de cor e com transparência total (opacidade nula). À medida que cada novo voxel é calculado, sua cor e opacidade são acumuladas com a cor e opacidade do voxel anterior, conforme equação 2.30.

O cálculo de composição é interrompido quando a opacidade acumulada atingir o valor 1 ou quando chegar ao valor estipulado pelo parâmetro de Término Antecipado do Raio (ERT).

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS EXPERIMENTAIS

Para testar a metodologia proposta neste trabalho, três séries de imagens provenientes de cortes seriados foram reconstruídas tridimensionalmente, todas com a supervisão dos especialistas responsáveis pelo estudo de cada série.

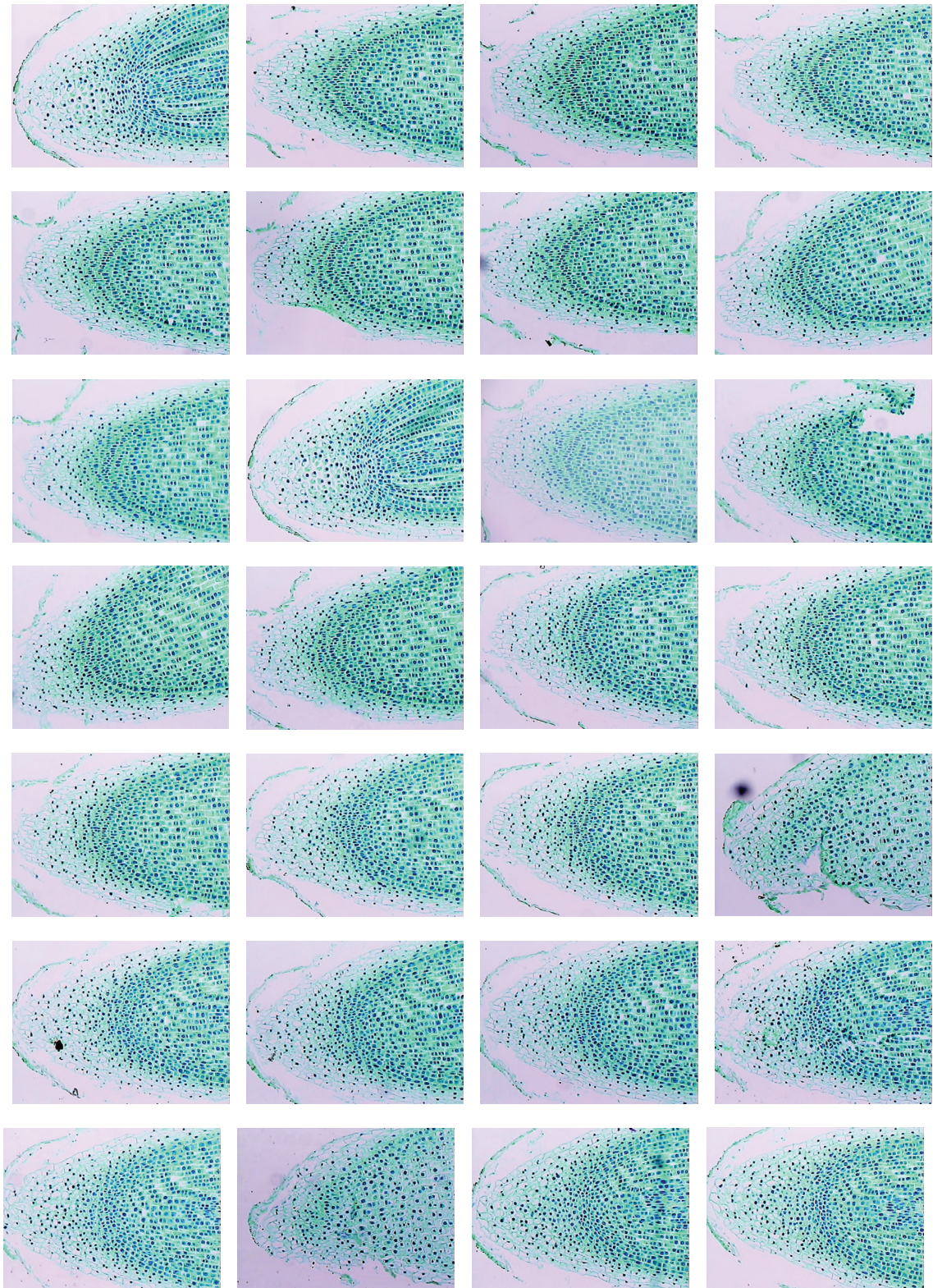
Os testes realizados com cada série são descritos nas próximas seções, expondo os detalhes de execução das técnicas mostradas nos capítulos 2 e 3. Os parâmetros utilizados para a geração das imagens são apresentados com detalhes no apêndice B.

#### 4.1 Estudo de Caso 1

A série de testes número 1 provém do corte da raiz de uma cebola, corada com Verde Rápido. As principais características desta série estão descritas na tabela 4.1. Esta seqüência foi fornecida pelo departamento de Biologia Celular da UFPR e especialmente preparada para a realização de testes deste trabalho. A figura 4.1 mostra todas as fatias do corte seriado.

Propriedade	Descrição
Material	Raiz de Cebola
Corante	Verde Rápido
Ampliação	Aproximadamente 400×
Microscópio	Olympus BX1
Câmera CCD	Colorida
Dimensões das fatias	640 × 480
Tipo da imagem	TIF (Targa Interchangeable Format)
Bits por pixel	24 bits, 8 para cada componente de cor
Número de fatias	44
Espessura das fatias	3 $\mu$ m
Relação espessura × distância entre pixels	15×

Tabela 4.1: Dados da Série do Caso 1.



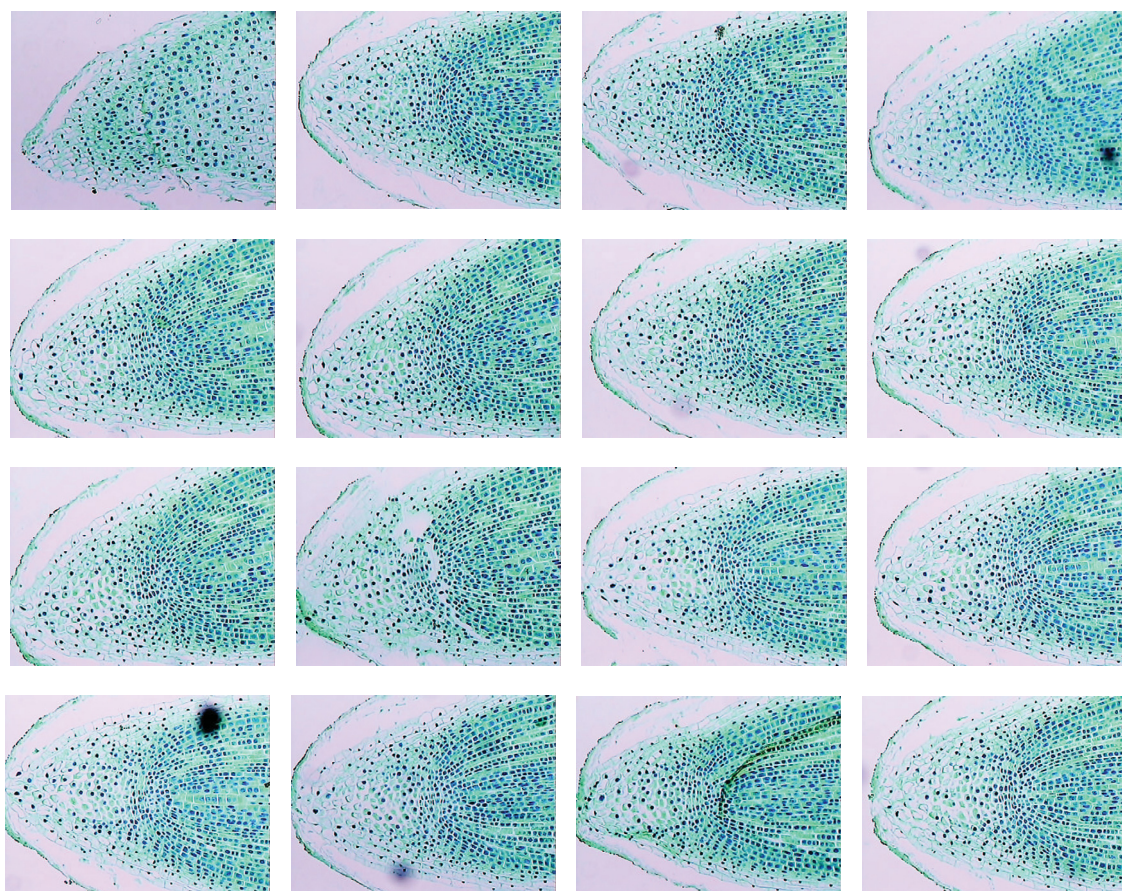


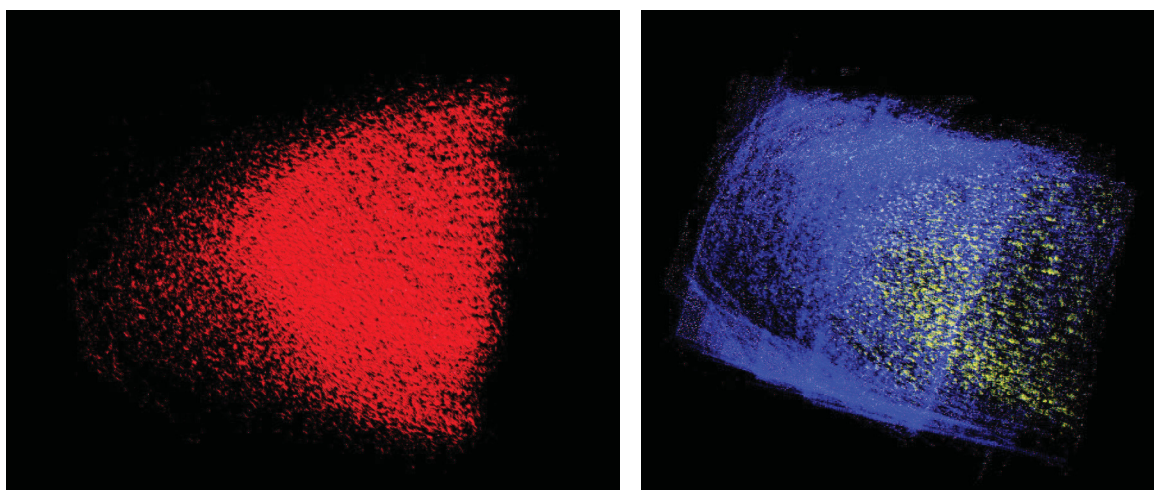
Figura 4.1: Fatias da série 1. A seqüência está ordenada da esquerda para direita e de cima para baixo.

A aquisição das imagens foi realizada com o microscópio do departamento de Zoologia e armazenada no formato TIF. Depois de pré-processadas com o filtro da mediana de vizinhança tamanho  $3 \times 3$  pixels, as imagens foram convertidas para tons de cinza, para então serem segmentadas pelo processo de limiarização.

As imagens desta série apresentam núcleos bem definidos porque o corante utilizado destaca todo e qualquer material genético das células. Aproveitando essa característica, a segmentação separa os núcleos da imagem por meio de um limiar definido pelo especialista. Uma única imagem da série, escolhida ao acaso, é segmentada interativamente pelo especialista, que decide visualmente qual o melhor valor para o limiar. O valor do limiar definido para esta série é 100.

Este valor é então aplicado a todas as imagens da série, seguido pela abertura e fechamento morfológicos das imagens segmentadas com um elemento estruturante em forma de disco com raio igual a uma unidade. O resultado desse processamento é composto com a imagem colorida inicial, colorindo os núcleos segmentados de vermelho, no caso da fatia ser de número par, ou amarelo, se a fatia for de número ímpar. Essa coloração, como descrito na seção 3.4, facilita a detecção visual de características que permitam o registro das imagens.

A série foi alinhada da fatia 1 à fatia 44 com o aplicativo Adobe Photoshop 7.0. Depois de alinhadas as fatias, um recorte retira o excesso de espaço ao redor do objeto de interesse e cada nível é gravado como uma imagem TIF. A seguir, essas imagens são transformadas em imagens monocromáticas e exportadas para o formato PGM e podem formar o volume de dados a ser visualizado.



(a)

(b)

Figura 4.2: Visualização tridimensional da série 1. Os núcleos celulares estão coloridos de vermelho e visualizados com material semi-transparente em (a). Em (b) a visualização apresenta os núcleos em amarelo e o restante dos componentes celulares e ar em azul.

A figura 4.2 mostra a visualização de duas imagens da série 1, da raiz de uma cebola. A

imagem do item (a) mostra apenas os núcleos segmentados em vermelho, visualizados com um material semi-transparente. A imagem do item (b) também é uma visualização da série 1, mas com os núcleos segmentados coloridos em amarelo. Ao restante dos tons de cinza das fatias foi atribuída uma densidade baixa de cor azul e, por isso, há a sensação de preenchimento nos espaços em que não existem núcleos.

A imagem da figura 4.3 é a visualização em diagonal da série 1, com três componentes evidenciados. Um deles é o núcleo, colorido de vermelho escuro e abrangendo os níveis de cinza de 0 a 20. A faixa de tons de cinza de 21 a 120 foi colorida de verde com baixa opacidade. A mistura dos dois materiais combina-se em um amarelo, onde há maior presença de material extranuclear (citoplasma e parede celular), e em laranja, onde a presença dos núcleos em vermelho é maior do que a de material extranuclear. Ao restante dos tons de cinza das imagens das fatias foi atribuído um valor de opacidade baixo, o que faz com que essas regiões não apareçam na visualização. Os pontos brancos da imagem são as reflexões especulares de superfícies de material extranuclear. As posições das fatias são bastante evidentes com as bordas em diagonal, visíveis pela reflexão especular. A imagem do item (b) foi gerada com atenuação da luz incidente.

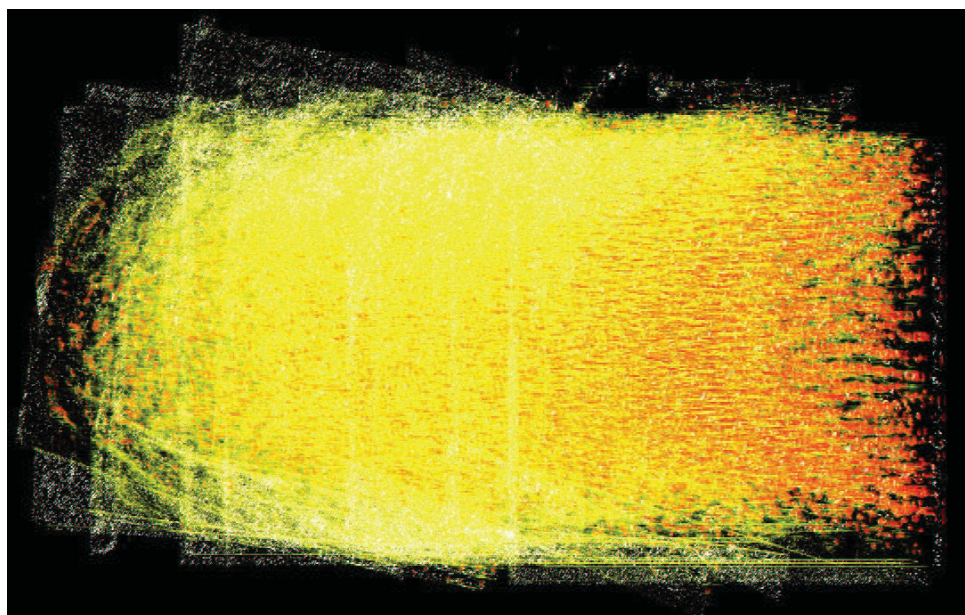
A figura 4.4 apresenta uma imagem lateral da seqüência de fatias com núcleos vermelhos e opacos. O acúmulo de núcleos dificulta a percepção tridimensional da visualização. A membrana mais externa, existente na ponta da raiz da cebola e na parte inferior da imagem, permite a sensação tridimensional da seqüência.

## 4.2 Estudo de Caso 2

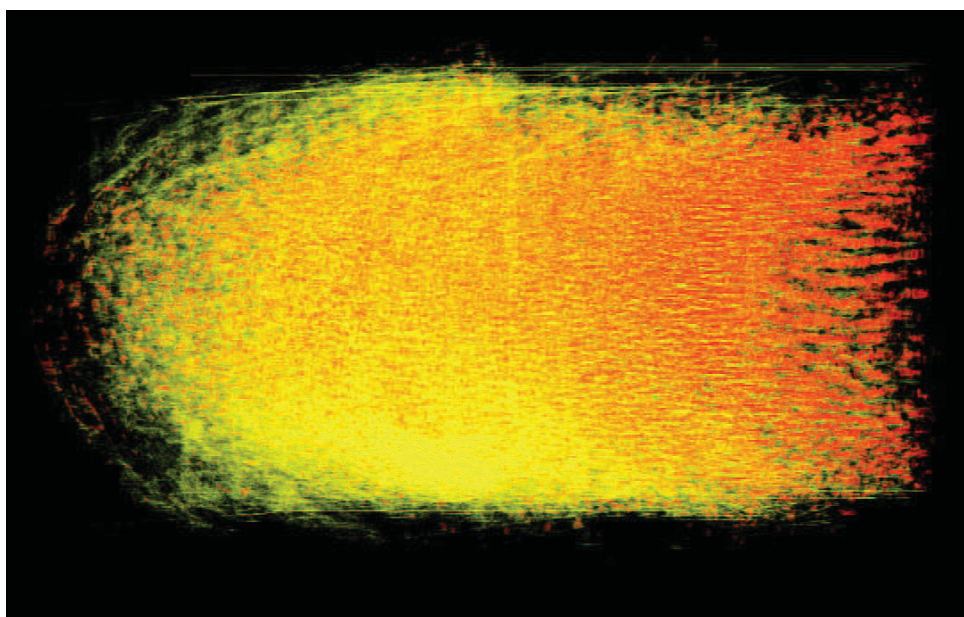
A série 2 de teste é um corte seriado do útero de uma rata na sexta semana de gestação, corada com Hematoxilina e Eosina. As características principais desta série são mostradas na tabela 4.2. Esta série foi preparada no departamento de Biologia Celular da UFPR. A figura 4.5 mostra todas as fatias do corte seriado.

Propriedade	Descrição
Material	Útero de Rata
Corante	Hematoxilina e Eosina
Ampliação	Aproximadamente 100×
Microscópio	Zeiss Axiophot
Câmera CCD	Monocromática
Dimensões das fatias	1280 × 1024
Tipo da imagem	TIF (Targa Interchangeable Format)
Bits por pixel	16 bits
Número de fatias	11
Espessura das fatias	5 $\mu$ m
Relação espessura × distância entre pixels	25×

Tabela 4.2: Dados da Série do Caso 2.



(a)



(b)

Figura 4.3: Visualização tridimensional da série 1. Nas duas imagens os núcleos celulares estão coloridos de vermelho, o citoplasma está colorido de verde claro e o restante das tonalidades de cinza das imagens originais estão corados de cinza escuro. (a) Imagem gerada com luz incidente constante. (b) Imagem gerada com atenuação da luz incidente.

A aquisição das imagens dessa série foi realizada no microscópio do departamento de Biologia Celular, que possui uma câmera CCD monocromática, porém, de maior resolução. As imagens são armazenadas no formato TIF com 16 bits por pixel. Primeiramente foram pré-processadas com o filtro da mediana de vizinhança tamanho com tamanho  $3 \times 3$  pixels e,

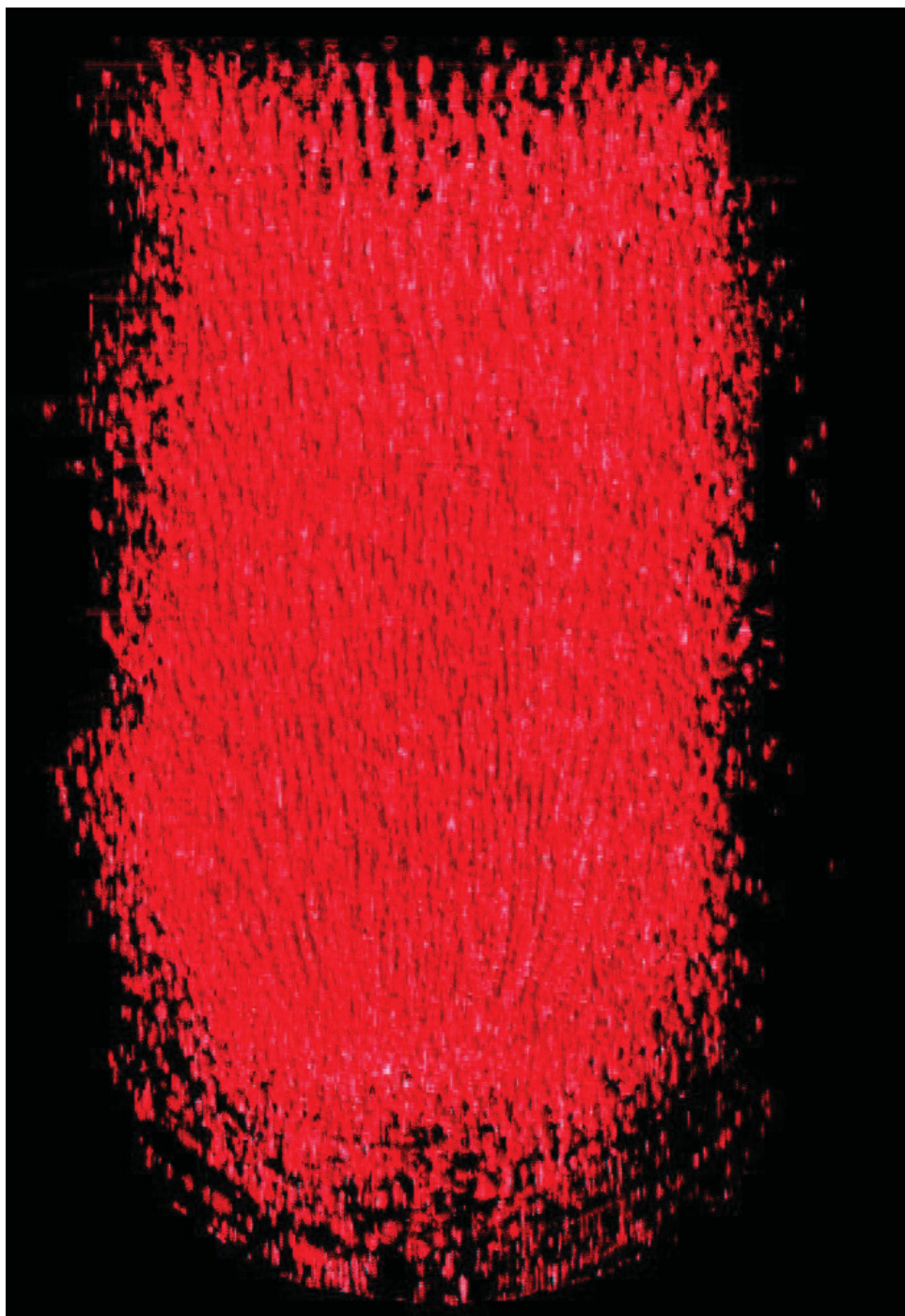


Figura 4.4: Visualização tridimensional da série 1 com os núcleos corados de vermelho e opacos.

em seguida, processadas para a detecção do limiar pelo especialista.

Ao contrário das imagens da série 1, a baixa ampliação dessa série dificulta a detecção dos núcleos celulares. O baixo contraste da série, causado pela combinação dos filtros do condensador e da aquisição monocromática, prejudica a segmentação dos núcleos, contribuindo para a complexidade da tarefa. Visto que o objetivo da segmentação dos núcleos é guiar a

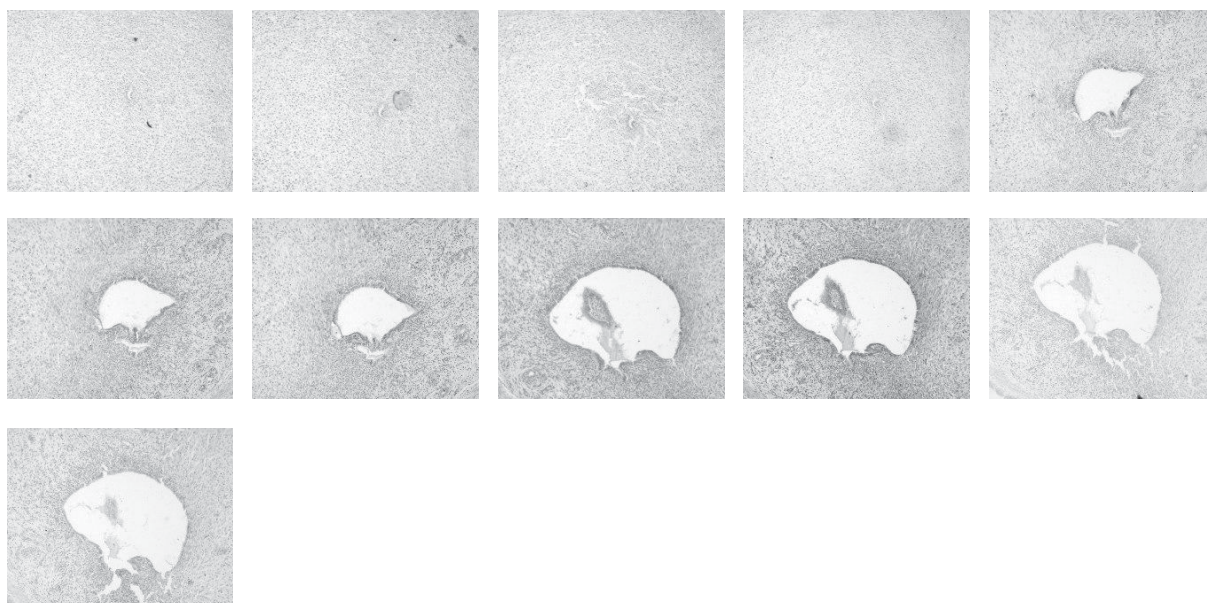


Figura 4.5: Fatias da série 2. A seqüência está ordenada da esquerda para direita e de cima para baixo.

compreensão tridimensional da visualização e não criar uma representação verossímil ou foto-realística, o limiar selecionado pelo especialista foi 203, o que permite destacar alguns núcleos da parede muscular e delinear melhor a mucosa de revestimento do útero.

Este valor de limiar é então utilizado na segmentação de todas as imagens da série. A segmentação é seguida pela abertura e fechamento das imagens com um elemento estruturante em forma de disco com raio igual a uma unidade. O resultado da segmentação é composto com a imagem original, atribuindo o valor 1 aos pixels da imagem original que foram detectados pela etapa anterior.

A série foi alinhada da fatia 1 à fatia 11 com o aplicativo Adobe Photoshop 7.0 e, depois de alinhadas as fatias, um recorte retira o excesso de espaço ao redor do objeto de interesse. As fatias então são segmentadas manualmente para que os níveis de cinza das regiões de interesse sejam diferenciados com a compressão da escala de níveis de cinza.

As imagens desta série contêm dois tipos de tecidos mais evidentes: mucosa de revestimento do útero (endométrio) e a parede muscular do útero (miométrio). A região da parede uterina, por facilitar o entendimento da visualização e por ser mais interior, teve sua escala de níveis de cinza comprimida entre os valores 0 e 50. O restante da imagem teve sua escala de níveis de cinza comprimida entre os valores 51 e 255. Cada nível é então gravado como uma imagem TIF e, em seguida, transformada para o formato PGM.

Duas imagens, provenientes da seqüência 2 sem a delimitação dos dois tecidos da amostra, são mostradas na figura 4.6. Na imagem do item (a), os núcleos segmentados estão coloridos de vermelho e a faixa de tons de cinza, contidos no intervalo  $[25, 200]$ , estão coloridos de verde. Nessas imagens, o limiar do gradiente tem valor 0,5 e impede que o ruído das imagens

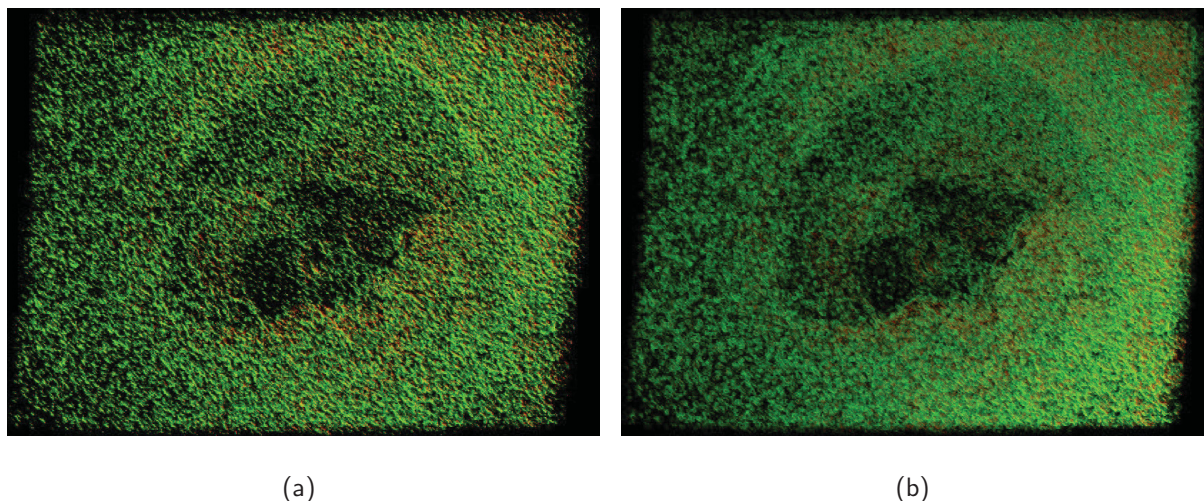
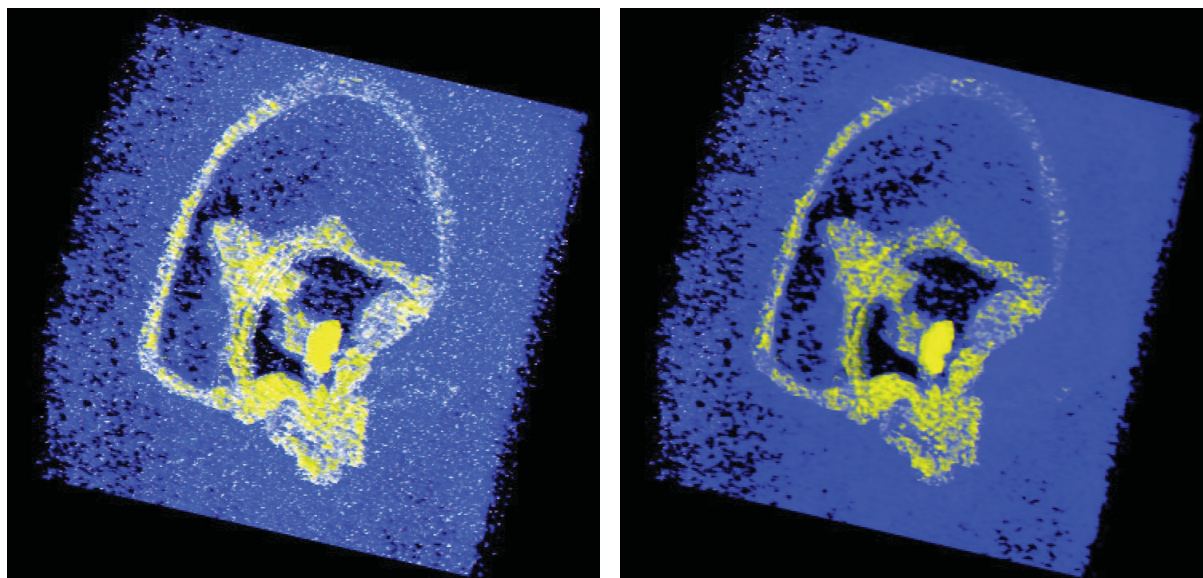


Figura 4.6: Visualização tridimensional da série 2. Os núcleos celulares estão coloridos de vermelho e os outros componentes celulares de verde. Item (a) sem atenuação da luz incidente e item (b) com atenuação.

forme superfícies diminutas e interfiram no resultado da visualização. A imagem do item (b) foi gerada com atenuação da luz incidente, porém com parâmetros iguais aos utilizados na criação da imagem do item (a).

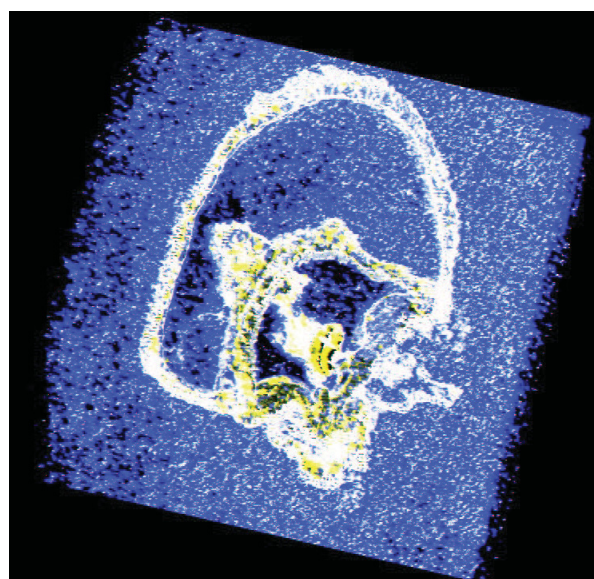
As imagens apresentadas na figura 4.7 mostram a visualização da seqüência do útero de uma rata. Essa seqüência teve os tecidos delimitados pelo especialista e, por isso, duas regiões são visíveis nas imagens. A região amarela é a mucosa de revestimento do útero. A parede muscular do útero está colorida de azul. Os pontos brancos nas imagens são os componentes da reflexão especular. A imagem do item (a) foi gerada com a classificação probabilística de Drebin [17]. Nessa imagem, a formação do útero fica pouco visível e destacada. A imagem do item (b) também foi gerada com a classificação proposta por Drebin, mas com atenuação da luz incidente. Nesse caso, o efeito da reflexão especular foi bastante reduzido. A imagem apresentada no item (c) foi criada com a classificação proposta na seção 3.5.2.6. Os materiais mais densos no interior do embrião são mais visíveis, bem como a formação do útero na parte posterior do volume. A região limítrofe entre o endométrio e o miométrio é mais destacada, principalmente nas regiões sobrepostas pelas fatias mais próximas do observador.

A figura 4.8 apresenta uma imagem da visualização volumétrica da série 2, gerada com os mesmos parâmetros utilizados na criação das imagens da figura 4.7. A técnica de classificação utilizada é a proposta por Levoy [36], descrita na seção 2.5.2.2. Embora mais simplificada do que as imagens anteriores, as regiões mais densas são mais visíveis, coloridas de um amarelo e cercadas pela cor branca.



(a)

(b)



(c)

Figura 4.7: Visualização tridimensional da série 2 com segmentação de tecidos. O tecido da parede uterina está colorido de amarelo. A imagem do item (a) é a visualização com a classificação probabilística de Drebin. O item (b) corresponde à mesma visualização, mas com atenuação luminosa. A classificação utilizada em (c) é a proposta na seção 3.5.2.6.

### 4.3 Estudo de Caso 3

A série de testes 3 foi cedida pela professora Maria Cecília do Departamento de Botânica da UFPR, que pesquisa a embriogênese da espécie *Adesmia latifolia*. As características da série estão na tabela 4.3 e as fatias do corte seriado são mostradas na figura 4.9.

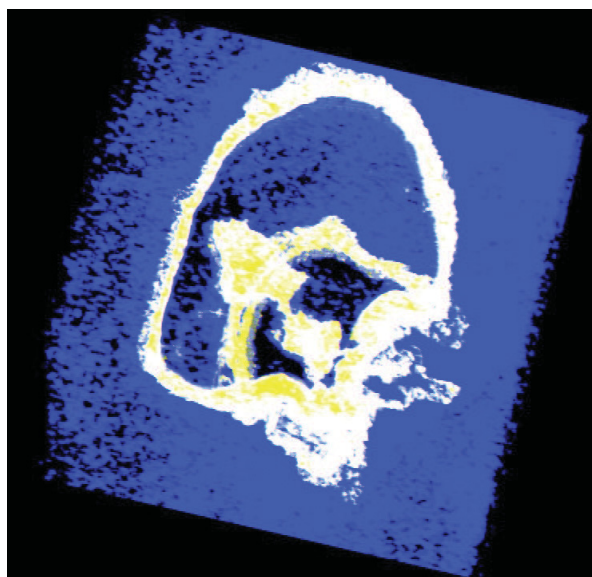


Figura 4.8: Visualização tridimensional da série 2 com segmentação de tecidos. A classificação empregada é a proposta por Levoy [36].

Diferente das séries anteriores, esta seqüência possui várias imagens para uma mesma fatia. Isso ocorre porque durante a aquisição das imagens várias fotografias foram feitas para aumentar o campo de visão e para que todo o objeto de interesse pudesse ser visualizado tridimensionalmente. Cada linha da figura 4.9 corresponde às imagens de uma mesma fatia.

Propriedade	Descrição
Material	Semente de <i>Adesmia latifolia</i>
Corante	Azul de Toluidina
Ampliação	Aproximadamente 200×
Microscópio	Zeiss Axiophot
Câmera CCD	Monocromática
Dimensões das fatias	1280 × 1024
Tipo da imagem	TIF (Targa Interchangeable Format)
Bits por pixel	16 bits
Número de fatias	5
Espessura das fatias	8 $\mu$ m
Relação espessura × distância entre pixels	26×

Tabela 4.3: Dados da Série do Caso 3.

O primeiro processo pelo qual as fatias dessa série foram processadas foi o alinhamento das imagens de um mesmo corte. Este alinhamento foi realizado com o uso do aplicativo Matlab. As imagens da primeira coluna eram carregadas no aplicativo como imagens de referência e as imagens subseqüentes eram carregadas como as imagens que sofrem as transformações. Depois de alinhar as imagens, elas foram sobrepostas no aplicativo Photoshop.

Devido ao corante utilizado nesta série e a origem do material, que é vegetal, os núcleos

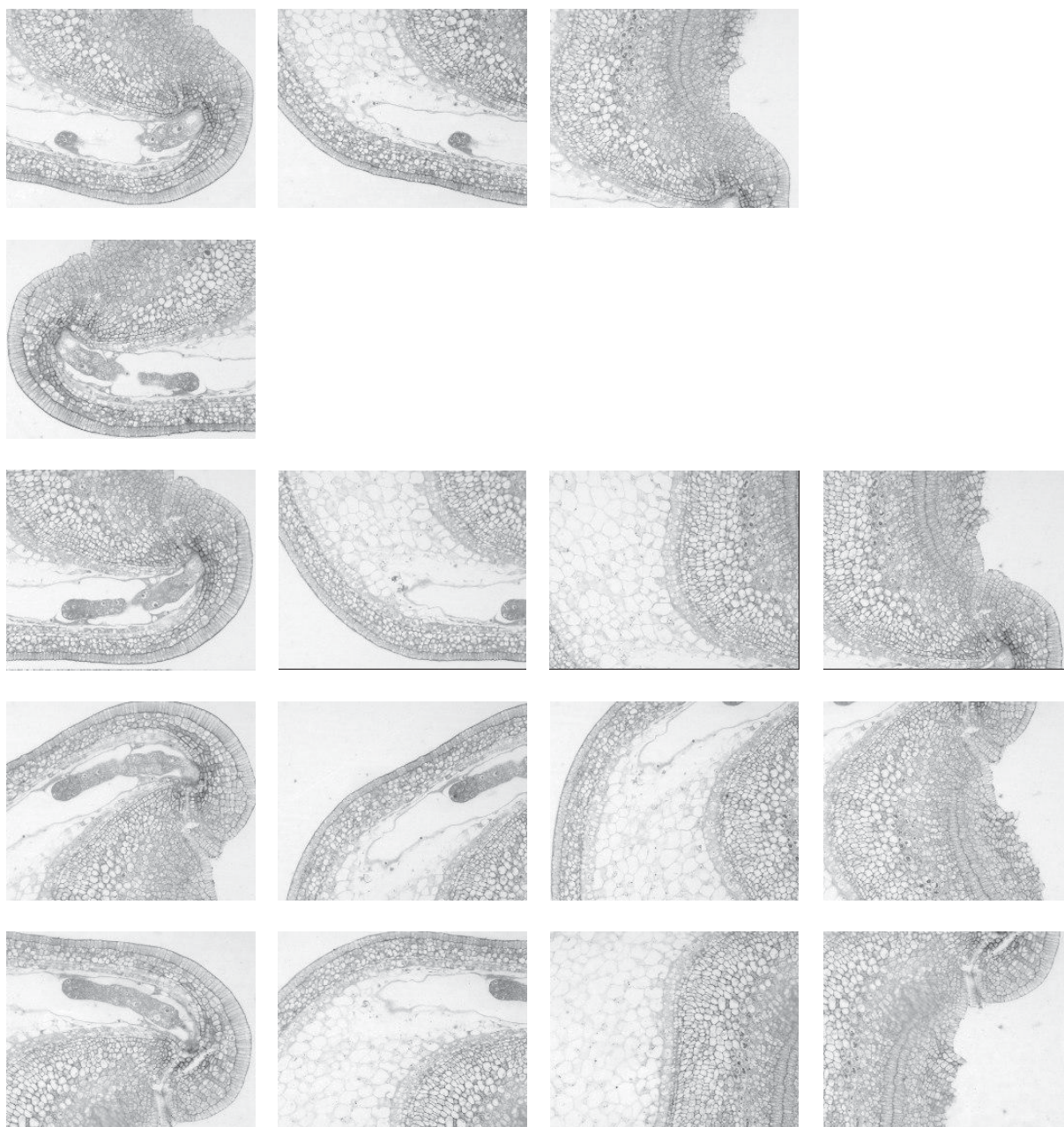


Figura 4.9: Fatias da série 3. A seqüência está ordenada da esquerda para direita e de cima para baixo. Cada linha representa uma única lâmina e as imagens foram combinadas para formar cada uma das 5 fatias.

não são evidentes o suficiente para que possam ser segmentados. Neste caso, as imagens não foram segmentadas, mas sofreram a divisão dos tecidos pelo especialista. No entanto, o processo de registro das imagens é o mesmo das séries anteriores. Depois de alinhados os cortes, as imagens sofreram uma redução do espaço excedente, reduzindo a quantidade de pixels formadores do volume de dados.

Essa amostra possui quatro tecidos diferentes que podem ser diferenciados. Utilizando as técnicas descritas na seção 2.2 e 3.2, os quatro tecidos foram demarcados manualmente e

Região	Limites mínimo e máximo
1	0 - 50
2	51 - 100
3	101 - 150
4	151 - 200

Tabela 4.4: Compressão das escalas de níveis de cinza das regiões detectadas nas imagens da série 3.

cada região teve sua escala de cinzas comprimida de acordo com os valores da tabela 4.4.

Os níveis de cinza de cada região foram escolhidos com base na localização espacial de cada estrutura da série. A região 1 é mais interna e, como não pode bloquear a visualização de outras estruturas, foi a região transformada para os níveis de cinza mais próximos de 0, que são os níveis mais opacos. As regiões 2 e 3 podem bloquear a visualização de outras estruturas e, por isso, uma escala que possibilita uma opacidade menor foi atribuída a cada uma delas. A região 4, por ser a mais externa, deve ter as menores opacidades do volume, já que o entendimento da visualização tridimensional depende quase que completamente da transparência desse tecido.

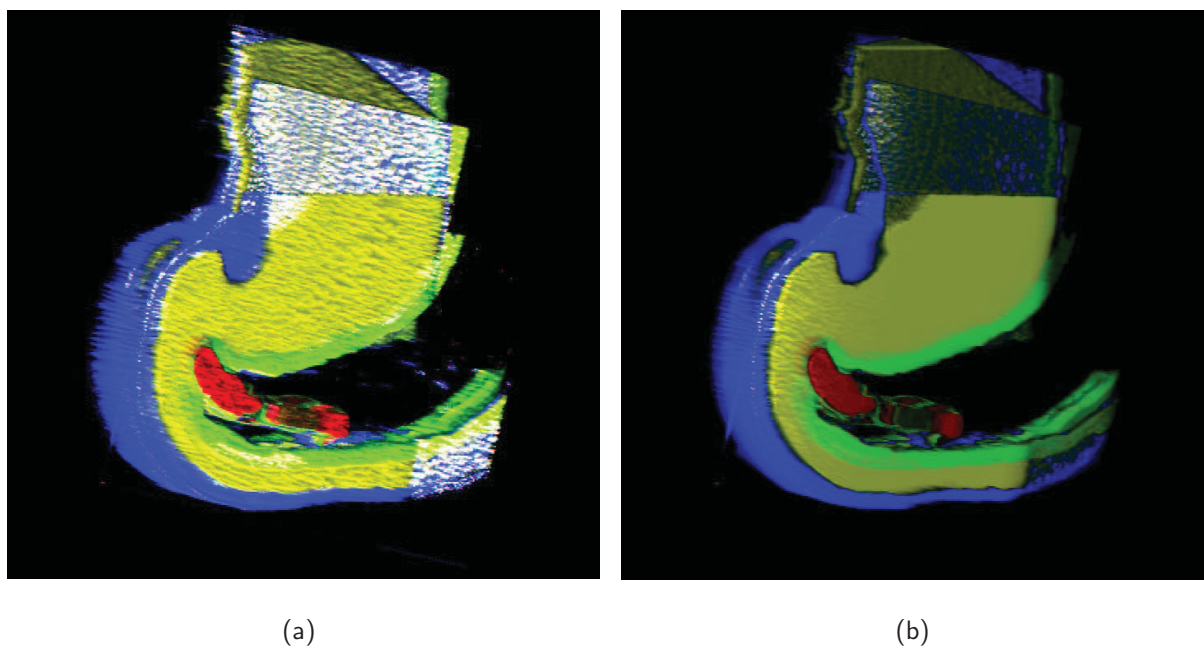
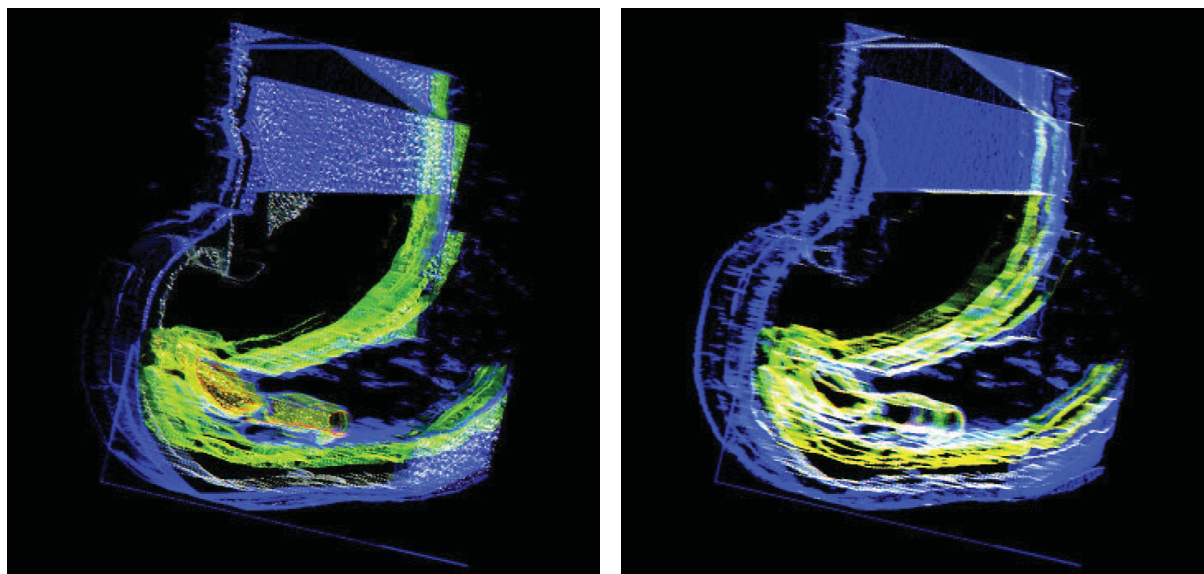


Figura 4.10: Visualização tridimensional da série 3. Os tecidos, do mais opaco ao mais transparente, foram coloridos na seguinte ordem: vermelho, verde, amarelo e azul.

A figura 4.10 apresenta duas imagens da série 3. Essas imagens foram geradas utilizando a classificação probabilística de Drebin. A imagem do item (b) possui atenuação da luz incidente em função da distância dos voxels ao observador. A estrutura tridimensional do embrião, na cor vermelha, é facilmente percebida nas duas imagens.



(a)

(b)

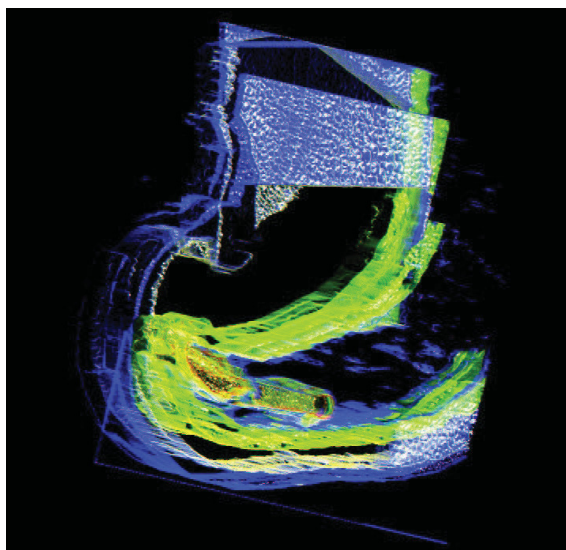
Figura 4.11: Visualização tridimensional da série 3.

As imagens apresentadas na figura 4.11, também da série 3, foram geradas com a técnica de visualização por membranas. Na geração da imagem do item (a) foi utilizada a classificação de Drebin. A imagem do item (b) foi criada com a classificação proposta na seção 3.5.2.6. O efeito da reflexão especular é drasticamente reduzido na imagem do item (b), se comparada a imagem do item (a). Embora pareça mais complexa e rica em detalhes, algumas fatias da imagem do item (a) encobrem informações que podem ser vistas na imagem do item (b). O aspecto borrado das imagens deve-se à composição dos voxels amostrados durante a geração das imagens e ao valor do limiar do gradiente, que evidencia a transição entre materiais.

A figura 4.12 mostra uma visualização da série 3 em que os detalhes das paredes celulares do tecido em azul são bastante evidentes na parte superior e no canto inferior direito da imagem. Essas estruturas são bastante visíveis porque apenas uma fatia contribuiu de forma significativa para a visualização desses detalhes. A contribuição de uma única fatia ocorre porque existe uma diferença de tonalidade entre as fatias capturadas com o microscópio. A estrutura do tecido mais externo é bem visível na parte inferior esquerda da imagem, com aspecto transparente.

#### 4.4 Discussão dos Resultados Obtidos

As imagens finais foram analisadas pelos especialistas responsáveis pelas séries apresentadas. Embora algumas imagens não transmitam o efeito tridimensional frequentemente encontrado na visualização de exames médicos, como Ressonância Magnética e Tomografia Computadori-



(a)

Figura 4.12: Visualização tridimensional da série 3.

zada, o resultado superou a expectativa de alguns pesquisadores. As estruturas microscópicas tridimensionais são bastante evidentes nas imagens das reconstruções. Além disso, a posição espacial dessas estruturas é bem definida e facilita bastante o entendimento da amostra de tecido antes dos cortes. Essas imagens podem ser de uso particularmente interessante no estudo microscópico preliminar de tecidos, apresentando as formas tridimensionais e algumas relações morfológicas entre as estruturas microscópicas.

Os resultados apresentados possuem uma diversidade de qualidades e artefatos visuais entre si. Isso ocorre porque a combinação dos parâmetros que regulam a visualização volumétrica é bastante grande. Se consideradas todas as possibilidades de um único parâmetro, a geração de um lote de testes pode durar dias para apenas uma seqüência de imagens. Determinar qual parâmetro afeta com qual eficácia uma determinada característica é um trabalho oneroso e complexo, já que o sistema de visualização volumétrica não é linear [16, 40].

A obtenção dessas imagens, embora empregue técnicas simples, é bastante trabalhosa. Além disso, a possibilidade de inclusão de erros por falta de parâmetros de consistência é enorme. As técnicas de registro empregadas demandam a presença do especialista, que precisa supervisionar todo o processo. Como a definição dos pontos característicos, utilizados para o alinhamento de duas imagens, é baseada no conhecimento prévio da estrutura tridimensional, a reconstrução não auxilia o entendimento da localização espacial dos tecidos, já que o registro deve ser realizado com base na experiência do operador.

Algumas propostas, objetivando a solução para esses problemas, são discutidas no próximo capítulo.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

O principal objetivo deste trabalho foi aplicar técnicas conhecidas de Computação Gráfica e Processamento de Imagens e aprimorar detalhes de implementação, viabilizando a visualização volumétrica de uma seqüência de imagens obtidas por meio de microscópios de luz. Um novo tipo de classificação foi proposto para a visualização volumétrica de imagens de microscopia, baseado na densidade óptica dos constituintes celulares.

Poucos trabalhos dedicaram-se a essa tarefa, o que torna a abordagem para a solução do problema ainda mais complexo. Isso ocorre porque inúmeras técnicas previamente conhecidas, mas nunca empregadas com a finalidade proposta neste trabalho, tiveram que ser avaliadas e testadas durante os experimentos. Além disso, o grande número de parâmetros nesses processos dificulta ainda mais a busca de técnicas que otimizem o resultado final da visualização.

Além da utilização prática dos métodos ajustados para a obtenção dos resultados aqui apresentados, este trabalho serve também como ponto de partida para o desenvolvimento de técnicas que facilitem o trabalho de reconstrução tridimensional dessa natureza de imagens. A descrição das técnicas e a apresentação dos resultados podem nortear trabalhos futuros que possam vir a criar novos procedimentos ou aprimorar os existentes para fornecer melhores resultados.

Embora o resultado tenha superado as expectativas dos especialistas da área de Biologia Celular e Botânica, a técnica pode ser bastante aprimorada. A próxima seção lista alguns trabalhos que podem ser desenvolvidos futuramente para aperfeiçoar a visualização volumétrica de imagens obtidas por meio de microscópios de luz.

#### 5.1 Trabalhos Futuros

Como observado por Drebin [16] e Lichtenbelt [40], a alteração dos parâmetros de visualização não é intuitiva e não há como prever o resultado final quando um parâmetro é alterado, mesmo sabendo como e por que é empregado. Essa dificuldade pode ser contornada com a otimização do aplicativo de visualização. As imagens geradas neste trabalho duram de 6 a 180 minutos para que possam ser calculadas, o que dificulta grandemente a busca extensiva dos parâmetros de visualização ótimos.

A otimização da visualização pode empregar técnicas de aprimoramento, como as descritas em [12, 27, 29, 38, 50, 58, 59]. O principal salto quantitativo, porém, é acelerar o processo implementando-se as técnicas do *pipeline* de visualização em *hardware*.

As placas gráficas aceleradoras, utilizadas atualmente em computadores pessoais, implementam funções de cálculo comuns à Computação Gráfica em *hardware*, reduzindo drasticamente a quantidade de computação realizada pelo processador. O programador pode incluir códigos de baixo nível, porém bastante elaborados em meio ao código do seu aplicativo, que é processado diretamente na placa gráfica aceleradora. Existem ainda dois tipos de códigos que podem ser implementados para execução na Unidade de Processamento Gráfico: códigos para cálculo com pontos tridimensionais e para cálculo com pixels da imagem. Não obstante, as placas aceleradoras possuem cada vez mais memória de alto desempenho embutida na própria placa gráfica. Como a utilização dessa memória se dá somente pelo processador da placa de vídeo, não existe problema se as fatias forem armazenadas como texturas. Esse processo é simplificado ainda mais porque as novas gerações de placas aceleradoras não limitam o tamanho das texturas ou obrigam que sejam de dimensões múltiplas de 2. Essa otimização pode facilitar a determinação dos parâmetros da visualização porque o resultado pode ser visualizado em um tempo muito menor do que se a execução do código for realizada completamente via *software*.

Imagens de microscopia possuem informações semânticas bastante relevantes e que podem ser utilizadas para o aprimoramento da visualização tridimensional. Os corantes utilizados para aumentar o contraste entre os constituintes celulares podem auxiliar enormemente o processo de segmentação. Além disso, as cores das imagens, se um dispositivo de captura de alta qualidade estiver disponível, podem fornecer as cores dos voxels quando o volume é reconstruído. Além de facilitar a determinação das funções de classificação dos materiais, as cores das imagens, que têm papel importante para o especialista em microscopia, podem fornecer pistas visuais que se assemelham às imagens coloridas bidimensionais.

Diferente dos exames médicos, as imagens provenientes de microscópios de luz podem conter inúmeros detalhes que podem vir a prejudicar a compreensão da visualização tridimensional. O emprego de diferentes coeficientes para as reflexões especular e difusa de cada material podem melhorar significativamente o resultado final da reconstrução.

Imagens coloridas podem ser manipuladas utilizando-se apenas um espectro de cor, ou seja, aquele que é melhor representado pelo corante empregado na preparação das lâminas. Uma lâmina corada com Hematoxilina e Eosina, por exemplo, por ter uma coloração rosa, pode ser melhor representada em tons de cinza utilizando-se apenas o espectro de cor vermelha. Dessa forma, existe a garantia de que a conversão da imagem colorida para níveis de cinza não perca as informações semânticas vinculadas à cor dos pixels.

O resultado da visualização pode ser aprimorado removendo-se as regiões onde existe apenas ar, ou ainda se um número pouco representativo para a rotulação seja atribuído aos pixels pertencentes a essas regiões. Para isso é necessário que essas regiões sejam detectadas, manual ou automaticamente.

Visando facilitar o alinhamento das fatias e produzir uma visualização mais próxima do objeto real, o processo de registro pode ser modificado para que seja completamente au-

tomatizado. Adicionalmente, o processo de segmentação, se automatizado, pode facilitar o alinhamento ou reduzir os artefatos visuais introduzidos pela segmentação manual. A automatização desses processos pode ser empregada utilizando-se ferramentas ou técnicas que atuem diretamente sobre a microtomia ou aquisição das imagens. A aquisição automática de fatias ópticas [48, 49] ou de várias imagens para o aumento do campo de visão podem auxiliar o registro e a segmentação das fatias da série.

O seccionamento óptico das fatias, quando a ampliação reduz drasticamente a profundidade de campo, pode ser útil para a segmentação de núcleos ou outras áreas de interesse da imagem. O seccionamento pode ser útil também no alinhamento de fatias subseqüentes ou para remoção de áreas fora de foco, devido à dobra do tecido durante o preparo da lâmina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ADOBE. Adobe photoshop 7.0. <http://www.adobe.com>.
- [2] APPLIED SPECTRAL IMAGING. Applied Spectral Imaging. <http://www.spectral-imaging.com/>.
- [3] BERNSEN, J. Dynamic thresholding of grey-level images. In *Proceedings of the 6th International Conference on Pattern Recognition (ICPR)* (Berlin, Alemanha, Outubro 1986), pp. 1251–1255.
- [4] BIENIECKI, W., GRABOWSKI, A., SEKULSKA, J., TURANT, M. E KALUZYNSKI, A. Automatic segmentation and recognition of patomorphological microscopic images. In *Proceedings of the CAD Systems in Microelectronics'2003* (Fevereiro 2003), pp. 461–464.
- [5] BLINN, J. F. Light reflection functions for simulation of clouds and dusty surfaces. In *Proceedings of Computer Graphics (SIGGRAPH '82)* (Julho 1982), vol. 16, pp. 21–29.
- [6] BOGDAN, M. E FITA, S. Elimination of the CCD Camera Noise in Microscopic Measurements of Machine Elements. *Measurement Science Review* 3 (2003), 33–36.
- [7] BORLAND SOFTWARE CORPORATION. Borland C++ 5.5.1. <http://www.borland.com>.
- [8] BORLAND SOFTWARE CORPORATION. Delphi Enterprise 7.0. <http://www.borland.com>.
- [9] BRODLIE, K. Scientific Visualization - past, present and future. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* 354, 1 (Janeiro 1995), 104–111.
- [10] BROWN, L. G. A survey of image registration techniques. *ACM Computing Surveys* 24, 4 (1992), 325–376.
- [11] CARLBOM, I., TERZOPOULOS, D. E HARRIS, K. M. Computer-Assisted Registration, Segmentation, and 3D Reconstruction from Images of Neuronal Tissue Sections. *IEEE Transactions on Medical Imaging* 13, 2 (Junho 1994), 351–362.
- [12] CARNEIRO, M. M. E GATTASS, M. Métodos e aceleração de rendering de volumes. Relatório técnico, PUC-RJ, Rio de Janeiro, 2000.

- [13] CHRISTIANSEN, H. N. E SEDERBERG, T. W. Conversion of complex contour line definitions into polygonal element mosaics. *Computer Graphics (SIGGRAPH '78 Proceedings)* 12 (1978), 187–192.
- [14] CORMACK, D. H. *Fundamentos de Histologia*. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, RJ, 1996.
- [15] DE GEUS, K. Visualização 3D em planejamento de radioterapia usando rendering de volumes por ray casting. In *Anais do Simpósio Brasileiro de Computação Gráfica e Processamento de Imagens (SIBGRAPI'93)* (Recife, Brasil, 1993), pp. 303–312.
- [16] DREBIN, R. A., CARPENTER, L. E HANRAHAN, P. Volume rendering. *Computer Graphics* 22, 4 (Agosto 1988), 65–74.
- [17] DREBIN, R. A., NEY, D. R., FISHMAN, E. K. E MAGID, D. Volumetric rendering of computed tomography data: Principles and techniques. *IEEE Computer Graphics and Applications* 10, 2 (Março 1990), 24–32.
- [18] DRURY, R. A. B. E WALLINGTON, E. A. *Carleton's Histological Technique*. Oxford University Press, Oxford, 1980.
- [19] FUCHS, H., KEDEM, Z. M. E USELTON, S. P. Optimal surface reconstruction for planar contours. *Communications of the ACM* 20, 10 (Outubro 1977), 693–702.
- [20] GALLAGHER, R. S. *Computer Visualization*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1995.
- [21] GANAPATHY, S. E DENNEHY, T. G. A new general triangulation method for planar contours. *Computer Graphics (SIGGRAPH '82 Proceedings)* 16 (1982), 69–75.
- [22] GARTNER, L. P. E HIATT, J. L. *Tratado de Histologia*. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, RJ, 1999.
- [23] GONZALEZ, R. C. E WOODS, R. E. *Processamento de Imagens Digitais*. Editora Edgard Blücher Ltda., São Paulo, SP, 2000.
- [24] GREVERA, G. J. E UDUPA, J. K. An Objective Comparison of 3-D Image Interpolation Methods. *IEEE Transactions on Medical Imaging* 17, 4 (Agosto 1998), 642–652.
- [25] HASEGAWA, J. K. E DE OLIVEIRA CAMARGO, P. Mapeamento com filmadora: uma análise da viabilidade. In *Anais do Congresso Brasileiro de Cadastro Técnico Multifinalitário (COBRAC98) - CD ROM* (Florianópolis, SC, 1998).
- [26] HOMEM, M. R. P. *Reconstrução tridimensional de imagens com o uso de deconvolução a partir de seções bidimensionais obtidas em microscopia óptica*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, SP, Brasil, 2003.

- [27] IHM, I. E LEE, R. K. Indexing data structures for faster volume rendering. *Computer & Graphics* 21, 4 (1997), 497–506.
- [28] INC., T. M. Matlab 6.5.0.180913a release 13. <http://www.matlab.com>.
- [29] JONES, M. W. Acceleration techniques for volume rendering. In *Visualization & Modeling* (Londres, Reino Unido, 1997), pp. 253–286.
- [30] JUNQUEIRA, L. C. E CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, RJ, 1999.
- [31] KAJIYA, J. T. E HERZEN, B. P. V. Ray tracing volume densities. In *Proceedings of Computer Graphics (SIGGRAPH '84)* (Julho 1984), vol. 18.
- [32] KAUFMAN, A., YAGEL, R., BAKALASH, R. E SPECTOR, I. Volume visualization in cell biology. In *VIS '90: Proceedings of the 1st conference on Visualization '90* (Los Alamitos, CA, USA, 1990), IEEE Computer Society Press, pp. 160–167.
- [33] KAUFMAN, A. E. Volume visualization. *ACM Computing Surveys (CSUR)* 28, 1 (Março 1996), 165–167.
- [34] KEPPEL, E. Approximation of Complex Surfaces from Volume Data. *IBM Journal of Research and Development* 19 (Janeiro 1975), 2–11.
- [35] LEAL, L. H. M. *Fundamentos de Microscopia*. Editora da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2000.
- [36] LEVOY, M. Display of surfaces from volume data. *IEEE Computer Graphics and Application* 8, 3 (Maio 1988), 29–37.
- [37] LEVOY, M. A Taxonomy of Volume Visualization Algorithms. In *ACM SIGGRAPH (1990), Course Notes* (1990), pp. 6–12.
- [38] LEVOY, M. Efficient ray tracing of volume data. *ACM Transactions on Graphics* 9, 3 (Julho 1990), 245–261.
- [39] LEZORAY, O. E CARDOT, H. Cooperation of color pixel classification schemes and color watershed: a study for microscopic images. *IEEE Transactions on Image Processing* 11, 7 (Julho 2002), 783–789.
- [40] LICHTENBELT, B., CRANE, R. E NAVQI, S. *Introduction to Volume Rendering*. Prentice-Hall, New Jersey, 1998.
- [41] LIU, F., SONG, X., LUO, Y. E HU, D. Adaptive thresholding based on variational background. *Electronics Letters* 38, 18 (Agosto 2002), 1017–1018.

- [42] LOUKAS, C. G. E LINNEY, A. On a relaxation-labelling algorithm for quantitative assessment of tumour vasculature in tissue sections images. *Computer in Biology and Medicine* 35 (2005), 157–171.
- [43] MAZZIOTTA, J. C. E HUANG, K. H. Thread (three-dimensional reconstruction and display) with biomedical applications in neuron ultrastructure and display. *American Federation of Information Processing Society* 45 (1976), 241–250.
- [44] MEDIA CYBERNETICS. Image Pro Express. <http://www.mediacy.com/ipe.htm>.
- [45] MUKHERJEE, D. P., RAY, N. E ACTON, S. T. Level set analysis for leukocytes detection and tracking. *IEEE Transactions on Image Processing* 13, 4 (Abril 2004), 562–572.
- [46] NATIONAL ELECTRICAL MANUFACTURERS ASSOCIATION. Digital Imaging and Communications in Medicine. <http://medical.nema.org>.
- [47] NIBLACK, W. *An Introduction to Digital Image Processing*. Prentice Hall, 1986.
- [48] NIEDERÖST, M., NIEDERÖST, J. E SCUCKA, J. Automatic 3D reconstruction and visualization of microscopic objects from a monoscopic multifocus image sequence. In *International Archives of Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences* (2003), vol. 34, pp. 1682–1777.
- [49] NIEDERÖST, M., NIEDERÖST, J. E SCUCKA, J. Fully automated 3D reconstruction and visualization of microscopic objects. In *Proceedings of 6th International Conference on Optical 3-D Measurement Techniques* (Zurich, Switzerland, 2003), pp. 236–243.
- [50] OLIVEIRA JUNIOR, P. P. M. Exames virtuais utilizando um algoritmo de ray casting acelerado. Dissertação de Mestrado , Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2002.
- [51] OLYMPUS. BX52. [http://www.olympusamerica.com/seg\\_section/seg\\_product.asp?p=3&sc=2&product=665](http://www.olympusamerica.com/seg_section/seg_product.asp?p=3&sc=2&product=665).
- [52] OTSU, N. A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Transactions on Systems Man Cybernetics* 9, 1 (1979), 62–66.
- [53] PHONG, B. T. Illumination for Computer Generated Pictures. *Communications of the ACM* 18, 6 (Junho 1975), 311–317.
- [54] RÚBIO, C. A. Estilização e visualização tridimensional de tumores intracranianos em exames de tomografia computadorizada. Dissertação de Mestrado , Univesidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brasil, 2002.

- [55] ROSENBLUN, L. *Scientific Visualization: Advances and Challenges*. Academic Press, London, 1994.
- [56] SANCHEZ-MARIN, F. J. Automatic segmentation of contour of corneal cells. *Computer in Biology and Medicine* 29 (1999), 243–258.
- [57] SCHROEDER, W., MARTIN, K. E LORENSEN, B. *The Visualization Toolkit: An Object-oriented approach to 3D graphics*. Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, New Jersey, 1996.
- [58] SEIXAS, R. B. Otimização de algoritmos de ray casting para visualização de tomografias. In *Simpósio Brasileiro de Computação Gráfica e Processamento de Imagens* (1994).
- [59] SEIXAS, R. B. Visualização volumétrica com otimizações de ray casting e detecção de bordas. In *Simpósio Brasileiro de Computação Gráfica e Processamento de Imagens* (1995), vol. 8, pp. 281–286.
- [60] SGI INC. OpenGL Specifications & Manual Pages. <http://www.opengl.org/developers/documentation/specs.html>.
- [61] STROUSTRUP, B. *The C++ Programming Language*. Addison-Wesley, Boston, MA, 2000.
- [62] SUNGURUFF, A. E GREENBERG, D. Computer generated images for medical applications. *Computer Graphics (SIGGRAPH '78 Proceedings)* 12 (1978), 196–202.
- [63] SWEENEY, N. E SWEENEY, B. V. Efficient segmentation of cellular images using gradient-based methods and simple morphological filters. In *Proceedings of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBS)* (Novembro 1997), pp. 880–882.
- [64] VANNIER, M. W., MARSH, J. L. E WARREN, J. O. Three dimensional computer graphics for craniofacial surgical planning and evaluation. *Computer Graphics (SIGGRAPH '83 Proceedings)* 17, 3 (Julho 1983), 263–273.
- [65] WANG, Y., ZHANG, Z. E GUO, B. 3D image interpolation based on directional coherence. *IEEE Workshop on Mathematical Methods in Biomedical Image Analysis* (2001), 195–202.
- [66] WU, H.-S., GIL, J. E BARBA, J. Optimal segmentation of cell images. In *Proceedings of the Visual Image and Signal Processing* (Fevereiro 1998), vol. 145, pp. 50–56.
- [67] ZHENG, H., CHAN, F. H. Y., .LAM, F. K. E LAM, K. Y. Segmentation of Pathology Microscopic Images. In *Proceedings of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBS)* (Novembro 1997), pp. 580–581.

- [68] ZITOVÁ, B. E FLUSSER, J. Image registration methods: a survey. *Image and Vision Computing* 21 (2003), 977–1000.

## APÊNDICE A

### FORMATO DAS IMAGENS

Este apêndice descreve os formatos das imagens de entrada e saída do aplicativo de visualização volumétrica, alterados para a utilização neste trabalho.

Dois tipos de imagem são utilizados pelo aplicativo de visualização, um tipo de imagem é utilizado para a leitura das fatias e outro para a gravação da imagem de saída.

Assim como em um exame médico, as informações de interesse para a visualização são as densidades de cada pixel. Por esse motivo, imagens em tons de cinza são utilizadas como formato de entrada para o aplicativo. No entanto, o resultado da visualização volumétrica é uma imagem colorida e, por isso, o formato de saída do aplicativo é uma imagem colorida.

As próximas seções descrevem os formatos das imagens de entrada e saída utilizadas pelo programa.

#### Imagem de Entrada

O formato das imagens de entrada é o *Portable Graymap* (PGM) no formato ASCII. Este formato permite que as imagens sejam gravadas com caracteres legíveis em um arquivo texto, em numeração decimal. O formato PGM consiste em:

- Um cabeçalho com as informações de formato, dimensões da imagem, número máximo de níveis de cinza por pixel;
- Os tons de cinza para cada pixel.

O cabeçalho do formato PGM é formado por:

- A letra P seguida do número 2 seguido por um espaço em branco. Este número identifica o formato PGM ASCII;
- A largura da imagem, um espaço em branco e a altura da imagem em pixels seguidos por um espaço em branco;
- O número máximo de tons de cinza por pixel e um espaço em branco;
- Os valores dos pixels, da esquerda pra direita e de cima pra baixo. Cada pixel é representado por um número decimal no padrão ASCII e deve existir no mínimo um espaço em branco antes e depois do valor do nível de cinza, mas não há limite máximo de espaços.

Os espaços em branco podem ser espaços, caracteres de tabulação, retorno de carro (CR) ou quebra de linha (LF). Qualquer linha entre o formato do arquivo (P2) e as dimensões da imagem que tenham # como primeiro caracter devem ser consideradas comentários e ignoradas.

Uma imagem exemplo com dimensões de  $24 \times 7$  e nível máximo de tons de cinza por pixel igual a 15 é mostrada na figura A.1. A imagem ampliada do arquivo é mostrada na figura A.2. Essa imagem possui, ao lado do valor de níveis de cinza da imagem, o valor que representa a espessura da fatia no eixo  $z$ , que nessa figura é 15 vezes maior do que as dimensões de um pixel.

```
P2
# Comentário
24 7
12 15
0 0 1 1 2 2 3 3 4 4 5 5 6 6 7 7 8 8 9 9 10 10 11 11
0 0 1 1 2 2 3 3 4 4 5 5 6 6 7 7 8 8 9 9 10 10 11 11
0 0 1 1 2 2 3 3 4 4 5 5 6 6 7 7 8 8 9 9 10 10 11 11
0 0 1 1 2 2 3 3 4 4 5 5 6 6 7 7 8 8 9 9 10 10 11 11
0 0 1 1 2 2 3 3 4 4 5 5 6 6 7 7 8 8 9 9 10 10 11 11
0 0 1 1 2 2 3 3 4 4 5 5 6 6 7 7 8 8 9 9 10 10 11 11
0 0 1 1 2 2 3 3 4 4 5 5 6 6 7 7 8 8 9 9 10 10 11 11
```

Figura A.1: Arquivo PGM.



Figura A.2: Imagem gerada pelo arquivo da figura A.1.

## Imagem de Saída

A imagem de saída do aplicativo é o resultado da visualização volumétrica e, por isso, é colorida. Internamente, o programa de visualização gera as imagens com 8 bits por componente de cor (vermelha, verde e azul), totalizando 25 bits por pixel. As dimensões da imagem variam de acordo com a projeção do volume e, portanto, são desconhecidas até o início da execução do programa.

O formato da imagem de saída é o *Portable Pixmap* (PPM) ASCII. Embora pouco eficiente e permita que poucas informações sejam adicionadas à imagem, o formato é bastante simples

para escrever e analisar programas que utilizam esse formato.

Igualmente ao formato PGM, o formato PPM é composto de um cabeçalho e das informações de cores de cada pixel. Cada informação é escrita em números decimais no código ASCII. Como a imagem é colorida, existe um valor decimal para cada componente de cor e para cada pixel. Assim, o número de valores para os pixels é igual a  $altura \times largura \times 3$ . Cada pixel consiste em três valores seguidos, um para o vermelho, outro para o verde e o último para o azul, nesta ordem.

A figura A.3 mostra o código da imagem da figura A.4, que possui dimensões de  $4 \times 4$  e 15 intensidades para cada componente de cor.

```
P3
# Comentário
4 4
15
15 0 0 0 15 0 0 0 15 15 15 0
15 0 0 0 15 0 0 0 15 0 15 15
15 0 0 0 15 0 0 0 15 15 0 15
15 0 0 0 15 0 0 0 15 0 0 0
```

Figura A.3: Arquivo PPM.



Figura A.4: Imagem gerada pelo arquivo da figura A.3.

## APÊNDICE B

### PARÂMETROS DE VISUALIZAÇÃO

#### Parâmetros de visualização da figura 4.2(a)

```

Start
ROTATION
  x = 15.0 degrees; 0.262 radians
  y = 15.0 degrees; 0.262 radians
  z =  0.0 degrees; 0.000 radians
ILLUMINATION
  Light Vector: x =  0.577; y =  0.577; z =  0.577
  View Vector: x =  0.000; y =  0.000; z =  1.000
  Ambient Intensity (Ia): 1.000
  Ambient Coefficient (Ka): 0.500
  Incident Intensity (Ii): 2.000
  Specular Coefficient (Ks): 0.3
  Specular Exponent (n):  8.0
MATERIALS
  1
    Range:  0.0 -  20.0
    Density: 1.000
    Color (RGBA): 0.1000; 0.0000; 0.0000; 0.1000
  2
    Range:  21.0 - 255.0
    Density: 0.000
    Color (RGBA): 0.0000; 0.0000; 0.0000; 0.0000
THRESHOLD (Gradient Magnitude)
  Value: 0.2000
EARLY RAY TERMINATION
  Percent: 0.98
VOLUME
  Dimensions: x = 940; y = 690; z =  44
  Spacing: x =  1.000; y =  1.000; z = 15.000
  Scale: x =  1.000; y =  1.000; z = 15.000
SCALE MATRIX
  (0,0)  1.000  (0,1)  0.000  (0,2)  0.000  (0,3)  0.000
  (1,0)  0.000  (1,1)  1.000  (1,2)  0.000  (1,3)  0.000
  (2,0)  0.000  (2,1)  0.000  (2,2) 15.000  (2,3)  0.000
  (3,0)  0.000  (3,1)  0.000  (3,2)  0.000  (3,3)  1.000
ROTATION MATRIX
  (0,0)  0.966  (0,1)  0.067  (0,2) -0.250  (0,3)  0.000
  (1,0)  0.000  (1,1)  0.966  (1,2)  0.259  (1,3)  0.000
  (2,0)  0.259  (2,1) -0.250  (2,2)  0.933  (2,3)  0.000
  (3,0)  0.000  (3,1)  0.000  (3,2)  0.000  (3,3)  1.000
BOX VOLUME
  Minimum: x =  0.000; y =  0.000; z =  0.000
  Maximum: x = 939.000; y = 689.000; z =  43.000
BOUNDING BOX
  Minimum: x = -161.250; y =  0.000; z = -172.250
  Maximum: x = 953.159; y = 832.461; z = 844.824
DISPLACEMENT

```

```

dudx = 0.966; dvdx = 0.067; dwdx = -0.017
dudy = 0.000; dvdy = 0.966; dwdy = 0.017
dudz = -0.259; dvdz = 0.250; dwdz = -0.062
VIEW PLANE
Color (RGBA): 0.00; 0.00; 0.00; 1.00
Rows = 834; columns = 1116
Number of Rays: 928795
Total Time: 4972 seconds
Finish

```

## Parâmetros de visualização da figura 4.2(b)

```

Start
ROTATION
x = 0.0 degrees; 0.000 radians
y = -45.0 degrees; -0.785 radians
z = 13.0 degrees; 0.227 radians
ILLUMINATION
Light Vector: x = 0.577; y = 0.577; z = 0.577
View Vector: x = 0.000; y = 0.000; z = 1.000
Ambient Intensity (Ia): 2.000
Ambient Coefficient (Ka): 0.500
Incident Intensity (Ii): 1.600
Specular Coefficient (Ks): 0.5
Specular Exponent (n): 8.0
MATERIALS
1
Range: 0.0 - 2.0
Density: 1.000
Color (RGBA): 0.1000; 0.1000; 0.0000; 0.1000
2
Range: 2.0 - 200.0
Density: 0.500
Color (RGBA): 0.0000; 0.0000; 0.0300; 0.0300
THRESHOLD (Gradient Magnitude)
Value: 0.5000
EARLY RAY TERMINATION
Percent: 0.98
VOLUME
Dimensions: x = 940; y = 690; z = 44
Spacing: x = 1.000; y = 1.000; z = 15.000
Scale: x = 1.000; y = 1.000; z = 15.000
SCALE MATRIX
(0,0) 1.000 (0,1) 0.000 (0,2) 0.000 (0,3) 0.000
(1,0) 0.000 (1,1) 1.000 (1,2) 0.000 (1,3) 0.000
(2,0) 0.000 (2,1) 0.000 (2,2) 15.000 (2,3) 0.000
(3,0) 0.000 (3,1) 0.000 (3,2) 0.000 (3,3) 1.000
ROTATION MATRIX
(0,0) 0.689 (0,1) 0.225 (0,2) 0.689 (0,3) 0.000
(1,0) -0.159 (1,1) 0.974 (1,2) -0.159 (1,3) 0.000
(2,0) -0.707 (2,1) 0.000 (2,2) 0.707 (2,3) 0.000
(3,0) 0.000 (3,1) 0.000 (3,2) 0.000 (3,3) 1.000
BOX VOLUME
Minimum: x = 0.000; y = 0.000; z = 0.000
Maximum: x = 939.000; y = 689.000; z = 43.000
BOUNDING BOX
Minimum: x = 0.000; y = -251.958; z = -663.973

```

Maximum: x = 1246.341; y = 671.341; z = 456.084  
DISPLACEMENT  
dudx = 0.689; dvdx = 0.225; dwdx = 0.046  
dudy = -0.159; dvdy = 0.974; dwdy = -0.011  
dudz = 0.707; dvdz = 0.000; dwdz = -0.047  
VIEW PLANE  
Color (RGBA): 0.00; 0.00; 0.00; 1.00  
Rows = 925; columns = 1248  
Number of Rays: 1152228  
Total Time: 6397 seconds  
Finish

## Parâmetros de visualização da figura 4.3(a)

Start  
ROTATION  
x = 0.0 degrees; 0.000 radians  
y = -45.0 degrees; -0.785 radians  
z = 0.0 degrees; 0.000 radians  
ILLUMINATION  
Light Vector: x = 0.577; y = 0.577; z = 0.577  
View Vector: x = 0.000; y = 0.000; z = 1.000  
Ambient Intensity (Ia): 2.000  
Ambient Coefficient (Ka): 0.800  
Incident Intensity (Ii): 2.000  
Specular Coefficient (Ks): 0.7  
Specular Exponent (n): 8.0  
MATERIALS  
1  
Range: 0.0 - 20.0  
Density: 1.000  
Color (RGBA): 0.1000; 0.0000; 0.0000; 0.1000  
2  
Range: 21.0 - 120.0  
Density: 0.700  
Color (RGBA): 0.0000; 0.0300; 0.0000; 0.0300  
3  
Range: 121.0 - 200.0  
Density: 0.700  
Color (RGBA): 0.0100; 0.0100; 0.0000; 0.0100  
THRESHOLD (Gradient Magnitude)  
Value: 0.2000  
EARLY RAY TERMINATION  
Percent: 0.98  
VOLUME  
Dimensions: x = 940; y = 690; z = 44  
Spacing: x = 1.000; y = 1.000; z = 15.000  
Scale: x = 1.000; y = 1.000; z = 15.000  
SCALE MATRIX  
(0,0) 1.000 (0,1) 0.000 (0,2) 0.000 (0,3) 0.000  
(1,0) 0.000 (1,1) 1.000 (1,2) 0.000 (1,3) 0.000  
(2,0) 0.000 (2,1) 0.000 (2,2) 15.000 (2,3) 0.000  
(3,0) 0.000 (3,1) 0.000 (3,2) 0.000 (3,3) 1.000  
ROTATION MATRIX  
(0,0) 0.707 (0,1) 0.000 (0,2) 0.707 (0,3) 0.000  
(1,0) 0.000 (1,1) 1.000 (1,2) 0.000 (1,3) 0.000  
(2,0) -0.707 (2,1) 0.000 (2,2) 0.707 (2,3) 0.000

```

(3,0)  0.000  (3,1)  0.000  (3,2)  0.000  (3,3)  1.000
BOX VOLUME
  Minimum: x =  0.000; y =  0.000; z =  0.000
  Maximum: x = 939.000; y = 689.000; z = 43.000
BOUNDED BOX
  Minimum: x =  0.000; y =  0.000; z = -663.973
  Maximum: x = 1120.057; y = 689.000; z = 456.084
DISPLACEMENT
  dudx =  0.707; dvdx =  0.000; dwdx =  0.047
  dudy =  0.000; dvdy =  1.000; dwdy =  0.000
  dudz =  0.707; dvdz =  0.000; dwdz = -0.047
VIEW PLANE
  Color (RGBA): 0.00; 0.00; 0.00; 1.00
  Rows = 690; columns = 1122
Number of Rays: 773490
Total Time: 6379 seconds
Finish

```

## Parâmetros de visualização da figura 4.3(b)

```

Start
ROTATION
  x =  0.0 degrees; 0.000 radians
  y = -45.0 degrees; -0.785 radians
  z =  0.0 degrees; 0.000 radians
ILLUMINATION
  Light Vector: x =  0.577; y =  0.577; z =  0.577
  View Vector: x =  0.000; y =  0.000; z =  1.000
  Ambient Intensity (Ia): 2.000
  Ambient Coefficient (Ka): 0.800
  Incident Intensity (Ii): 2.000
  Specular Coefficient (Ks): 0.7
  Specular Exponent (n):  8.0
MATERIALS
  1
    Range:  0.0 -  20.0
    Density: 1.000
    Color (RGBA): 0.1000; 0.0000; 0.0000; 0.1000
  2
    Range:  21.0 - 120.0
    Density: 0.700
    Color (RGBA): 0.0000; 0.0300; 0.0000; 0.0300
  3
    Range: 121.0 - 200.0
    Density: 0.700
    Color (RGBA): 0.0100; 0.0100; 0.0000; 0.0100
THRESHOLD (Gradient Magnitude)
  Value: 0.2000
EARLY RAY TERMINATION
  Percent: 0.98
VOLUME
  Dimensions: x = 940; y = 690; z = 44
  Spacing: x =  1.000; y =  1.000; z = 15.000
  Scale: x =  1.000; y =  1.000; z = 15.000
SCALE MATRIX
(0,0)  1.000  (0,1)  0.000  (0,2)  0.000  (0,3)  0.000
(1,0)  0.000  (1,1)  1.000  (1,2)  0.000  (1,3)  0.000

```

```

(2,0)  0.000  (2,1)  0.000  (2,2) 15.000  (2,3)  0.000
(3,0)  0.000  (3,1)  0.000  (3,2)  0.000  (3,3)  1.000
ROTATION MATRIX
(0,0)  0.707  (0,1)  0.000  (0,2)  0.707  (0,3)  0.000
(1,0)  0.000  (1,1)  1.000  (1,2)  0.000  (1,3)  0.000
(2,0) -0.707  (2,1)  0.000  (2,2)  0.707  (2,3)  0.000
(3,0)  0.000  (3,1)  0.000  (3,2)  0.000  (3,3)  1.000
BOX VOLUME
Minimum: x =  0.000; y =  0.000; z =  0.000
Maximum: x = 939.000; y = 689.000; z = 43.000
BOUNDING BOX
Minimum: x =  0.000; y =  0.000; z = -663.973
Maximum: x = 1120.057; y = 689.000; z = 456.084
DISPLACEMENT
dudx =  0.707; dvdx =  0.000; dwdx =  0.047
dudy =  0.000; dvdy =  1.000; dwdy =  0.000
dudz =  0.707; dvdz =  0.000; dwdz = -0.047
VIEW PLANE
Color (RGBA): 0.00; 0.00; 0.00; 1.00
Rows = 690; columns = 1122
Number of Rays: 773490
Total Time: 6405 seconds
Finish

```

## Parâmetros de visualização da figura 4.4

```

Start
ROTATION
x =  0.0 degrees; 0.000 radians
y = 120.0 degrees; 2.094 radians
z =  90.0 degrees; 1.571 radians
ILLUMINATION
Light Vector: x =  0.577; y =  0.577; z =  0.577
View Vector: x =  0.000; y =  0.000; z =  1.000
Ambient Intensity (Ia): 1.000
Ambient Coefficient (Ka): 0.500
Incident Intensity (Ii): 2.000
Specular Coefficient (Ks): 0.3
Specular Exponent (n):  8.0
MATERIALS
1
  Range:  21.0 - 255.0
  Density: 0.000
  Color (RGBA): 0.0000; 0.0000; 0.0000; 0.0000
2
  Range:   0.0 - 20.0
  Density: 1.000
  Color (RGBA): 0.2500; 0.0000; 0.0000; 0.2500
THRESHOLD (Gradient Magnitude)
Value: 0.5000
EARLY RAY TERMINATION
Percent: 0.98
VOLUME
Dimensions: x = 940; y = 690; z = 44
Spacing: x =  1.000; y =  1.000; z = 15.000
Scale: x =  1.000; y =  1.000; z = 15.000
SCALE MATRIX

```

```

(0,0)  1.000  (0,1)  0.000  (0,2)  0.000  (0,3)  0.000
(1,0)  0.000  (1,1)  1.000  (1,2)  0.000  (1,3)  0.000
(2,0)  0.000  (2,1)  0.000  (2,2)  15.000  (2,3)  0.000
(3,0)  0.000  (3,1)  0.000  (3,2)  0.000  (3,3)  1.000
ROTATION MATRIX
(0,0)  0.000  (0,1)  1.000  (0,2)  0.000  (0,3)  0.000
(1,0)  0.500  (1,1) -0.000  (1,2)  0.866  (1,3)  0.000
(2,0)  0.866  (2,1)  0.000  (2,2) -0.500  (2,3)  0.000
(3,0)  0.000  (3,1)  0.000  (3,2)  0.000  (3,3)  1.000
BOX VOLUME
Minimum: x =  0.000; y =  0.000; z =  0.000
Maximum: x = 939.000; y = 689.000; z = 43.000
BOUNDING BOX
Minimum: x =  0.000; y = -0.000; z = -322.500
Maximum: x = 689.000; y = 1028.086; z = 813.198
DISPLACEMENT
dudx =  0.000; dvdx =  1.000; dwdx =  0.000
dudy =  0.500; dvdy = -0.000; dwdy =  0.058
dudz = -0.866; dvdz =  0.000; dwdz =  0.033
VIEW PLANE
Color (RGBA): 0.00; 0.00; 0.00; 1.00
Rows = 1030; columns = 690
Number of Rays: 710010
Total Time: 6647 seconds
Finish

```

## Parâmetros de visualização da figura 4.6(a)

```

Start
ROTATION
x = 15.0 degrees; 0.262 radians
y = 15.0 degrees; 0.262 radians
z =  0.0 degrees; 0.000 radians
ILLUMINATION
Light Vector: x =  0.577; y =  0.577; z =  0.577
View Vector: x =  0.000; y =  0.000; z =  1.000
Ambient Intensity (Ia): 1.000
Ambient Coefficient (Ka): 0.500
Incident Intensity (Ii): 2.000
Specular Coefficient (Ks): 0.3
Specular Exponent (n):  8.0
MATERIALS
1
  Range:  0.0 -  20.0
  Density: 1.000
  Color (RGBA): 0.1000; 0.0000; 0.0000; 0.1000
2
  Range:  25.0 - 200.0
  Density: 0.500
  Color (RGBA): 0.0000; 0.0600; 0.0000; 0.0600
THRESHOLD (Gradient Magnitude)
Value: 0.5000
EARLY RAY TERMINATION
Percent: 0.98
VOLUME
Dimensions: x = 800; y = 600; z = 11
Spacing: x =  1.000; y =  1.000; z =  8.000

```

Scale: x = 1.000; y = 1.000; z = 8.000

SCALE MATRIX

(0,0)	1.000	(0,1)	0.000	(0,2)	0.000	(0,3)	0.000
(1,0)	0.000	(1,1)	1.000	(1,2)	0.000	(1,3)	0.000
(2,0)	0.000	(2,1)	0.000	(2,2)	8.000	(2,3)	0.000
(3,0)	0.000	(3,1)	0.000	(3,2)	0.000	(3,3)	1.000

ROTATION MATRIX

(0,0)	0.966	(0,1)	0.067	(0,2)	-0.250	(0,3)	0.000
(1,0)	0.000	(1,1)	0.966	(1,2)	0.259	(1,3)	0.000
(2,0)	0.259	(2,1)	-0.250	(2,2)	0.933	(2,3)	0.000
(3,0)	0.000	(3,1)	0.000	(3,2)	0.000	(3,3)	1.000

BOX VOLUME

Minimum: x = 0.000; y = 0.000; z = 0.000

Maximum: x = 799.000; y = 599.000; z = 10.000

BOUNDING BOX

Minimum: x = -20.000; y = 0.000; z = -149.750

Maximum: x = 811.900; y = 599.295; z = 281.437

DISPLACEMENT

dudx = 0.966; dvdx = 0.067; dwdx = -0.031

dudy = 0.000; dvdy = 0.966; dwdy = 0.032

dudz = -0.259; dvdz = 0.250; dwdz = -0.117

VIEW PLANE

Color (RGBA): 0.00; 0.00; 0.00; 1.00

Rows = 601; columns = 833

Number of Rays: 499200

Total Time: 619 seconds

Finish

## Parâmetros de visualização da figura 4.6(b)

Start

ROTATION

x = 15.0 degrees; 0.262 radians

y = 15.0 degrees; 0.262 radians

z = 0.0 degrees; 0.000 radians

ILLUMINATION

Light Vector: x = 0.577; y = 0.577; z = 0.577

View Vector: x = 0.000; y = 0.000; z = 1.000

Ambient Intensity (Ia): 1.000

Ambient Coefficient (Ka): 0.500

Incident Intensity (Ii): 2.000

Specular Coefficient (Ks): 0.3

Specular Exponent (n): 8.0

MATERIALS

1

Range: 0.0 - 20.0

Density: 1.000

Color (RGBA): 0.1000; 0.0000; 0.0000; 0.1000

2

Range: 25.0 - 200.0

Density: 0.500

Color (RGBA): 0.0000; 0.0600; 0.0000; 0.0600

THRESHOLD (Gradient Magnitude)

Value: 0.5000

EARLY RAY TERMINATION

Percent: 0.98

VOLUME

```

Dimensions: x = 800; y = 600; z = 11
Spacing: x = 1.000; y = 1.000; z = 8.000
Scale: x = 1.000; y = 1.000; z = 8.000
SCALE MATRIX
(0,0) 1.000 (0,1) 0.000 (0,2) 0.000 (0,3) 0.000
(1,0) 0.000 (1,1) 1.000 (1,2) 0.000 (1,3) 0.000
(2,0) 0.000 (2,1) 0.000 (2,2) 8.000 (2,3) 0.000
(3,0) 0.000 (3,1) 0.000 (3,2) 0.000 (3,3) 1.000
ROTATION MATRIX
(0,0) 0.966 (0,1) 0.067 (0,2) -0.250 (0,3) 0.000
(1,0) 0.000 (1,1) 0.966 (1,2) 0.259 (1,3) 0.000
(2,0) 0.259 (2,1) -0.250 (2,2) 0.933 (2,3) 0.000
(3,0) 0.000 (3,1) 0.000 (3,2) 0.000 (3,3) 1.000
BOX VOLUME
Minimum: x = 0.000; y = 0.000; z = 0.000
Maximum: x = 799.000; y = 599.000; z = 10.000
BOUNDING BOX
Minimum: x = -20.000; y = 0.000; z = -149.750
Maximum: x = 811.900; y = 599.295; z = 281.437
DISPLACEMENT
dudx = 0.966; dvdx = 0.067; dwdx = -0.031
dudy = 0.000; dvdy = 0.966; dwdy = 0.032
dudz = -0.259; dvdz = 0.250; dwdz = -0.117
VIEW PLANE
Color (RGBA): 0.00; 0.00; 0.00; 1.00
Rows = 601; columns = 833
Number of Rays: 499200
Total Time: 625 seconds
Finish

```

## Parâmetros de visualização da figura 4.7(a)

```

Start
ROTATION
x = 0.0 degrees; 0.000 radians
y = -45.0 degrees; -0.785 radians
z = 13.0 degrees; 0.227 radians
ILLUMINATION
Light Vector: x = 0.577; y = 0.577; z = 0.577
View Vector: x = 0.000; y = 0.000; z = 1.000
Ambient Intensity (Ia): 2.000
Ambient Coefficient (Ka): 0.500
Incident Intensity (Ii): 1.600
Specular Coefficient (Ks): 0.5
Specular Exponent (n): 8.0
MATERIALS
1
Range: 0.0 - 50.0
Density: 1.000
Color (RGBA): 0.1000; 0.1000; 0.0000; 0.1000
2
Range: 51.0 - 200.0
Density: 0.500
Color (RGBA): 0.0000; 0.0000; 0.0300; 0.0300
THRESHOLD (Gradient Magnitude)
Value: 0.0000
EARLY RAY TERMINATION

```

```

Percent: 0.98
VOLUME
Dimensions: x = 800; y = 600; z = 11
Spacing: x = 1.000; y = 1.000; z = 8.000
Scale: x = 1.000; y = 1.000; z = 8.000
SCALE MATRIX
(0,0) 1.000 (0,1) 0.000 (0,2) 0.000 (0,3) 0.000
(1,0) 0.000 (1,1) 1.000 (1,2) 0.000 (1,3) 0.000
(2,0) 0.000 (2,1) 0.000 (2,2) 8.000 (2,3) 0.000
(3,0) 0.000 (3,1) 0.000 (3,2) 0.000 (3,3) 1.000
ROTATION MATRIX
(0,0) 0.689 (0,1) 0.225 (0,2) 0.689 (0,3) 0.000
(1,0) -0.159 (1,1) 0.974 (1,2) -0.159 (1,3) 0.000
(2,0) -0.707 (2,1) 0.000 (2,2) 0.707 (2,3) 0.000
(3,0) 0.000 (3,1) 0.000 (3,2) 0.000 (3,3) 1.000
BOX VOLUME
Minimum: x = 0.000; y = 0.000; z = 0.000
Maximum: x = 799.000; y = 599.000; z = 10.000
BOUNDING BOX
Minimum: x = 0.000; y = -139.818; z = -564.978
Maximum: x = 740.362; y = 583.648; z = 56.569
DISPLACEMENT
dudx = 0.689; dvdx = 0.225; dwdx = 0.086
dudy = -0.159; dvdy = 0.974; dwdy = -0.020
dudz = 0.707; dvdz = 0.000; dwdz = -0.088
VIEW PLANE
Color (RGBA): 0.00; 0.00; 0.00; 1.00
Rows = 725; columns = 742
Number of Rays: 536484
Total Time: 5248 seconds
Finish

```

## Parâmetros de visualização da figura 4.7(b)

```

Start
ROTATION
x = 0.0 degrees; 0.000 radians
y = -45.0 degrees; -0.785 radians
z = 13.0 degrees; 0.227 radians
ILLUMINATION
Light Vector: x = 0.577; y = 0.577; z = 0.577
View Vector: x = 0.000; y = 0.000; z = 1.000
Ambient Intensity (Ia): 2.000
Ambient Coefficient (Ka): 0.500
Incident Intensity (Ii): 1.600
Specular Coefficient (Ks): 0.5
Specular Exponent (n): 8.0
MATERIALS
1
Range: 0.0 - 50.0
Density: 1.000
Color (RGBA): 0.1000; 0.1000; 0.0000; 0.1000
2
Range: 51.0 - 200.0
Density: 0.500
Color (RGBA): 0.0000; 0.0000; 0.0300; 0.0300
THRESHOLD (Gradient Magnitude)

```

```

Value: 0.0000
EARLY RAY TERMINATION
Percent: 0.98
VOLUME
Dimensions: x = 800; y = 600; z = 11
Spacing: x = 1.000; y = 1.000; z = 8.000
Scale: x = 1.000; y = 1.000; z = 8.000
SCALE MATRIX
(0,0) 1.000 (0,1) 0.000 (0,2) 0.000 (0,3) 0.000
(1,0) 0.000 (1,1) 1.000 (1,2) 0.000 (1,3) 0.000
(2,0) 0.000 (2,1) 0.000 (2,2) 8.000 (2,3) 0.000
(3,0) 0.000 (3,1) 0.000 (3,2) 0.000 (3,3) 1.000
ROTATION MATRIX
(0,0) 0.689 (0,1) 0.225 (0,2) 0.689 (0,3) 0.000
(1,0) -0.159 (1,1) 0.974 (1,2) -0.159 (1,3) 0.000
(2,0) -0.707 (2,1) 0.000 (2,2) 0.707 (2,3) 0.000
(3,0) 0.000 (3,1) 0.000 (3,2) 0.000 (3,3) 1.000
BOX VOLUME
Minimum: x = 0.000; y = 0.000; z = 0.000
Maximum: x = 799.000; y = 599.000; z = 10.000
BOUNDING BOX
Minimum: x = 0.000; y = -139.818; z = -564.978
Maximum: x = 740.362; y = 583.648; z = 56.569
DISPLACEMENT
dudx = 0.689; dvdx = 0.225; dwdx = 0.086
dudy = -0.159; dvdy = 0.974; dwdy = -0.020
dudz = 0.707; dvdz = 0.000; dwdz = -0.088
VIEW PLANE
Color (RGBA): 0.00; 0.00; 0.00; 1.00
Rows = 725; columns = 742
Number of Rays: 536484
Total Time: 656 seconds
Finish

```

## Parâmetros de visualização da figura 4.7(c)

```

Start
ROTATION
x = 0.0 degrees; 0.000 radians
y = -45.0 degrees; -0.785 radians
z = 13.0 degrees; 0.227 radians
ILLUMINATION
Light Vector: x = 0.577; y = 0.577; z = 0.577
View Vector: x = 0.000; y = 0.000; z = 1.000
Ambient Intensity (Ia): 2.000
Ambient Coefficient (Ka): 0.500
Incident Intensity (Ii): 1.600
Specular Coefficient (Ks): 0.5
Specular Exponent (n): 8.0
MATERIALS
1
Range: 0.0 - 50.0
Density: 1.000
Color (RGBA): 0.1000; 0.1000; 0.0000; 0.1000
2
Range: 51.0 - 200.0
Density: 0.500

```

```

Color (RGBA): 0.0000; 0.0000; 0.0300; 0.0300
THRESHOLD (Gradient Magnitude)
Value: 0.0000
EARLY RAY TERMINATION
Percent: 0.98
VOLUME
Dimensions: x = 800; y = 600; z = 11
Spacing: x = 1.000; y = 1.000; z = 8.000
Scale: x = 1.000; y = 1.000; z = 8.000
SCALE MATRIX
(0,0) 1.000 (0,1) 0.000 (0,2) 0.000 (0,3) 0.000
(1,0) 0.000 (1,1) 1.000 (1,2) 0.000 (1,3) 0.000
(2,0) 0.000 (2,1) 0.000 (2,2) 8.000 (2,3) 0.000
(3,0) 0.000 (3,1) 0.000 (3,2) 0.000 (3,3) 1.000
ROTATION MATRIX
(0,0) 0.689 (0,1) 0.225 (0,2) 0.689 (0,3) 0.000
(1,0) -0.159 (1,1) 0.974 (1,2) -0.159 (1,3) 0.000
(2,0) -0.707 (2,1) 0.000 (2,2) 0.707 (2,3) 0.000
(3,0) 0.000 (3,1) 0.000 (3,2) 0.000 (3,3) 1.000
BOX VOLUME
Minimum: x = 0.000; y = 0.000; z = 0.000
Maximum: x = 799.000; y = 599.000; z = 10.000
BOUNDING BOX
Minimum: x = 0.000; y = -139.818; z = -564.978
Maximum: x = 740.362; y = 583.648; z = 56.569
DISPLACEMENT
dudx = 0.689; dvdx = 0.225; dwdx = 0.086
dudy = -0.159; dvdy = 0.974; dwdy = -0.020
dudz = 0.707; dvdz = 0.000; dwdz = -0.088
VIEW PLANE
Color (RGBA): 0.00; 0.00; 0.00; 1.00
Rows = 725; columns = 742
Number of Rays: 536484
Total Time: 640 seconds
Finish

```

## Parâmetros de visualização da figura 4.8

```

Start
ROTATION
x = 0.0 degrees; 0.000 radians
y = -45.0 degrees; -0.785 radians
z = 13.0 degrees; 0.227 radians
ILLUMINATION
Light Vector: x = 0.577; y = 0.577; z = 0.577
View Vector: x = 0.000; y = 0.000; z = 1.000
Ambient Intensity (Ia): 2.000
Ambient Coefficient (Ka): 0.500
Incident Intensity (Ii): 1.600
Specular Coefficient (Ks): 0.5
Specular Exponent (n): 8.0
MATERIALS
1
Range: 0.0 - 50.0
Density: 1.000
Color (RGBA): 0.1000; 0.1000; 0.0000; 0.1000
2

```

```

Range: 51.0 - 200.0
Density: 0.500
Color (RGBA): 0.0000; 0.0000; 0.0300; 0.0300
THRESHOLD (Gradient Magnitude)
Value: 0.5000
EARLY RAY TERMINATION
Percent: 0.98
VOLUME
Dimensions: x = 800; y = 600; z = 11
Spacing: x = 1.000; y = 1.000; z = 8.000
Scale: x = 1.000; y = 1.000; z = 8.000
SCALE MATRIX
(0,0) 1.000 (0,1) 0.000 (0,2) 0.000 (0,3) 0.000
(1,0) 0.000 (1,1) 1.000 (1,2) 0.000 (1,3) 0.000
(2,0) 0.000 (2,1) 0.000 (2,2) 8.000 (2,3) 0.000
(3,0) 0.000 (3,1) 0.000 (3,2) 0.000 (3,3) 1.000
ROTATION MATRIX
(0,0) 0.689 (0,1) 0.225 (0,2) 0.689 (0,3) 0.000
(1,0) -0.159 (1,1) 0.974 (1,2) -0.159 (1,3) 0.000
(2,0) -0.707 (2,1) 0.000 (2,2) 0.707 (2,3) 0.000
(3,0) 0.000 (3,1) 0.000 (3,2) 0.000 (3,3) 1.000
BOX VOLUME
Minimum: x = 0.000; y = 0.000; z = 0.000
Maximum: x = 799.000; y = 599.000; z = 10.000
BOUNDING BOX
Minimum: x = 0.000; y = -139.818; z = -564.978
Maximum: x = 740.362; y = 583.648; z = 56.569
DISPLACEMENT
dudx = 0.689; dvdx = 0.225; dwdx = 0.086
dudy = -0.159; dvdy = 0.974; dwdy = -0.020
dudz = 0.707; dvdz = 0.000; dwdz = -0.088
VIEW PLANE
Color (RGBA): 0.00; 0.00; 0.00; 1.00
Rows = 725; columns = 742
Number of Rays: 536484
Total Time: 496 seconds
Finish

```

## Parâmetros de visualização da figura 4.10(a)

```

Start
ROTATION
x = 0.0 degrees; 0.000 radians
y = -45.0 degrees; -0.785 radians
z = 13.0 degrees; 0.227 radians
ILLUMINATION
Light Vector: x = 0.577; y = 0.577; z = 0.577
View Vector: x = 0.000; y = 0.000; z = 1.000
Ambient Intensity (Ia): 1.000
Ambient Coefficient (Ka): 0.500
Incident Intensity (Ii): 1.300
Specular Coefficient (Ks): 0.5
Specular Exponent (n): 8.0
MATERIALS
1
Range: 0.0 - 50.0
Density: 1.000

```

```

Color (RGBA): 0.1000; 0.0000; 0.0000; 0.1000
2
Range: 51.0 - 100.0
Density: 0.700
Color (RGBA): 0.0000; 0.0700; 0.0000; 0.0700
3
Range: 101.0 - 150.0
Density: 0.500
Color (RGBA): 0.0500; 0.0500; 0.0000; 0.0500
4
Range: 151.0 - 200.0
Density: 0.300
Color (RGBA): 0.0000; 0.0000; 0.0300; 0.0300
THRESHOLD (Gradient Magnitude)
Value: 0.0000
EARLY RAY TERMINATION
Percent: 0.98
VOLUME
Dimensions: x = 744; y = 600; z = 5
Spacing: x = 1.000; y = 1.000; z = 26.000
Scale: x = 1.000; y = 1.000; z = 26.000
SCALE MATRIX
(0,0) 1.000 (0,1) 0.000 (0,2) 0.000 (0,3) 0.000
(1,0) 0.000 (1,1) 1.000 (1,2) 0.000 (1,3) 0.000
(2,0) 0.000 (2,1) 0.000 (2,2) 26.000 (2,3) 0.000
(3,0) 0.000 (3,1) 0.000 (3,2) 0.000 (3,3) 1.000
ROTATION MATRIX
(0,0) 0.689 (0,1) 0.225 (0,2) 0.689 (0,3) 0.000
(1,0) -0.159 (1,1) 0.974 (1,2) -0.159 (1,3) 0.000
(2,0) -0.707 (2,1) 0.000 (2,2) 0.707 (2,3) 0.000
(3,0) 0.000 (3,1) 0.000 (3,2) 0.000 (3,3) 1.000
BOX VOLUME
Minimum: x = 0.000; y = 0.000; z = 0.000
Maximum: x = 743.000; y = 599.000; z = 4.000
BOUNDING BOX
Minimum: x = 0.000; y = -134.728; z = -525.380
Maximum: x = 718.315; y = 583.648; z = 73.539
DISPLACEMENT
dudx = 0.689; dvdx = 0.225; dwdx = 0.026
dudy = -0.159; dvdy = 0.974; dwdy = -0.006
dudz = 0.707; dvdz = 0.000; dwdz = -0.027
VIEW PLANE
Color (RGBA): 0.00; 0.00; 0.00; 1.00
Rows = 720; columns = 720
Number of Rays: 516961
Total Time: 634 seconds
Finish

```

## Parâmetros de visualização da figura 4.10(b)

```

Start
ROTATION
x = 0.0 degrees; 0.000 radians
y = -45.0 degrees; -0.785 radians
z = 13.0 degrees; 0.227 radians
ILLUMINATION
Light Vector: x = 0.577; y = 0.577; z = 0.577

```

```

View Vector: x = 0.000; y = 0.000; z = 1.000
Ambient Intensity (Ia): 1.000
Ambient Coefficient (Ka): 0.500
Incident Intensity (Ii): 1.300
Specular Coefficient (Ks): 0.5
Specular Exponent (n): 8.0
MATERIALS
1
  Range: 0.0 - 50.0
  Density: 1.000
  Color (RGBA): 0.1000; 0.0000; 0.0000; 0.1000
2
  Range: 51.0 - 100.0
  Density: 0.700
  Color (RGBA): 0.0000; 0.0700; 0.0000; 0.0700
3
  Range: 101.0 - 150.0
  Density: 0.500
  Color (RGBA): 0.0500; 0.0500; 0.0000; 0.0500
4
  Range: 151.0 - 200.0
  Density: 0.300
  Color (RGBA): 0.0000; 0.0000; 0.0300; 0.0300
THRESHOLD (Gradient Magnitude)
  Value: 0.0000
EARLY RAY TERMINATION
  Percent: 0.98
VOLUME
  Dimensions: x = 744; y = 600; z = 5
  Spacing: x = 1.000; y = 1.000; z = 26.000
  Scale: x = 1.000; y = 1.000; z = 26.000
SCALE MATRIX
(0,0) 1.000 (0,1) 0.000 (0,2) 0.000 (0,3) 0.000
(1,0) 0.000 (1,1) 1.000 (1,2) 0.000 (1,3) 0.000
(2,0) 0.000 (2,1) 0.000 (2,2) 26.000 (2,3) 0.000
(3,0) 0.000 (3,1) 0.000 (3,2) 0.000 (3,3) 1.000
ROTATION MATRIX
(0,0) 0.689 (0,1) 0.225 (0,2) 0.689 (0,3) 0.000
(1,0) -0.159 (1,1) 0.974 (1,2) -0.159 (1,3) 0.000
(2,0) -0.707 (2,1) 0.000 (2,2) 0.707 (2,3) 0.000
(3,0) 0.000 (3,1) 0.000 (3,2) 0.000 (3,3) 1.000
BOX VOLUME
  Minimum: x = 0.000; y = 0.000; z = 0.000
  Maximum: x = 743.000; y = 599.000; z = 4.000
BOUNDING BOX
  Minimum: x = 0.000; y = -134.728; z = -525.380
  Maximum: x = 718.315; y = 583.648; z = 73.539
DISPLACEMENT
  dudx = 0.689; dvdx = 0.225; dwdx = 0.026
  dudy = -0.159; dvdy = 0.974; dwdy = -0.006
  dudz = 0.707; dvdz = 0.000; dwdz = -0.027
VIEW PLANE
  Color (RGBA): 0.00; 0.00; 0.00; 1.00
  Rows = 720; columns = 720
Number of Rays: 516961
Total Time: 634 seconds
Finish

```

## Parâmetros de visualização da figura 4.11(a)

```

Start
ROTATION
  x = 0.0 degrees; 0.000 radians
  y = -45.0 degrees; -0.785 radians
  z = 13.0 degrees; 0.227 radians
ILLUMINATION
  Light Vector: x = 0.577; y = 0.577; z = 0.577
  View Vector: x = 0.000; y = 0.000; z = 1.000
  Ambient Intensity (Ia): 2.000
  Ambient Coefficient (Ka): 0.500
  Incident Intensity (Ii): 1.600
  Specular Coefficient (Ks): 0.5
  Specular Exponent (n): 8.0
MATERIALS
  1
    Range: 0.0 - 50.0
    Density: 1.000
    Color (RGBA): 0.1000; 0.0000; 0.0000; 0.1000
  2
    Range: 51.0 - 100.0
    Density: 0.700
    Color (RGBA): 0.0000; 0.1000; 0.0000; 0.1000
  3
    Range: 101.0 - 150.0
    Density: 0.500
    Color (RGBA): 0.1000; 0.1000; 0.0000; 0.1000
  4
    Range: 151.0 - 200.0
    Density: 0.300
    Color (RGBA): 0.0000; 0.0000; 0.1000; 0.1000
THRESHOLD (Gradient Magnitude)
  Value: 0.2000
EARLY RAY TERMINATION
  Percent: 0.98
VOLUME
  Dimensions: x = 744; y = 600; z = 5
  Spacing: x = 1.000; y = 1.000; z = 26.000
  Scale: x = 1.000; y = 1.000; z = 26.000
SCALE MATRIX
  (0,0) 1.000 (0,1) 0.000 (0,2) 0.000 (0,3) 0.000
  (1,0) 0.000 (1,1) 1.000 (1,2) 0.000 (1,3) 0.000
  (2,0) 0.000 (2,1) 0.000 (2,2) 26.000 (2,3) 0.000
  (3,0) 0.000 (3,1) 0.000 (3,2) 0.000 (3,3) 1.000
ROTATION MATRIX
  (0,0) 0.689 (0,1) 0.225 (0,2) 0.689 (0,3) 0.000
  (1,0) -0.159 (1,1) 0.974 (1,2) -0.159 (1,3) 0.000
  (2,0) -0.707 (2,1) 0.000 (2,2) 0.707 (2,3) 0.000
  (3,0) 0.000 (3,1) 0.000 (3,2) 0.000 (3,3) 1.000
BOX VOLUME
  Minimum: x = 0.000; y = 0.000; z = 0.000
  Maximum: x = 743.000; y = 599.000; z = 4.000
BOUNDING BOX
  Minimum: x = 0.000; y = -134.728; z = -525.380
  Maximum: x = 718.315; y = 583.648; z = 73.539
DISPLACEMENT
  dudx = 0.689; dvdx = 0.225; dwdx = 0.026

```

```

dudy = -0.159; dvdy = 0.974; dwdy = -0.006
dudz = 0.707; dvdz = 0.000; dwdz = -0.027
VIEW PLANE
Color (RGBA): 0.00; 0.00; 0.00; 1.00
Rows = 720; columns = 720
Number of Rays: 516961
Total Time: 780 seconds
Finish

```

## Parâmetros de visualização da figura 4.11(b)

```

Start
ROTATION
x = 0.0 degrees; 0.000 radians
y = -45.0 degrees; -0.785 radians
z = 13.0 degrees; 0.227 radians
ILLUMINATION
Light Vector: x = 0.577; y = 0.577; z = 0.577
View Vector: x = 0.000; y = 0.000; z = 1.000
Ambient Intensity (Ia): 2.000
Ambient Coefficient (Ka): 0.500
Incident Intensity (Ii): 1.600
Specular Coefficient (Ks): 0.5
Specular Exponent (n): 8.0
MATERIALS
1
Range: 0.0 - 50.0
Density: 1.000
Color (RGBA): 0.1000; 0.0000; 0.0000; 0.1000
2
Range: 51.0 - 100.0
Density: 0.700
Color (RGBA): 0.0000; 0.1000; 0.0000; 0.1000
3
Range: 101.0 - 150.0
Density: 0.500
Color (RGBA): 0.1000; 0.1000; 0.0000; 0.1000
4
Range: 151.0 - 200.0
Density: 0.300
Color (RGBA): 0.0000; 0.0000; 0.1000; 0.1000
THRESHOLD (Gradient Magnitude)
Value: 0.2000
EARLY RAY TERMINATION
Percent: 0.98
VOLUME
Dimensions: x = 744; y = 600; z = 5
Spacing: x = 1.000; y = 1.000; z = 26.000
Scale: x = 1.000; y = 1.000; z = 26.000
SCALE MATRIX
(0,0) 1.000 (0,1) 0.000 (0,2) 0.000 (0,3) 0.000
(1,0) 0.000 (1,1) 1.000 (1,2) 0.000 (1,3) 0.000
(2,0) 0.000 (2,1) 0.000 (2,2) 26.000 (2,3) 0.000
(3,0) 0.000 (3,1) 0.000 (3,2) 0.000 (3,3) 1.000
ROTATION MATRIX
(0,0) 0.689 (0,1) 0.225 (0,2) 0.689 (0,3) 0.000
(1,0) -0.159 (1,1) 0.974 (1,2) -0.159 (1,3) 0.000

```

```

(2,0) -0.707 (2,1) 0.000 (2,2) 0.707 (2,3) 0.000
(3,0) 0.000 (3,1) 0.000 (3,2) 0.000 (3,3) 1.000
BOX VOLUME
Minimum: x = 0.000; y = 0.000; z = 0.000
Maximum: x = 743.000; y = 599.000; z = 4.000
BOUNDING BOX
Minimum: x = 0.000; y = -134.728; z = -525.380
Maximum: x = 718.315; y = 583.648; z = 73.539
DISPLACEMENT
dudx = 0.689; dvdx = 0.225; dwdx = 0.026
dudy = -0.159; dvdy = 0.974; dwdy = -0.006
dudz = 0.707; dvdz = 0.000; dwdz = -0.027
VIEW PLANE
Color (RGBA): 0.00; 0.00; 0.00; 1.00
Rows = 720; columns = 720
Number of Rays: 516961
Total Time: 792 seconds
Finish

```

## Parâmetros de visualização da figura 4.12

```

Start
ROTATION
x = 0.0 degrees; 0.000 radians
y = -45.0 degrees; -0.785 radians
z = 13.0 degrees; 0.227 radians
ILLUMINATION
Light Vector: x = 0.577; y = 0.577; z = 0.577
View Vector: x = 0.000; y = 0.000; z = 1.000
Ambient Intensity (Ia): 2.000
Ambient Coefficient (Ka): 0.500
Incident Intensity (Ii): 1.600
Specular Coefficient (Ks): 0.5
Specular Exponent (n): 8.0
MATERIALS
1
Range: 0.0 - 50.0
Density: 1.000
Color (RGBA): 0.1000; 0.0000; 0.0000; 0.1000
2
Range: 51.0 - 100.0
Density: 0.700
Color (RGBA): 0.0000; 0.1000; 0.0000; 0.1000
3
Range: 101.0 - 150.0
Density: 0.500
Color (RGBA): 0.1000; 0.1000; 0.0000; 0.1000
4
Range: 151.0 - 200.0
Density: 0.300
Color (RGBA): 0.0000; 0.0000; 0.1000; 0.1000
THRESHOLD (Gradient Magnitude)
Value: 0.0500
EARLY RAY TERMINATION
Percent: 0.98
VOLUME
Dimensions: x = 744; y = 600; z = 5

```

Spacing: x = 1.000; y = 1.000; z = 26.000  
Scale: x = 1.000; y = 1.000; z = 26.000

SCALE MATRIX

(0,0)	1.000	(0,1)	0.000	(0,2)	0.000	(0,3)	0.000
(1,0)	0.000	(1,1)	1.000	(1,2)	0.000	(1,3)	0.000
(2,0)	0.000	(2,1)	0.000	(2,2)	26.000	(2,3)	0.000
(3,0)	0.000	(3,1)	0.000	(3,2)	0.000	(3,3)	1.000

ROTATION MATRIX

(0,0)	0.689	(0,1)	0.225	(0,2)	0.689	(0,3)	0.000
(1,0)	-0.159	(1,1)	0.974	(1,2)	-0.159	(1,3)	0.000
(2,0)	-0.707	(2,1)	0.000	(2,2)	0.707	(2,3)	0.000
(3,0)	0.000	(3,1)	0.000	(3,2)	0.000	(3,3)	1.000

BOX VOLUME

Minimum: x = 0.000; y = 0.000; z = 0.000  
Maximum: x = 743.000; y = 599.000; z = 4.000

BOUNDING BOX

Minimum: x = 0.000; y = -134.728; z = -525.380  
Maximum: x = 718.315; y = 583.648; z = 73.539

DISPLACEMENT

dudx = 0.689; dvdx = 0.225; dwdx = 0.026  
dudy = -0.159; dvdy = 0.974; dwdy = -0.006  
dudz = 0.707; dvdz = 0.000; dwdz = -0.027

VIEW PLANE

Color (RGBA): 0.00; 0.00; 0.00; 1.00  
Rows = 720; columns = 720

Number of Rays: 516961  
Total Time: 777 seconds  
Finish