



Processamento de Imagens Histológicas de Cérebros Marcados com IHC para Estudos Neurofisiológicos

UMinho | 2023

Rui Emanuel Gomes Vieira



**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

Rui Emanuel Gomes Vieira

**Processamento de Imagens Histológicas de Cérebros Marcados com IHC para Estudos Neurofisiológicos**

Outubro 2023





**Universidade do Minho**

Escola de Engenharia

Rui Emanuel Gomes Vieira

**Processamento de Imagens Histológicas de  
Cérebros Marcados com IHC para Estudos  
Neurofisiológicos**

Dissertação de Mestrado  
Mestrado em Engenharia Informática

Orientada por:  
Víctor Alves  
Hugo Almeida

Outubro 2023

## DECLARAÇÃO

**Nome:** Rui Emanuel Gomes Vieira

**Título da Dissertação:** Processamento de Imagens Histológicas de Cérebros Marcados com IHC para Estudos Neurofisiológicos

**Orientadores:** Victor Alves, Hugo Almeida

**Ano de Conclusão:** 2023

**Nome do Mestrado:** Mestrado Integrado em Engenharia Informática

**Área do Mestrado:** Engenharia Informática

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos. Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada. Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.



**Atribuição-NãoComercial-SemDerivações**

**CC BY-NC-ND**

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Universidade do Minho, 30 de outubro de 2023

Assinado por: **Rui Emanuel Gomes Vieira**

Num. de Identificação: 30135616

Data: 2023.11.08 17:51:27+00'00'

Assinatura: \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar queria agradecer às duas pessoas que criaram este tema para tese de mestrado, o Professor Vítor Alves e Professor Hugo Almeida, não só pela oportunidade proporcionada, mas também pela confiança que depositaram em mim para o desenvolvimento desta dissertação. Obrigado Professor Vítor Alves por todo o conhecimento que me transmitiu e por todos os momentos que disponibilizou sem exitar para me ajudar em todas as partes que foram necessárias realizar para alcançar o objetivo final desta dissertação. Obrigado Professor Hugo Almeida e Juliana Fiuza-Fernandes por todos os contributos, desde reuniões a demonstrações, que me possibilitaram ter uma visão mais clara das bases de um domínio que não o meu, fundamentais para a compreensão integral do tema desta dissertação.

Aqui está o culminar de 5 anos de estudo na Universidade do Minho onde tive o privilégio de conhecer pessoas a que agora chamo de amigos, que me ajudaram em todo este meu percurso tanto a um nível pessoal como académico.

Também não podia deixar de agradecer especialmente aos meus pais e à minha irmã por criarem a pessoa que sou hoje e por todo o apoio incondicional que tive e sempre terei, sendo eles exemplos e inspiração a seguir em qualquer etapa da minha vida. Ainda gostava de deixar um agradecimento aos amigos que me viram crescer e sempre me motivaram a ser melhor, a seguir os meus sonhos e que me ensinaram a importância de nunca deixar de ser quem sou.

Obrigado a todas as pessoas que fazem ou fizeram parte da minha vida e que deixaram algum tipo de memória que me permite dar sentido à expressão "saber viver".

## DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Universidade do Minho, 30 de outubro de 2023

Assinado por: **Rui Emanuel Gomes Vieira**  
Num. de Identificação: 30135616  
Data: 2023.11.08 17:53:28+00'00'

Assinatura: \_\_\_\_\_

## RESUMO

A curiosidade do ser humano é algo que estará sempre presente no caminho da humanidade, sendo este aspeto que nos faz querer perceber como nós e o mundo que nos rodeia funciona. Com os diferentes estudos e ensaios realizados ao longo dos tempos, foi possível observar que os seres humanos não são tão diferentes de outros animais em diversos aspetos, desta maneira, ao estudar os comportamentos e anatomia destes animais foi possível descobrir e estudar de forma análoga novos aspetos dos seres humanos.

Nesta dissertação o foco principal é o cérebro de rato da estripe Wistar e tem como objetivo auxiliar o estudo desta estrutura. Mais especificamente foram usadas dois tipos de imagens: uma de microscopia de secções do cérebro do rato e outra de um atlas que representam esquematicamente as primeiras. De modo a facilitar o processo de análise das imagens de microscopia, esta dissertação explica o desenvolvimento de uma linha de processos capaz de auxiliar esta etapa essencial na realização de qualquer tipo de estudo com as estruturas.

O resultado obtido ao executar o método, publicamente disponível num repositório<sup>1</sup>, consiste na sobreposição da representação esquemática de uma parte do cérebro do rato com a imagem de microscopia do tecido que lhe corresponde, o que permite a visualização mais clara dos componentes presentes na imagem original da secção coronal do cérebro de rato, auxiliando no seu estudo.

**Palavras-Chave:** Processamento de imagens, Atlas, Imagens histológicas de cérebros de rato, Registo de imagens.

---

<sup>1</sup> <https://github.com/6Hunter/Procesamento-de-imagens>

## ABSTRACT

The human curiosity is something that had always been present in mankind, being this on of the aspects that makes us want to understand ourselves and the world surrounding us. Over the years studies and essays have been written, in which is possible to realize that we are not that difference from other animals in so many levels, thus, through the studies of the anatomy and behavior of these animals, it was possible to find and study new aspects related to the human being.

In this thesis the main focus is the rat brain of the Wistar strain and has as the main purpose assist in the study of this. Specifically, 2 different types of images will be used: microscopy from a section of the rat brain and its schematical representation from an atlas. In order to ease the process of microscopy image analysis, throughout this thesis is explained the development of a pipeline of processes capable of assisting in this crucial step of any kind of study with these structures.

The outcome accomplished through this pipeline processes, publicly available in a repository<sup>2</sup>, consist of the overlapping of the schematical representation of the section of the rat brain and the related microscopy image of the tissue, allowing a clearer way to analyze the different components of the source image of a rat brain coronary section, supporting its study.

**Keywords:** Image processing, Atlas, Brain rat histological images, Image registration.

---

<sup>2</sup> <https://github.com/6Hunter/Procesamento-de-imagens>

# Índice

|          |                                                                                                 |           |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b><i>Introdução</i></b>                                                                        | <b>1</b>  |
| 1.1      | Contexto e Motivação                                                                            | 2         |
| 1.2      | Objetivos                                                                                       | 2         |
| 1.3      | Estrutura da Dissertação                                                                        | 3         |
| <b>2</b> | <b><i>Conceitos e Tecnologias</i></b>                                                           | <b>4</b>  |
| 2.1      | Anatomia do Cérebro de Rato                                                                     | 5         |
| 2.2      | Cérebro Humano vs Cérebro de um Rato                                                            | 6         |
| 2.3      | Registo de Imagens                                                                              | 7         |
| <b>3</b> | <b><i>Revisão de Literatura</i></b>                                                             | <b>9</b>  |
| 3.1      | Registo de Imagens Aplicado em Órgãos de Seres Humanos                                          | 10        |
| 3.2      | Métodos para Análise do Cérebro de rato                                                         | 11        |
| 3.3      | Registo de Imagens de Cérebros de Roedores                                                      | 13        |
| <b>4</b> | <b><i>Fluxo de Métodos para Estudos Neurofisiológicos de Imagens de Cérebro de Rato ...</i></b> | <b>17</b> |
| 4.1      | Materiais                                                                                       | 18        |
| 4.1.1    | Imagens Histológicas de Cérebro de Rato                                                         | 19        |
| 4.1.2    | Imagens Referentes ao atlas                                                                     | 23        |
| 4.2      | Métodos                                                                                         | 26        |
| 4.3      | Resultados                                                                                      | 30        |
| <b>5</b> | <b><i>Discussão e Conclusões</i></b>                                                            | <b>37</b> |
| 5.1      | Discussão                                                                                       | 38        |
| 5.2      | Conclusão                                                                                       | 39        |
| 5.3      | Trabalho Futuro                                                                                 | 40        |
|          | <b><i>Referências</i></b>                                                                       | <b>41</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - <i>Flatmap</i> do CNS de um rato. Retirado de (Swanson et al., 2018) .....                                                                                                                                                                                   | 5  |
| Figura 2 - <i>Flatmap</i> do CNS de um ser humano. Retirado de (Swanson et al., 2018).....                                                                                                                                                                              | 6  |
| Figura 3 - Resultado da manga da superfície do cérebro e sua reconstrução 3D. Adaptado de (Zhao, 2014) .....                                                                                                                                                            | 11 |
| Figura 4 - Imagens de microscopia dos planos axial, sagital e coronal respetivamente. Adaptado de (Paxinos & Watson, 2007) .....                                                                                                                                        | 12 |
| Figura 5 - Representação através de MRI dos planos axial, sagital e coronal. Adaptado de (Nie et al., 2013).....                                                                                                                                                        | 13 |
| Figura 6 - A representa uma MRI de um, B,C e D representam, respetivamente, uma MRI com o <i>labeling</i> nos planos coronal, sagital e axial e E é uma representação 3D do atlas de uma perspetiva da parte inferior do cérebro. Retirado de (Dorr et al., 2008) ..... | 14 |
| Figura 7 - Fluxograma usada para a reconstrução do processamento das imagens. Retirado de (Stille et al., 2013).....                                                                                                                                                    | 15 |
| Figura 8 - Processo de união das imagens 2D para a criação de um modelo 3D. Retirada de (Stille et al., 2013).....                                                                                                                                                      | 16 |
| Figura 9 - Imagem de uma secção do cérebro de um rato .....                                                                                                                                                                                                             | 18 |
| Figura 10 - Fluxo de processos usado para o estudos neurofisiológicos de imagens de cérebro de rato .....                                                                                                                                                               | 19 |
| Figura 11 - Imagem do cérebro de rato após aplicação de métodos de pré-processamento.                                                                                                                                                                                   | 20 |
| Figura 12 - Máscara de uma secção do cérebro de um rato .....                                                                                                                                                                                                           | 21 |
| Figura 13 - Máscara final sem ruído no fundo .....                                                                                                                                                                                                                      | 21 |
| Figura 14 - Máscara da imagem original com remoção manual da estrutura excedente .....                                                                                                                                                                                  | 22 |
| Figura 15 - Imagem após a aplicação do pré-processamento .....                                                                                                                                                                                                          | 23 |
| Figura 16 - Figura 35 do Atlas. Retirada de (Paxinos & Watson, 2007) .....                                                                                                                                                                                              | 24 |
| Figura 17 - Esquematização do crânio do rato com indicação das origens dos dois referenciais, Bregma e Interaural. Retirada de (Paxinos et al., 1985) .....                                                                                                             | 24 |
| Figura 18 - Imagem do atlas após a filtragem .....                                                                                                                                                                                                                      | 25 |
| Figura 19 - Resultado final do pré processamento das imagens do atlas.....                                                                                                                                                                                              | 26 |
| Figura 20 - Imagem do atlas pós deformação elástica utilizando os parâmetros do ficheiro de texto .....                                                                                                                                                                 | 28 |

|                                                                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 21 - Resultado final da linha de processos descrita .....                                                                                           | 29 |
| Figura 22 - Imagem de microscopia de cérebro de rato relativa à imagem 12 do atlas .....                                                                   | 30 |
| Figura 23 - Figura número 12 do atlas. Retirada de (Paxinos & Watson, 2007).....                                                                           | 31 |
| Figura 24 - Resultado do processo de registo de imagens referente à imagem 12 do atlas...                                                                  | 31 |
| Figura 25 - Imagem de microscopia de cérebro de rato relativa à imagem 13 do atlas .....                                                                   | 32 |
| Figura 26 - Imagem 13 do atlas. Retirada de (Paxinos & Watson, 2007) .....                                                                                 | 33 |
| Figura 27 - Resultado do processo de registo de imagens referente à imagem 13 do atlas...                                                                  | 33 |
| Figura 28 - Imagem de microscopia de cérebro de rato relativa à imagem 34 do atlas .....                                                                   | 34 |
| Figura 29 - Imagem 34 do atlas. Retirada de (Paxinos & Watson, 2007) .....                                                                                 | 34 |
| Figura 30 - Resultado do processo de registo de imagens referente à imagem 34 do atlas...                                                                  | 35 |
| Figura 31 - Imagens de referência e transformações da segunda imagem usando os algoritmos de registo GA e PSO. Adaptada de (Das & Bhattacharya, 2011)..... | 38 |

## **Lista de Tabelas**

|                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Descrição das variáveis do plugin bUnwarpJ do ImageJ ..... | 27 |
|-----------------------------------------------------------------------|----|

## LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

|             |                                  |
|-------------|----------------------------------|
| <b>2D</b>   | Bidimensional                    |
| <b>3D</b>   | Tridimensional                   |
| <b>μm</b>   | Micrómetro                       |
| <b>AVC</b>  | Acidente vascular cerebral       |
| <b>CNS</b>  | <i>Central Nervous System</i>    |
| <b>GA</b>   | General Algorithm                |
| <b>IHC</b>  | Imunohistoquímica                |
| <b>IVUS</b> | Ecografia intravascular          |
| <b>MRI</b>  | Ressonância magnética            |
| <b>PSO</b>  | Particle Swarn Optimization      |
| <b>txt</b>  | Ficheiro texto com extensão .txt |

## GLOSSÁRIO

|                               |                                                                                                                     |
|-------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Atlas</b>                  | Coleção de imagens ou diagramas que fornecem informação detalhada sobre um objeto, neste caso do cérebro            |
| <b>C57BL/6J</b>               | Estripe de rato castanho-escuro desenvolvido pelo The Jackson Laboratory em 1948                                    |
| <b>Estirpe</b>                | Subespécie de uma dada espécie                                                                                      |
| <b>Flatmap</b>                | Representação do córtex cerebral de forma achatada num formato de duas dimensões                                    |
| <b>Imunohistoquímica</b>      | Método que usa o princípio da ligação de anticorpos a antígenos em tecido biológico para a localização de antígenos |
| <b>Imagens histológicas</b>   | Tipos de imagens usados para estudos de tecidos ou células de seres vivos                                           |
| <b>ImageJ</b>                 | Ferramenta utilizada para aplicação de diversos métodos a uma ou mais imagens                                       |
| <b>Imunorreação</b>           | Reação entre um antígeno e o anticorpo                                                                              |
| <b>In vivo</b>                | Método realizado sob um tecido vivo                                                                                 |
| <b>Pixel</b>                  | Unidade de imagem digital                                                                                           |
| <b>Prostatectomia radical</b> | Procedimento médico cirúrgico que implica a remoção total da próstata                                               |
| <b>Ruído</b>                  | Tipos de dados sem informação essencial no contexto presente                                                        |
| <b>Wistar</b>                 | Estripe de rato albino desenvolvido pelo instituto Wistar em 1906                                                   |

# **1 INTRODUÇÃO**

## 1.1 CONTEXTO E MOTIVAÇÃO

Atualmente existem milhares de estudos que possuem como objeto de estudo algum órgão ou estrutura celular em roedores. O uso destes modelos começou a ser cada vez mais frequente, por estes apresentarem diversas características similares aos seus humanos. É por esta razão que os estudos de algumas partes do ser humano, como o caso do cérebro, esteja transposto em algum tipo de estudo ou ensaio relacionados com ratos.

Intrinsecamente relacionado com esta conveniência está associado um processo de observação das imagens microscópicas obtidas do cérebro do rato, no caso desta dissertação, sob a forma de secções cortadas num plano coronal. Este processo de análise ainda é algo realizado muito por métodos não mecânicos, não havendo grandes ferramentas que auxiliem na identificação dos diferentes constituintes presentes na imagem retirada do tecido. Apesar disto para cada imagem existe uma uniformização de quais e onde se podem identificar os diferentes componentes das imagens, esta uniformização da informação é possível através de um atlas, este é constituído por representações esquemáticas das diferentes secções que em conjunto representam o cérebro de um rato da estripe Wistar, adicionalmente pode suportar diferentes planos de orientação das secções mencionadas.

Desta forma nasce a necessidade de aumentar a proximidade entra as imagens de microscopia retiradas das secções do cérebro de um rato e as suas representações esquemáticas, de modo a facilitar a sua análise para a realização dos objetivos que têm como precedente estas imagens.

## 1.2 OBJETIVOS

A obtenção de imagens do cérebro de roedor por Ressonância Magnética tem várias limitações, sendo a principal, o facto de não poder ser obtida aquando da execução de uma tarefa; tornando-se, portanto, difícil estabelecer correlatos anátomo-funcionais particularmente ao nível de redes complexas. Nesse sentido, a possibilidade de analisar múltiplos cortes de cérebro de rato em simultâneo, após tarefa e com marcações relevantes (e.g. imunohistoquímica), pode ser muito importante. Este trabalho tem como objetivo principal o processamento de imagens do cérebro de rato, partindo de cortes histológicos preparados para imunohistoquímica convencional.

Deste modo, um dos passos iniciais tem como foco a análise das imagens de microscopia ótica, de diferentes planos coronais do cérebro, realizando etapas de pré-processamento capazes de melhorar a qualidade da imagem através de diversos métodos.

No passo seguinte, usando técnicas de registo de imagens, será estabelecida a forma como os dois tipos de imagens, histológica e atlas, se relacionam, com o objetivo de alinhar as mesmas, para ser possível uma sobreposição dos diferentes tipos de informação que as imagens trazem para serem analisadas com uma só.

Como objetivo complementar temos o auxílio no processo de análise de diferentes secções ou características do cérebro de rato, de forma a tornar todo este processo mais intuitivo para qualquer pessoa que esteja a trabalhar com este tipo de imagens.

### **1.3 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO**

Esta dissertação é constituída por 5 capítulos começando com a introdução na qual este subcapítulo se inclui, com o complemento do contexto, motivação e exposição dos objetivos. Os restantes 4 capítulos são, sequencialmente, relacionados com:

- Conceitos e tecnologias dos quais é necessário possuir conhecimento para a compreensão integral desta dissertação. É nesta secção que serão explorados temas como a anatomia do cérebro do rato e as ferramentas usadas no desenvolvimento da componente prática associada a esta dissertação.
- Revisão de literatura que consiste na exploração do ponto de desenvolvimento do tema da dissertação na atualidade, abordando diversos artigos com temas semelhantes ou relacionados com a temática desta dissertação.
- Desenvolvimento da linha de processamento onde será explicado o processo de obtenção e as características dos materiais usados para o desenvolvimento da dissertação. De seguida será descrito de forma detalha todo o processo de desenvolvimento da linha de processos, bem como de todos os resultados obtidos.
- Para terminar será realizada uma discussão comparando os resultados obtidos com outros referentes a um estudo semelhante no ser humano. Adicionalmente será elaborada a conclusão onde será feita uma reflexão sobre o trabalho realizado, referido ainda o trabalho futuro que pode ser executado.

## **2 CONCEITOS E TECNOLOGIAS**

## 2.1 ANATOMIA DO CÉREBRO DE RATO

A base de estudo principal utilizada nesta dissertação é o cérebro de rato, consequentemente, o rumo a seguir começa pela exposição dos elementos principais deste pilar do trabalho, para ser possível uma melhor compreensão do trabalho desenvolvido como um todo.

Como podemos observar na Figura 1, existem diferentes regiões e estruturas no cérebro que podem ser facilmente identificadas. Cada uma destas estruturas integra uma rede funcional e possui nesse contexto uma ou várias funções.

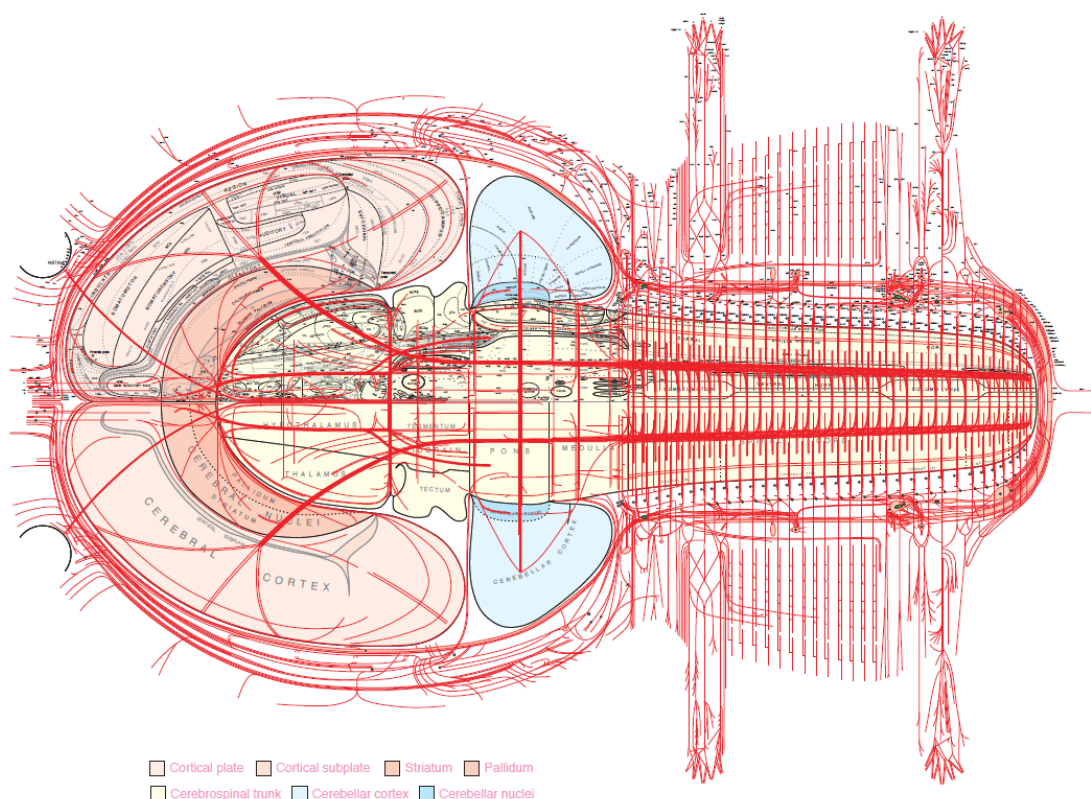


Figura 1 - Flatmap do CNS de um rato. Retirado de (Swanson et al., 2018)

## 2.2 CÉREBRO HUMANO VS CÉREBRO DE UM RATO

Por norma, o cérebro de um rato macho possui um tamanho aproximado de  $1971\text{mm}^3$  (Welniak-Kaminska et al., 2019) sendo cerca de 573 vezes mais pequeno que o de um ser humano masculino uma vez que o valor do volume do mesmo é de  $1130\text{cm}^3$  (Cosgrove et al., 2007).

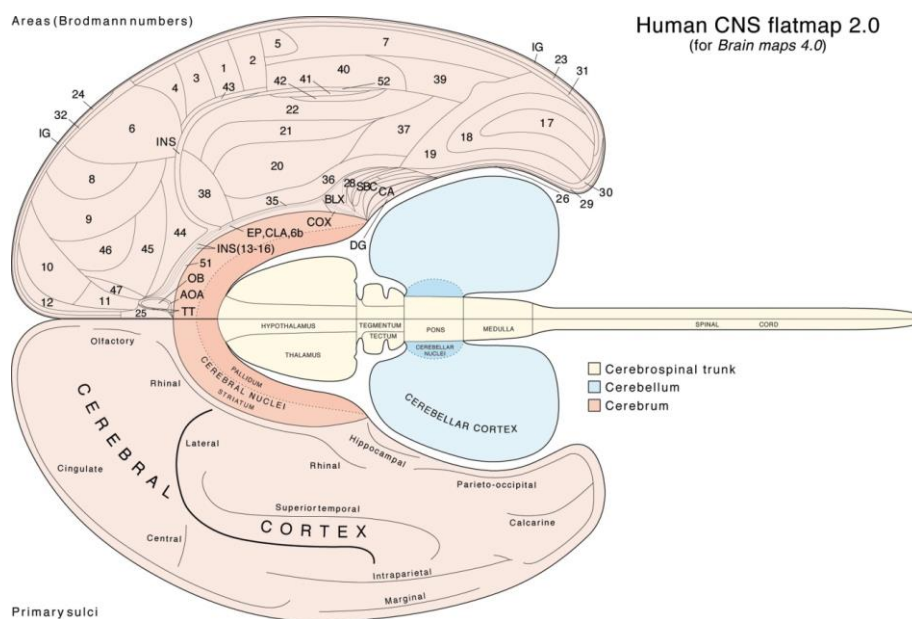


Figura 2 - Flatmap do CNS de um ser humano. Retirado de (Swanson et al., 2018)

Apesar desta diferença de tamanhos, é possível perceber que a anatomia de ambos possui algumas semelhanças, através das Figura 1 e 2 podemos observar as diversas regiões idênticas presentes nas diferentes espécies. Como é por exemplo o caso do córtex cerebral e cerebelar, entre muitas outras regiões com estruturas que desempenham funções semelhantes nos dois seres vivos em questão.

Esta relação entre as estruturas e funcionamento das mesmas de ambas as espécies é suportada por diferentes estudos como por exemplo: um estudo (Yamori et al., 1976) relacionado com AVCs em ratos e seres humanos é possível concluir que a estrutura dos vasos sanguíneos, que sustentam várias partes dos cérebros que os dois seres em estudo possuem, é comum a ambos. Outro exemplo é o caso apresentado em (Terasaki & Schwarz, 2017), que com o apoio de outros estudos associados, comprova que tanto nos humanos como nos ratos, o consumo de álcool por parte de uma progenitora enquanto esta se encontra grávida, mesmo

que não provoque a síndrome alcoólica fetal, pode ser prejudicial para a parte do processamento cognitiva que o feto apresentará.

## 2.3 REGISTO DE IMAGENS

O registo de imagens é um processo computacional que permite realizar a união de duas imagens ou mais imagens, podendo estas ter sido retiradas em marcas temporais diferentes, usando diferentes métodos ou usando diferentes perspetivas para ser possível recriar modelos bidimensionais ou tridimensionais (Wyawahare, Pradeep M. Patil, et al., 2009).

Para realizar o registo de imagens é importante ser capaz de efetuar a classificação do processo para permitir o uso posterior dos métodos que mais se apropriam. Deste modo, (Maintz & Viergever, 1998) enumera nove fatores para classificar o registo de imagens: dimensionalidade, natureza da base de registo, natureza da transformação, domínio da transformação, interação, procedimento de otimização, modalidades envolvidas, sujeito(s) e o objeto.

A referida união de imagens é executada através do mapeamento de pontos, linhas ou áreas de referência em ambas as imagens para que estas duas se possam relacionar. Deste modo um registo de imagens pode ser usado aplicando diferentes métodos cada um com as suas diferenças e peculiaridades. Assim, é necessário explorá-los, através de uma breve explicação, para perceber qual se poderá adequar melhor ao nosso problema.

### 1. Métodos de registo intrínseco

Neste tipo de registo de imagens são usados objetos artificiais para desempenhar a função de marcadores para a realização do registo das imagens retiradas com estes objetos (Wan & Li, 2003).

### 2. Métodos de curva

Estes métodos usam curvas como pontos de referência, como é o caso das extremidades de um objeto presente nas imagens, para, desta forma, ser possível detetar estas curvas nas outras imagens de modo a realizar o alinhamento das mesmas (Wan & Li, 2003).

### **3. Métodos de superfície**

Neste tipo de métodos são procuradas superfícies para estas serem o ponto comum das diferentes imagens permitindo a realização da adaptação das mesmas com a área de referência (Wan & Li, 2003).

### **4. Métodos de momento e eixos principais**

Para estes métodos existe a necessidade de as imagens serem muito semelhantes pois estes têm como mecanismo de funcionamento o alinhamento do eixo principal de uma estrutura da imagem permitindo assim corrigir rotações e translações (Wan & Li, 2003).

### **5. Métodos de correlação**

Nestes casos, à semelhança do caso anterior, as imagens devem ser similares mudando apenas a sua fonte ou pequenos objetos pois estes métodos funcionam realizando a maximização da semelhança entre imagens do mesmo cenário (Wan & Li, 2003).

### **6. Métodos de atlas**

Em contrapartida, estes métodos usam um atlas sobre o objeto que esta presente nas imagens para mapear diferentes exemplares, de forma a auxiliar na relação que se pretende fazer entre eles (Wan & Li, 2003).

### **7. Métodos baseados em maximização de informação mútua**

Já em relação a estes métodos, são usados processos de iterações até chegar aos parâmetros de transformação em que a informação mútua das imagens atinja o seu máximo (Wan & Li, 2003).

### **8. Métodos baseados em *Wavelet***

Estes métodos recorrem métodos de decomposição de imagens resultando em coeficientes de *Wavelet*, que através do ajuste de parâmetros de transformação, são usados como parâmetro para chegar às imagens mais parecidas possíveis entre si (Wan & Li, 2003).

### **9. Métodos baseados em redes neuronais**

Como o próprio nome indica, este tipo de métodos usam as vantagens das redes neuronais para realizar o registo de imagens (Wan & Li, 2003).

# **3 REVISÃO DE LITERATURA**

### 3.1 REGISTO DE IMAGENS APLICADO EM ÓRGÃOS DE SERES HUMANOS

Apesar do nosso foco de estudo não estar presente nos seres humanos, existem diversas técnicas que são usadas na investigação em estruturas do ser humano que podem ser úteis para a realização desta dissertação. Isto porque estes estudos abordam métodos que podem ser transpostos para o estudo do processamento de imagens microscópicas de cérebro de ratos marcados com IHC.

Como primeiro exemplo temos um estudo (Kutty et al., 2015) que revela a importância da reconstrução tridimensional das artérias coronais por esta técnica por permitir a realização de diagnósticos mais rápidos e mais precisos, neste caso, na doença cardíaca coronária, uma das doenças mais mortais dos Estados Unidos da América no ano de 2010. Para obter estes resultados foram utilizadas imagens de pacientes obtidas através de dois procedimentos diferentes, IVUS e angiogramas coronários, que com o auxílio de técnicas de registo de imagens intermodais, ou seja, que é baseado em duas formas diferentes de imagens, permitiu a criação de modelos tridimensionais, começando pelo uso dos dois tipos de imagens relacionadas entre si.

Um outro exemplo relevante dados os paralelos com o presente trabalho, é relativo ao reconhecimento e vigilância do cancro da próstata (Orczyk et al., 2013), onde é proposto um método para localizar a patologia num espaço tridimensional que é gerado utilizando imagens histológicas digitais e imagens de ressonância magnética multiparamétrica *in vivo* que foram obtidas por uma pequena amostra de apenas 3 pacientes que foram sujeitos a prostatectomias radicais. Para ser possível determinar a precisão foram marcados 22 pontos de referência internos juntamente com o coeficiente de Dice, que serviram também para fazer a comparação dos diferentes métodos utilizados, como o de transformação rígida e transformação *affine*. Este estudo suporta que o uso da técnica de registo transformação *affine* gera modelos mais precisos do que o uso de transformações rígidas.

No caso de outro estudo (Sengupta et al., 2022) que introduz uma perspetiva mais abstrata, mas não menos útil, relata um pouco de toda a evolução do campo do registo de imagens na área da medicina comparando diferentes algoritmos que têm sido estudados e introduzidos com a evolução e exploração desta área. Para efetuar a comparação de alguns dos algoritmos, baseados na intensidade, é usando apenas uma transformação rígida

bidimensional de um par de imagens, de uma tomografia computadorizada e de uma ressonância magnética, obtendo resultados que revelam ser o algoritmo de *Mutual Information* que se destaca pela sua precisão, robustez e velocidade de execução

Por fim, ainda referente ao ser humano, mas já relacionado com o cérebro, é apresentado um método de reconstrução da superfície do cérebro em 3D utilizando imagens de ressonância magnética (Zhao, 2014). O algoritmo proposto para realizar esta reconstrução de apenas a superfície do cérebro é de fácil compreensão utilizando apenas triângulos como forma de preenchimento e ligação entre as diferentes imagens resultantes da ressonância. Neste método é usado a heurística da diagonal mais curta para decidir o mecanismo de decisão na formação do triângulo entre os pontos de referência que serão unidos no processo de reconstrução das imagens. Este algoritmo apresentado oferece uma imagem final que pode ser considerada de boa qualidade (Figura 3) e que ainda possui a vantagem de reduzir a complexidade computacional de outros métodos para a realização deste processo.

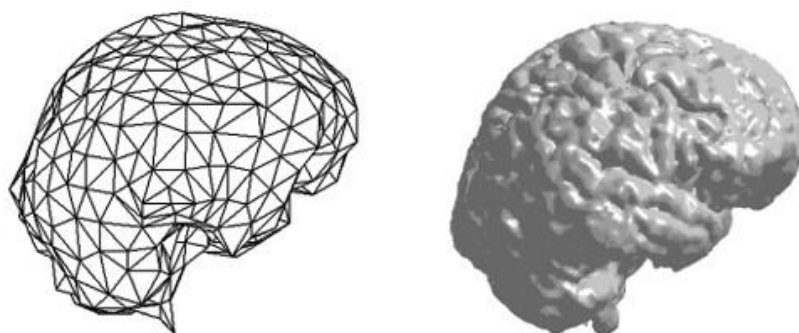


Figura 3 - Resultado da manga da superfície do cérebro e sua reconstrução 3D. Adaptado de (Zhao, 2014)

Perante todos estes estudos, para além de todos os métodos que são usados para a obtenção e processamento das imagens, é possível compreender a importância da análise dos diferentes tipos de imagens que podem impactar no desenvolvimento do setor da saúde.

### 3.2 MÉTODOS PARA ANÁLISE DO CÉREBRO DE RATO

Para a realização da análise de cérebro de um rato foi necessário a criação de métodos que permitissem uma visualização detalhada. Deste modo iremos destacar a análise por

imagens de microscopia, também conhecido por imagens histológicas, e a análise por imagens de ressonância magnética.

No caso da análise através de imagens de microscopia é necessário retirar o cérebro de um rato para ser possível realizar o estudo do mesmo, isto porque, é necessário realizar o corte de vários segmentos para a análise do seu interior seguindo um plano de referência.

Os planos de referência das secções podem ser deduzidos pressupondo a posição de um rato em descanso numa superfície nivelada: um plano que é paralelo à superfície é axial, um plano que é perpendicular à superfície e paralelo ao eixo de simetria do rato é sagital e, por fim, um plano que também seja perpendicular à superfície, mas perpendicular ao eixo de simetria do animal é um plano coronal.



Figura 4 - Imagens de microscopia dos planos axial, sagital e coronal respetivamente. Adaptado de (Paxinos & Watson, 2007)

Qualquer um dos planos da Figura 4 permite visualizar as estruturas mudando apenas a perspetiva com que vemos cada região do cérebro do rato.

Terminada a fase de segmentação do cérebro, é necessário estudar cada segmento através da observação dos mesmos utilizando um microscópio. Esta observação pode ser preservada ao proceder com a realização de fotografias individuais dos segmentos, sendo cada uma catalogada seguindo parâmetros associados a pontos de referência que nos permite deduzir que secção do cérebro estamos a analisar.

Em relação à análise recorrendo a imagens de ressonância magnética, como o próprio nome sugere, é necessário a realização de uma ressonância magnética à cabeça de um rato para obter, à semelhança do método anterior, as diferentes secções do cérebro, permitindo, desta forma, uma exposição completa de todas as partes do cérebro como podemos observar na Figura 5.

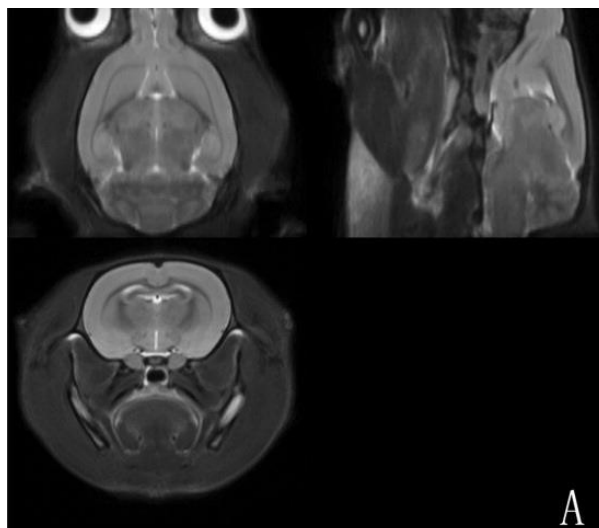


Figura 5 - Representação através de MRI dos planos axial, sagital e coronal. Adaptado de (Nie et al., 2013)

### 3.3 REGISTO DE IMAGENS DE CÉREBROS DE ROEDORES

Nesta secção já nos aproximamos mais de estudos relacionados com o foco de estudo desta dissertação, dado que os estudos referenciados de seguir são à cerca de ratos ou espécies de roedores que fazem sentido mencionar por serem anatomicamente semelhantes entre si.

De forma a compreender e representar órgãos existe a construção de um atlas, sendo este um exemplar padrão que serve como referência para o estudo tanto das diferentes partes que constituem um órgão, como também este como um todo. Deste modo, existe a publicação de diferentes atlas do cérebro de um rato dependendo da sua estripe.

Num estudo (Dorr et al., 2008) foi desenvolvido um atlas com particularidade de este ser em três dimensões, o que permite uma maior imersividade no uso do mesmo. Para o seu desenvolvimento, foram usados 40 ratos da estripe C57Bl/6J, sendo 20 machos e 20 fêmeas, com 12 semanas de idade. Com esta amostra, foram retiradas individualmente imagens de ressonância magnética com uma resolução de 32  $\mu\text{m}$  e, em cada uma destas imagens, foi possível visualizar até 62 estruturas cerebrais, que foram manualmente segmentadas para ser possível a construção 3D do atlas do cérebro com cada uma destas estruturas representadas. Como observável na Figura 6, as estruturas que se revelaram demasiado pequenas para a sua observação foram incluídas como agregados.

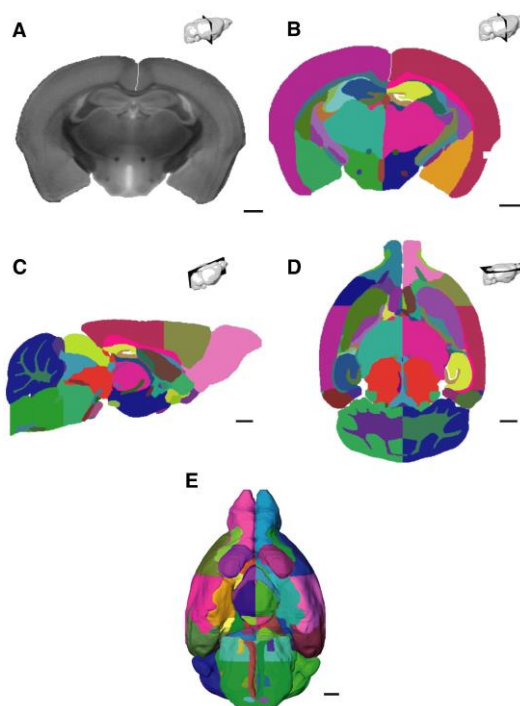


Figura 6 - A representa uma MRI de um, B,C e D representam, respetivamente, uma MRI com o *labeling* nos planos coronal, sagital e axial e E é uma representação 3D do atlas de uma perspetiva da parte inferior do cérebro. Retirado de (Dorr et al., 2008)

Outra espécie de roedores, que é utilizada especialmente para estudos de comportamentos sociais humanos, é o degu, que, de forma análoga, um estudo do cérebro desta espécie explica a criação do seu atlas correspondente (Kumazawa-Manita et al., 2013). Neste caso a estratégia utilizada difere, pois são usadas um conjunto de imagens histológicas e de ressonância magnética para a criação deste atlas. Estas imagens foram obtidas utilizando 6 degus como amostra e, para a reconstrução do cérebro cada imagem histológica era alinhada com a imagem de ressonância magnética correspondente. O atlas gerado permite uma visualização exterior do cérebro tridimensionalmente bem como a visualização de qualquer plano, permitindo assim uma representação mais próxima da realidade proporcionando um estudo mais interativo.

Assemelhando-se mais ao tema desta dissertação o estudo (Stille et al., 2013) consegue, através de imagens histológicas fluorescentes, ou seja, imagens de estruturas marcadas com IHC, reconstruir o cérebro de ratos em 3D através de imagens de microscopia de secções do cérebro, com o auxílio de um modelo de imagens de ressonância magnética. Neste artigo são usados ratos da estirpe Sprague Dawley onde, depois de retiradas as imagens referidas anteriormente, é executada a linha de processos representada na Figura 7 em cada um dos

conjuntos de imagens retiradas de cada espécimen, resultando num modelo com um erro de registo de 0.323mm.

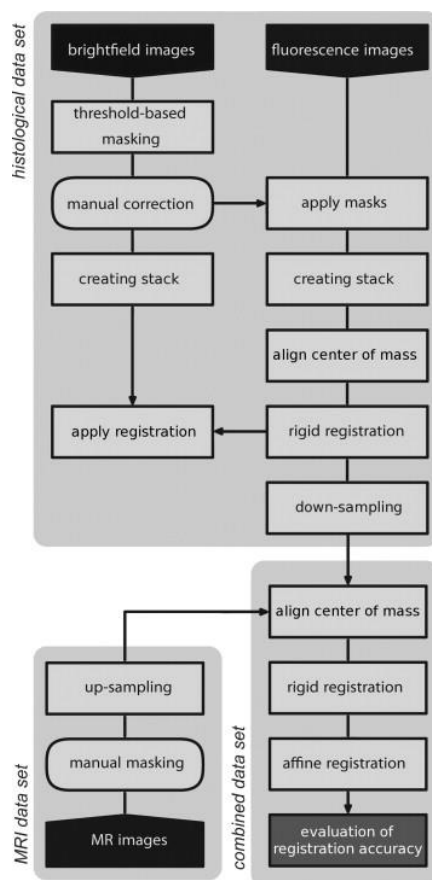


Figura 7 - Fluxograma usada para a reconstrução do processamento das imagens. Retirado de (Stille et al., 2013)

Nesta fluxograma é de elevada importância o processo de registo das imagens 2D, pois este processo tem uma grande influência na orientação e forma do modelo 3D final, deste modo, foi seguida uma ordem de registo destas imagens. Primeiramente, é necessário escolher uma imagem para ser usada como referência, tendo esta escolha um grande impacto no resultado desta união. Esta escolha pode ser efetuada manualmente, tendo como opção mais ideal a imagem mais central com menos artefactos, ou automaticamente, idealmente escolhendo a imagem com o menor número de pixéis nulos ou, simplesmente, escolhendo a imagem mais central. Depois de escolhida a imagem de referência, as restantes imagens são registadas em associação com a imagem vizinha mais próxima da imagem de referência ou, no caso particular das imagens adjacentes da imagem referência, com ela mesma. Podemos observar este processo na Figura 8, em que a "slice  $I_{ref}$ " representa a imagem de referência.

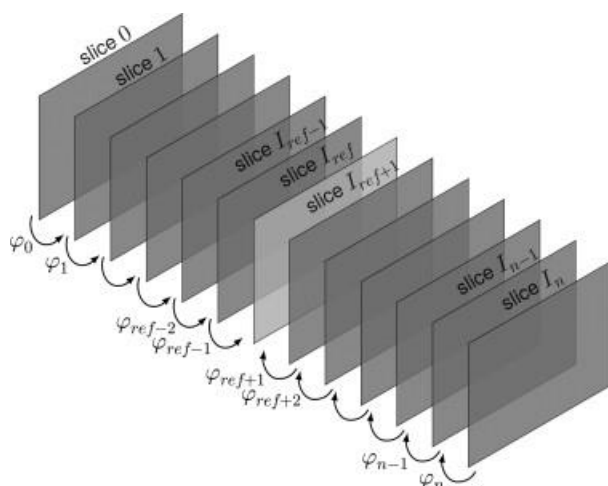


Figura 8 - Processo de união das imagens 2D para a criação de um modelo 3D. Retirada de (Stille et al., 2013)

# **4 FLUXO DE MÉTODOS PARA ESTUDOS NEUROFISIOLÓGICOS DE IMAGENS DE CÉREBRO DE RATO**

## 4.1 MATERIAIS

As imagens que são objetos primários de estudo para o desenvolvimento desta dissertação são segmentos de cérebro de ratos da estripe Wistar. Para a obtenção das imagens é necessário que, primeiramente, o animal seja anestesiado (Esteves et al., 2019), profunda sendo de seguida executada uma perfuração intracardíaca com uma solução de 4% paraformaldeído. Passamos de seguida à parte de remoção do cérebro do rato sendo ente posteriormente seccionado sob o plano coronal em cortes de 50  $\mu$ m para de seguida realizar o processo de imunorreacção sob as mesmas (Leite-Almeida et al., 2014).

Por fim, para ser possível analisar cada segmento retirado do cérebro é necessário que estes sejam observados por um microscópio onde também é possível tirar uma fotografia, como o exemplo apresentado de seguida, para deste modo analisar a mesma usando diversas ferramentas com diferentes propósitos.

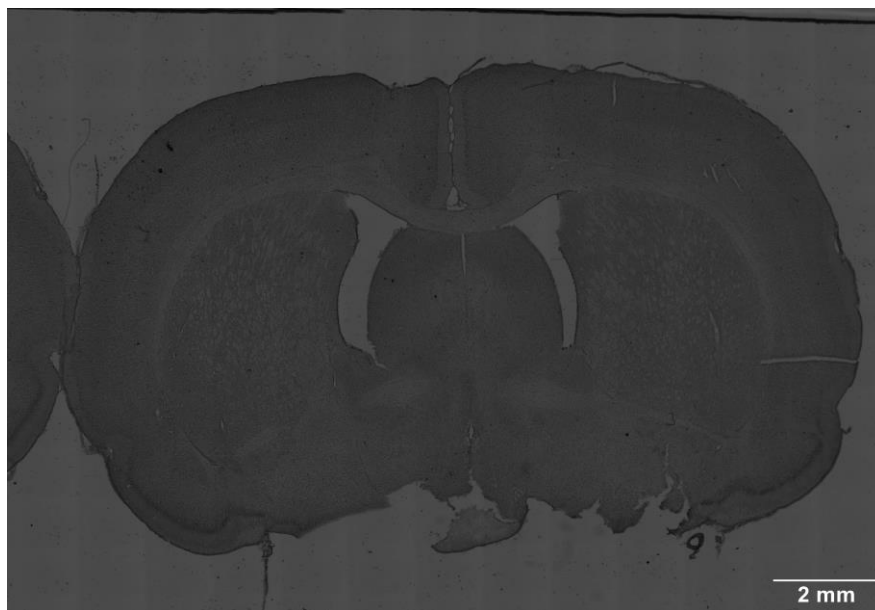


Figura 9 - Imagem de uma secção do cérebro de um rato

Após este processo de obtenção das imagens histológicas, ainda é necessário realizar a escolha da imagem do atlas (Paxinos & Watson, 2007) que mais se assemelha à primeira. Com a posse de ambas as imagens, estão reunidas todas as condições para iniciar os métodos presentes no fluxo de processamento destas imagens.

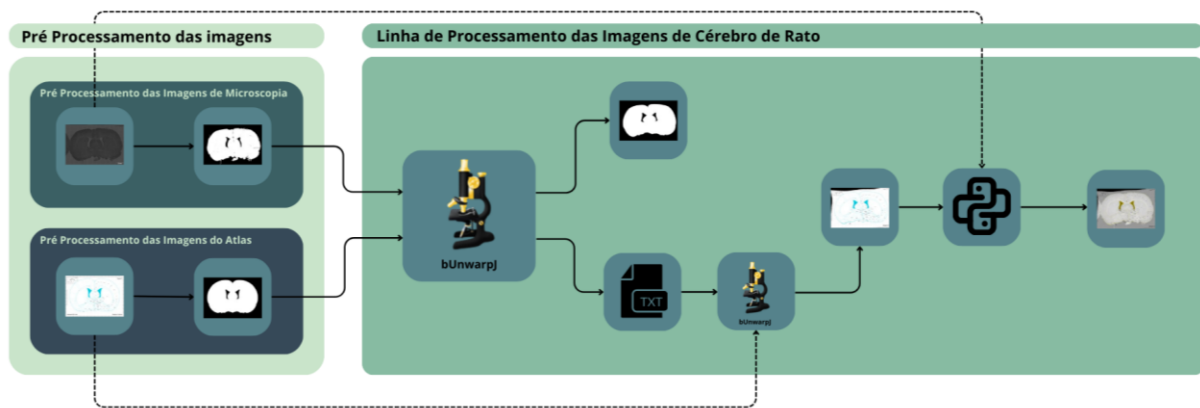


Figura 10 - Fluxo de processos usado para o estudos neurofisiológicos de imagens de cérebro de rato

O esquema apresentado na Figura 10 apresenta de forma esquemática todos os processos efetuados durante a linha de processamento para a obtenção da imagem resultante. Como podemos observar a primeira grande secção, destacada pelo verde mais claro é a parte do pré-processamento das imagens, tanto de microscopia, como a do atlas.

Os processos de pré-processamento de imagens têm como objetivo melhorar a qualidade das imagens, dando mais destaque às partes essenciais das imagens e moldando as mesmas de acordo com o seu propósito.

#### 4.1.1 IMAGENS HISTOLÓGICAS DE CÉREBRO DE RATO

Pela observação da imagem usada como exemplo é possível destacar diferentes características, como a falta de contraste nas tonalidades de cinzento da imagem, a existência de "ruído", ou seja, conteúdo que não representa informação relevante, no fundo da imagem e, ainda, o tamanho grande da imagem devido à sua natureza e finalidade. Todas estas propriedades da imagem concebem à imagem uma margem de melhoria para proporcionar uma maior qualidade dos resultados que serão obtidos.

Deste modo foi decidido utilizar a biblioteca de processamentos de imagens em Python chamada de *scikit-image* (Van Der Walt et al., 2014). Nesta fase foi usada a função de *rescale\_intensity* em par com a técnica dos percentis. Estas técnicas podem ser usadas quando o valor dos pixels de uma imagem representa tons de cinzento, com os valores compreendido entre 0 e 255, quando esta condição se verifica começamos por atribuir ao valor mais pequeno entre os pixels da imagem o valor de 0 se este não for o caso e o valor de 255 aos que possuem o valor mais alto, criando assim um maior contraste entre o valor mínimo e o valor máximo

da imagem. De seguida é necessário distribuir os restantes valores para criar também mais contraste entre eles através de uma série de operações aritméticas tendo como referência os valores do mínimo e máximo originais da imagem acabando assim por obter uma imagem com muito mais contraste (Contrast Adjustment with scikit-image – Data, Science, Energy). O resultado desta operação na imagem do cérebro de rato está representado na figura seguinte.

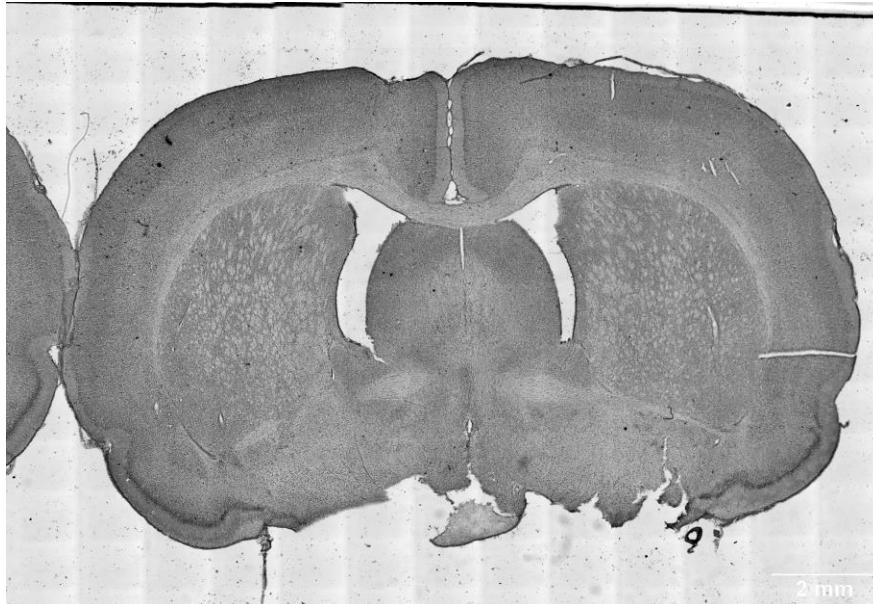


Figura 11 - Imagem do cérebro de rato após aplicação de métodos de pré-processamento

A questão que surgiu de seguida foi a remoção do fundo da imagem para esta possuir com mais clareza uma distinção entre a estrutura sobre a qual é pretendido realizar o registo e o fundo da imagem. Na solução desta parte foram aplicados dos métodos da classe *morphology* da biblioteca *scikit-image* utilizados para a criação de máscaras de imagens, resultando numa imagem com um notável contraste entre as estruturas e o fundo.

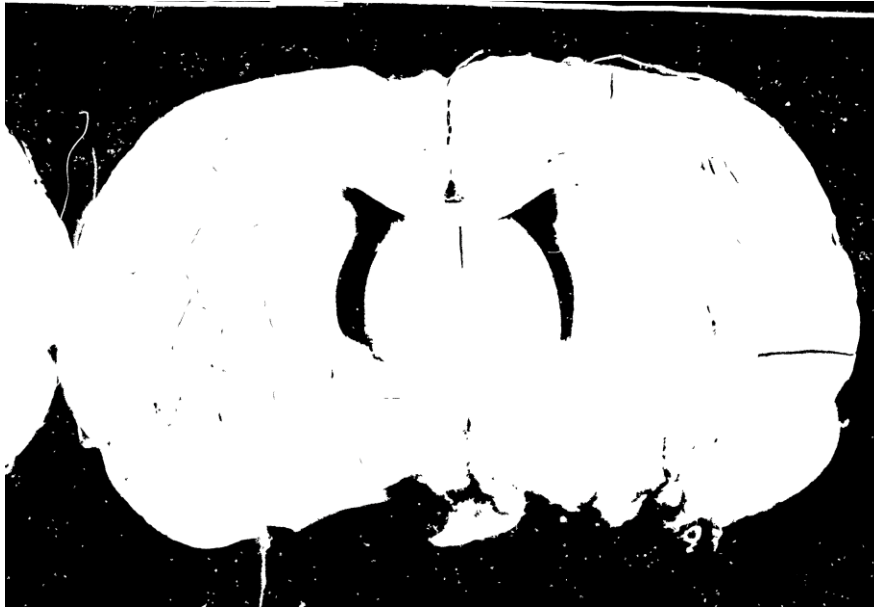


Figura 12 - Máscara de uma secção do cérebro de um rato

Apesar da máscara resultante retirar maior parte do fundo ainda existem algumas partes da máscara que são ruído para o conteúdo essencial da imagem. Estas partes da imagem foram retirados recolhendo todas as áreas individuais da máscara geradas e ficando apenas com a maior, pois o resultado irá sempre representar a parte essencial da imagem.

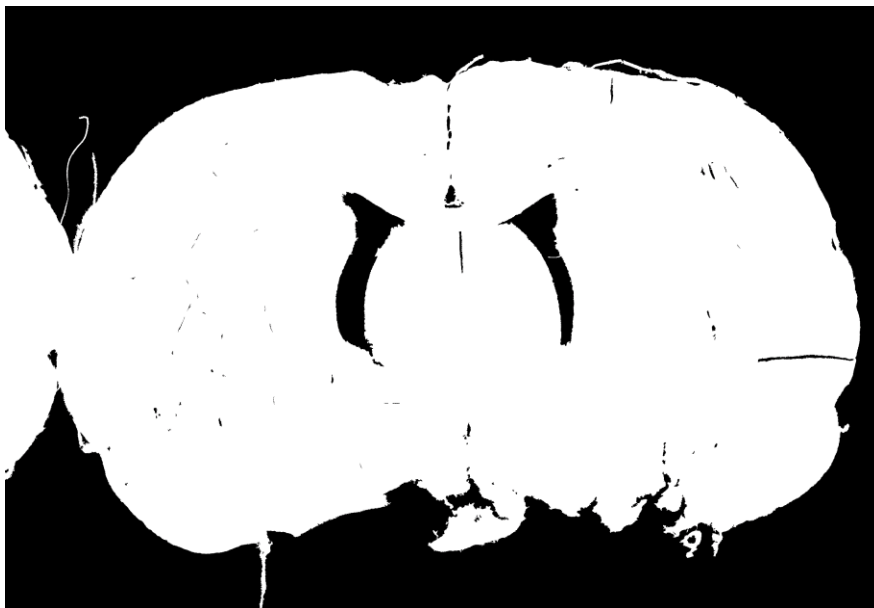


Figura 13 - Máscara final sem ruído no fundo

Com o intuito de obter resultados mais confiáveis e para potenciar as condições ótimas da imagem ainda iremos, de forma manual, retirar a parte do segmento de cérebro de rato que se encontra a mais nesta imagem, com a finalidade de simular uma foto com apenas uma única estrutura. Para isto, ao invés de retirar esta parte da imagem inicialmente, com a

possibilidade de influenciar os processos de contraste e filtragem dos diferentes elementos da imagem referidos anteriormente, essa etapa foi executada na máscara produzida pelo pré processamento da imagem, podendo, desta forma, refletir as mudanças executadas na imagem resultante.



Figura 14 - Máscara da imagem original com remoção manual da estrutura excedente

Por fim aplicamos a máscara obtida, ou seja, aos pixéis originais da imagem em que aplicamos a imagem, se estes se encontram representados a preto na máscara continuarão a preto, em contrapartida, se estes estiveram representados a branco é indicação que são informação relevante da imagem e que devem ser, desta forma, atribuídos ao seu valor original. Neste contexto a imagem previamente processada, em relação ao seu contraste, será a escolhida para a aplicação da máscara de forma a obter uma imagem com bom contraste entre os diferentes componentes da secção de cérebro e sem elementos extraordinários à informação relevante.



Figura 15 - Imagem após a aplicação do pré-processamento

#### **4.1.2 IMAGENS REFERENTES AO ATLAS**

As imagens que irão completar as secções do cérebro com as informações sobre as diferentes partes que constituem a estrutura são referentes ao atlas de Paxinos (Paxinos & Watson, 2007). O mesmo é composto por três categorias de orientação, axial, sagital e coronal, mas para haver uma relação entre os dois tipos de imagens em processamento iremos usar a orientação coronal, reduzindo, desta maneira, o banco de imagem para as 161 imagens. Estas correspondem a uma representação esquemática das secções retiradas do cérebro de um rato da estripe Wistar, com um intervalo entre si de 120  $\mu\text{m}$  (Paxinos & Watson, 2007) ao longo do comprimento do mesmo.

Com o propósito de facilitar a relação entre as duas imagens iremos utilizar a imagem do atlas referente à da secção anterior.

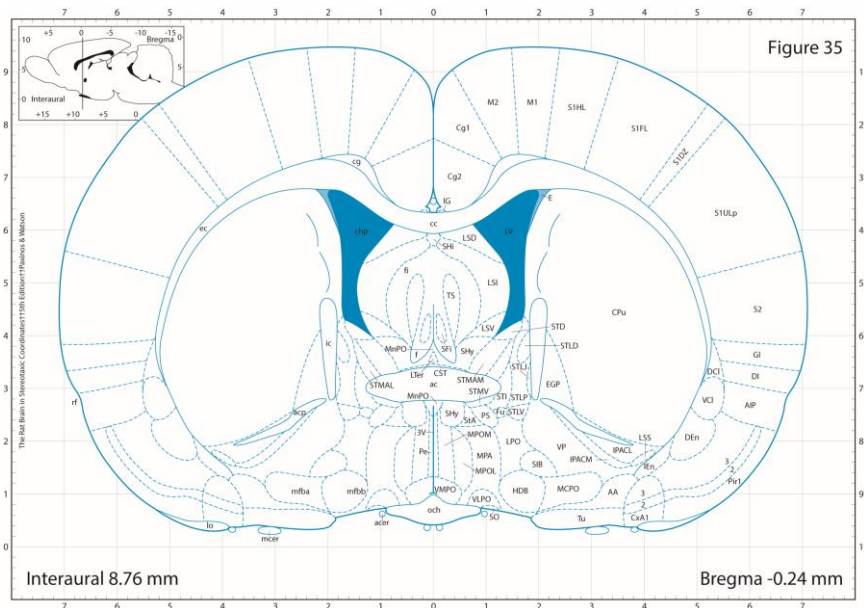


Figura 16 - Figura 35 do Atlas. Retirada de (Paxinos & Watson, 2007)

Pela observação deste exemplo de uma imagem do atlas podemos observar diversos componentes, cada um com um caráter informativo diferente relativamente à representação esquemática da secção de cérebro do rato da estirpe Wistar.

Primeiramente, no canto superior direito temos uma referência visual da representação do plano sagital central do cérebro do rato, onde a linha vertical representa a localização que a imagem do atlas em questão representa. Os referenciais que se encontram neste pequeno esquema são alusivos a dois tipos de medidas que podem ser usadas para navegar pelas coordenadas do cérebro de diferentes espécies de rato («A stereotaxic atlas of the albino mouse forebrain», 1979).

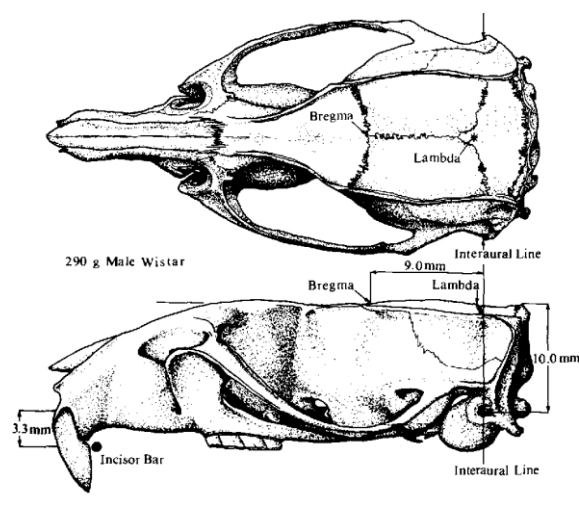


Figura 17 - Esquematisação do crânio do rato com indicação das origens dos dois referenciais, Bregma e Interaural. Retirada de (Paxinos et al., 1985)

Vinculando as informações sobre a imagem do crânio e as medidas apresentadas nos cantos inferiores da imagem do atlas, rapidamente percebemos que o ponto Bregma e a linha interaural, representam a origem de cada um dos respectivos referenciais, deste modo, o valor apresentado em cada uma das medidas representa a distância entre a secção do atlas e a origem do referencial que o observador estiver a utilizar.

Por último, mas não menos importante, a imagem do atlas possui identificação dos diferentes componentes da estrutura representada e delimitada com as linhas de cor azul. A denominação dos mesmos é executada através de siglas, em que é possível aceder às legendas correspondentes no atlas em que esta imagem está incluída.

Apesar de todas estas informações serem vitais para a utilidade do projeto, as mesmas não ajudam no processo de registo dos dois tipos de imagens, representando apenas ruído para a operação. Portanto, foi imperativo o isolamento das linhas que representavam efetivamente a secção do cérebro do rato, assim, observando a imagem é possível denotar que estas linhas possuem uma cor diferente (azul) em relação aos restantes componentes. Consequentemente, foi aplicado um filtro de cores que isolava os tons de azul utilizando a ferramenta "Color Threshold" (Sankur, 2004) do ImageJ, ficando apenas as partes de tons azul como resultado que podemos evidenciar na imagem seguinte.

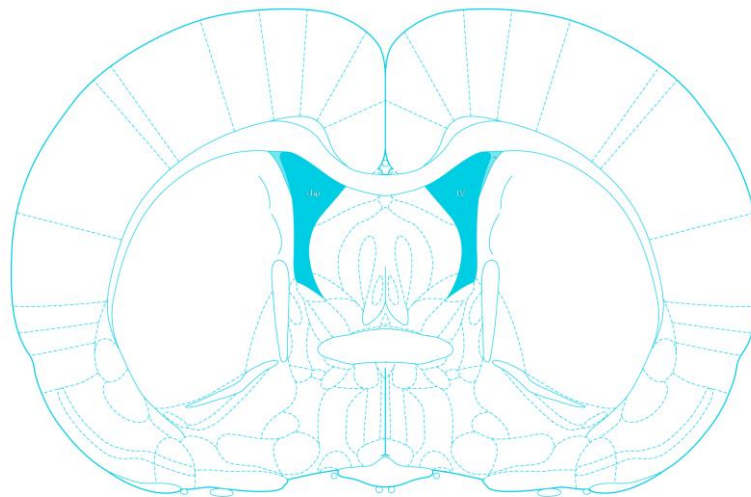


Figura 18 - Imagem do atlas após a filtragem

Com este resultado, deixamos de ter informação com a qual não é possível realizar com a imagem da secção do cérebro de rato, sobre a qual é pressuposto realizar o registo de imagens. Apesar da clareza da informação vital para este processo, um grande problema é

não haver uma distinção evidente entre o fundo da imagem e a estrutura, sendo ambas marcadas a branco, adicionalmente, algumas partes do fundo são azul como as delimitações dos diferentes componentes da estrutura.

Refletindo sobre estas adversidades, o ponto seguinte deste pré-processamento das imagens do atlas será distinguir os diferentes constituintes do atlas. Deste modo, usando mais uma vez o ImageJ, o atlas sofreu uma transformação para que o fundo se tornasse preto e a área referente à estrutura manter-se branca, obtendo o seguinte resultado.

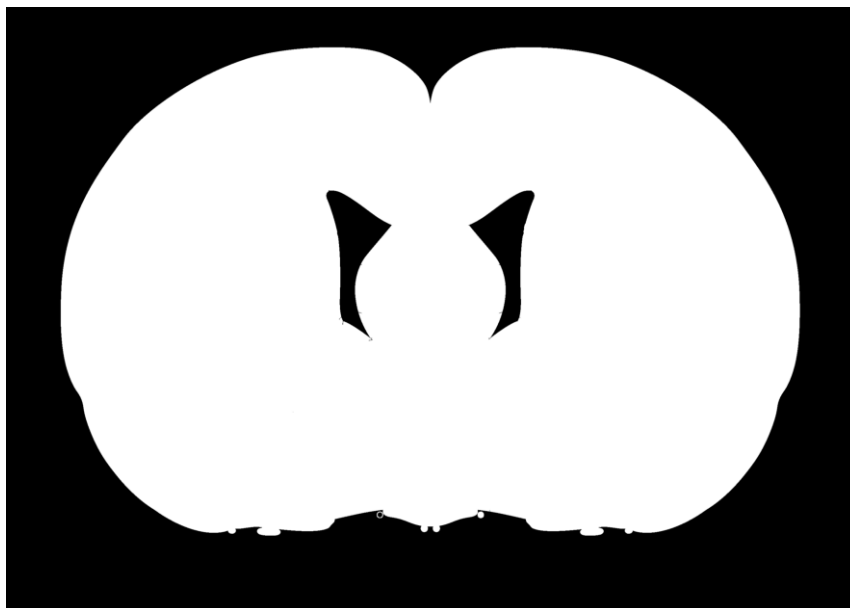


Figura 19 - Resultado final do pré processamento das imagens do atlas

Como podemos observar, o resultado distingue evidentemente as duas grandes áreas que constituem uma imagem do atlas, tornando o processo de registo de imagem mais propício ao sucesso.

## 4.2 MÉTODOS

Terminado o pré-processamento de ambas as imagens que são pontos centrais desta dissertação, é altura de avançar para a realização do registo de ambas as imagens.

Como já referido anteriormente, para este processo ser bem-sucedido é necessário encontrar a imagem do atlas correspondente à imagem de microscopia do cérebro do rato. É possível efetuar este processo de duas maneiras, uma mais comum sendo por observação de ambas as imagens chegando à conclusão de qual a parte do atlas que mais se assemelha à imagem de microscopia, o segundo método consiste em calcular a imagem do atlas seguindo

os pontos de referência denominados de Bregma e/ou linha interaural a partir da estrutura da qual foram retiradas as imagens das secções do cérebro de rato. Nesta dissertação foi seguido o primeiro método para corresponder à imagem de microscopia, que temos usado como exemplo ao longo do documento, a 35ª imagem do atlas, também usada como referência nas secções anteriores.

Sendo a técnica de registo de imagens um processo computacional bastante custoso, num contexto temporal e de uso de recursos, e, adicionalmente, por as imagens serem de tamanhos consideravelmente diferentes, foi estabelecido como solução de ambos os problemas a diminuição proporcional da imagem microscópica da secção do cérebro de rato para o tamanho aproximado da imagem do atlas usando o método *Image>Adjust>Size* do ImageJ, atribuindo o tamanho do comprimento do atlas ao comprimento da imagem histológica.

De seguida foi novamente usado a ferramenta ImageJ, mais concretamente um *plugin* de registo de imagens denominado de bUnwarpJ que consiste na realização do registo de duas imagens através de deformações elásticas (Arganda-Carreras et al., 2006), para isso depois de iniciar o plugin temos uma série de parâmetros que podemos manipular de forma a aperfeiçoar o registo que será executado.

Tabela 1 - Descrição das variáveis do plugin bUnwarpJ do ImageJ

| Parâmetro                  | Descrição                                                                                                                                                                           | Valor                                                                                                    |
|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Source Image</i>        | Imagem sob a qual irá ser aplicada a deformação                                                                                                                                     | Máscara da imagem do atlas                                                                               |
| <i>Target Image</i>        | Imagem de referência da deformação                                                                                                                                                  | Máscara da imagem histológica                                                                            |
| <i>Registration Mode</i>   | <i>Fast</i> e <i>Accurate</i> são modos que realizam o registo bidirecionalmente<br><i>Mono</i> é o modo que realiza apenas o registo da <i>source image</i> na <i>target image</i> | Mono, visto que não traz nenhum valor o resultado do outro registo                                       |
| <i>Advanced Options</i>    | Possui parâmetro dos pesos e modos das transformações iniciais e finais                                                                                                             | <i>Default</i> , dado que o único peso com valor é o peso das imagem, sendo o mais importante neste caso |
| <i>Verbose</i>             | Permite a observação da execução dos algoritmos envolvidos no <i>plugin</i>                                                                                                         |                                                                                                          |
| <i>Save Transformation</i> | Permite guardar a imagem resultante do registo, assim como, um ficheiro txt com os parâmetros associados à transformação                                                            | Esta caixa deve ser marcada pois o ficheiro de texto vai ser utilizado posteriormente                    |

Pelas observações da descrição dos parâmetros manipuláveis chegamos aos valores e condições ótimas para a realização do registo das duas imagens que provêm do pré-processamento descrito anteriormente que podem ser observados na Tabela 2.

Após serem colocados todos estes parâmetros no local destinados, é executada o registo das duas imagens, obtendo como resultando dois tipos de ficheiro. Uma imagem no formato Tiff com 3 camadas, uma com a imagem resultante do registo de imagens, outra com uma projeção dos vetores usados para a deformação da *source image*, neste caso na imagem do atlas, e, por último, o resultado da aplicação dos vetores aplicados numa grelha representativa da imagem. Adicionalmente ainda é gerado um ficheiro de texto que contém os parâmetros usados na transformação elástica realizada no registo das duas imagens.

É precisamente este ficheiro de texto que contém a informação vital resultante do processo de registo das imagens, isto porque, as imagens sobre as quais foi realizado o registo não contém nenhuma informação sobre a natureza das imagens iniciais, não possuindo, desta forma, as informações que tornam o fruto deste processo tão produtivo. Consequentemente, utilizamos este ficheiro .txt para realizar a deformação na imagem original do atlas que contém toda a informação das estruturas presentes na imagem de microscopia da secção do cérebro de rato.

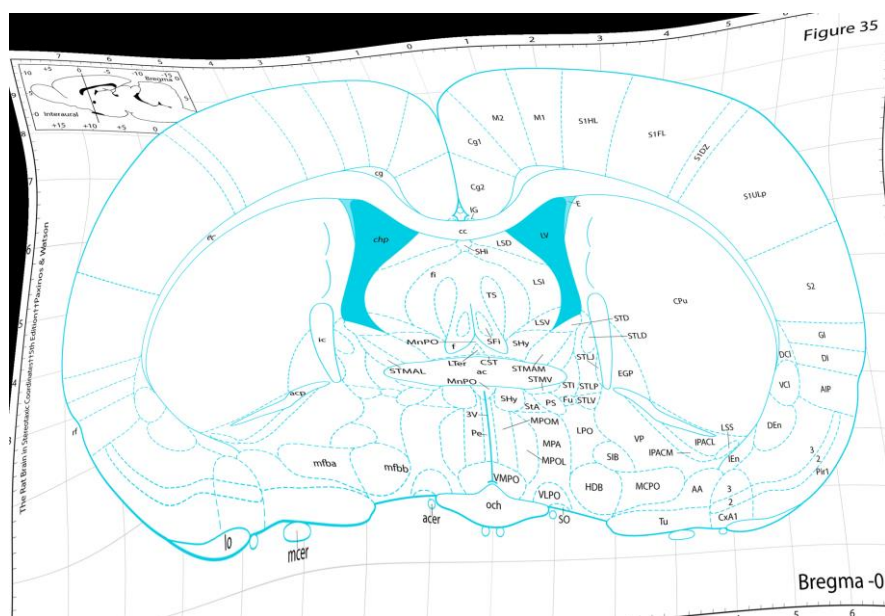


Figura 20 - Imagem do atlas pós deformação elástica utilizando os parâmetros do ficheiro de texto

Este processo é realizado utilizando o menu secundário do plugin utilizado anteriormente que permite realizar diferentes operações, como conversões, composições, comparações e inversões de diferentes tipos de transformações, deformações de imagens através de

coeficientes de transformação lidas através de um ficheiro de texto e guardar/aplicar marcos nas imagens.

Antes da operação final de sobreposição das duas imagens após a realização do registo das mesmas, ainda é necessário fazer a adaptação da imagem do atlas transformada com a imagem original da secção de cérebro de rato. Desta vez, a diferença de tamanho é tratada da maneira inversa, isto é, utilizando na mesma a ferramenta *Image>Adjust>Size* do ImageJ, aumentamos proporcionalmente a imagem do atlas processada com o registo, até à medida do comprimento da imagem histológica original ficando apenas com uma pequena diferença nos rácios das imagens.

Desta maneira, depois de concluídos todos os passos necessários podemos realizar a sobreposição das duas imagens através de um processo de sobreposição utilizando a função `addWeighted` da biblioteca de Python *opencv*, resultando na imagem 21. Neste processo ainda é possível optar pela sobreposição com a imagem de microscopia original ou sobre a qual já foi aplicada a máscara, que retirou todas as partes dispensáveis da imagem da secção de cérebro de rato. Nesta imagem resultante é possível observar as diferentes estruturas associadas à imagem de microscopia com uma legenda proporcionada pela imagem do atlas correspondente permitindo uma análise da imagem mais rápida, intuitiva e informativa.

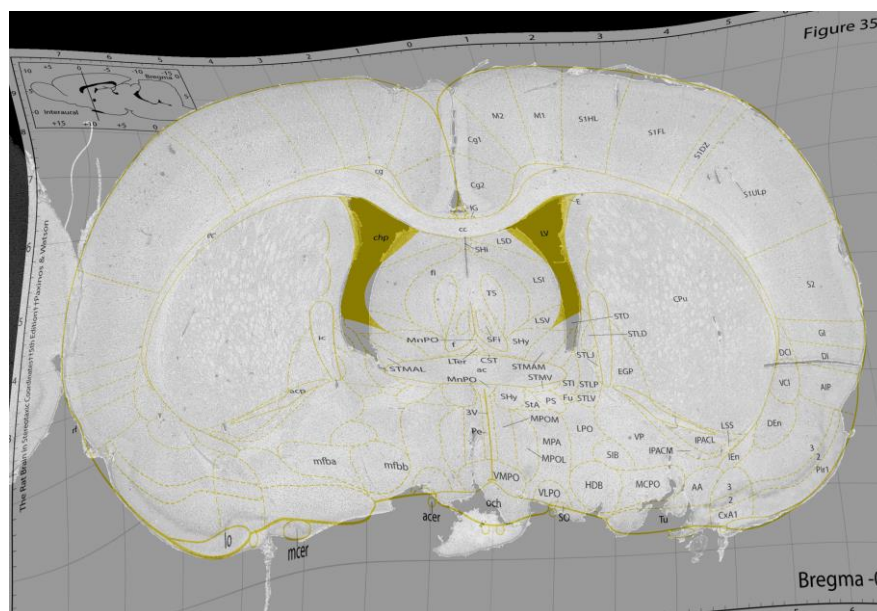


Figura 21 - Resultado final da linha de processos descrita

No fim de todo este processo de manipulação de duas imagens chegamos a um resultado que carrega o melhor de ambas as imagens numa só e de forma que nos permite realizar uma análise de uma forma mais simplificada. Podemos observar que a imagem do resultado

apresenta uma grande precisão nas margens da estrutura da imagem e, apesar de os componentes interiores não possuírem qualquer valor no momento do registo das imagens, como o caso das margens, estas possuem uma etiquetagem bastante competente.

### 4.3 RESULTADOS

Nesta secção serão expostos mais exemplos de imagens resultantes de todo o processo descrito anteriormente, no qual, para cada imagem individual foi necessário atribuir a imagem correspondente do atlas, sendo este um passo essencial para o resultado fazer sentido quando for analisado.

Como primeiro exemplo iremos utilizar a imagem seguinte em conjunto com a imagem número 12 do atlas que temos usado nesta dissertação.

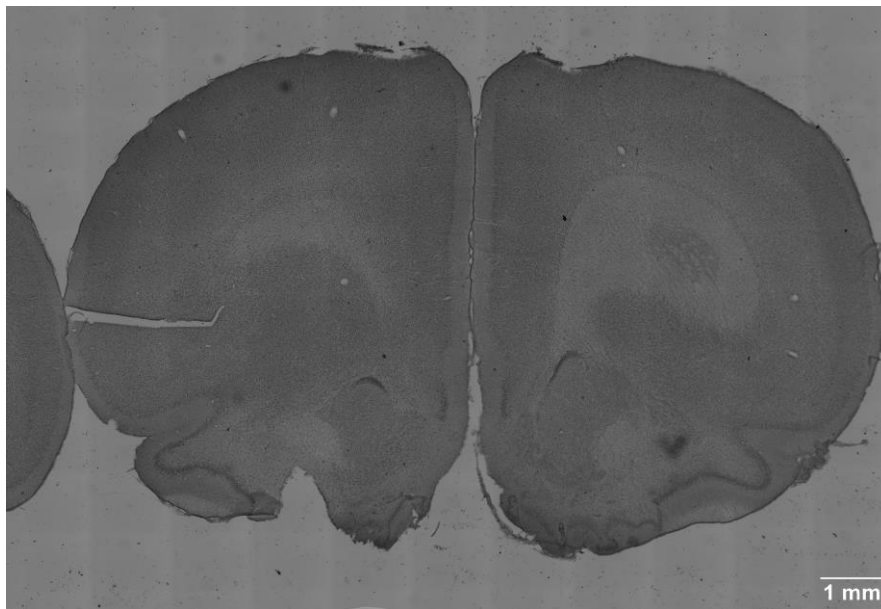


Figura 22 - Imagem de microscopia de cérebro de rato relativa à imagem 12 do atlas

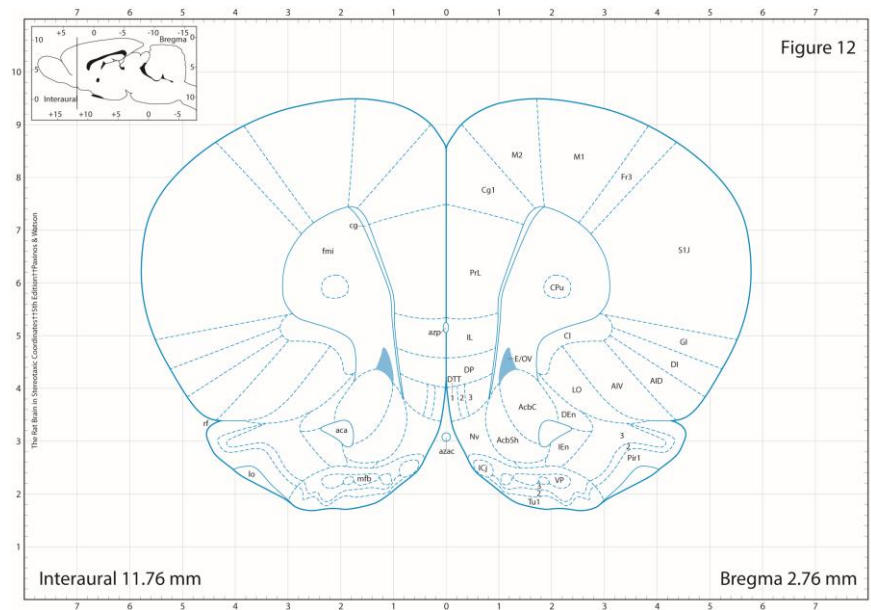


Figura 23 - Figura número 12 do atlas. Retirada de (Paxinos & Watson, 2007)

Começando o processo pelo pré processamento das imagens, criando as máscaras, realizando o processo de registo das últimas e, por fim, aplicando os resultados obtidos na imagem no atlas para a sobreposição final obtemos o seguinte resultado.

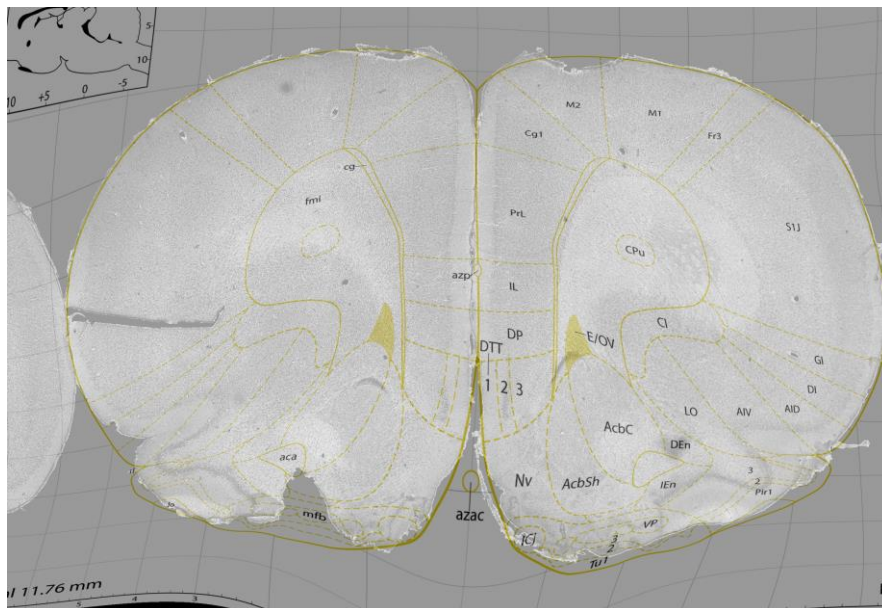


Figura 24 - Resultado do processo de registo de imagens referente à imagem 12 do atlas

Analisado o resultado desta linha de processamento podemos observar diferentes pontos. Primeiramente verificamos evidentemente que as linhas exteriores do atlas se aproximaram bastante das extremidades da imagem de microscopia, de forma síncrona, a linha central também se encontra no local correto. Uma das falhas que pode ser vista logo antes do processo iniciar é o facto de nenhuma imagem do atlas se assemelhar com grande

exatidão devido ao erro humano que pode ocorrer durante o processo de corte das secções do cérebro de rato, podendo acontecer a criação de um ângulo não reto com o eixo de simetria da estrutura, resultando, desta forma, em cortes onde diferentes partes da imagem histológica sejam representadas por diferentes imagens do atlas para que as estruturas correspondam à realidade representada. Adicionalmente, ainda é possível perceber que as estruturas que são facilmente visíveis na imagem, não estão totalmente alinhadas com os esquemas presentes no atlas.

De forma análoga podemos observar o processo da secção seguinte à apresentada anteriormente, deste modo iremos analisar a imagem microscópica da secção de cérebro de rato associada à imagem 13 do atlas.

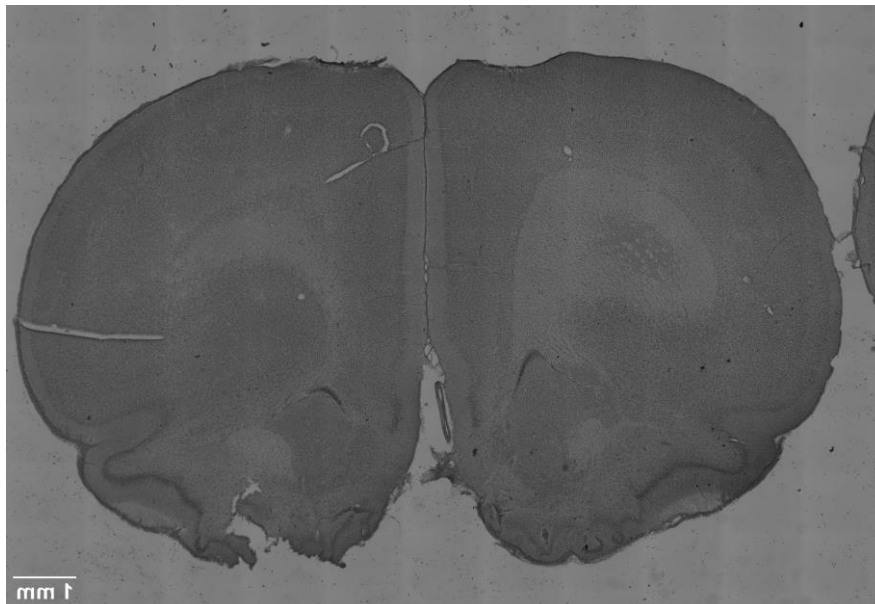


Figura 25 - Imagem de microscopia de cérebro de rato relativa à imagem 13 do atlas

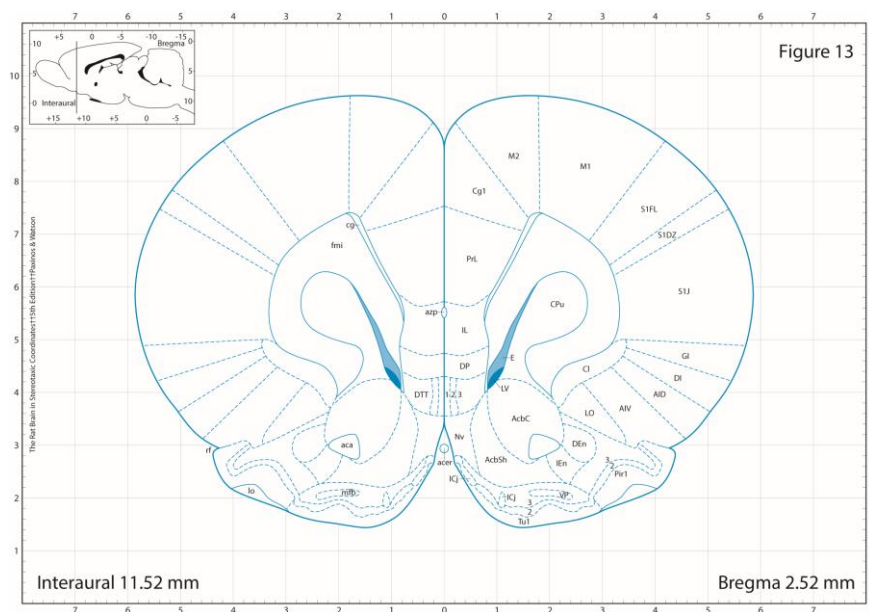


Figura 26 - Imagem 13 do atlas. Retirada de (Paxinos & Watson, 2007)

Antes de revelar este resultado final do processo desenvolvido, também é possível perceber que esta aproximação do atlas à imagem da secção do cérebro de rato não é a mais apropriada devido ao declive que aconteceu no corte das secções do cérebro.

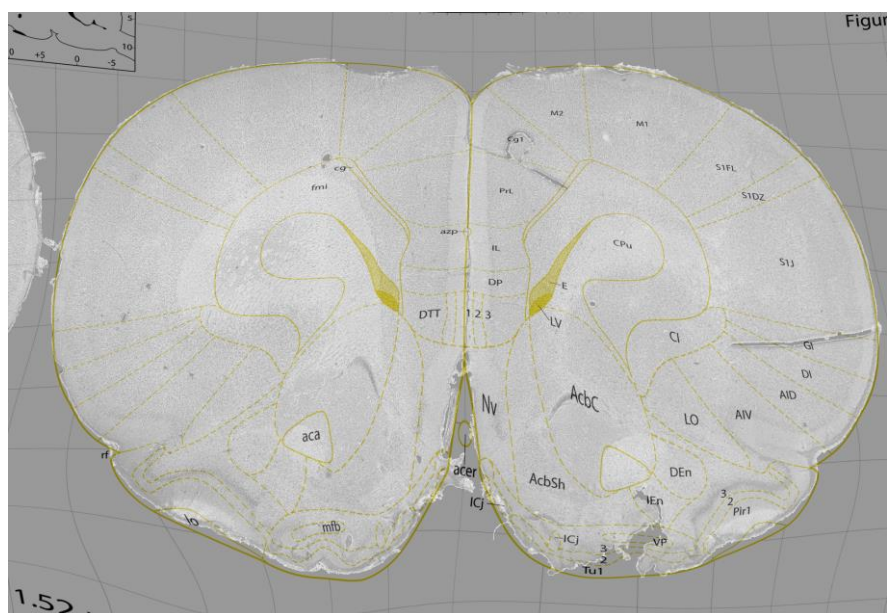


Figura 27 - Resultado do processo de registo de imagens referente à imagem 13 do atlas

Observando esta imagem final, da mesma forma que a imagem anterior, é possível identificar que as margens da estrutura e a sua representação do atlas coincidem bastante bem. No caso das estruturas interiores é possível repara que as que correspondem ao lado direito da estrutura estão visivelmente aproximadas às linhas do atlas, isto porque, esta parte

da imagem se assemelha mais à figura do atlas que foi escolhida para realizar todo o processo descrito anteriormente.

Por fim temos mais um exemplo, desta vez relativo à secção adjacente da que foi utilizada como exemplo na descrição do processo e que foi utilizada para alcançar o objetivo principal desta dissertação.

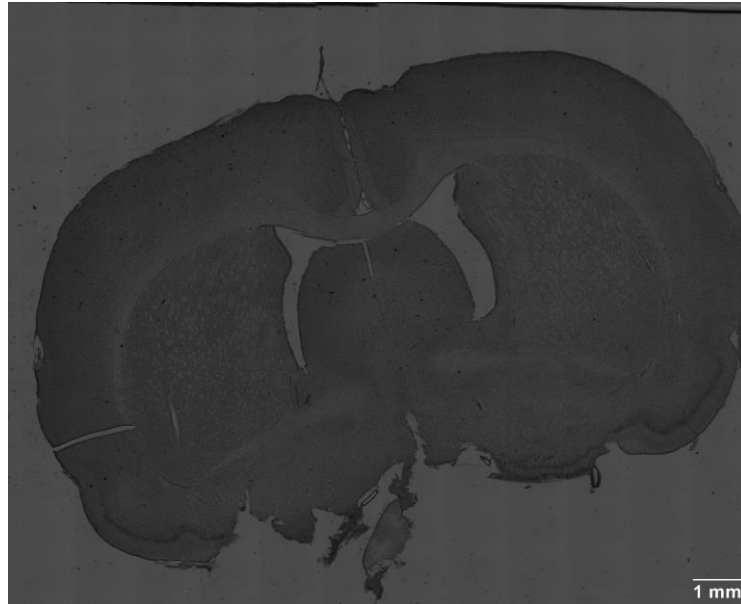


Figura 28 - Imagem de microscopia de cérebro de rato relativa à imagem 34 do atlas

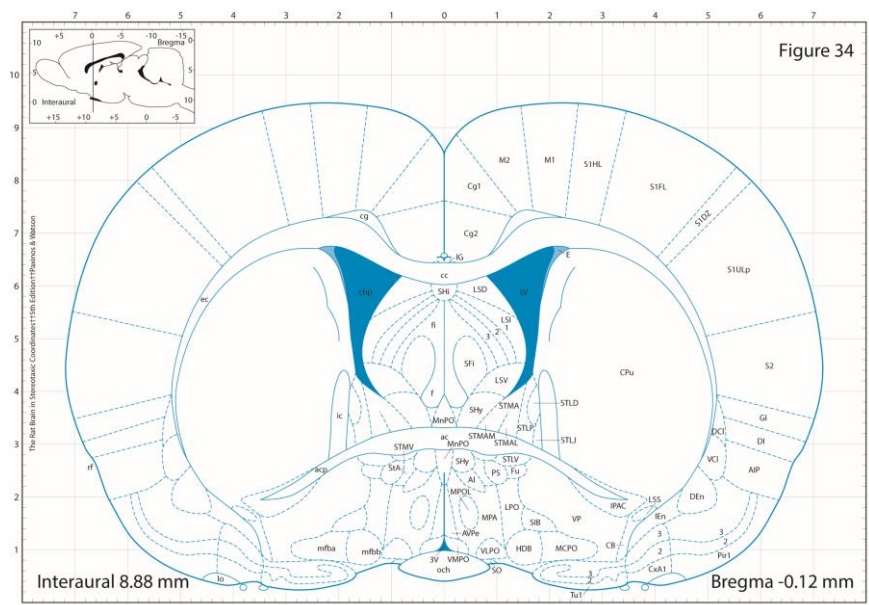
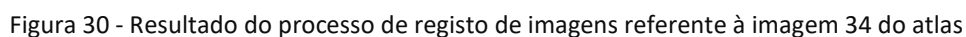


Figura 29 - Imagem 34 do atlas. Retirada de (Paxinos & Watson, 2007)

Observando estas duas imagens iniciais do processo de registo, podemos identificar que talvez o maior desafio do processo será realizar a rotação para que as estruturas de ambas as imagens correspondam da forma mais exata possível. Passamos então para a observação do



Em suma, é possível perceber que com a utilização desta linha de processos é possível alcançar bons resultados relativamente às linhas exteriores das estruturas das imagens microscópicas com a sua representação nas imagens respetivas do atlas. O que faz bastante sentido já que os coeficientes de deformação utilizados na imagem do atlas são originados pela realização do registo das máscaras de ambas as imagens onde apenas é possível observar a diferença entre o fundo e a estrutura. Adicionalmente, podemos concluir que antes de o

processo iniciar devem ser analisados diferentes fatores, como o declive do corte da estrutura da imagem microscópica, a presença de estruturas adicionais no momento da realização das fotografias de microscopia, bem como a proporção de ambas as imagens, pois todos estes aspetos podem fazer com que o resultado obtido não seja o mais desejado ao fim de realizar todos os processos desenvolvidos e explicados nesta dissertação.

# **5 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**

## 5.1 DISCUSSÃO

Esta secção tem como foco discutir os resultados obtidos com a realização de todos os processos desenvolvidos ao longo desta dissertação. Para chegar a este objetivo, o melhor método de análise neste caso será a utilização de um estudo semelhante, comparando os resultados obtidos nos dois casos e perceber quais as principais diferenças que trazem os dois métodos apresentados.

Desta forma, iremos usar um estudo (Das & Bhattacharya, 2011) sobre o cérebro de um ser humano em que o registo de imagens seja efetuado de forma semelhante, ou seja, usando imagens diferentes. No caso do ser humano, para executar o registo de imagens com mútua informação é normalmente usado dois tipos de imagens obtidas por procedimentos diferentes, com a tentativa de fazer com que os pontos fortes de ambos os métodos serem conjugados.

Utilizando imagens do cérebro de um ser humano obtidas pelos processos de ressonância magnética e tomografia computadorizada, é usado o método de registo por deformação denominado de transformação *affine* para uma aplicação nas diferentes imagens correspondentes à região ventricular do cérebro em questão. Os resultados presentes na figura 31 são obtidos usando dois algoritmos diferentes, o GA (*General Algorithm*) e o PSO (*Particle Swarn Optimization*)(Das & Bhattacharya, 2011).

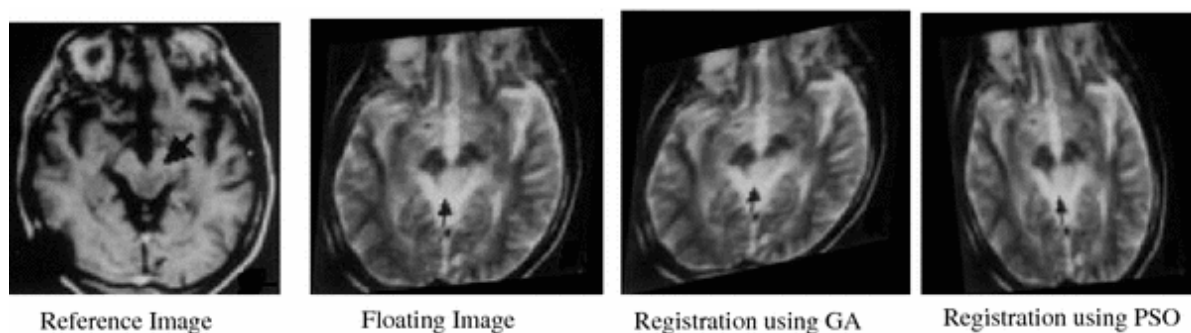


Figura 31 - Imagens de referência e transformações da segunda imagem usando os algoritmos de registo GA e PSO. Adaptada de (Das & Bhattacharya, 2011)

Neste caso a decisão da melhor forma de realizar o registo das duas imagens é comparado usando a métrica da correlação entre a imagem fixa e a imagem que é deformada através dos algoritmos GA e PSO. No nosso caso como não possuímos nenhum método quantitativo dos resultados obtidos resta a opção de comparação visual para perceber se os nossos resultados se encontram muito diferentes dos obtidos neste artigo.

Assim sendo, comparando as imagens transformadas com a imagem de referência é possível observar que os limites exteriores da estrutura não se encontram tão bem alinhados como no caso das imagens produzidas pelos processos usados nesta dissertação. Outro fator a ter em conta na análise das imagens é o alinhamento das estruturas presentes nas imagens, no caso destas imagens é possível denotar que algumas estruturas estão relativamente alinhadas, já no caso da dissertação depende um pouco de como as estruturas se encontram na imagem histológica.

Em suma, o procedimento utilizado neste estudo produz resultados mais focados nos pontos que permitem realizar a relação entre elementos comuns das duas imagens, ao contrário desta dissertação em que os métodos usados geram uma imagem com um alinhamento sobre a borda da estrutura presente na imagem e não sobre as partes específicas da estrutura.

## 5.2 CONCLUSÃO

A análise de qualquer tipo de dados é parte fundamental dos projetos associados, por isso mesmo, cada vez mais existem ferramentas que nos auxiliam a manipular os diferentes tipos de dados que estamos a processar. Apesar disto ainda existem tipos de dados novos ou mesmo muito específicos em que estas ferramentas não podem ajudar de forma tão direta e acessível.

Deste modo, esta dissertação tem por base um problema que existe na análise das imagens histológicas retiradas de um cérebro de rato sob a forma de secção coronais. Este problema está relacionado com o facto de a análise destas imagens ser puramente visual tendo apenas como auxílio a imagem de um atlas. Apesar de haver este suporte pelo atlas, a representação esquemática não referencia de forma automática os componentes presentes na imagem microscópica, pelo que esta associação também necessita de ser realizada de forma visual e, se for necessária, delimitada manualmente.

Depois de analisar todos os desafios que provinham das imagens originais foi necessário estudar como relacionar ambas as imagens de forma a solucionar o problema apresentado. Utilizando uma ferramenta, o ImageJ, como auxílio e algumas bibliotecas de Python, foi possível alcançar um resultado que, apesar de possuir algumas condições sobre as imagens originais para produzir bons resultados, permite alcançar e cumprir os objetivos de auxílio na

observação nestas imagens e, desta maneira, acelerar os estudos relacionados com este tipo de seres vivos. O método desenvolvido pode ser encontrado num repositório online<sup>3</sup>, que para além do script do método desenvolvido, ainda contem todas as imagens do atlas no formato que foi utilizado para o processo de registo das imagens.

### 5.3 TRABALHO FUTURO

Como trabalho futuro, seria importante incorporar uma forma de corrigir alguns dos erros humanos associados ao corte das secções deste pequeno cérebro de rato através da possível divisão dos dois tipos de imagens em metades ou mesmo quadrantes, para resolver o problema associado ao declive formado pelo corte e ser possível associar cada subimagem à respetiva subimagem do atlas, podendo estas corresponderem a diferentes secções. Adicionalmente, para tornar este processo ainda mais autónomo, seria criar uma forma de calcular a similaridade entre as imagens do atlas e as imagens da estrutura de modo a proceder à atribuição da imagem do atlas correspondente de modo automático.

---

<sup>3</sup> <https://github.com/6Hunter/Procesamento-de-imagens>

# REFERÊNCIAS

- A stereotaxic atlas of the albino mouse forebrain. (1979). *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 11(6), 750. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(79\)90284-3](https://doi.org/10.1016/0091-3057(79)90284-3)
- Arganda-Carreras, I., Sorzano, C. O. S., Marabini, R., Carazo, J. M., Ortiz-De-Solorzano, C., & Kybic, J. (2006). Consistent and elastic registration of histological sections using vector-spline regularization. *Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*, 4241 LNCS, 85–95. [https://doi.org/10.1007/11889762\\_8/COVER](https://doi.org/10.1007/11889762_8/COVER)
- Contrast Adjustment with scikit-image – Data, Science, Energy*. (sem data). Obtido 11 de Outubro de 2023, de <https://danielmuellerkomorowska.com/2020/06/27/contrast-adjustment-with-scikit-image/>
- Cosgrove, K. P., Mazure, C. M., & Staley, J. K. (2007). Evolving Knowledge of Sex Differences in Brain Structure, Function and Chemistry. *Biological psychiatry*, 62(8), 847. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2007.03.001>
- Das, A., & Bhattacharya, M. (2011). Affine-based registration of CT and MR modality images of human brain using multiresolution approaches: Comparative study on genetic algorithm and particle swarm optimization. *Neural Computing and Applications*, 20(2), 223–237. <https://doi.org/10.1007/S00521-010-0374-8/TABLES/8>
- Dorr, A. E., Lerch, J. P., Spring, S., Kabani, N., & Henkelman, R. M. (2008). High resolution three-dimensional brain atlas using an average magnetic resonance image of 40 adult C57Bl/6J mice. *NeuroImage*, 42(1), 60–69. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROIMAGE.2008.03.037>
- Esteves, M., Almeida, A. M., Silva, J., Silva Moreira, P., Carvalho, E., Pêgo, J. M., Almeida, A., Sotiropoulos, I., Sousa, N., & Leite-Almeida, H. (2019). MORPhA Scale: Behavioral and electroencephalographic validation of a rodent anesthesia scale. *Journal of Neuroscience Methods*, 324, 108304. <https://doi.org/10.1016/J.JNEUMETH.2019.05.013>
- Kumazawa-Manita, N., Katayama, M., Hashikawa, T., & Iriki, A. (2013). Three-dimensional reconstruction of brain structures of the rodent *Octodon degus*: A brain atlas constructed by combining histological and magnetic resonance images. *Experimental Brain Research*, 231(1), 65–74. <https://doi.org/10.1007/S00221-013-3667-1/FIGURES/5>

- Kutty, S. B., Rahmat, R. W. O. K., Kassim, S., Madzin, H., & Hamdan, H. (2015). A Review of 3D Reconstruction of Coronary Arteries Based on the Co-registration of IVUS and Coronary Angiogram. *Proceedings - 2014 International Conference on Computer Assisted System in Health, CASH 2014*, 1–5. <https://doi.org/10.1109/CASH.2014.21>
- Leite-Almeida, H., Guimarães, M. R., Cerqueira, J. J., Ribeiro-Costa, N., Anjos-Martins, H., Sousa, N., & Almeida, A. (2014). Asymmetric c-fos expression in the ventral orbital cortex is associated with impaired reversal learning in a right-sided neuropathy. *Molecular Pain*, 10(1). [https://doi.org/10.1186/1744-8069-10-41/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1186\\_1744-8069-10-41-FIG3.JPEG](https://doi.org/10.1186/1744-8069-10-41/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1186_1744-8069-10-41-FIG3.JPEG)
- Maintz, J. B. A., & Viergever, M. A. (1998). A survey of medical image registration. *Medical Image Analysis*, 2(1), 1–36. [https://doi.org/10.1016/S1361-8415\(01\)80026-8](https://doi.org/10.1016/S1361-8415(01)80026-8)
- Nie, B., Chen, K., Zhao, S., Liu, J., Gu, X., Yao, Q., Hui, J., Zhang, Z., Teng, G., Zhao, C., & Shan, B. (2013). A rat brain MRI template with digital stereotaxic atlas of fine anatomical delineations in paxinos space and its automated application in voxel-wise analysis. *Human Brain Mapping*, 34(6), 1306–1318. <https://doi.org/10.1002/HBM.21511>
- Orczyk, C., Rusinek, H., Rosenkrantz, A. B., Mikheev, A., Deng, F. M., Melamed, J., & Taneja, S. S. (2013). Preliminary experience with a novel method of three-dimensional co-registration of prostate cancer digital histology and in vivo multiparametric MRI. *Clinical Radiology*, 68(12), e652–e658. <https://doi.org/10.1016/J.CRAD.2013.07.010>
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates*.
- Paxinos, G., Watson, C., Pennisi, M., & Topple, A. (1985). Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. *Journal of Neuroscience Methods*, 13(2), 139–143. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90026-3](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90026-3)
- Sankur, B. (2004). Survey over image thresholding techniques and quantitative performance evaluation. *Journal of Electronic Imaging*, 13(1), 146. <https://doi.org/10.1117/1.1631315>
- Sengupta, D., Gupta, P., & Biswas, A. (2022). A survey on mutual information based medical image registration algorithms. *Neurocomputing*, 486, 174–188. <https://doi.org/10.1016/J.NEUCOM.2021.11.023>

- Stille, M., Smith, E. J., Crum, W. R., & Modo, M. (2013). 3D reconstruction of 2D fluorescence histology images and registration with in vivo MR images: Application in a rodent stroke model. *Journal of Neuroscience Methods*, 219(1), 27–40. <https://doi.org/10.1016/J.JNEUMETH.2013.06.003>
- Swanson, L. W., Building, N., & 428, R. (2018). Brain maps 4.0—Structure of the rat brain: An open access atlas with global nervous system nomenclature ontology and flatmaps. *Journal of Comparative Neurology*, 526(6), 935–943. <https://doi.org/10.1002/CNE.24381>
- Terasaki, L. S., & Schwarz, J. M. (2017). Impact of Prenatal and Subsequent Adult Alcohol Exposure on Pro-Inflammatory Cytokine Expression in Brain Regions Necessary for Simple Recognition Memory. *Brain Sciences*, 7(10). <https://doi.org/10.3390/BRAINSCI7100125>
- Van Der Walt, S., Schönberger, J. L., Nunez-Iglesias, J., Boulogne, F., Warner, J. D., Yager, N., Gouillart, E., & Yu, T. (2014). Scikit-image: Image processing in python. *PeerJ*, 2014(1). <https://doi.org/10.7717/PEERJ.453>
- Wan, R., & Li, M. (2003). An overview of medical image registration. *Proceedings - 5th International Conference on Computational Intelligence and Multimedia Applications, ICCIMA 2003*, 385–390. <https://doi.org/10.1109/ICCIMA.2003.1238156>
- Welniak-Kaminska, M., Fiedorowicz, M., Orzel, J., Bogorodzki, P., Modlinska, K., Stryjek, R., Chrzanowska, A., Pisula, W., & Grieb, P. (2019). Volumes of brain structures in captive wild-type and laboratory rats: 7T magnetic resonance in vivo automatic atlas-based study. *PLOS ONE*, 14(4), e0215348. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0215348>
- Wyawahare, M. v., Pradeep M. Patil, & Hemant K. Abhyanka. (2009). Image registration techniques: an overview. *academia.edu*. <https://www.academia.edu/download/49405929/2.pdf>
- Yamori, Y., Horie, R., Handa, H., Sato, M., & Fukase, M. (1976). Pathogenetic similarity of strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans. *Stroke*, 7(1), 46–53. <https://doi.org/10.1161/01.STR.7.1.46>

Zhao, D. xin. (2014). A method for brain 3D surface reconstruction from MR images. *Optoelectronics Letters*, 10(5), 383–386. <https://doi.org/10.1007/S11801-014-4076-9>/METRICS