



Método de Quantificação de Cores Tonais por Computador para Aplicações Biológicas

Relatório Final F-590 A – Iniciação Científica

Aluno: Valquer José Lagosta Filho
Aluno de Graduação do IFGW
e-mail: valquer@fcm.unicamp.br

Orientador: Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini
Pesquisador médico associado da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP – FCM
Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular
e-mail: franchin@obelix.unicamp.br

Hortolândia, 12 de Junho de 2003.

Introdução

Análises estruturais e funcionais de células e tecidos é fato comum em um grande número de campos na biologia.

Nesse contexto a microscopia ótica tem se tornado absolutamente essencial na pesquisa biomédica moderna. Uma aproximação morfológica nos permitirá diferenciar os elementos intersticiais quanto quanto os celulares contidos em órgãos e tecidos, mas também em associação com marcações específicas usando-se anticorpos e sondas de oligonucleotídeos nos permite avaliar aspectos funcionais que incluem expressões gênicas e proteicas em locais específicos no interior celular.

Todavia a maior limitação das imagens oriundas da microscopia reside no fato de que são apenas qualitativas, o que gera informações claramente subjetivas. Investigações quantitativas de amostras celulares e de tecidos têm sido realizadas desde que ferramentas morfométricas apropriadas tornaram-se acessíveis (Weibel).

Seções aleatórias de espécimes médicos, ou biológicos (comumente de seções microscópicas) são ainda analisados de maneira mais frequente por meio de contagem individual de estruturas específicas pela superposição de simples grades de teste transparentes similares aos papéis milimetrados usados em gráficos, sendo que as intersecções das estruturas de interesse com as linhas de teste são contadas (características das estruturas de interesse são contadas).

Métodos aritméticos simples são então usados para se estimar a quantidade de material presente em duas e três dimensões. Todavia, embora esse método seja largamente utilizado para se estimar quantidades de material, o maior problema enfrentado por aqueles que dele fazem uso, seja para quantificar diferenças, tais como, número de células fibrose e expressão gênica por análise de imagens é o tempo consumido e a necessidade de pessoal altamente especializado para realizar tais contagens.

Embora existam softwares que auxiliem nesse ponto, esses ou são de difícil utilização demandando pessoal altamente qualificado para sua utilização, exigem a perda de informação das imagens, ou então são extremamente caros quando disponíveis comercialmente. Como um exemplo de software disponível temos o NIH-Image, um dos mais populares softwares não-comerciais para análise digital que em seu uso exige que todas as imagens sejam convertidas em tons de cinza (8 Bits) antes de realizar qualquer análise, isso limita a qualidade da análise, pois diminui a quantidade de informação da imagem.

Tendo isso em vista decidimos desenvolver um software que nos possibilitasse uma análise rápida, amigável e confiável da área de tecido, ou estruturas celulares corados.

MÉTODOS

Todos os componentes do Software de Análise e Processamento Digital foram desenvolvidos usando-se o compilador Delphi versão 6, o que nos possibilitou a geração de um arquivo executável único e independente de bibliotecas do sistema, além da característica intrínseca do Delphi de gerar executáveis com altíssima performance em termos de estabilidade, aliada a grande velocidade de execução, e baixo consumo de memória e recursos do sistema.

O desenvolvimento foi feito objetivando-se a plataforma Windows[®] de 32 Bits por causa da grande plataforma de hardware existente nos laboratórios de estudos médicos e biológicos, e por causa da familiaridade das pessoas com o sistema operacional proprietário da Microsoft[®].

Uma versão em GNU/Linux foi aventada como passo futuro da evolução natural do software, mas a inexistência de um compilador eficiente para a plataforma POSIX limitou o projeto. Tentou-se ainda o uso do Kylix, um clone do Delphi da Borland[®] para o GNU/Linux, mas as bibliotecas gráficas de manipulação de pixels não suportavam as características necessárias à compilação do programa. Além disso todo software gerado no Kylix necessita do compilador e suas bibliotecas instaladas no computador, e isso deve ser específico para cada distribuição de GNU/Linux existente, sendo que essas bibliotecas exigem um espaço em disco mais de 160 megas. Isso vai de encontro ao nosso objetivo inicial de gerar um programa pequeno e independente.

Poder-se-ia ainda usar um compilador que gerasse uma GUI ao usuário, tal como o GTK do GNOME, ou o Python mas a dificuldade de se programar nessas linguagens tornaria o tempo de desenvolvimento proibitivo para a feitura do projeto dentro do prazo estipulado de um semestre. De posse de todos esses dados optamos pela plataforma Windows[®].

Além disso foi escolhido o Inglês americano como o idioma padrão de desenvolvimento do programa para facilitar o uso pela comunidade internacional.

Desenvolveu-se então um software com as características necessárias a uma ferramenta laboratorial para a análise de cores e sua quantificação em imagens digitais.

O programa então chamado de LGMC-IMAGE (Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology – Image), usou de um artifício interessante para a análise de imagens. O programa imitou o olho humano, pois, ao invés de mecanismos tradicionais de determinação de cores em sistemas digitais que se baseiam em códigos hexadecimais exatos, ou mesmo em códigos RGB puros que buscam a exatidão numérica dos dados, o algoritmo interno do LGMC-IMAGE possui

leves traços de percepção tonal para cores que imitam a percepção humana das cores. Isso permite que se efetue análises digitais com características inerentes às analógicas, tendo como base uma margem de erro controlada pelo utilizador. Com esse mecanismo o tempo de análise de uma determinada cor numa imagem digital se dá em 2 ou 3 segundos.

O programa possui ainda uma capacidade limitada de gravar novas análises solicitadas pelo usuário, essas são denominadas “Color Events”, e são um notável incremento na automação laboratorial.

Isto seria similar a uma “macro”. Mas, com um código de otimização gerenciando as ações gravadas.

O software desenvolvido processa imagens com 256 cores, ou mais, e opera com os seguintes formatos: Windows BitMap (BMP), Jpeg e TIFF 6.0. Salva imagens em formato BMP e as exporta em formato WMF.

O fato de não salvar as imagens em formato Jpeg foi ignorado propositadamente, sendo que a rotina de salvamento foi desenvolvida e posteriormente abandonada, pois, a compressão pertinente ao formato altera os tons das cores a um nível que o mecanismo interno do LGMC-IMAGE não consegue manter a exatidão, mas isso é válido apenas para imagens salvas pelo LGMC-IMAGE e no caso em que uma nova quantificação seja solicitada nessa mesma imagem após salva. Embora essa possibilidade seja remota o código foi extirpado do programa para evitar eventuais perdas de dados confiáveis.

A interface do programa consiste de um único painel dividido em quatro áreas de instrumentos virtuais denominados: 1. Viewer Space, 2. fast functions control, 3. results space e 4. adjust controls. O último ativa dois painéis ocultos com funções mais avançadas e de parâmetros de ajustes e calibração do programa.

O desenvolvimento e testes foram feitos num Pentium III de 450 MHz, sendo que o programa poderá rodar em hardware mais lento, mas com sensível degradação do desempenho, devido ao fato de que o processamento de imagens demanda um grande processamento de dados.

O programa foi feito para trabalhar com uma resolução mínima de 1024 x 768 pixels, com uma placa de vídeo com capacidade de manter 16 bits de cor.

Isso pode parecer muito, mas deve ser tido em conta que o programa se destina ao processamento de imagens e neste caso a resolução conta, pois, quanto maior a resolução, maior a imagem a ser processada.

Um fato interessante a ser dito é que o programa não faz uso de drivers OpenGL, presentes nas modernas placas aceleradoras, logo o que definirá o desempenho do programa é a velocidade de processamento da CPU.

Na figura a seguir (Fig. 1) temos a interface do programa com uma imagem de tecido cardíaco humano corado, possuindo os miócitos cor vermelho-púrpura e o interstício cor azulada.

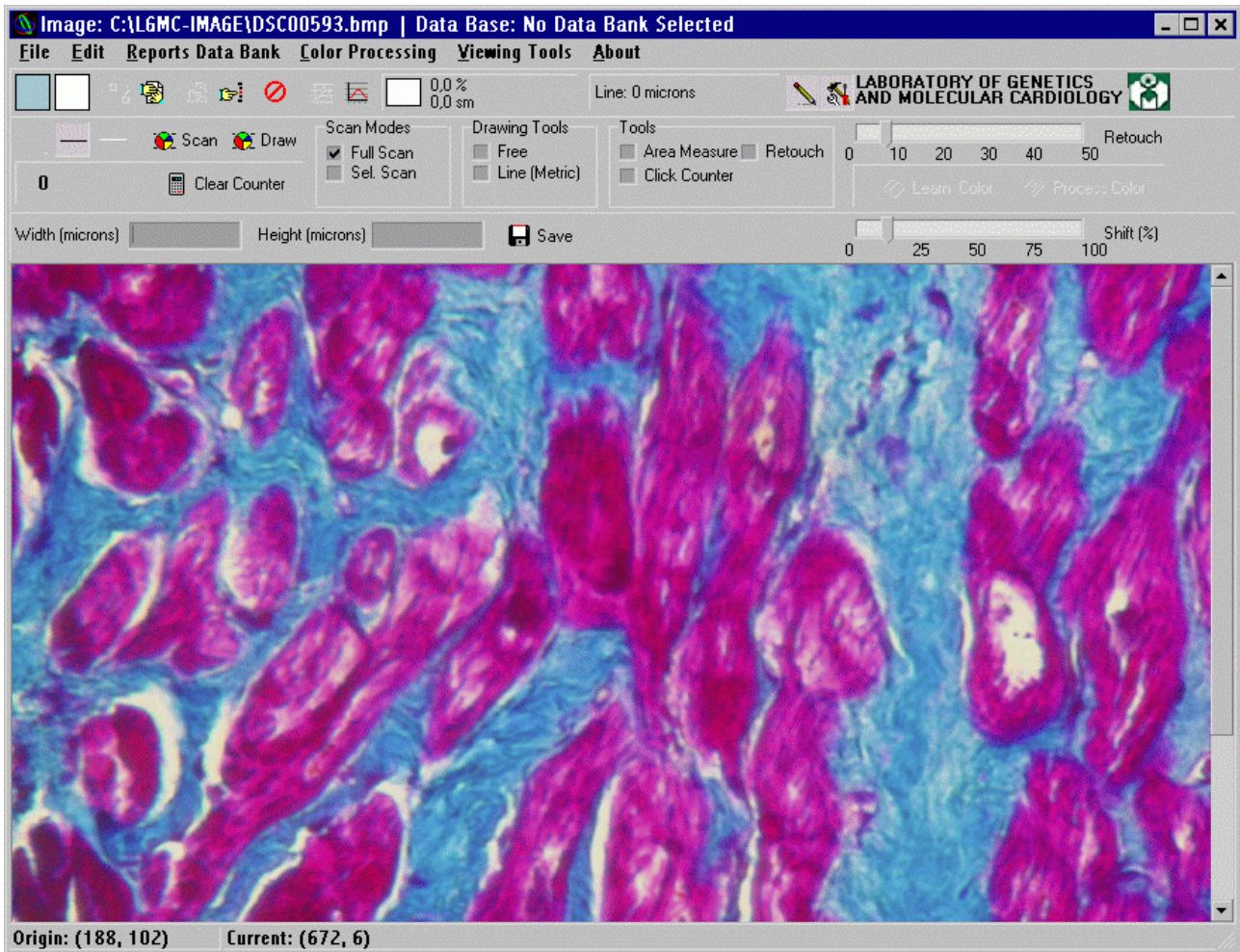


Figura 1 – Interface do Programa

O algoritmo de trabalho do programa é mostrado na Fig. 2, e seu funcionamento é o seguinte. A imagem é carregada em uma matriz de pixels na RAM contendo seus valores RGB, isso garante velocidade de processamento e a garantia de manutenção e preservação do arquivo original. Uma matriz de orientação é gerada para criar uma malha de referência que possibilitará a manipulação de cada elemento da matriz dos elementos da imagem, que são determinados individualmente pelos pixels da imagem original.

O programa foi desenvolvido de modo a permitir uma mudança definida pelo usuário de um valor de RGB escolhido pelo usuário em uma cor padrão que pode ser utilizada para calcular as áreas fracionada e absoluta pela cor, ou cores de interesse na imagem.

Para isso os atributos RGB de um pixel selecionado pelo usuário são extraídos e então uma matriz de cores tonais é gerada (espectro digital) baseada num erro definido pelo usuário. Esta

matriz é carregada em memória volátil para uma análise sistemática comparativa do conjunto formado por todos os pixels restantes da imagem. Todo e qualquer pixel coincidente com os valores da matriz de referência será considerado válido e terá sua cor alterada para uma cor padrão (verde-oliva).

Todos os pixels processados são então computados e transformados em áreas fracional e absoluta.

O programa pode ser executado no Windows 95, 98, Me, NT, 2000 e XP, e necessita ao pelo menos de um processador Pentium 233 MHz, 32 MRAM, e de uma placa de vídeo com 2 megas, aliado a um monitor com capacidade de exibição de 1024 x 768 pixels de resolução de vídeo com 16 bits de profundidade de cor.

Sendo que um processamento satisfatório será obtido a partir de um Pentium III 450 MHz, com 256 MRAM e resolução de vídeo de 1152 x 864 pixels com profundidade de cor de 32 bits.

O esquema geral do LGMC-IMAGE consiste de um painel principal no qual o usuário poderá selecionar quais tarefas a realizar. O menu principal consiste no conjunto das principais funções a serem usadas para a seleção de determinada cor tonal a partir de um determinado erro por uma cor pré-definida.

O procedimento pode ser repetido para que se incluam áreas de interesse não inclusas na detecção inicial. Isto pode ser feito repetindo-se a detecção de cor pela escolha de um novo tom da cor desejada com um erro definido (Color Shift), ou então se reprocessar o mesmo pixel pelo incremento do erro tonal (Color Shift). Outros comandos pertencentes ao painéis ocultos podem ser usados para se desenhar sobre a imagem para se realizar medidas de estruturas, áreas e seleção de partes específicas da imagem para uma análise mais específica.

Pode-se ainda criar máscaras para excluir marcações não específicas, colocar os resultados da análise sobre a própria figura, gerar uma imagem de tons de cinza preservando as cores processadas, manipular bancos de dados e exportar resultados de análises diretamente para o Excel em forma de planilha e contar estruturas específicas.

Qualquer dúvida sobre a função de cada botão pode ser respondida mantendo-se o cursor do mouse sobre o botão durante alguns instantes, isso fará surgir uma caixa contendo uma pequena descrição do botão, notadamente seu nome, mas isso já é suficiente para saber sua função.

O programa possui ainda um tutorial farto de imagens e exemplos de utilização. Esse tutorial foi desenvolvido para que todo o usuário com capacidades básicas em informática pudesse tirar proveito máximo do LGMC-IMAGE.

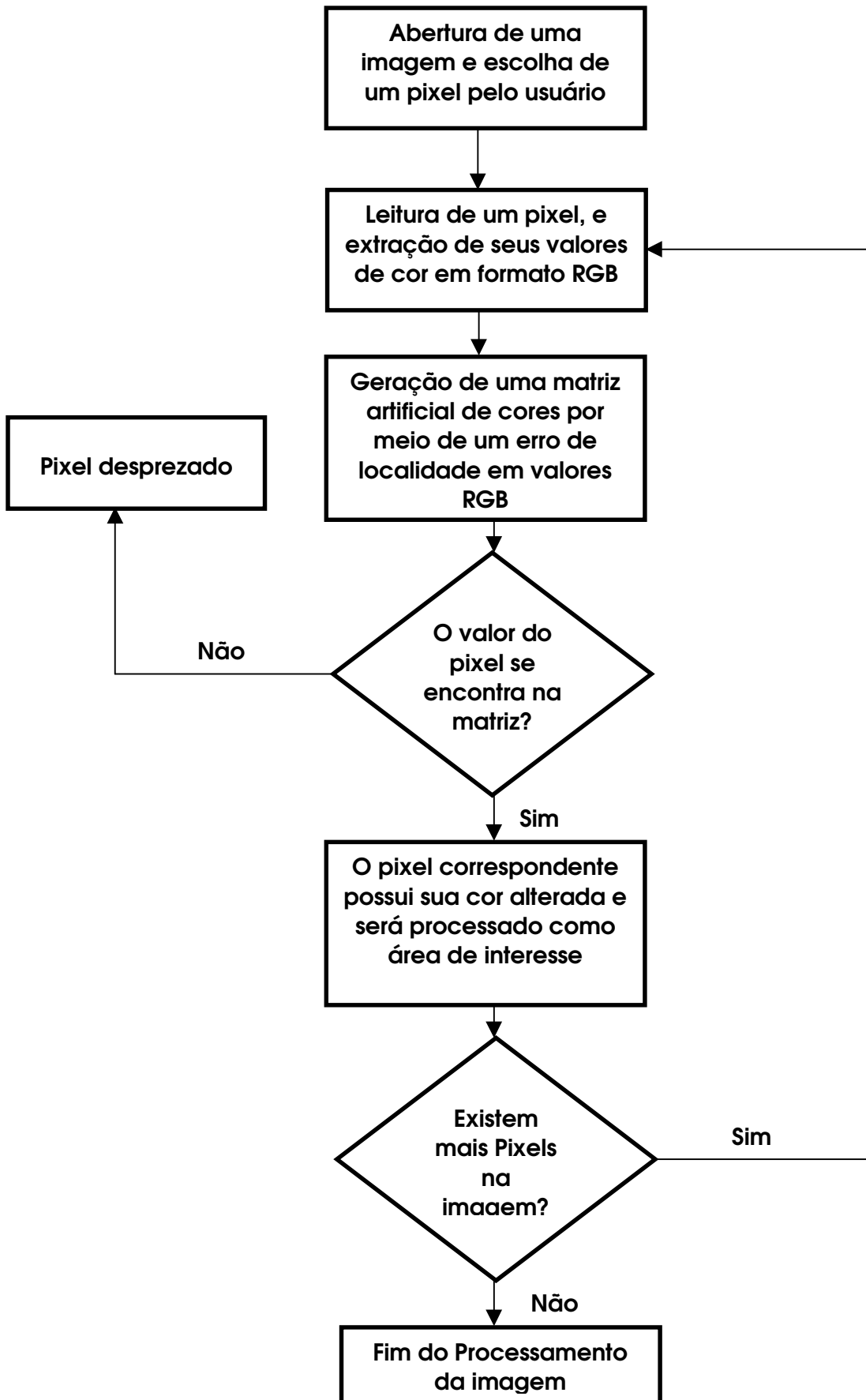


Figura 2 – Algoritmo do Programa

AMOSTRAS HISTOLÓGICAS

A validação do software LGMC-IMAGE foi desenvolvida em 1) Amostras obtidas a partir de biópsias endomiocárdicas obtidas durante cirurgia cardíaca para reconstrução geométrica do ventrículo esquerdo após infarto miocárdico e então coradas com tricromo de Masson, e 2) Amostras do LDH-Receptor +/- aorta preparadas para imunohistoquímica com anticorpos contra óxido nítrico sintase 3 (NOS3). Procedimentos para imunohistoquímica foram realizados como descrito antes (12). Os ventrículos foram fixados com paraformaldeído a 4% e postas em parafina. Seções finas foram incubadas com anticorpos primários (1:75) seguido por uma incubação com peroxidase conjugada com anticorpos secundários (1:100). As amostras de tecido foram então coradas pela reação de diaminobenzidina com H₂O₂. A especificidade do anticorpo negativo foi testada em séries de sete medidas de controles positivos e negativos. As imagens foram então capturadas por uma câmera digital de alta resolução SONY Cybershot DSC-S75 (Japan) conectada a um microscópio ótico (Leica DM IL, Wetzlar Germany) usando imersão em óleo com amplificação final para todas as amostras de X1440. As imagens foram então transferidas para um computador pessoal e salvas em formato bitmap para análise posterior.

ANÁLISE DE DADOS E ESTATÍSTICA

As amostras foram examinadas em três ocasiões diferentes por meio de dois observadores que desconheciam os resultados um do outro. Ambos os observadores analisaram imagens usando o LGMC-IMAGE e o sistema de manual da grade estatística. A análise foi realizada em sessenta campos microscópicos aleatórios corados com tricromo de Masson e imunohistoquímica. Após isso uma análise de regressão linear por meio de um gráfico, para testar a habilidade do software reproduzir os dados gerados pela análise manual.

RESULTADOS

Comparação entre as Contagens manual e assistida por Software

Para validar a habilidade da análise assistida por software produzir contagens precisas de imagens de estruturas, nós primeiro comparamos os resultados obtidos pela contagem manual com aqueles obtidos pela análise assistida por software de amostras de tecido estromal de miocardios humanos (Fig. 1) obtidas por biópsia intra-operativa e coradas com tricromo de Masson.

Uma comparação das contagens manual e assistida por software revelou uma boa correlação entre os métodos. As contagens por software retornaram contagens com resultados comparáveis aos obtidos pela contagem manual, mas com uma variação muito menor. Pelo fato das amostras de

tecidos de miocárdio humano uma área fracional relativamente grande de tecido corado nós realizamos em seguida análises com amostras de aorta obtidas por LDL-Receptor -/- alimentadas com dieta hipercolesteróica e preparados para 8 imunohistoquímica com anticorpo anti-NOS1.

Esses experimentos caracteristicamente geraram uma característica de coração mais discreta, localizada em pontos específicos da aorta de rato, tal como no espaço sub-intimal a na camada mediana. Como mostrado na figura 3, a contagem assistida por software da coração imunohistoquímica também demonstrou uma boa correlação com as contagens manuais de áreas especificamente coradas com anticorpo anti-NOS1.

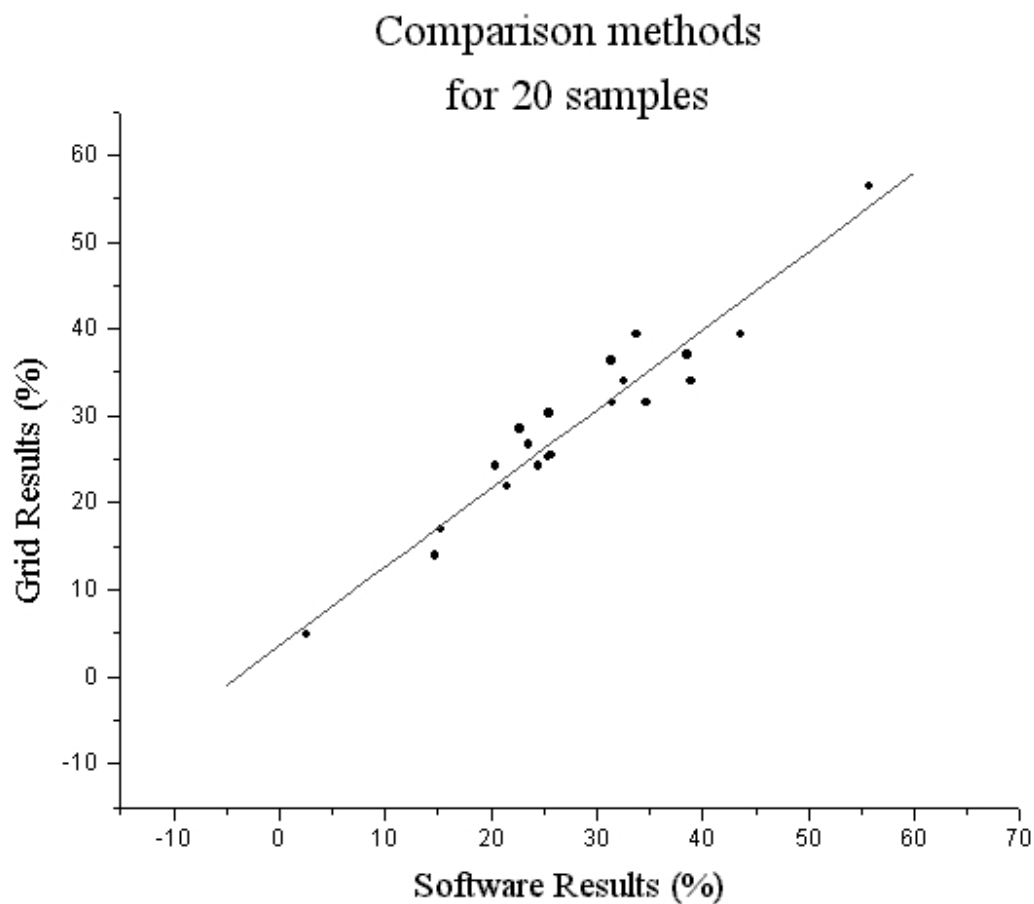


Figura 3 – Gráfico de Comparação entre os métodos manual e por software

Reprodutibilidade das contagens manual e assistida por software

A reprodutibilidade da contagem de área fracional usando-se o software e a contagem manual foram testadas usando-se imagens obtidas de 15 seções histológicas distintas de LDL-Receptor -/- aorta.

A área racional corada com anticorpo anti-NOS1 foi contada em 30 imagens diferentes por dois indivíduos, sendo cada imagem posta em triplicata. As variações intra e inter-pessoal são dadas na Tabela 1. Os mesmos indivíduos também quantificaram a área fracional em seções usando o programa de computador. Os resultados desses métodos mostraram uma boa correlação entre os métodos, contudo houve uma variação muito maior quando a análise foi realizada pelo modo manual.

Tabela 1 – Variação Inter e Intra-pessoal nas quantificações manuais e assistida por software.

	Manual	Software
Intra-pessoal (%)	4.6	1.0
Inter-pessoal (%)	9.8	1.8

UTILIZAÇÃO

A ANÁLISE DE IMAGENS

Existem dois modos distintos de análise para se analisar uma imagem o Padrão e o automático.

O MODO PADRÃO

Para uma análise no modo padrão devemos escolher um ponto de imagem com a cor desejada a partir de um clique de mouse e em seguida acionamos o botão “Start Color Search” no painel principal, ou então clicarmos no botão direito do mouse e escolhermos a função “Start” no Pop menu que surgirá. Na figura 3.a é mostrado o resultado dessa ação, nota-se que o programa coloriu grande parte do azul, mas no entanto ainda existem áreas azuis deixadas para trás. Isso acontece por que a barra de controle de erro “Error Color Shift” está em seu padrão de 12.5%, esse

valor é importante, pois é ele que informa ao algoritmo inteligente do LGMC-IMAGE com qual nível de profundidade ele deve analisar cada pixel da imagem. Se for aumentado o “Erro de Cor” mais área será processada, mas se corre o risco nesse caso do software cometer erros grotescos e processar áreas indevidas. Nas figuras 4.a a 4.d é mostrada uma sequência de quatro cliques de mouse em quatro pontos distintos de azul com tons diferentes, e notamos que o resultado final é o processamento de todo o azul da imagem.

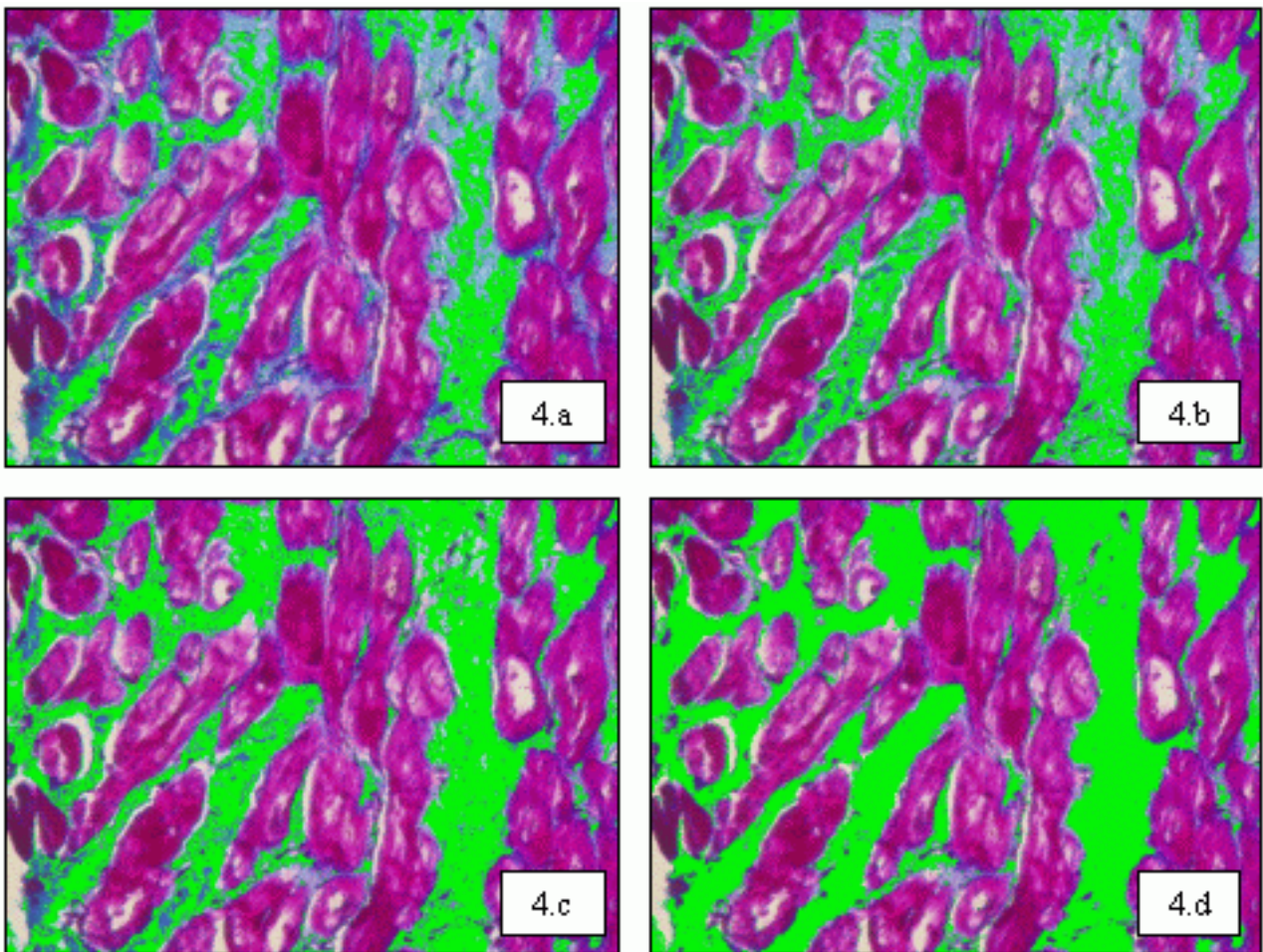


Figura 4. Processo de Varredura de uma Imagem.

Para finalizar a análise basta pressionar o botão “Calculate Result” que o resultado da área processada (marcada em verde) será devolvido em porcentagem da imagem total, ou em unidades quadradas, desde que as dimensões da imagem tenham sido informadas ao programa.

O resultado obtido foi de 32,79%.

Embora o resultado dessa análise tenha sido rápida, sendo efetuada em poucos segundos, algo surpreendentemente mais veloz que o método tradicional de grade estatística, existe um modo ainda mais rápido de análise, o modo automático, que permite otimizar o processo de análise sem a perda de precisão alguma. Nesse modo o usuário trabalha com o que chamamos de “Eventos de Cor”, que é uma maneira de trabalhar completamente diferente do que se encontra em qualquer software de análise de imagem.

Nesse modo o usuário processa apenas uma imagem informando ao programa as atitudes que deve tomar, mas devemos notar que esse processo não é uma simples automação de atitudes, o software toma decisões próprias a respeito de como processa as cores e apresenta os resultados em tela.

O MODO AUTOMÁTICO

Aqui o usuário deve abrir uma imagem de um lote que queira analisar, e em seguida deve criar um “evento de cor”, a partir do Menu “Color Processing”, deve então abrir esse “Evento de Cor” no mesmo Menu. Nesse instante o software está apto a “aprender” a analisar determinada cor. Nota-se, a ativação de dois botões antes bloqueados: “Learn New Color” e “Process New Color”. Sendo que ao lado desses botões é indicado qual evento de cor está sendo utilizado.

O início desse modo é idêntico ao modo padrão sendo que ao final de cada clique de varredura é necessário pressionar o botão “Learn New Color”, e aquela varredura de cores estará armazenada no disco rígido como um padrão de análise. No caso dessa imagem foram efetuados quatro cliques de varredura como mostrado no modo padrão, sendo pressionado o botão “Learn New Color” após cada varredura.

Após a primeira imagem não é mais necessário dar vários cliques de mouse sobre as imagens seguintes, pois, o software conhecerá todas as nuances de cor, que nesse caso são constituídas por uma grande gama de tons de azul. Quando uma nova figura for carregada basta

então pressionar o botão “Processe Know Color”, e pronto, o software analisará a imagem com os mesmos parâmetros que o usuário humano faria. O programa então está imitando as atitudes do usuário que as informou previamente.

Na figura 5, é mostrado um gráfico de comparação entre os modos automático e o padrão.

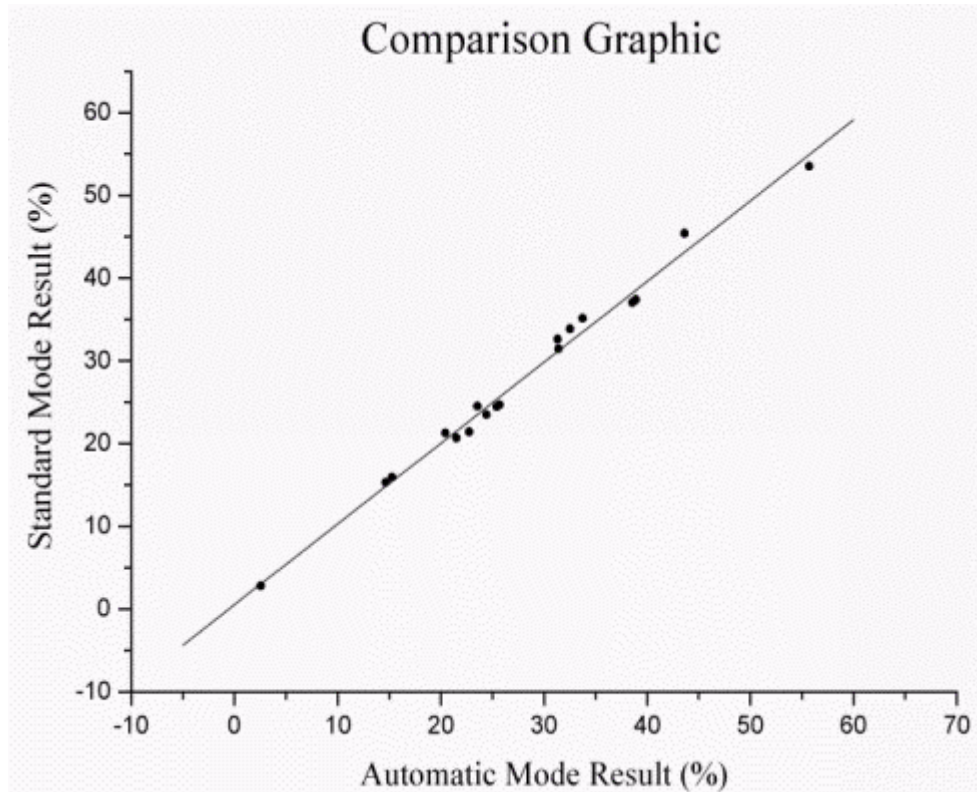


Figura 5 – Comparação entre os modos Manual e Automático.

AJUSTE DO ERRO

Outra maneira de aumentar o desempenho na análise de imagens é modificando o erro de varredura (Fig. 6).

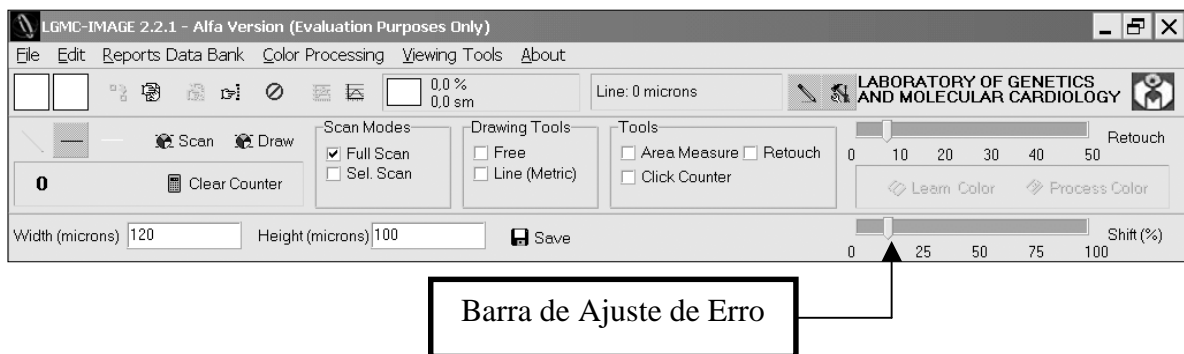


Figura 6 – Controle de Ajuste do Erro.

Modificando o erro de varredura nós estamos modificando o tamanho da matriz de cores artificiais localizada na memória para determinado pixel. Isto seria equivalente a se por uma margem de erro maior, ou menor para a varredura, um erro maior significa uma maior matriz na memória para comparação, um erro menor, uma matriz menor. O valor padrão para o erro de varredura é de 12,5%, que foi definido pelos testes de uso em nosso laboratório, mas isto poderá ser alterado pelo usuário de 0% a 100%.

Aumentando o erro de varredura podemos aumentar em muito a velocidade de processamento final de determinada imagem, mas em contrapartida perdemos precisão em nossa análise, pois áreas com tons errados podem ser incluídas no processamento. Um erro menor aumentará a precisão, mas necessitará de mais intervenções do usuário durante a análise. Na figura a seguir (Fig. 7), vemos 4 varreduras do mesmo pixel com erros distintos.

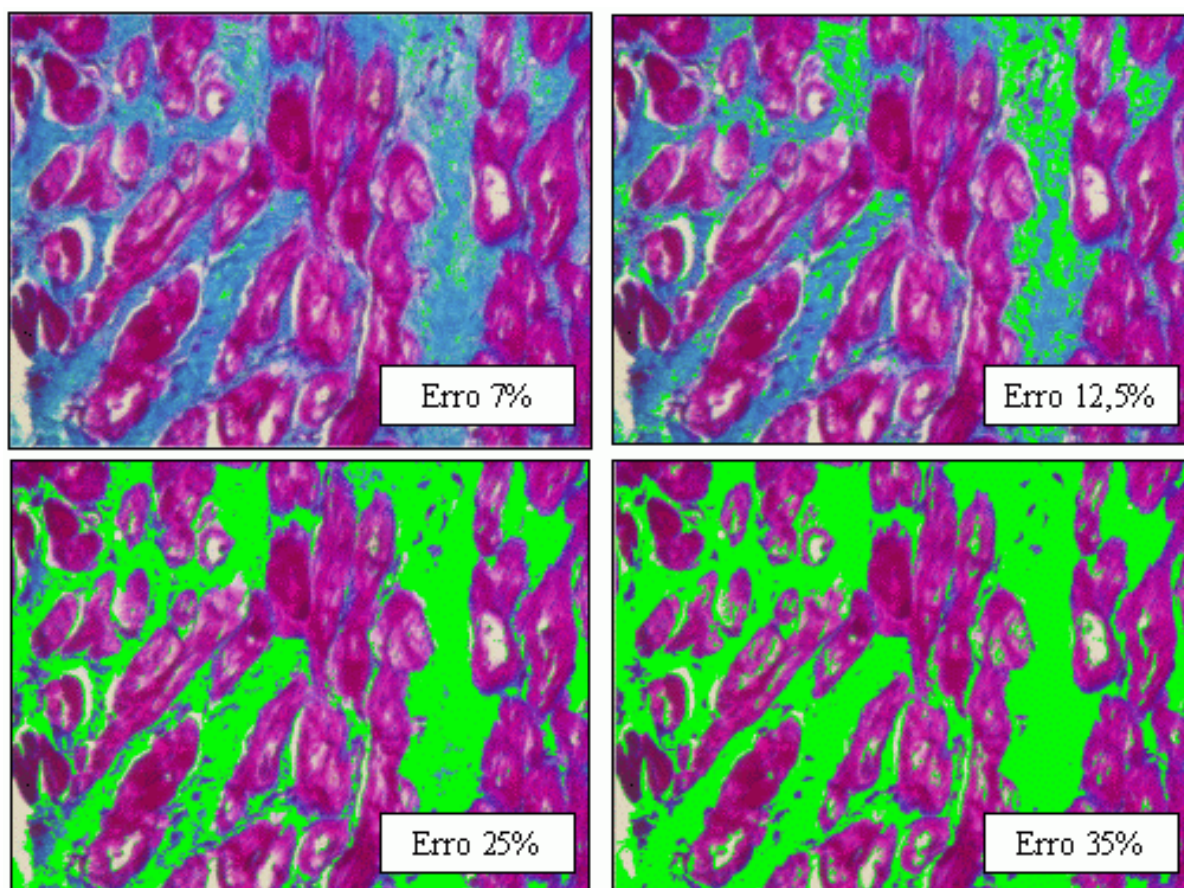


Figura 7 – Efeito da Variação do Erro na Varredura.

OUTRAS CARACTERÍSTICAS

Áreas Seletivas

Essa função permite o processamento de determinadas porções delimitadas pelo usuário da imagem como mostrado na figura a seguir (Fig. 8), isso permite que somente as áreas desejadas sejam processadas.

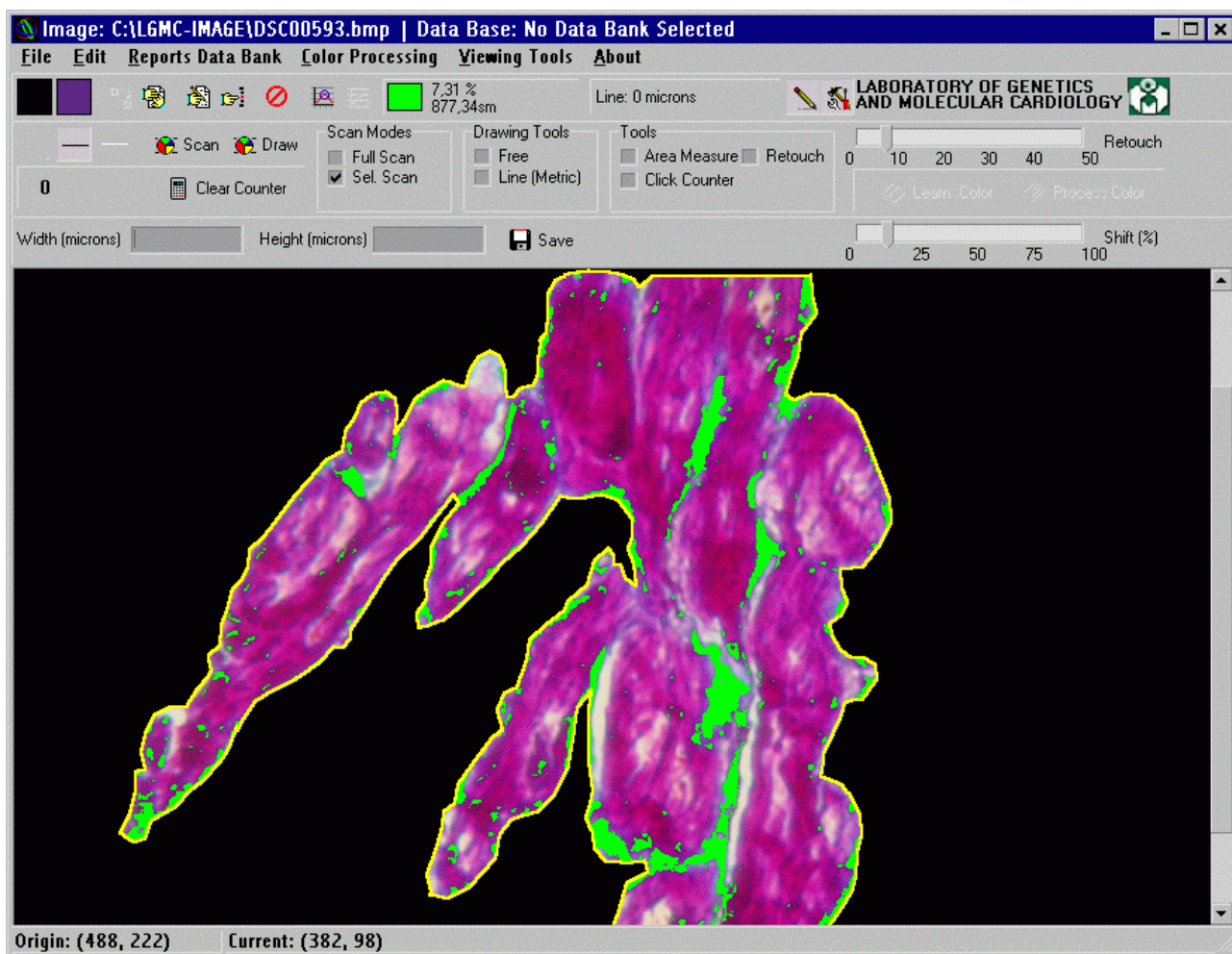


Figura 8 – Processamento da Áreas Específicas.

Sendo que nesse caso somente a área limitada será contada como área total da imagem.

Máscaras e Correções na Imagem

Em amostras biológicas é muito comum a presença de porções não desejadas nas imagens, tais como, corações não específicos, ou estruturas indesejáveis. Para eliminar essas condições desenvolvemos duas ferramentas de correção: Máscara e Retoque.

A função Máscara, foi desenvolvida para coração inespecífica. Isto ocorre quando a imagem possui porções de coração indesejáveis muito parecida com a coração desejada. Ne seqüência de figuras a seguir (Fig. 9) mostramos a aplicação de máscara delimitada pela cor preta que elimina as cores indesejadas.

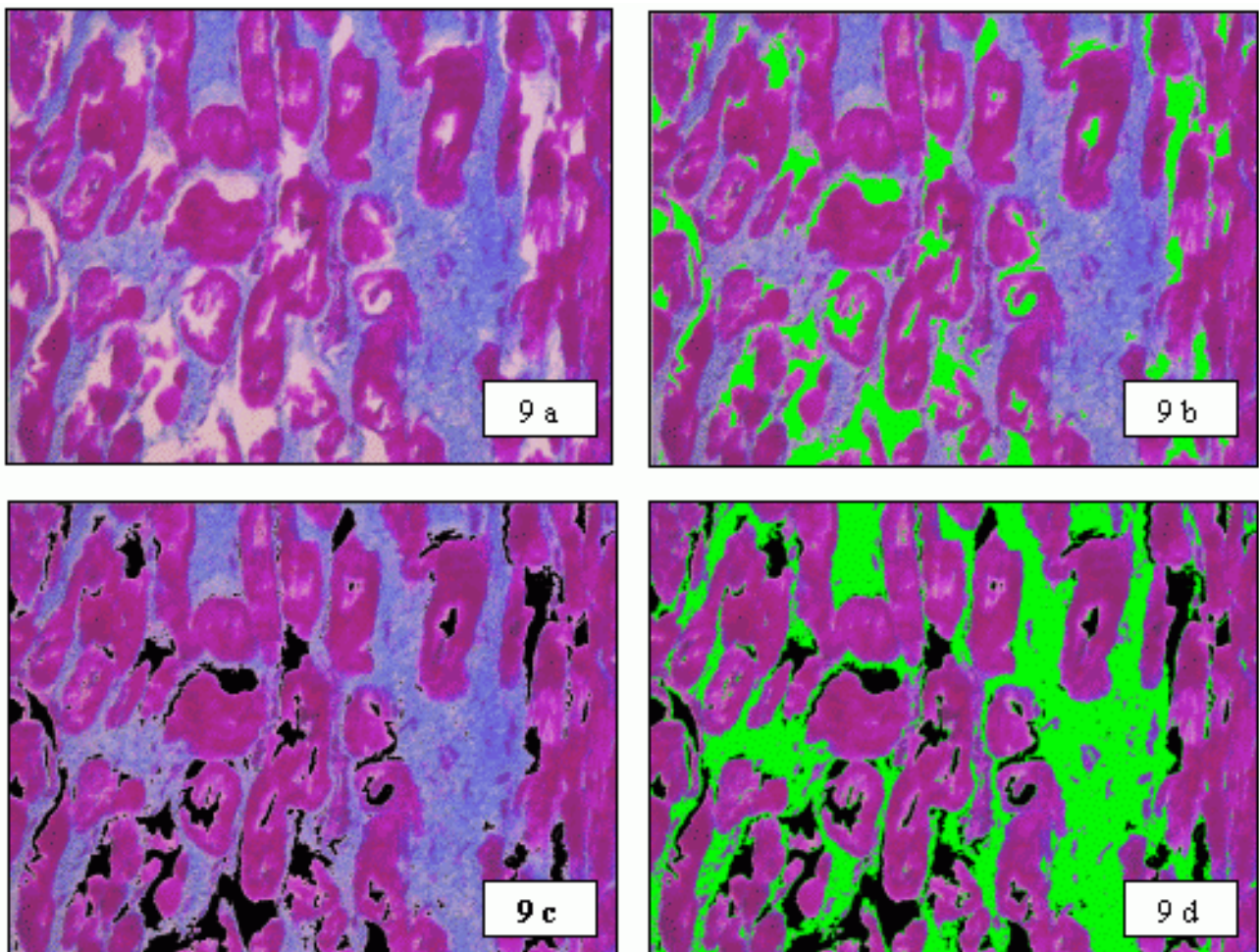


Figura 9 – Aplicação de uma Máscara em Áreas de Marcação Indesejada.

Nesse caso primeiro se processa a área indesejada e se aplica a máscara sobre ela. Procedendo então com o processamento normal.

Agora imaginemos que queiramos apenas selecionar uma pequena parte da imagem na qual a varredura não deverá ser feita, para esta situação desenvolvemos a ferramenta de retoque que permite que o usuário retire porções específicas da imagem com cliques se mouse.

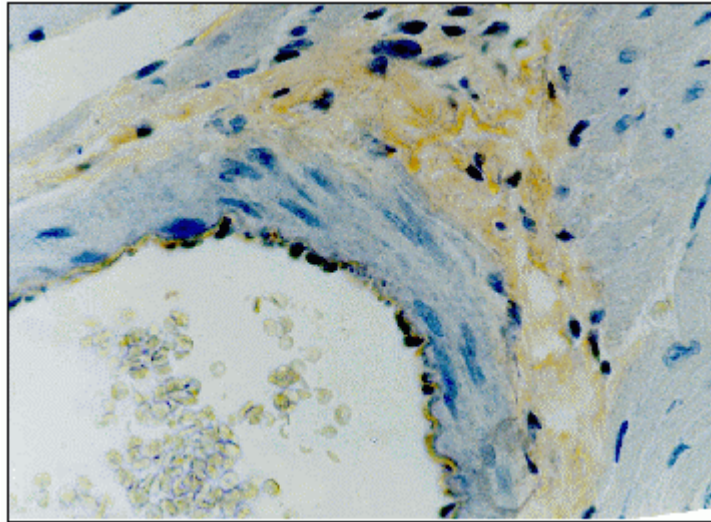


Figura 10 – Figura de Trabalho.

Na figura 10 a varredura produzirá uma marcação não desejada nas hemácias presentes no interior da aorta de rato, como podemos ver na figura 11. Para isso vamos usar a ferramenta de retoque com a qual retiraremos essa marcação inespecífica.

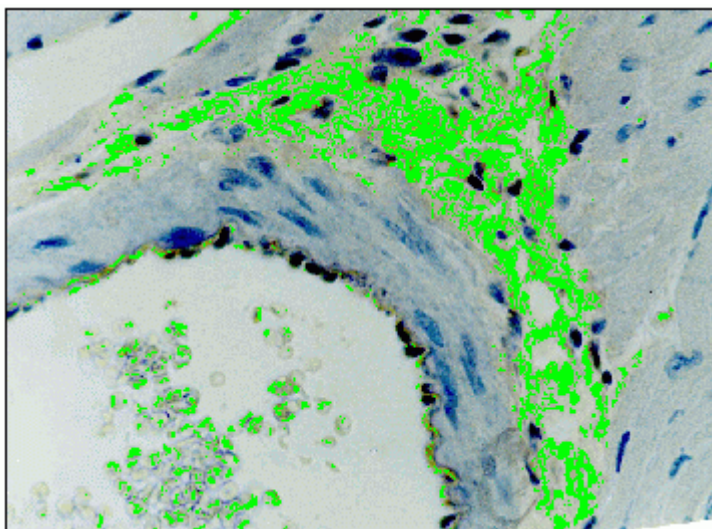


Figura 11 – Hemácias marcadas no interior da aorta de rato.

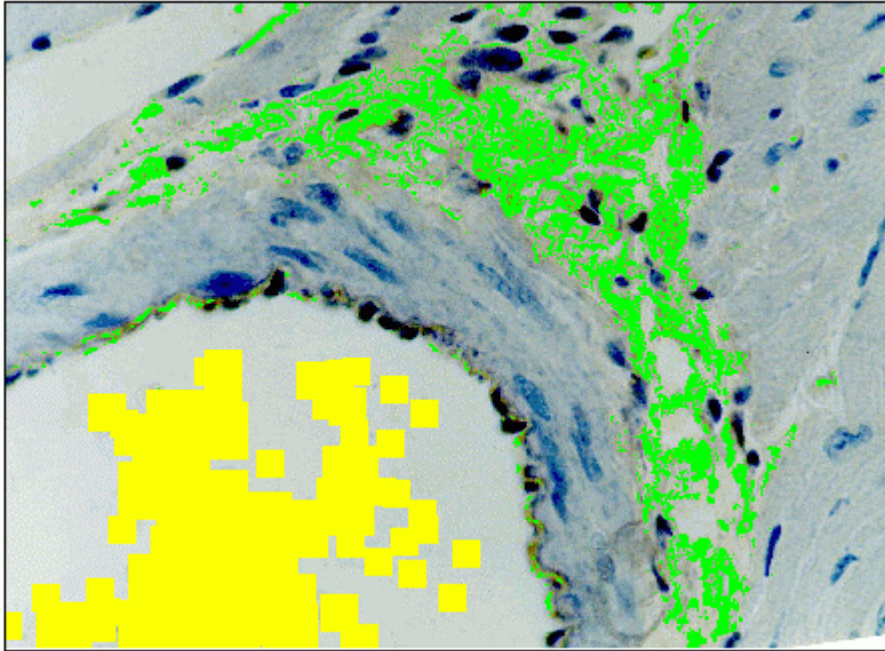


Figura 12 – Áreas inespecíficas retiradas com a ferramenta de retoque.

Figuras de Registro

Essa função permite que se ponha os dados de varredura diretamente sobre a imagem processada. Nesse caso (Fig. 12) a área processada está marcada em amarelo.

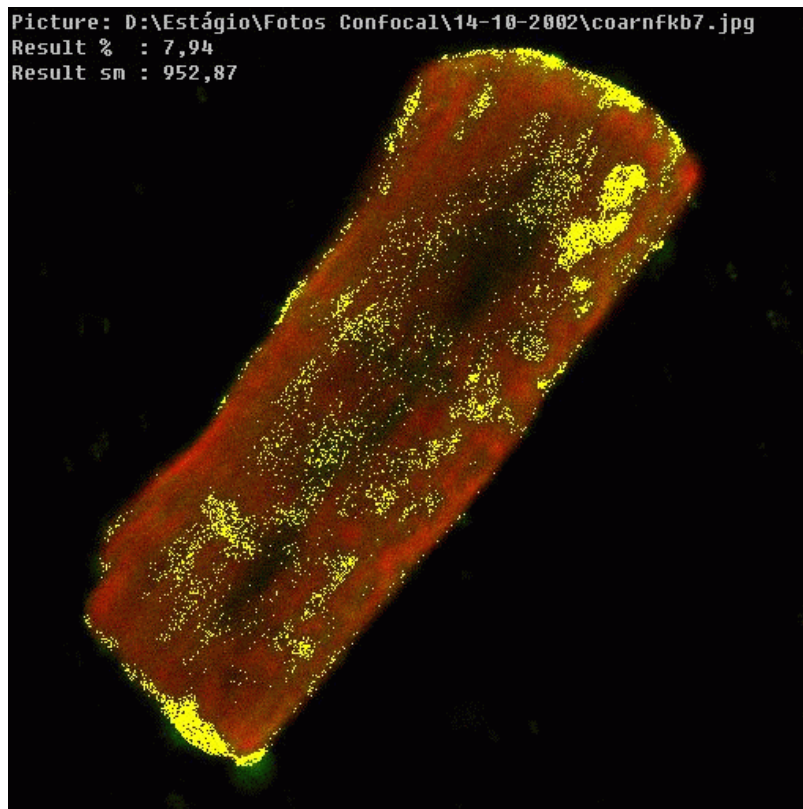


Figura 12 – Imagem Confocal de Cardiomiócito.

Bancos de Dados

O LGMC-IMAGE permite a criação de bancos de dados pelo usuário que possuem integração direta com o MS EXCEL[®], o que permite que se trabalhe com uma grande quantidade de material e então se obtenha um registro rápido e fácil de processar (Fig. 13). Esses bancos de dados ativos verificam as atitudes do usuário e então geram um registro automático das varreduras, isso deixa o usuário com maior liberdade de trabalho ao não ter que preocupar com o registro dos dados.

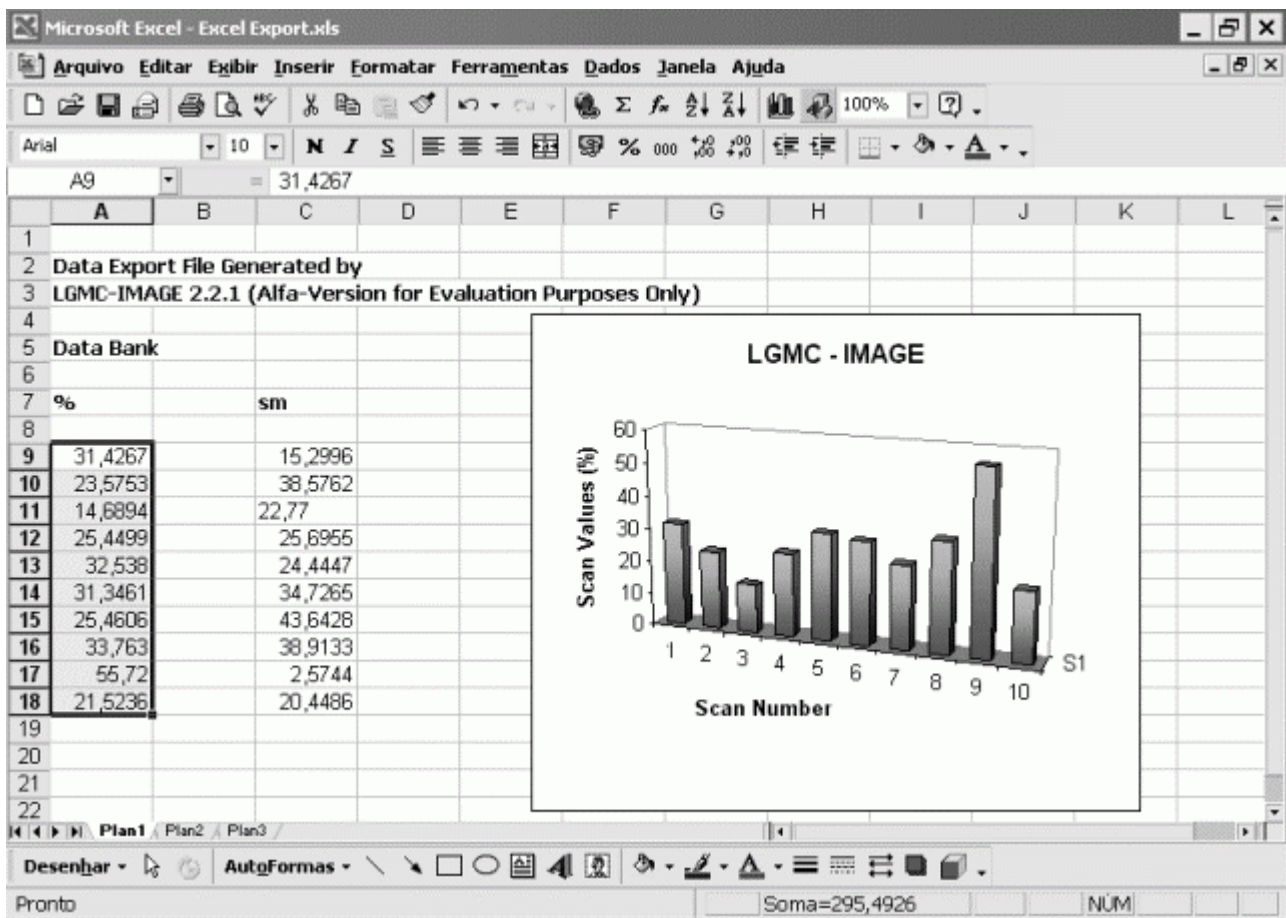


Figura 13 – Integração com o MS EXCEL[®].

Função Métrica

Esta função permite que se meça estruturas nas imagens desde que as dimensões da imagem sejam calibradas no programa (Fig. 14). Além disso o programa possui a capacidade de medir áreas

desenhos com o mouse e de contar clique de mouse, o que é de uso comum na biologia para a contagem de núcleos por exemplo.

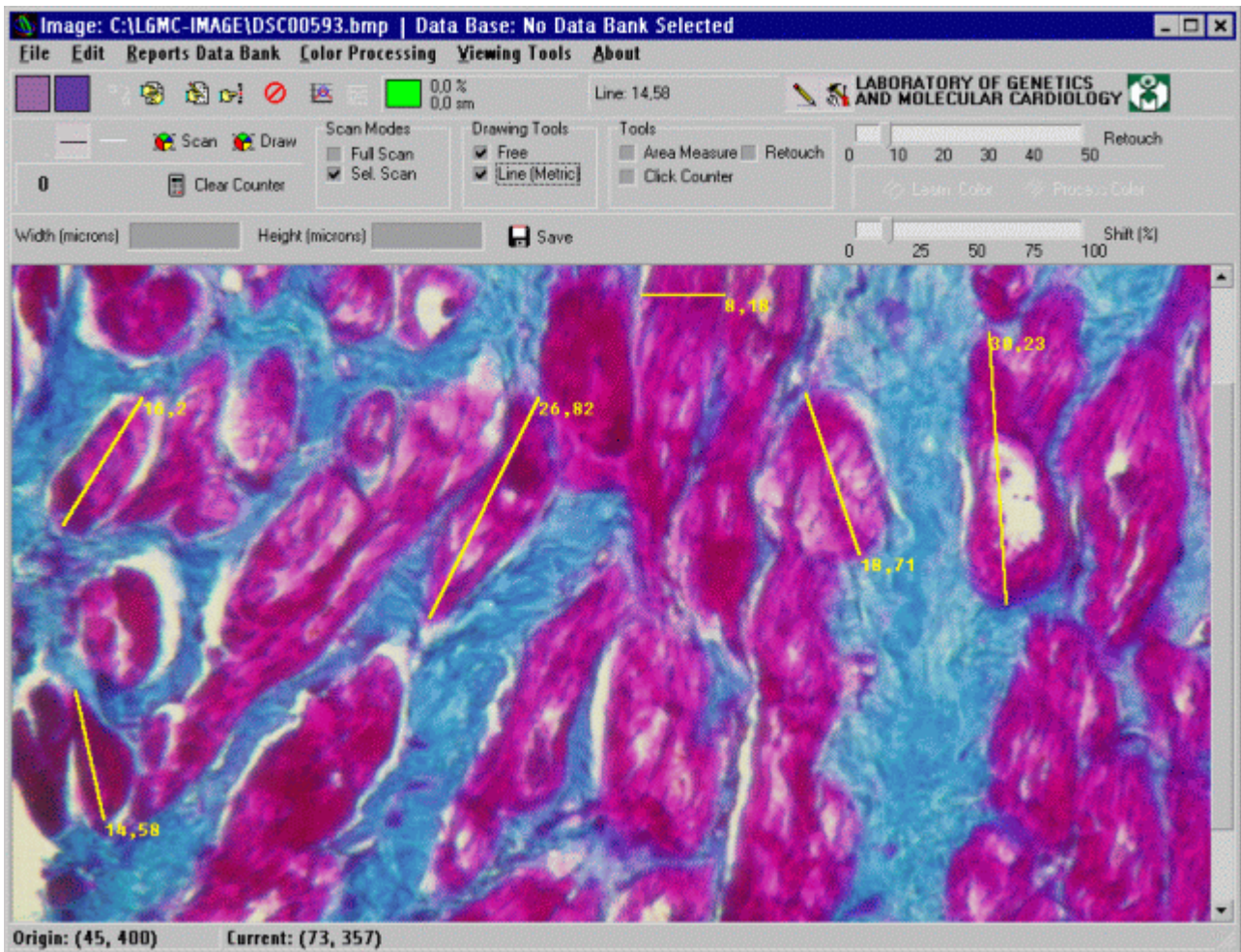


Figura 14 – Função Métrica.

DISCUSSÃO

Nós apresentamos um programa versátil e de fácil utilização desenvolvido inicialmente para quantificação de mudanças em componentes de tecidos de amostras histológicas coradas. Todavia, existe um enorme potencial de atuação para o LGMC-IMAGE. Isso por que a facilidade de quantificação de cores onde a informação espectral é conveniente, ou útil, tal como quantificações *in situ* de hibridizações de qualquer tipo usando-se marcadores de cor afim de se detectar alterações gênicas e proteínas.

Os procedimentos de validação realizados pela comparação com o método de padrão de quantificação. 9 demonstraram a reprodutibilidade e credibilidade da aplicação do software LGMC-IMAGE para a análise de imagens de seções histológicas, e também para amostras imunohistoquímicas.

LGMC-IMAGE possui várias características que lhe permitem uma grande gama de aplicações em processamento de imagens. Primeiro, uma importante característica é a da possibilidade de ajustes definidos pelo usuário em tempo real dos tons de cores pertinentes à contagem de áreas coradas pelo simples ajuste do erro aplicado à uma determinada cor selecionada para análise. Isto possui a vantagem de eliminar a influência de uma elevada variabilidade e ruído nas preparações usadas para histologia e imunoquímica (15). Isto ainda elimina os problemas que fazem a análise em RGB mais pobre do que a análise baseada nos atributos de cor HIS, e da necessidade da criação de padrões fixos dos procedimentos de coração da amostras, por que a estoquiometria da coração é o principal método para aplicações densitométricas, mas não para aplicações de análises de imagens (2).

Uma segunda característica vantajosa do LGMC-IMAGE é a habilidade de permitir retoques da imagem definidos pelo usuário, e portanto da eliminação de áreas coradas não desejáveis da contagem final. O uso desta função elimina os erros causados por coração inespecífica de uma amostra.

Uma terceira vantagem do LGMC-IMAGE é a de poder ser executado com alto desempenho em computadores de uso comum do tipo PC com hardware moderado. Alguns softwares disponíveis comercialmente para análise de imagens, além de caros necessitam de computadores com hardware caro, o que restringe seu uso por muitos usuários em potencial. Mais ainda, a possibilidade de se poder trabalhar com imagens digitais salvas em formatos amplamente disponíveis e de uso comum, oriundas de quaisquer meios de digitalização de imagens, inclusive de scanners.

Finalmente, é de relevância ser dito que o LGMC-IMAGE necessita que o usuário possua apenas conhecimentos básicos de informática e análise de imagens. Sendo que a aparência do

programa foi feita especialmente para encorajar seu uso por pessoal com pouca intimidade com software, facilitando o aprendizado e a exploração dos recursos (10). Nesse relatório temos mostrado um software desenvolvido com o propósito inicial de análises quantitativas das amostras coradas de amostras histológicas, particularmente útil por que realiza análises rápidas e confiáveis não requerendo hardware caro e específico, ou pessoal com alta especialização em análises de imagens, ou informática. Um desenvolvimento posterior desse software poderá permitir seu uso para quantificação de géis, e outros experimentos biológicos que necessitem de automação laboratorial para a análise de espectros de cor.

O resultado final do software mostrou tão satisfatório que o programa foi sujeito à publicação no:

American Journal of Physiology

Uma versão plenamente funcional do software poderá futuramente ser baixada gratuitamente no site de nosso laboratório. Lembrando que esse software está sendo distribuído à comunidade científica de maneira gratuita, caracterizado como software “freeware”.

Nosso Site: www.fcm.unicamp.br/departamentos/clinica/pesquisa/Franchini.html

REFERÊNCIAS

1. Anversa P, Vitali-Mazza L, Gandolfi A, Loud AV. Morphometry and autoradiography of early hypertrophic changes in the ventricular myocardium of adult rat. A light microscopic study. *Lab Invest* 33:125-129, 1975.
2. Aziz DC, Barathur RB. Quantification and morphometric analysis of tumors by image analysis. *J Cell Biol* 19:120-125, 1994.
3. Bloom HJG, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer A study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Brit J Cancer* 11:359-377, 1957.
4. Bolender RP, Hyde DM, Dehoff RT. Lung morphometry: a new generation of tools and experiments for organ, tissue, cell, and molecular biology. *Am J Physiol* 265:L521-L548, 1993..11
5. Foley JD, van Dam A: Fundamentals of interactive computer graphics. Reading, Massachusetts, Addison Wesley Publishing Company, 1982.
6. Frierson HF Jr, Wolber RA, Berean KW, Franquemont DW, Gaffey MJ, Boyd JC, Wilbur DC. Interobserver reproducibility of the Nottingham modification of the Bloom and Richardson histologic grading scheme for infiltrating ductal carcinoma. *Am J Clin Pathol* 103:195-198, 1995.

7. Julis I, Mikes J. True colour image analysis and histopathology. *Eur Micr Anal* 7:11-13, 1992.
8. Linder J. Overview of digital imaging in pathology. *Am J Clin Pathol* 94:30-34, 1990
9. Marszalek A, Tsutomu D, Kashima K, Nakayama I, and Yokoyama S. Ultrastructural and morphometric studies related to expression of the cell adhesion molecule PECAM- 1/CD31 in developing rat lung. *J Histochem Cytochem* 48:1283-1289, 2000.
10. Paddock SW. Imaging techniques: picture the world with kaleidoscope dyes. *Curr Biol* 7:R182-185, 1997.
11. Ong SH, Jin XC, Jayasooriah, Sinniah R. Image analysis of tissue sections. *Comput Biol Med* 26:269-279, 1996..12
12. Tambascia RC, Fonseca PM, Corat PDC, Moreno H, Saad MJA, and Franchini KG. Expression and Distribution of NOS1 and NOS3 in the Myocardium of Angiotensin II(Infused Rats. *Hypertension* 37: 1423-1428, 2000.
13. Weibel ER. *Stereological Methods, Vol. 1. Practical Methods for Biological Morphometry.* Academic Press, London , 1979.
14. Weibel ER. *Stereological Methods, Vol. 2. Theoretical Foundations.* Academic Press, London, 1980
15. Willemse F, Nap M, Henzen-Logmans SC, Eggink HF: Quantification of area percentage of immunohistochemical staining by true color image analysis with application of fixed thresholds. *Anal Quant Cytol Histol* 16:357-364, 1994.