

### 3 Resultados Experimentais e Discussão

Neste capítulo, uma avaliação numérica do método proposto para segmentação e contagem de CML em imagens digitais e um estudo comparativo com o algoritmo de watershed por inundação desenvolvido por Meyer [54].

A fim de avaliar a qualidade e eficiência do método proposto, foram realizados dois experimentos: segmentação e contagem de objetos em fotos e segmentação e contagem de células tronco embrionárias em imagem de microscopia fluorescente. Os resultados obtidos no experimento 1 foram validados pela autora e os obtidos no experimento 2 pelos biólogos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Até o momento não se tem conhecimento de uma base de imagens de domínio público composta por imagens de objetos que possam ser representados por CML. Assim, uma base de dados composta de mais de 200 imagens foi criada, a qual inclui fotos de objetos reais coletadas da Internet, imagens de células tronco embrionárias obtidas através de um microscópio fluorescente e algumas imagens biológicas. Com o intuito de dar maior visibilidade e apoio à pesquisa apresentada nesta tese, todas estas imagens foram disponibilizadas na Internet e podem ser baixadas gratuitamente em <http://www.inf.puc-rio.br/~gfaustino/dda>.

O método apresentado nesta tese possui algumas semelhanças com o algoritmo clássico de watershed. Tanto o método proposto quanto o algoritmo de watershed por inundação consideram a imagem como um relevo topográfico, onde o nível de cinza de um pixel é interpretado como a sua altitude, e utilizam somente a informação de luminância para segmentá-la. A principal diferença é que o método proposto divide o plano principal da imagem em classes de luminância, enquanto o algoritmo de watershed trabalha com cada uma das intensidades da imagem. Além disso, o watershed encontra as fronteiras (linhas divisoras de água) das bacias hidrográficas e o método proposto segmenta os CML presentes no relevo.

Assim, dadas as semelhanças entre estes métodos, com o objetivo de melhor avaliar o método proposto, os resultados obtidos com os experimentos foram comparados com os resultados gerados pelo algoritmo de watershed por inundação proposto por Meyer [54], o qual é bastante utilizado em segmentação de imagens.

Um estudo relevante para esta tese seria comparar a metodologia proposta

com outros métodos além do algoritmo de watershed, tais como os apresentados em [66] e [44]. No entanto, nem o código fonte ou uma aplicação computacional que implemente a metodologia proposta nestes trabalhos e as imagens utilizadas estão disponíveis. Em [66], é apresentado um método de decomposição morfológica em multi-escala para regiões conectadas com ênfase em *clusters* de células. Assim como o método proposto, este método também não depende do tamanho da célula nem do tamanho dos *clusters* e pode ser aplicado em outros tipos de imagens além de células. Em [44], é apresentado um método para segmentação de núcleos sobrepostos o qual é baseado em redes Bayesianas e estratégia de fusão por etapas. Embora esta técnica tenha sido projetada para segmentação de imagens FISH<sup>1</sup>, acredita-se que ela possa ser aplicada para segmentar células tronco embrionárias em imagens de microscopia fluorescente.

Para medir a qualidade de ambos os métodos, foram utilizadas as métricas *precision* ( $P$ ), *recall* ( $R$ ) e *F-measure* ( $F1$ ) como definidas a seguir:

$$P = \frac{tp}{tp + fp}, \quad R = \frac{tp}{tp + fn} \quad \text{e} \quad F1 = \frac{2 * P * R}{P + R},$$

onde  $tp$  (verdadeiros positivos) representa o número de objetos (CML) segmentados corretamente,  $fp$  (falsos positivos) representa as estruturas incorretamente classificadas como objetos e  $fn$  (falsos negativos) representa as estruturas que não foram classificadas como objetos, mas deveriam ter sido. Para mais detalhes sobre estas métricas veja [19].

O método proposto foi implementado em linguagem Java 6.0 utilizando-se a ferramenta de desenvolvimento Eclipse 3.2. O algoritmo de watershed foi aplicado sobre as imagens através de um *plugin* para o ImageJ [2] fornecido pela *Biomedical Imaging Group* - EPFL [82], o qual implementa o algoritmo de watershed por inundação proposto por Meyer [54]. Os testes foram executados em uma máquina com processador Intel Core 2 Duo 2.20GHz com 2Gb RAM.

### 3.1

#### Experimento 1: segmentação e contagem de objetos em fotos

Nesta seção, são apresentados os resultados numéricos obtidos e algumas imagens geradas com o método proposto no que diz respeito à segmentação e contagem de objetos em fotos. Os resultados numéricos obtidos através de testes realizados nestas imagens foram comparados com os resultados gerados pelo algoritmo de watershed por inundação [54].

Para este experimento, uma base de dados composta de 28 fotos de objetos

<sup>1</sup>FISH (*fluorescence in situ hybridization*) é uma técnica citogenética utilizada para detectar e localizar a presença ou ausência de seqüências específicas de DNA nos cromossomos [1].

foi construída. Estas imagens foram coletadas na Internet e englobam imagens de grão, pérolas, balas, pedras e miçangas (contas), conforme ilustrado na Figura 3.1.



Figura 3.1: Fotos de objetos reais divididas em sete grupos: (a) fotos de miçangas (contas); (b) fotos de pérolas sintéticas; de (c) a (g) fotos de miçangas (contas); de (h) a (l) fotos de pérolas sintéticas; (m) e (n) fotos de doces; (o) fotos de pedra; de (p) à (r) fotos de grãos de feijão; (s) fotos de grãos de café e; (t) fotos de uvas.

As imagens acima foram divididas em grupos de acordo com critérios, tais como o tamanho dos objetos, nível de sobreposição, tipo de iluminação e fundo da imagem, os quais influenciam diretamente os valores dos parâmetros de entrada ( $\varepsilon$ ,  $\lambda$ ). Por este motivo, fotos do mesmo objeto ou de objetos de mesmo tipo podem pertencer a grupos diferentes. As Figuras 3.1(b), 3.1(h), 3.1(i), 3.1(j), 3.1(k) e 3.1(l) ilustram esta situação. Embora todas estas fotos mostrem pérolas, levando-se em consideração os parâmetros mencionados anteriormente, elas foram divididas em 6 grupos distintos (Grupo 2, Grupo 8, Grupo 9, Grupo 10, Grupo 11 e Grupo 12).

Uma vez estabelecido os grupos de imagens, através de testes executados em uma imagem por grupo, pode-se facilmente ajustar os valores de  $\varepsilon$  e, se necessário, de  $\lambda$ . Para os grupos apresentados na Figura 3.1 o ajuste dos parâmetros foi feito

visualmente pela autora através de testes experimentais. Embora estes valores sejam inferidos sobre uma única imagem, dadas as semelhanças entre as imagens de um mesmo grupo, eles podem ser generalizados para as demais imagens. Assim, embora o método proposto não seja automático, ele pode se automatizar para grupos específicos de imagens.

A Figura 3.1 apresenta a base de dados acima dividida em 7 grupos e a Tabela 3.1 apresenta os respectivos valores para os parâmetros utilizados: raio do filtro Gaussiano ( $\sigma$ ), parâmetro ( $x$ ) utilizado para calcular o *threshold*, tamanho do intervalo ( $\varepsilon$ ) e metade do tamanho médio do diâmetro dos objetos ( $\lambda$ ) medido sobre a imagem de entrada, o qual é utilizado no passo de clusterização. Parâmetros sem valor correspondem à passos que não foram aplicados. O parâmetro ( $f$ ) corresponde ao nível de inundação utilizado pelo algoritmo de watershed.

Todas as imagens processadas pelo método proposto foram analisadas e validadas visualmente pela autora. Cada imagem processada foi verificada individualmente e tanto os objetos que não foram detectados (falsos negativos) quanto os artefatos que foram incorretamente classificados como objetos (falsos positivos) foram identificados. Com base nestes dados foram calculadas as medidas de *precision*, *recall* e *F-measure* para cada imagem e em seguida a média aritmética sobre todas as imagens. A Tabela 3.1 apresenta os valores computados e as Figuras 3.2 e 3.3 mostram algumas imagens processadas.

Observando as Figuras 3.2 e 3.3, pode-se notar que o método proposto gera bons resultados para imagens de objetos com forma similar a de uma esfera como, por exemplo, aqueles mostrados nas Figuras 3.2(b), 3.2(c) e 3.2(g). No entanto, o método proposto é propenso a erros quando os objetos possuem forma muito alongada (Figuras 3.2(h), 3.2(i) e 3.3(a)). Para imagens que apresentam esta situação, o valor para  $\lambda$  é dado pela metade da média aritmética entre o eixo maior e menor do objeto. Entretanto, embora este valor tenha sido calculado de modo adequado o algoritmo de clusterização não é capaz de agrupar os CML que representam o mesmo objeto corretamente. Em situações onde os CML estejam localizados nas extremidades (ao longo do maior eixo) do objeto, embora representem o mesmo objeto, estes CML provavelmente não serão agrupados pois estão a uma distância superior a  $\lambda$ . Outra situação desfavorável é quando os CML de objetos diferentes, posicionados lado a lado na imagem, estão localizados muito próximos a borda do objeto. Quando isto acontece, estes CML embora representem objetos diferentes provavelmente serão agrupados pois estão a uma distância inferior a  $\lambda$ .

Em se tratando de imagens onde os objetos possuem a mesma cor ou textura e um baixo contraste entre eles (Figura 3.2(a)), o método proposto pode gerar resultados insatisfatórios. Para imagens com estas características, objetos diferentes podem pertencer à mesma componente conectada e como consequência não serem



G.	Método Proposto						Algoritmo de Watershed				
	Parâmetros				P	R	F1	Parâmetro	P	R	F1
	$\sigma$	x	$\varepsilon$	$\lambda$	(%)	(%)	(%)	f	(%)	(%)	(%)
1	2	-	8	7	98,04	67,4	79,88	200	78,74	78,61	78,67
					90,09	78,63	83,97	188	72,35	91,67	80,87
					97,04	74,86	84,52	195	84,31	86,85	85,56
					96,87	63,41	76,65	200	75,53	88,62	81,55
					98,77	78,69	87,6	130	73,49	94,33	82,62
					98,04	67,4	79,88	200	72,29	77,59	74,85
2	2	-	32	18	78,00	87,65	82,54	25	69,61	83,05	75,74
					95,3	76,11	84,63	200	53,8	97,76	69,4
3	2	-	8	10	69,76	78,2	73,74	150	33	88,41	48,06
4	2	-	8	22	80,52	74,7	77,5	50	36,54	90,48	52,06
5	2	-	8	-	98,58	69,88	81,78	200	56,74	62,11	59,3
6	2	-	8	10	96,88	77,5	86,12	200	61,78	92,54	74,09
7	2	-	8	12	98,78	71,56	82,99	100	38,98	83,2	53,09
8	2	-	16	18	95,38	81,75	88,04	200	61,09	99,2	75,61
					75,76	79,79	77,73	11	86,21	64,94	74,08
					89,25	80,12	84,44	91	74,18	83,34	78,49
9	2	-	16	15	91,58	87,00	89,24	200	46,89	98,99	63,64
10	2	-	16	39	86,05	84,1	85,06	3	65,22	86,21	74,26
11	2	0,3	32	15	98,19	99,09	98,64	30	100	99,1	99,55
12	2	0,3	32	10	100	100	100	100	98,64	100	99,32
13	3	0,3	8	23	100	100	100	165	97,06	100	98,51
14	3	0,3	8	30	99,19	92,68	95,83	150	88,11	94,5	91,19
15	2	-	8	75	98,67	54,02	69,82	150	62,35	74,82	68,02
16	3	0,3	8	35	92,4	100	96,05	150	38,41	100	55,5
17	2	-	16	35	89,38	83,72	86,45	60	35,72	92,06	51,47
18	2	-	32	10	79,14	91,23	84,76	255	41,89	99,03	58,88
19	2	-	16	11	95,57	85,09	90,03	100	89,51	71,69	79,61
20	2	-	8	11	97,84	69,76	81,45	200	90,76	86,21	88,43
					<b>92,32</b>	<b>80,51</b>	<b>85,33</b>		<b>67,26</b>	<b>88,05</b>	<b>74,02</b>

Tabela 3.1: Resultados obtidos e respectivos parâmetros utilizados para as imagens de cada grupo. Valores em branco indicam que o respectivo passo não foi aplicado. A primeira coluna (G.) indica o Grupo de imagens e a última linha apresenta a média aritmética para *precision*, *recall* e *F-measure* obtidos pelo método proposto e pelo algoritmo de watershed.

segmentados individualmente.

Apesar destas falhas, os números apresentados na Tabela 3.1 mostram que o método proposto fornece resultados satisfatórios. Para estas imagens foram obtidas uma média de 92,32% para *precision*, 80,51% para *recall* e 85,33% para *F-measure*.

### 3.1.1 Comparação com o algoritmo de watershed

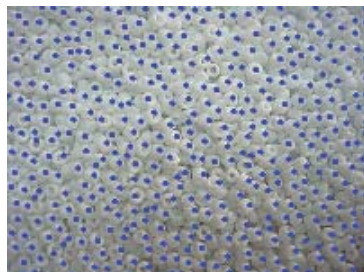
A fim de comparar o método proposto com o algoritmo de watershed, as 28 imagens foram pré-processadas aplicando o passo 1 do método proposto com os mesmos valores para os parâmetros  $\sigma$  e  $x$ , apresentados na Tabela 3.1. Estas imagens foram então processadas utilizando-se o plugin para o ImageJ [2] fornecido pela *Biomedical Imaging Group* - EPFL [82].

Da mesma forma que para as imagens processadas pelo método proposto, os resultados obtidos com o algoritmo de watershed foram analisados e validados pela autora. Cada imagem processada foi verificada individualmente e foram apontados os objetos que não foram detectados (falsos negativos) bem como os artefatos que foram incorretamente classificados como objetos (falsos positivos). As medidas de *precision*, *recall* e *F-measure* foram calculadas para cada imagem e então a média aritmética sobre as 28 imagens foi obtida. A Tabela 3.1 apresenta os resultados computados.

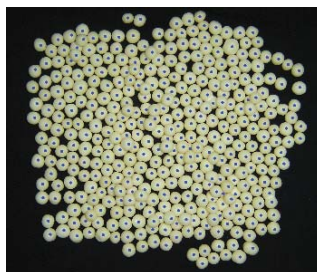
Comparando os resultados obtidos com o método apresentado nesta tese com aqueles gerados pelo algoritmo de watershed por inundação proposto por [54], pode-se observar que o método proposto é, em média, 25% mais preciso. O algoritmo de watershed alcançou uma média de 67,26%, 88,05% e 74,02% para *precision*, *recall* e *F-measure*, respectivamente, contra 92,32%, 80,51% e 85,33% obtidos pelo método proposto.

As Figuras 3.2 e 3.3 apresentam algumas imagens processadas por ambos os métodos e a Figura 3.4 mostra um gráfico comparando os resultados obtidos por ambos os métodos para as 28 imagens que compõe a base de teste. Nesta figura pode-se observar que o método proposto provê melhores resultados para praticamente todas as imagens.

No entanto, para as imagens das Figuras 3.2(a) e 3.2(c), pode-se notar que o watershed provê melhores resultados. Devido ao baixo contraste entre os objetos, o método proposto não é capaz de segmentar tantos objetos quando o algoritmo de watershed. No entanto, a diferença entre as medidas de *F-measure* é inferior a 1%. Além disso, para obter estes resultados, o parâmetro responsável pelo nível de inundação ( $f$ ) deve ser ajustado para cada imagem enquanto que o método proposto é facilmente parametrizado para cada grupo de imagens. A Tabela 3.1 ilustra essa situação.



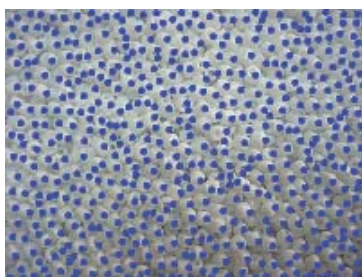
(a) Método proposto – 405 obj. detectados com F1 de 84.52%



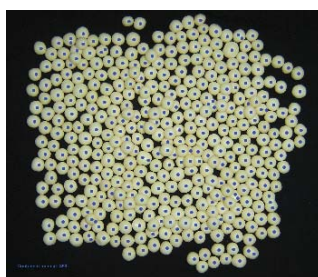
(b) Método proposto – 396 obj. detectados com F1 de 100%



(c) Método proposto – 110 obj. detectados com F1 de 98.64%



(d) Watershed – 548 obj. detectados com F1 de 85.56%



(e) Watershed – 408 obj. detectados com F1 de 98.51%



(f) Watershed – 109 objects detectados com F1 de 99.55%



(g) Método proposto – 203 obj. detectados com F1 de 90.03%



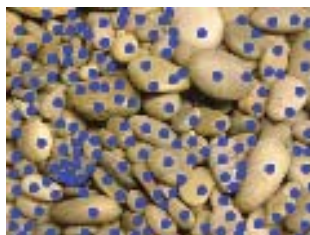
(h) Método proposto – 75 obj. detectados com F1 de 69.82%



(i) Método proposto – 207 obj. detectados com F1 de 86.45%



(j) Watershed – 181 obj. detectados com F1 de 79.61%



(k) Watershed – 162 obj. detectados com F1 de 68.02%



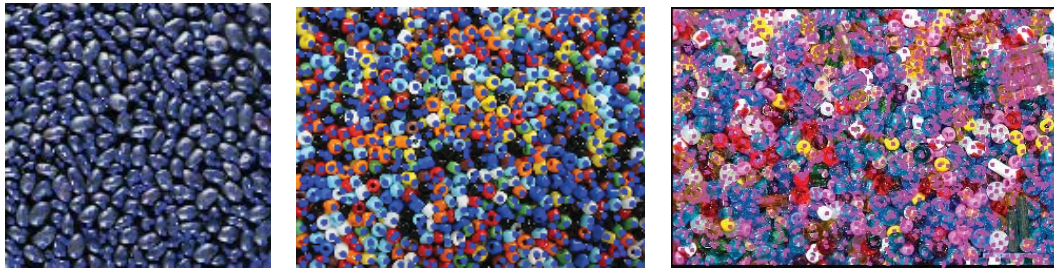
(l) Watershed – 616 obj. detectados com F1 de 51.47%

Figura 3.2: Resultados obtidos com o método desenvolvido e o algoritmo de watershed em fotos de objetos.

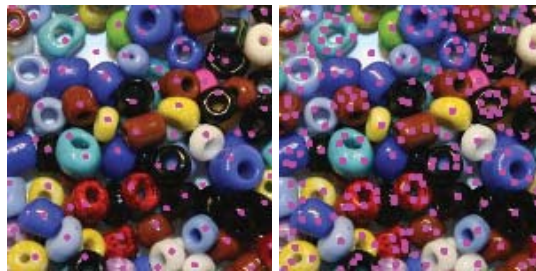




(a) Método proposto – 302 obj. detec. com F1 de 84.76% (b) Método proposto – 407 obj. detectados com F1 de 79.88% (c) Método proposto – 658 obj. detectados com F1 de 73.74%



(d) Watershed alg. – 487 obj. detec. com F1 de 58.88% (e) Watershed alg. – 616 obj. detectados com F1 de 78.67% (f) Watershed alg. – 1594 obj. detectados com F1 de 48.05%



(g) Método proposto – 77 obj. detec. com F1 de 77.5% (h) Watershed alg. – 208 obj. detec. com F1 de 52.06%

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0711301/CA

Figura 3.3: Resultados obtidos com o método desenvolvido e o algoritmo de watershed em fotos de objetos.

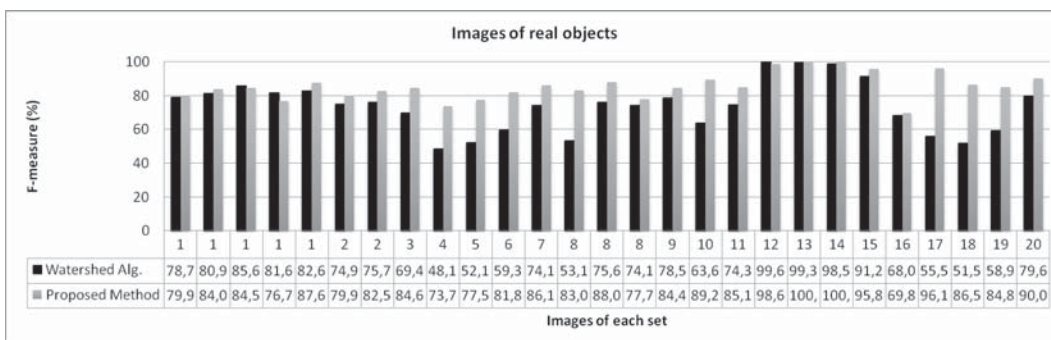


Figura 3.4: Comparação entre o método desenvolvido e o algoritmo de watershed para fotos de objetos. Note que o método proposto obteve melhores resultados para a maioria das imagens.



## 3.2

### Experimento 2: detecção e contagem de células tronco embrionárias em imagem de microscopia fluorescente

Esta seção apresenta os resultados numéricos obtidos e algumas imagens geradas com o método proposto no que diz respeito à tarefa de segmentar e contar células tronco embrionárias em imagens de microscopia fluorescente. Com o intuito de contextualizar o problema de segmentação e contagem de células tronco em imagens, são apresentados também uma breve descrição do que são células tronco e sua importância, o porquê é necessário contá-las bem como alguns trabalhos relacionados. Por último, da mesma forma que na seção anterior, com o objetivo de melhor avaliar o método proposto, os resultados obtidos são comparados com aqueles gerados pelo algoritmo de watershed [54].

#### 3.2.1

##### O que são células tronco e sua importância

De modo geral, células tronco (*stem cells - SC*) são células que possuem a capacidade de se dividir dando origem a células semelhantes às progenitoras. As células tronco embrionárias (*embryonic stem cell - ES cell*) têm ainda a capacidade de se transformar, através de um processo conhecido por diferenciação celular, em outros tecidos do corpo, tais como ossos, nervos, músculos e sangue, dentre outros. Na verdade, estas células são capazes de gerar qualquer tipo de célula em um organismo.

Uma vez que as células-tronco embrionárias foram descobertas, a possibilidade de utilizá-las no tratamento de várias doenças tem incentivado muitos projetos de pesquisa na área biomédica. Devido à sua propriedade de pluripotência<sup>2</sup> e a real possibilidade de direcionar sua diferenciação *in vitro* para tipos específicos de células, as células tronco embrionárias vêm se tornando uma alternativa para a terapia de combate à vários tipos de doenças como, por exemplo, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes tipo-1, acidentes vasculares cerebrais, doenças hematológicas, traumas na medula espinhal e nefropatias.

#### 3.2.2

##### Necessidade de contar células

A contagem das células desempenha um papel fundamental na análise estatística e permite que os especialistas compreendam e validem os experimentos. Quando as células são marcadas corretamente, a análise visual pode revelar mecanismos biológicos. Além disso, utilizando marcadores celulares diferen-

<sup>2</sup>Células tronco pluripotentes são aquelas capazes de diferenciar-se em quase todos os tecidos humanos, excluindo a placenta e anexos embrionários.

tes, os pesquisadores são capazes de determinar, por exemplo, o número total de células, quantas e quais células pluripotentes se especializaram em células maduras, e também quantas células morreram. A monitoração da porcentagem de células indiferenciadas durante a cultura é importante para garantir a qualidade da cultura e, como resultado, a pluripotência das células-tronco embrionárias.

Embora avanços consideráveis na área de processamento de imagens e visão computacional tenham permitido a automatização da contagem de tipos diferentes de células, no caso das imagens de células tronco embrionárias esta tarefa ainda é feita manualmente por biólogos especialistas através de inspeção visual. Entretanto, a contagem manual é um processo tedioso e demorado, e seu caráter subjetivo pode levar a uma grande variação nos resultados. Na prática, contar grandes quantidades de células manualmente leva a altos valores de desvio padrão, e como consequência a resultados pouco precisos.

Assim, um método automático para segmentação e contagem deste tipo de célula pode se tornar uma ferramenta útil, capaz de agilizar e tornar mais preciso a avaliação dos métodos de cultivo e, conseqüentemente, acelerar o processo de terapia celular.

### 3.2.3

#### Trabalhos relacionados

A seguir, são apresentados alguns dos trabalhos relacionados com a tarefa de segmentação e contagem de células tronco, os quais são mais relevantes para nossa abordagem.

A técnica mais utilizada para a detecção de células diferenciadas é a citometria de fluxo [59, 77]. Esta técnica é capaz de identificar e quantificar um grande número de células em um curto período de tempo e seus resultados podem expressar o percentual de um ou mais tipos de células dentro de uma população. No entanto, esse procedimento é caro e requer um especialista treinado. Outra desvantagem é a perda da informação espacial, uma vez que este procedimento pode ser aplicado somente a culturas de células em suspensão. Portanto, esta técnica é geralmente utilizada como um complemento à análise de microscopia, fornecendo informações sobre a arquitetura do tecido e distribuição da fluorescência na célula.

Um número considerável de pesquisadores têm lidado com a segmentação e contagem de células em imagens de microscopia [31, 72, 30, 29, 27, 69, 80]. Técnicas baseadas em aprendizado de máquina [32, 36, 52] e em métodos clássicos de segmentação, tais como *threshold*, filtros morfológicos e watershed têm sido desenvolvidas [57, 33, 39, 66]. Entretanto, estas técnicas não tratam adequadamente um problema que ocorre freqüentemente quando as células estão parcialmente ou totalmente sobrepostas, como ilustrado na Figura 3.5. Quando isto acontece, estes

métodos dificilmente conseguem identificar as células individualmente.

Com a descoberta do potencial das células tronco, muitos pesquisadores vêm investigando como segmentar, monitorar e quantificar este tipo de célula [75, 74, 56, 34, 70, 45, 37].

Althoff et al. [34] e Tang et al. [74] propuseram métodos para segmentação e rastreamento de células tronco neurais. Ambas as abordagens são baseadas em métodos clássicos de segmentação e utilizam a informação sobre a posição prévia das células para decidir quais aglomerados correspondem à células reais.

Korzynska [75] desenvolveu um método para contagem automática de células tronco neurais criadas em culturas, o qual é realizado em duas etapas: 1) a imagem é segmentada em várias regiões e 2) cada região homogênea é contada separadamente.

Kachouie et al. [35, 45, 37] desenvolveram métodos para localizar e rastrear células tronco hematopoéticas individuais. Em seu primeiro trabalho [37], foi apresentado um método de deconvolução para localizar células hematopoéticas individuais através de um algoritmo otimizado de ajustes de elipse. Nos trabalhos subsequentes [35, 45] os autores utilizaram informações sobre a morfologia celular (e.g. tamanho da célula, intensidade de brilho no seu interior e uniformidade e/ou simetria da borda) para localizar e rastrear este tipo de célula.

No entanto, vale ressaltar que os métodos descritos acima podem lidar apenas com um tipo de célula tronco nas imagens. Além disso, uma vez que eles tendem a usar informações sobre a morfologia e/ou uma abordagem tradicional para o processo de segmentação, tais métodos dificilmente conseguem lidar de modo adequado com variações no tamanho ou forma das células.

Utilizando a metodologia proposta, as células tronco embrionárias são representadas por CML e através dos algoritmos de mineração e clusterização, estas células são segmentadas e contadas, sem a necessidade de qualquer informação prévia sobre sua morfologia. Como mostrado a seguir, o método proposto é tolerante a variações no tamanho e na forma das células e é facilmente parametrizado para grupos diferentes de imagem, resultantes de protocolos de diferenciação distintos. Com o objetivo de ser aplicado em imagens de células tronco embrionárias adquiridas durante o processo de diferenciação celular, o método proposto é capaz de lidar com vários tipos de células tronco na mesma imagem. Além disso, diferentemente dos trabalhos anteriores, o método proposto pode lidar com células sobrepostas ou fortemente agrupadas, como aquelas apresentadas na Figura 3.5.



### 3.2.4 Resultados experimentais

A seguir, os resultados experimentais obtidos pelo método proposto no que diz respeito à segmentação e contagem de células tronco embrionárias em imagens de microscopia fluorescente são apresentados.

Neste trabalho, foram utilizadas imagens de células tronco pluripotentes cultivadas *in vitro*. Todas as imagens foram coletadas no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

A fim de avaliar a qualidade do método proposto em matéria de segmentação e contagem de células tronco embrionárias em imagens de microscopia fluorescente, uma base de dados com 234 imagens foi construída. Esta base de dados inclui imagens de células tronco embrionárias provenientes de seções de corte em corpos embrióides (EB cryosection), imagens de migração celular de corpos embrióides (*embryoid bodies - EB*), imagens de colônias de células tronco embrionárias murinas (*murine embryonic stem cells - mES*) sobre fibroblastos embrionários murinos (*murine embryonic fibroblasts - MEF*) e imagens de neuroesferas<sup>3</sup>. A Figura 3.5 mostra exemplos de imagens capturadas para cada um dos tipos de imagens citadas acima.

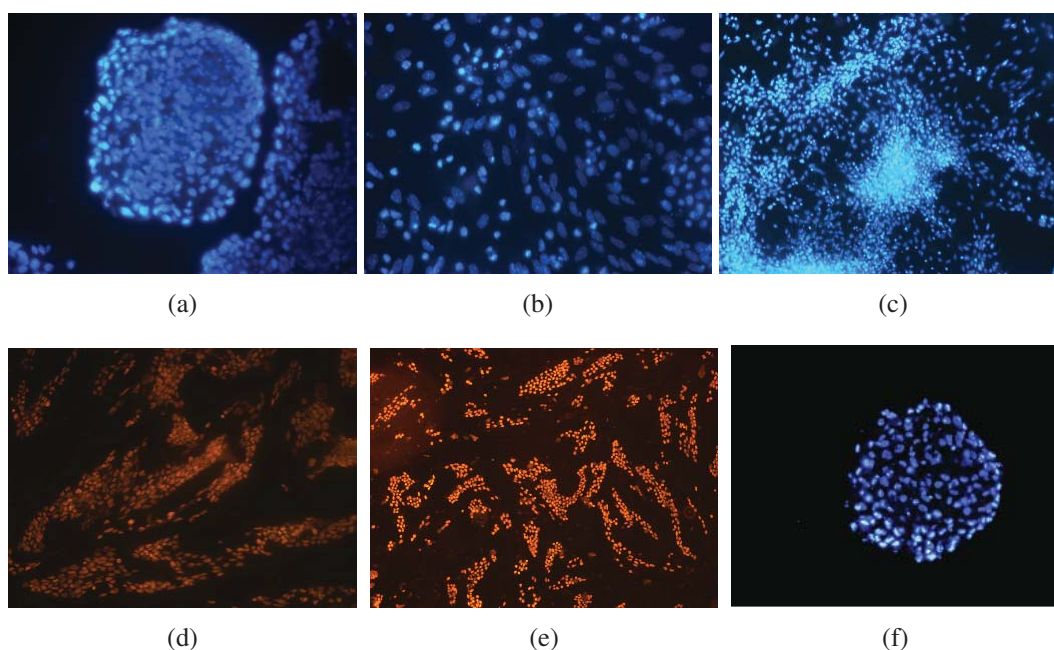


Figura 3.5: Exemplo de imagens de células tronco embrionárias: (a) EB cryosection com aumento de 40 $\times$ ; (b) e (c) imagens de migração celular de corpos embrióides com aumento de 40 $\times$  e 20 $\times$ , respectivamente; (d) e (e) imagens de colônias de células mES sobre MEF com aumento de 40 $\times$  e 20 $\times$ , respectivamente; e (f) neuroesferas.

<sup>3</sup>Neurosferas são agregados celulares que crescem em suspensão na presença de fatores de crescimento, como FGF-2 e EGF. Para mais informações veja [24].

Nestas imagens foram utilizados dois tipos de marcadores celulares: 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) e Octamer-4 (Oct-4). O DAPI é um tipo de marcador fluorescente que se liga fortemente ao DNA das células tornando-as visíveis em cor ciano/azul quando visualizadas através de um microscópio fluorescente (Figuras 3.5(a), 3.5(b), 3.5(c) e 3.5(f)). O fator de transcrição Oct-4 é uma proteína importante para a renovação das células tronco embrionárias, e diminui a sua expressão durante o processo de diferenciação. Portanto, é frequentemente utilizado como um marcador de células indiferenciadas, as quais aparecem em cor laranja quando visualizadas através de um microscópio fluorescente (Figuras 3.5(d) e 3.5(e)). Mais informações sobre os protocolos e sistema de aquisição utilizados podem ser encontradas em [6].

As 234 imagens foram divididas em sete grupos, de acordo com o protocolo de diferenciação utilizado e características das imagens, conforme mostra a Tabela 3.2. Esta tabela apresenta o número do grupo, o tipo de imagem contida neste grupo e o número de imagens por grupo. Da mesma forma que no experimento anterior, os valores para os parâmetros de entrada foram obtidos através de testes experimentais e também são apresentados na Tabela 3.2.

Base de Dados			Parâmetros			
Grupo	N.	Tipo de Imagem	$\sigma$	$x$	$\varepsilon$	$\lambda$
1	69	EB cryosections com nível de ruído aceitável	2	0.3	8	12
2	23	EB cryosections com forte presença de ruído	3	0.3	8	12
3	32	migração celular de EB com aumento de 40×	2	0.3	16	30
4	17	migração celular de EB com aumento de 20×	2	0.3	16	-
5	66	colônias de mES sobre MEF com aumento de 20×	2	0.3	8	-
6	12	colônias de mES sobre MEF com aumento de 10×	2	0.3	8	-
7	15	imagens de neuroesferas	2	0.3	32	-

Tabela 3.2: Base de dados dividida em 7 grupos de imagens e os respectivos valores utilizados para os parâmetros de entrada: valor para o raio do filtro Gaussiano ( $\sigma$ ), o parâmetro ( $x$ ) utilizado para calcular o *threshold*, tamanho do intervalo ( $\varepsilon$ ) e metade do valor médio do diâmetro da célula ( $\lambda$ ). A segunda coluna mostra a quantidade de imagens para cada um dos grupos.

Todas as imagens processadas pelo método proposto foram analisadas e validadas pelos biólogos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Eles identificaram as células que não foram segmentadas (falsos negativos) e também os artefatos que foram incorretamente classificados como células (falsos positivos). Com base nesses dados, foram calculadas as medidas de *precision*, *recall* e *F-measure* para cada imagem e, em seguida, obteve-se a média aritmética para cada grupo. A Tabela 3.3 apresenta os resultados computados e indica quando o passo 6 (clusterização do grafo) foi utilizado. A Figura 3.6 mostra algumas imagens processadas pelo método proposto. Nestas figuras, as células segmentadas estão indicadas pelos pontos em cor vermelha (Figuras 3.6(a),

3.6(b), 3.6(c), 3.6(d) e 3.6(g) e em cor azul (Figuras 3.6(e) e 3.6(f)). Os resultados para as imagens das Figuras 3.6(a), 3.6(b), 3.6(c) e 3.6(d) foram obtidos utilizando o passo 6 do método proposto. Para as imagens das Figuras 3.6(e), 3.6(f) e 3.6(g) foram utilizados somente os cinco primeiros passos.

Grupo de Imagens	Precision (%)	Recall (%)	F-measure (%)	Clust. do grafo
Grupo 1	96,29	93,13	94,60	✓
Grupo 2	96,96	91,48	94,08	✓
Grupos 1 e 2	96,47	92,68	94,46	✓
Grupo 3	89,74	83,70	86,09	✓
Grupo 4	95,97	93,44	94,63	
Grupo 5	94,69	85,28	89,55	
Grupo 6	97,82	80,39	87,88	
Grupo 7	94,71	90,95	92,67	
	<b>94,90</b>	<b>87,74</b>	<b>90,88</b>	

Tabela 3.3: Resultados obtidos com o método proposto para imagens de células tronco embrionárias. Todos os números são valores médios calculado sobre as imagens de cada grupo. A última coluna mostra quando o sexto passo (clusterização do grafo) do algoritmo foi utilizado. A última linha apresenta o valor médio para *precision*, *recall* e *F-measure* sobre todas as imagens.

Devido à fluorescência, o fundo dessas imagens não é uniforme (Figuras 2.4(b) e 3.5). Logo, a etapa de segmentação de fundo presente no passo 1 (pré-processamento) do método proposto foi aplicada em todas estas imagens. Os resultados para os grupos 1, 2 e 3 foram obtidos incluindo o passo 6 no processo. Para os grupos de 4 à 7 esse passo não foi utilizado, como discutido a seguir.

No caso de imagens de migração celular de EB com aumento de  $20\times$  (grupo 4) e imagens de colônias de células mES sobre MEF com aumento de  $20\times$  e  $10\times$  (grupos 5 e 6, respectivamente), devido a escala de aumento utilizada, as células presentes nestas imagens são muito pequenas e apresentam apenas um ponto brilhante. Logo, se o passo 6 (clusterização do grafo) do método proposto for aplicado, alguns caminhos simples que representam células (CML) distintas podem ser agrupados. Como consequência, estas células que haviam sido segmentadas corretamente serão perdidas. Portanto, para estes tipos de imagens, o algoritmo de clusterização de grafos não deve ser aplicado. Utilizando apenas os cinco primeiros passos, foi obtido um valor médio para *F-measure* de 93,87%, 83,20% e 87,78% para os grupos 4, 5 e 6, respectivamente.

Embora as imagens de neuroesferas (grupo 7) tenham sido capturados com um aumento de  $40\times$ , devido a fatores biológicos estas células apresentam apenas um ponto brilhante quando visualizadas por meio de um microscópio fluorescente. Assim, como explicado anteriormente, o algoritmo de clusterização não é



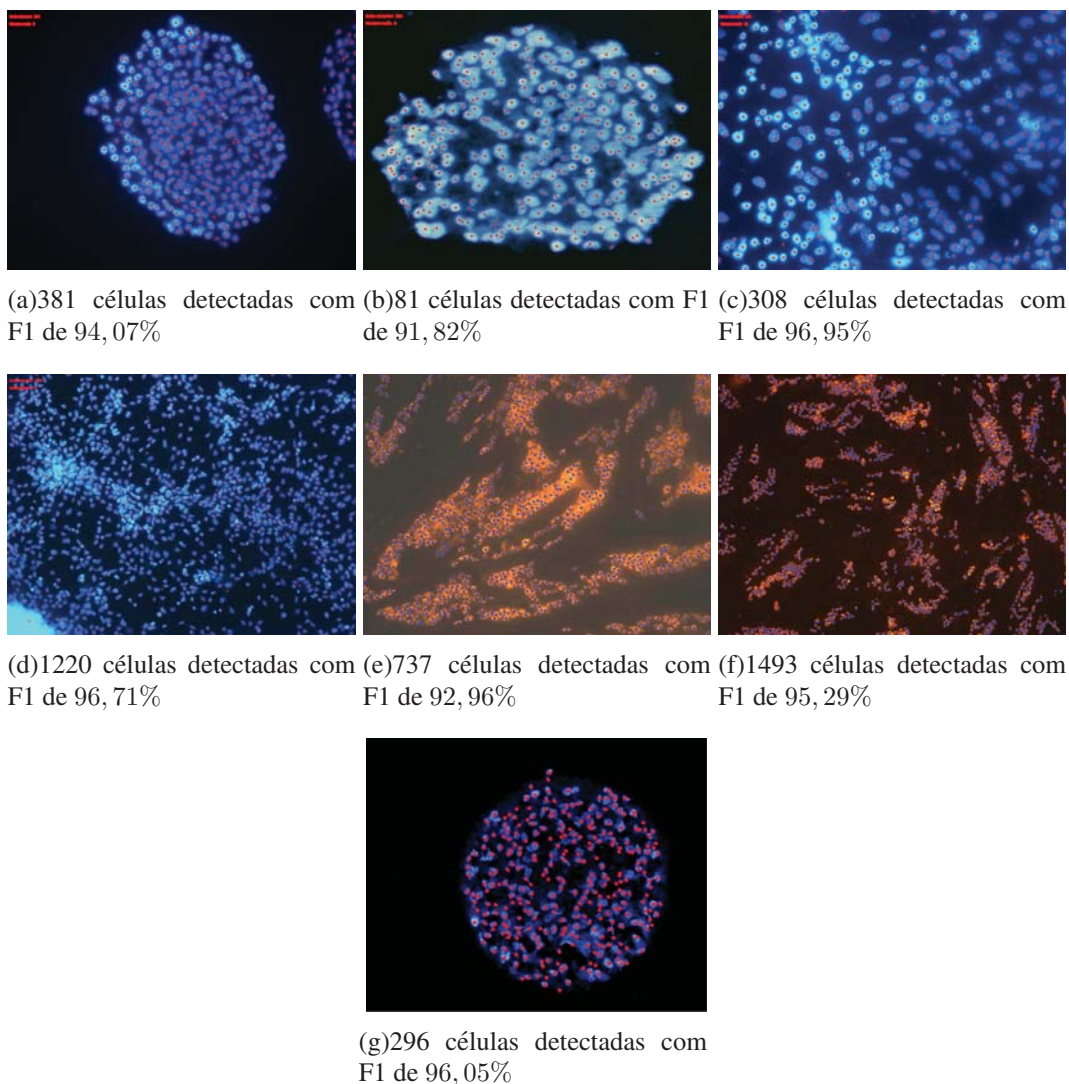


Figura 3.6: Resultados obtidos com o método proposto: (a) e (b) mostram imagens de EB cryosections com um nível de ruído aceitável (grupo 1) e presença de forte ruído (grupo 2), respectivamente; (c) e (d) apresentam imagens de migração de EB com aumento de  $40\times$  e  $20\times$  (grupos 3 e 4), respectivamente; (e) e (f) mostram imagens de colônias de mES sobre MEF com aumento de  $20\times$  e  $10\times$  (grupos 5 e 6), respectivamente; e (g) apresenta uma imagem de neuroesfera.

necessário. Para essas imagens, o método proposto obteve uma média de 94,71%, 90,95% e 92,67% para *precision*, *recall* e *F-measure*, respectivamente.

Para imagens de seções de corte em corpos embriões (EB cryosection – grupos 1 e 2) e imagens de migração celular de EB (grupo 3), devido ao grande fator de aumento utilizado ( $40\times$ ) no momento da captura das imagens, essas células são exibidas com uma melhor resolução e, como consequência, apresentam vários pontos brilhantes em seu interior. Assim, a fim de melhorar os resultados obtidos para essas imagens, o sexto passo do método proposto foi utilizado.

Adicionando o algoritmo de clusterização de grafo ao processo, os valores para *precision*, *recall* e *F-measure* para as imagens de EB cryosection foram

melhorados em 2,49%, 0,64% e 1,58%, respectivamente. No que diz respeito à imagens de migração celular de EB, o valor médio para *precision* foi melhorado em 22,41%. No entanto, algumas células que estavam muito próximas (com distância inferior a  $\lambda$ ) foram segmentadas como uma só, aumentando o número de falsos negativos. No entanto, o valor para F1 aumentou de 77,83% para 86,09% em relação à essas imagens. A tabela 3.5 compara os resultados obtidos com e sem a aplicação do passo 6 para os grupos de imagens apresentados na tabela 3.4.

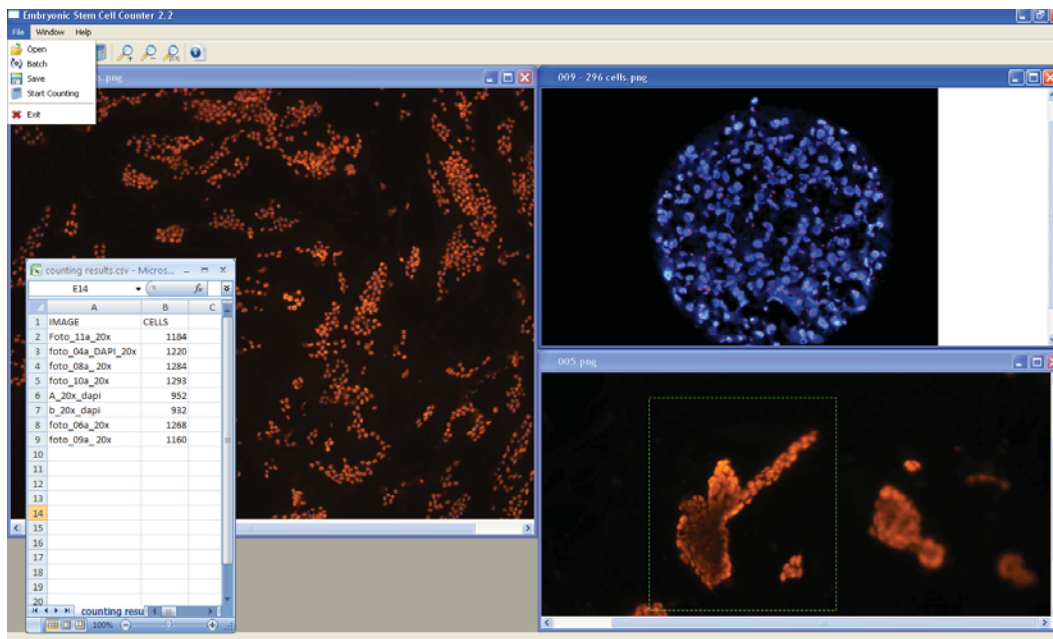
Como demonstrado aqui, o método proposto provê resultados satisfatórios para imagens de células tronco embrionárias obtidas através de um microscópio fluorescente. Entretanto, da mesma forma que no experimento anterior, este método é propenso a erros quando o contraste entre as células ou entre as células e o fundo da imagem é muito baixo. Em imagens onde as células possuem um baixo contraste entre elas, células diferentes podem pertencer à mesma componente. Em se tratando de imagens com um contraste muito baixo entre as células e o fundo, algumas células podem cair na mesma classe de luminância que contém o fundo da imagem ou ainda desaparecer durante a etapa de segmentação do fundo. Como consequência de ambas as situações, estas células não serão segmentadas individualmente. No entanto, os números apresentados na Tabela 3.3 estão de acordo com resultados obtidos pelos biólogos e, segundo eles, o método proposto é robusto, eficaz e confiável para práticas biológicas nesse contexto.

Utilizando a metodologia apresentada nesta tese, foi desenvolvida uma ferramenta computacional chamada *Embryonic Stem Cell Counter* – ESCC, para segmentação e contagem automática de células tronco embrionárias em imagens de microscopia fluorescente. A Figura 3.7 mostra um *screenshot* do ESCC. Esta ferramenta vem sendo utilizada no Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ desde 2009 e pode ser baixada gratuitamente em <http://escs.inf.puc-rio.br/>. Através desta aplicação, os biólogos são capazes de reduzir o tempo médio de contagem de 15 minutos para 6,2 segundos por imagem. Além disso, uma vez que o método usa sempre os mesmos critérios, elimina completamente a subjetividade, fornecendo resultados confiáveis para experimentos de grande escala em horas, contra meses de inspeção visual entediante.

### 3.2.5

#### Comparação com o método de watershed

A fim de comparar o método proposto com o algoritmo de watershed por inundação [54], imagens de cada grupo foram selecionadas aleatoriamente e 6 conjuntos, cada um representando o respectivo grupo principal, foram construídos. A Tabela 3.4 mostra a quantidade e o tipo de imagem para cada conjunto criado e indica qual grupo ele representa.



(a)

Figura 3.7: *Embryonic Stem Cell Counter software* (ESCC), aplicativo gratuito desenvolvido para detectar e contar automaticamente células tronco embrionárias em imagens de microscopia fluorescente.

Da mesma forma que para as fotos de objetos, as imagens de cada conjunto foram pré-processadas aplicando o passo 1 do método proposto com os mesmos valores para os parâmetros  $\sigma$  e  $x$ , apresentados na Tabela 3.2. Estas imagens foram então processadas utilizando-se o *plugin* para o ImageJ [2] fornecido pela *Biomedical Imaging Group* - EPFL [82].

Conj.	Grupo	Composto de
1	1 e 2	20 imagens de EB cryosections
2	3	12 imagens de migração celular de EB com aumento de 40×
3	4	6 imagens de migração celular de EB com aumento de 20×
4	5	14 imagem de colônias de mES sobre MEF com aumento de 20×
5	6	5 imagem de colônias de mES sobre MEF com aumento de 10×
6	7	7 imagens de neuroesferas

Tabela 3.4: Conjuntos representando os grupos principais. A primeira coluna indica os conjuntos e a segunda os respectivos grupos que eles representam. A terceira coluna apresenta o número e o tipo de imagem.

As imagens processadas pelo algoritmo de watershed foram analisadas e avaliadas visualmente pela autora baseada em exemplos de contagem correta fornecidos pelos biólogos. Da mesma forma que para o método proposto, tanto as células que não foram segmentadas (falsos negativos) quanto os artefatos que foram incorretamente classificados como células (falsos positivos) foram identificados. Assim, as medidas de *precision*, *recall* e *F-measure* foram calculadas para



cada imagem e em seguida a média aritmética para cada conjunto foi obtida. A Tabela 3.5 apresenta os valores médios para *precision*, *recall* e *F-measure* para cada um dos conjuntos e a Figura 3.10 compara os resultados obtidos para cada imagem.

Observando a Figura 3.10 pode-se perceber que o método proposto possui melhor desempenho que o algoritmo de watershed para a maioria das imagens. As Figuras 3.8 e 3.9 apresentam algumas imagens processadas por ambos os métodos.

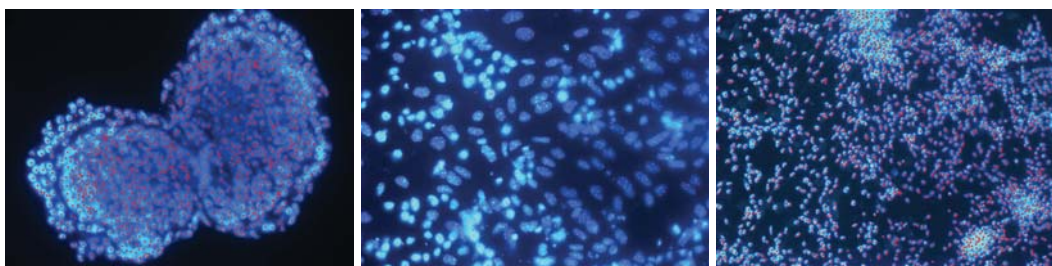
Conj.	Método Proposto						Wathershed		
	Alg. de Mineração			Alg. de Clusterização			P	R	F1
	P	R (%)	F1	P	R (%)	F1			
1	93,57	93,65	93,55	95,82	94,03	94,86	62,80	97,94	76,34
2	62,69	94,21	74,42	95,51	89,45	92,23	34,36	98,12	50,21
3	96,48	95,67	96,05	97,14	84,96	90,62	76,75	97,65	85,86
4	96,05	88,99	92,29	95,27	78,85	86,03	82,01	95,59	88,21
5	97,70	77,78	86,07	97,68	77,08	85,59	83,69	93,77	88,19
6	96,58	90,79	93,55	95,86	84,25	89,49	68,91	97,96	80,86

Tabela 3.5: Comparação entre método proposto, com e sem o passo 6 (clusterização do grafo), e o algoritmo de watershed [54]. A primeira coluna indica os conjuntos de imagens e as demais apresentam os resultados obtidos pelo método proposto e pelo watershed. Todos os números são valores médios obtidos sobre todas as imagens do respectivo conjunto.

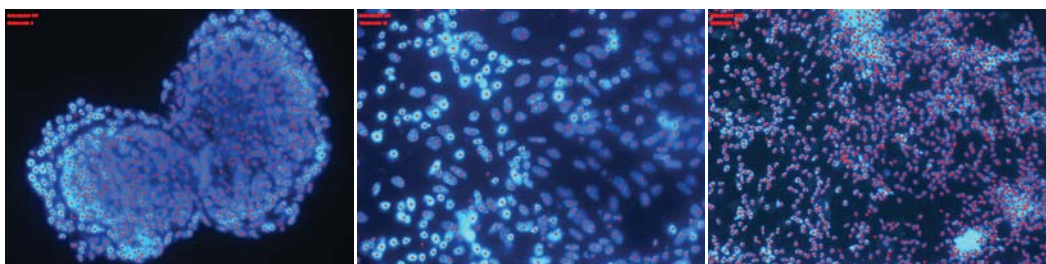
Em se tratando de imagens de colônias de células mES sobre MEF com aumento de  $10\times$  (conjunto 5), pode-se notar que, na média, o algoritmo de watershed provê melhores resultados. Este obteve valores médios para *precision*, *recall* e *F-measure* de 83, 69%, 93, 77% e 88, 19%, respectivamente, contra 97, 70%, 77, 78% e 86, 07%, alcançado pelo método proposto. Nas imagens capturadas com aumento de  $10\times$ , as células presentes são muito pequenas e, geralmente, têm baixo contraste. Por este motivo, o método apresentado nesta tese não detecta tantas células quanto o algoritmo de watershed. No entanto, a diferença entre os valores de *F-measure* é inferior a 2, 2%. Além disso, para atingir este resultado, o valor do parâmetro que define o nível de inundação utilizado pelo algoritmo de watershed deve ser ajustado para cada uma das imagens, enquanto o método proposto é facilmente parametrizado para cada conjunto.

No caso das imagens de EB cryosections (conjunto 1), de migração celular de EB com aumento de  $40\times$  e  $20\times$  (conjuntos 2 e 3, respectivamente), de colônias de células mES sobre MEF com aumento de  $20\times$  (conjunto 4), e imagens de neuroesferas (conjunto 6), o método proposto é, em média, 31% mais preciso que o algoritmo de watershed. Além disso, foi obtido um valor médio para *F-measure* superior a 90% contra 76% alcançado pelo watershed.

De modo geral, o algoritmo de watershed provê resultados satisfatórios para imagens onde as células não estão muito sobrepostas e não contêm mais de um

**Imagens processadas pelo algoritmo de watershed**

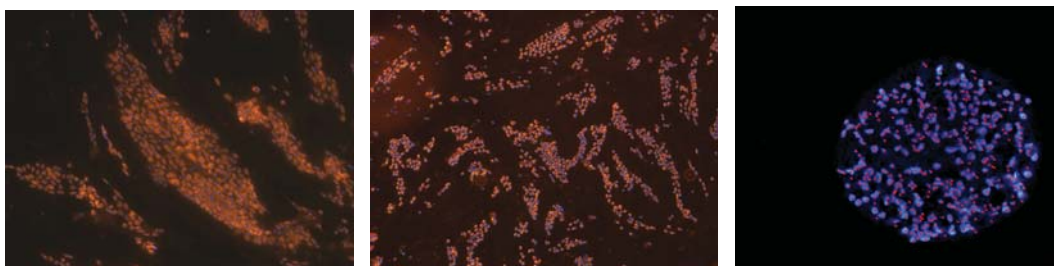
(a)1149 células detectadas com F1 de 77,51%      (b)1055 células detectadas com F1 de 39,05%      (c)2130 células detectadas com F1 de 83,10%.

**Imagens processadas pelo método proposto**

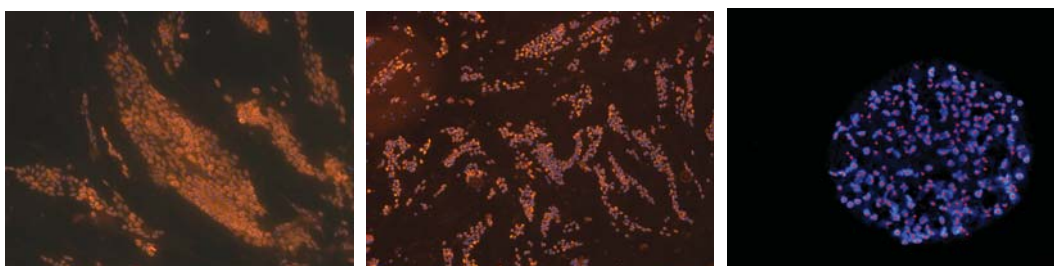
(d)647 células detectadas com F1 de 96,21%      (e)246 células detectadas com F1 de 98,1%      (f)1489 células detectadas com F1 de 97,50%.

Figura 3.8: Resultados obtidos com o método proposto e com o algoritmo de watershed: (a) e (d) comparam os resultados para imagens de EB cryosection; (b) e (e) para imagens de migração de EB com aumento de 40 $\times$ ; e (c) e (f) para imagens de migração de EB com aumento de 20 $\times$ . Os pontos em vermelho e em azul assinalam as células que foram detectadas.

ponto brilhante. Caso contrário, este geralmente produz uma super-segmentação como resultado (Figura 3.8(b)). No entanto, se as células estiverem fortemente agrupadas e/ou sobrepostas como, por exemplo, na imagem da Figura 3.8(a) ou apresentem muitos pontos brilhantes, seus resultados são inferiores aos obtidos com o método proposto. Outra desvantagem do algoritmo de watershed é que, para se obter resultados satisfatórios, é necessário avaliar a saída para cada nível de inundação e então escolher aquele que produz o melhor resultado para a imagem corrente.

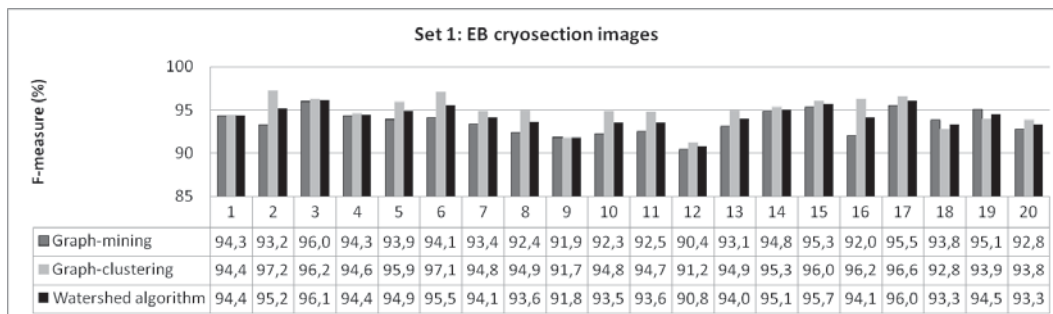
**Imagens processadas pelo algoritmo de watershed**

(a) 815 células detectadas com F1 de 89,86%. (b) 1410 células detectadas com F1 de 92,74%. (c) 396 células detectadas com F1 de 76,68%.

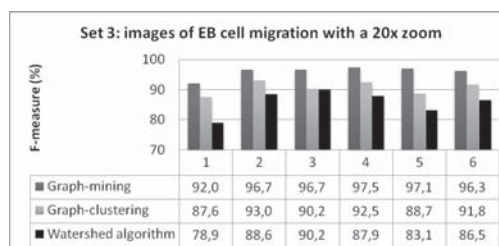
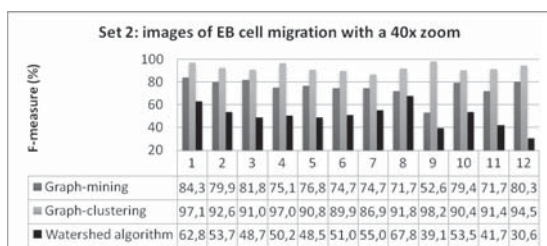
**Imagens processadas pelo método proposto**

(d) 585 células detectadas com F1 de 92,96%. (e) 1085 células detectadas com F1 de 90,00%. (f) 215 células detectadas com F1 de 91,35%.

Figura 3.9: Resultados obtidos com o método proposto e com o algoritmo de watershed: (a) e (d) para imagens de colônias de células mES sobre MEF com aumento de 20 $\times$ ; (b) e (e) para imagens de colônias de mES sobre MEF com aumento de 10 $\times$ ; e (c) e (f) para imagens de neuroesferas. Os pontos em vermelho e em azul assinalam as células que foram detectadas.

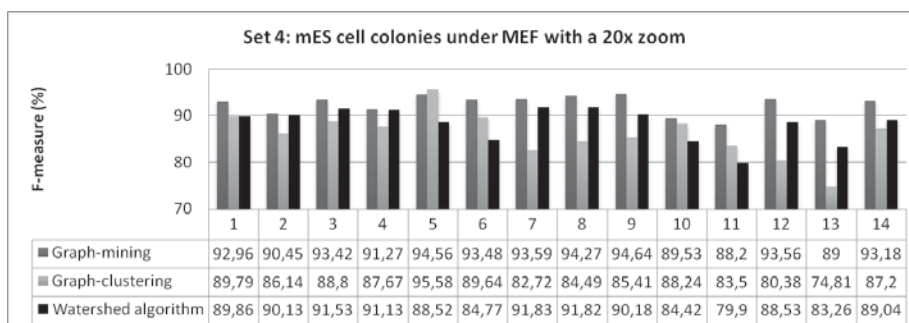


(a)Imagens de EB cryosection (conjunto 1)

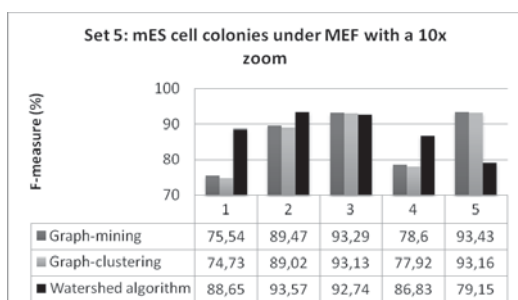


(b)Imagens de migração celular de EB com aumento de 40× (conjunto 2)

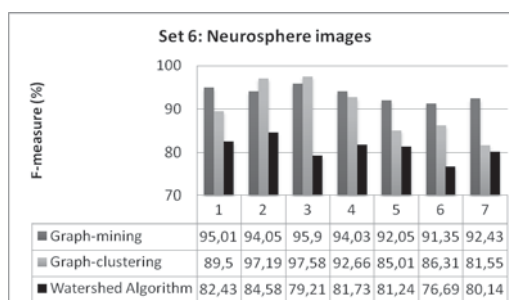
(c)Imagens de migração celular de EB com aumento de 20× (conjunto 3)



(d)Imagens de colônias de células mES sobre MEF com aumento de 20× (conjunto 4)



(e)Imagens de colônias de células mES sobre MEF com aumento de 10× (conjunto 5)



(f)Imagens de neuroesferas (conjunto 6)

Figura 3.10: Comparação entre o método proposto e a algoritmo de watershed no que diz respeito à imagens de células tronco embrionárias. Todas as imagens foram analisadas e avaliadas visualmente pela autora baseada em exemplos de contagem correta fornecidos pelos biólogos do Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ.