

4 Conclusão

Embora avanços na área de processamento de imagens e visão computacional vêm possibilitando a segmentação, reconhecimento e detecção automática de vários tipos de objetos, em se tratando de imagens onde os objetos são idênticos ou muito próximos em relação a cor ou textura e aparecem parcialmente sobrepostos ou fortemente agrupados, segmentá-los individualmente é um problema que métodos clássicos de segmentação, tais como watershed ou processos morfológicos básicos, podem não solucionar adequadamente. Outro problema é contar objetos semelhantes em imagens previamente segmentadas. Esta tarefa, quando executada manualmente, é tediosa, demorada e que, devido ao cansaço visual, exige um grande esforço humano. Além disso, seu caráter subjetivo pode levar a uma grande variação nos resultados. Na prática, contar grandes quantidades de objetos manualmente leva a um alto desvio padrão, obtendo-se resultados de baixa qualidade.

Para suprir os problemas citados anteriormente uma abordagem bastante utilizada em processamento de imagens é considerar uma imagem monocromática como uma superfície topológica. Desta forma objetos de interesse podem aparecer como picos (*sharp mountains*), domos (*smooth hills*) ou vales (*V- or U-shaped*). Os domos presentes nesta superfície são resultados de regiões da imagem que possuem, geralmente, um ponto central brilhante e esta luminância diminui gradualmente deste ponto em direção a borda do objeto. Entretanto, devido a fatores como a presença de ruído, iluminação inadequada e até mesmo características intrínsecas dos objetos fotografados, um objeto na imagem pode apresentar mais de um ponto brilhante. Como consequência, o domo correspondente pode conter vários pontos de máximo local em seu topo. Portanto, um domo fica caracterizado por um *cluster* de máximos locais (CLM).

Existe um grande número de objetos em vários tipos de imagens que são representados por CML quando a imagem é considerada como uma superfície topológica. Células em imagens de microscopia fluorescente [76], palmeiras de óleo em imagens IKONOS [42], microcalcificações em imagens de mamografia digital [41], filamentos de miosina no músculo em imagens de eletromicrografias [79] e, *spots* em imagens biológicas [73] e em imagens de 2-DE gel [81] são alguns exemplos. Assim, a segmentação e contagem, tanto manual quanto automática,

destes objetos podem ser simplificadas pela tarefa de segmentar e contar os CML presentes da superfície que representa a imagem.

Nesta tese foi apresentado um novo método para segmentação e contagem de CML em uma imagem digital. Na metodologia proposta a imagem é considerada como uma superfície topológica e os objetos de interesse são representados por CML. Através da informação de luminância é gerada uma representação da imagem baseada em grafo. O CML é caracterizado por um subgrafo e um algoritmo de mineração é utilizado para detectar os *clusters*. Por fim, de acordo com características da imagem, um algoritmo de clusterização pode ser incorporado ao processo para melhorar o resultado final. A contagem dos objetos é um resultado direto do algoritmo de mineração e de clusterização, quando este último é aplicado.

O método proposto foi testado em uma base de dados com mais de 200 imagens. A fim de avaliar sua qualidade e eficiência, 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 primeiro experimento foram validados pela autora e os obtidos no segundo experimento pelos biólogos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Para as fotos de objetos foi obtido um valor médio de 92,32% para *precision*, de 80,51% para *recall*, e 85,33% para *F-measure*. Para as imagens de células tronco obteve-se um valor médio de 94,90%, 87,74% e 90,88% para *precision*, *recall*, e *F-measure*, respectivamente.

Vantagens do método proposto incluem a sua tolerância a variações no tamanho e forma dos objetos em um determinado grupo de imagens e sua fácil parametrização para lidar com diferentes grupos de imagens provenientes de objetos distintos. Através de testes executados em uma imagem por grupo, pode-se facilmente estabelecer os valores para o tamanho do intervalo (ϵ) utilizado na etapa de partição do histograma e, se necessário, para λ que representa a metade do diâmetro médio dos objetos medido a partir da imagem de entrada. Embora estes valores tenham sido inferidos sobre uma única imagem, dadas as semelhanças entre imagens de um mesmo grupo, eles podem ser generalizados. Assim, embora o método proposto não seja automático, ele pode ser automatizado para grupos específicos de imagens. Como resultado, através deste método é possível reduzir os esforços, eliminar a subjetividade dos resultados, simplificar e agilizar a tarefa de segmentação e contagem necessária em várias áreas de pesquisa.

Embora funcione bem para a maioria das imagens, o método proposto possui algumas limitações. É propenso a erros em imagens onde os objetos apresentam uma forma muito alongada. Apesar de o valor para λ ser calculado de modo adequado para estas imagens ($\lambda = (\text{eixo maior} + \text{eixo menor})/4$), o algoritmo de clusterização não é capaz de agrupar os CML 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 λ . Outra situação desfavorável é quando a imagem apresenta objetos muito próximos em relação a cor ou textura e que possuem um baixo contraste entre eles. Nesta situação, objetos diferentes podem pertencer à mesma componente conectada e como consequência não serem segmentados individualmente. Para imagens com um contraste muito baixo entre os objetos e o fundo da imagem o método proposto pode gerar resultados insatisfatórios, pois alguns objetos podem ficar na mesma classe de luminância que contém o fundo da imagem ou ainda desaparecer durante a etapa de segmentação do fundo.

Apesar das falhas mencionadas acima, conforme demonstrado ao longo desta tese o método proposto fornece resultados satisfatórios. As métricas mostram que o método desenvolvido é suficientemente robusto para segmentação e contagem de objetos em imagens reais. No mais, de acordo com os biólogos do Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ, o método proposto é robusto, eficaz e confiável para práticas biológicas no que diz respeito a segmentação e contagem de células tronco embrionárias em imagens de microscopia fluorescente.

Em comparação com o algoritmo de watershed por inundação proposto por Meyer [54], os números mostram que a metodologia apresentada é, em média, 25% mais precisa para fotos de objetos. Para as 28 imagens que formam o grupo 1, o método proposto obteve valores médios para *precision*, *recall* e *F-measure* de 92,32%, 80,51% e 85,33% respectivamente, contra 67,26%, 88,05% e 74,02% alcançados pelo watershed.

Para imagens de células tronco embrionárias, pôde-se perceber que o método proposto provê melhores resultados para a maioria das imagens. No caso das imagens de EB cryosections, de migração celular de EB com aumento de 40 \times e 20 \times , de colônias de células mES sobre MEF com aumento de 20 \times , e imagens de neuroesferas, o método proposto é, em média, 31% mais preciso que o algoritmo de watershed. Por outro lado, para imagens de colônias de células mES sobre MEF com aumento de 10 \times , observou-se que o algoritmo de watershed provê resultados um pouco melhores do que aqueles gerados pelo método proposto. 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 grupo. Para as imagens de células tronco, foi obtido um valor médio para *precision*, *recall* e *F-measure* de 96,47%, 87,67%, 91,60%, respectivamente contra 68,09%, 96,84%, 78,28% atingido pelo algoritmo de watershed.

De moto geral, o algoritmo de watershed provê resultados satisfatórios para

imagens onde os objetos não estão muito sobrepostos e apresentam apenas um ponto brilhante. No entanto, se estes estiverem fortemente agrupadas e/ou sobrepostos 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.

Utilizando a metodologia apresentada neste trabalho também foi desenvolvida uma aplicação computacional – *Embryonic Stem Cell Counter* (ESCC) – para segmentação e contagem automática de células tronco embrionárias em imagens de microscopia fluorescente. O ESCC vem sendo utilizado, desde 2009, pelos biólogos do Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ, e está se tornando uma ferramenta bastante útil, dado que é suficientemente robusto para práticas biológicas. 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 algoritmo 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.

Sendo o método proposto facilmente parametrizável para lidar com variados tipos de objetos, desde que estes possam ser representados por CML quando a imagem é interpretada como uma superfície, através da metodologia apresentada nesta tese tem-se a expectativa de possibilitar e facilitar a construção de ferramentas computacionais capazes de automatizar a etapa de segmentação e contagem de objetos em imagens digitais. Desta forma, espera-se melhorar a etapa de segmentação e contagem, a qual é necessária em várias áreas de pesquisa, tornando-a mais rápida, eficiente e precisa.

4.1 Trabalhos Futuros

Com o objetivo de generalizar o método proposto foram feitos testes em vários tipos de imagens diferentes. Comparando os resultados gerados com aqueles apresentados nos trabalhos onde se obtiveram as imagens, pode-se dizer que o método proposto provê resultados satisfatórios. No entanto, devido à ausência de um especialista para estas imagens estes resultados não foram validados. Além disso, conforme descrito ao longo desta tese o método proposto apresenta alguns desafios a serem superados. Assim, com a experiência adquirida neste trabalho, são sugeridas as seguintes extensões para esta tese e aplicação do método proposto:

4.1.1

Aprimoramento do método proposto

Como primeiro trabalho futuro, pretende-se solucionar ou ao menos amenizar as deficiências do método proposto. Conforme apresentado nesta tese, este método é propenso a erros em imagens onde os objetos são muito semelhantes em relação a cor ou textura e apresentam um baixo contraste entre eles. Nesta situação, objetos diferentes podem pertencer a mesma componente conectada e como consequência não serem segmentados individualmente. Uma possível solução para este problema é particionar o histograma da imagem adaptativamente ao invés de utilizar intervalos de tamanho fixo. Assim, a parte da superfície que contém os CML (geralmente o topo) pode ser dividida em um número maior de intervalos impedindo que objetos diferentes pertençam a mesma componente.

Para a situação onde a imagem apresenta um contraste muito baixo entre os objetos e fundo, uma possível solução é substituir o *threshold* simples por um adaptativo. Este novo *threshold* dificulta o desaparecimento de objetos durante a etapa de segmentação do fundo. No entanto, não impede que alguns objetos pertençam a mesma componente que representa o fundo da imagem. Esta situação seria solucionada pela partição adaptativa do histograma descrita anteriormente.

Para imagens onde o objeto de interesse apresenta forma alongada, uma possível solução é utilizar uma medida diferente para λ . Considerando o objeto de interesse como uma elipse, o valor de λ pode se dado pelo o tamanho total do eixo maior (AA') ou uma proporção deste tamanho ($eAA' = a\sqrt{a^2 - b^2}$, onde e representa a excentricidade e a e b a metade do eixo maior e menor, respectivamente). No entanto, muito provavelmente, esta solução não resolveria o problema totalmente, mas amenizaria esta deficiência do método. Outra possível solução é o uso de métricas diferentes da distância Euclidiana na etapa de clusterização do grafo.

4.1.2

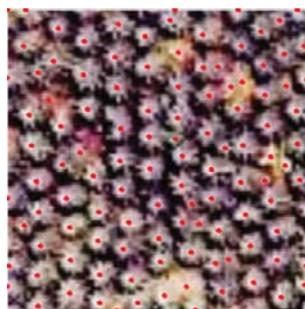
Aplicação do método em outros tipos de imagens

A metodologia apresentada neste trabalho pode ser aplicada a diversos tipos de imagens, desde que os objetos de interesse possam ser representados por CML quando a imagem é interpretada como uma superfície topológica.

Na tentativa de generalização do método proposto foram feitos testes em vários tipos de imagens diferentes. Comparando os resultados preliminares de testes feitos em imagens IKONOS [42], imagens bidimensionais de *electrophoresis gels* [81], imagens de *solitary odontogenic keratocyst lining* [48] e imagens de microscopia eletrônica muscular [79] com aqueles apresentados nos trabalhos onde as imagens foram obtidas, pode-se dizer que o método proposto gera resultados

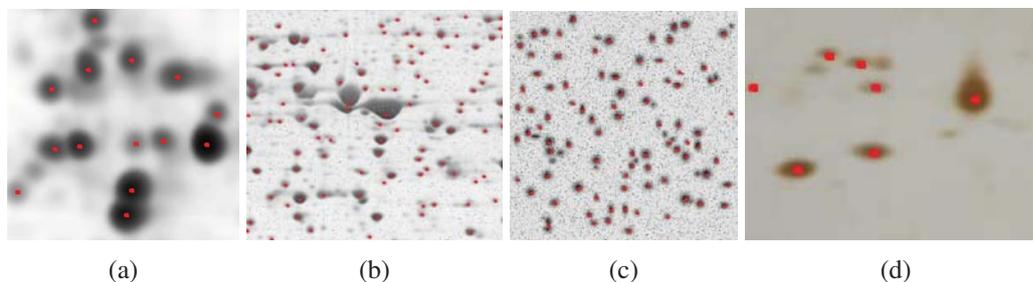
promissores, conforme mostrado nas Figuras 4.1, 4.2, 4.3 e 4.4. No entanto, devido a falta de um especialista, estes resultados não foram validados. Assim, como uma primeira extensão para esta tese pode-se pensar em um estudo aprofundado sobre estas imagens validando os resultados obtidos, e posteriormente, caso necessário, uma adaptação (extensão) do método proposto para cada uma delas.

A Figura 4.1 apresenta os resultados obtidos para imagens IKONOS. Esta imagem mostra palmeiras que produzem óleo e as árvores segmentadas são indicadas pelos pontos na cor vermelha. A Figura 4.2 mostra os resultados obtidos para imagens bidimensionais de *electrophoresis gels*. Nestas imagens o objetivo é encontrar os *spots*, os quais representam proteínas. Os *spots* segmentados são indicados pelos pontos na cor vermelha. A Figura 4.3 apresenta os resultados geradas para imagens de *solitary odontogenic keratocyst lining* que são cistos dentários de origem não inflamatória. Os pontos na cor vermelha indicam os cistos segmentados. Por último, a Figura 4.4 mostra os resultados obtidos para imagens de micrografias eletrônicas muscular. Os pontos na cor vermelha indicam os filamentos de miosina segmentados.



(a)

Figura 4.1: Resultados preliminares obtidos com o método proposto para imagens do tipo IKONOS [42]. Os pontos na cor vermelha indicam as árvores segmentadas.



(a)

(b)

(c)

(d)

Figura 4.2: Resultados preliminares obtidos com o método apresentado neste trabalho para imagens bidimensionais de *electrophoresis gels* [81]. Os pontos na cor vermelha indicam os *spots* segmentados.

Outras imagens interessantes são imagens de células tronco provenientes de marcadores celulares distintos. A Figura 4.5 mostra um exemplo de uma imagem de

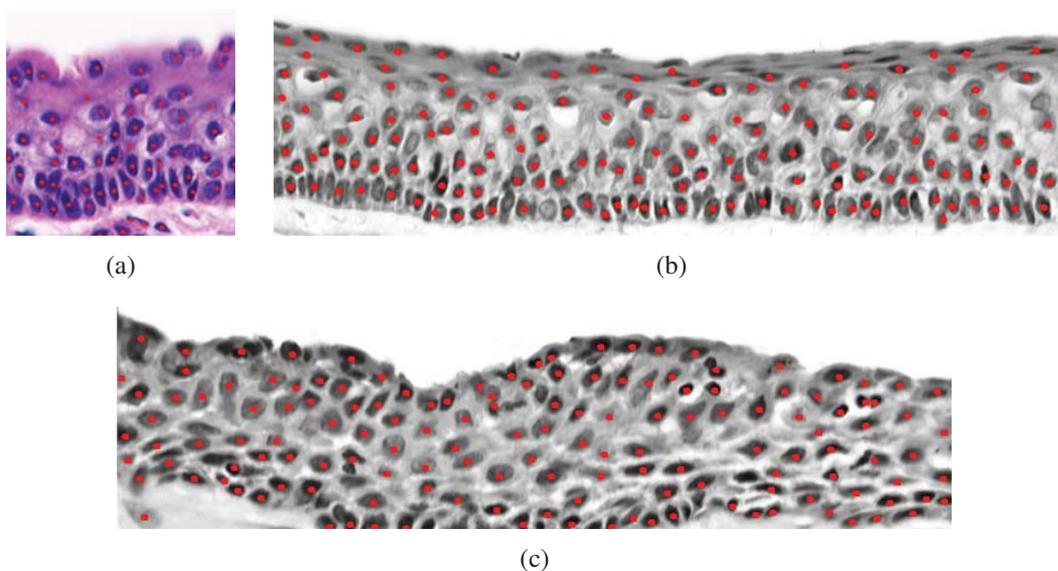


Figura 4.3: Resultados preliminares obtidos com o método apresentado neste trabalho para imagens de *solitary odontogenic keratocyst lining* [48]. Os pontos vermelhos representam os cistos segmentados.

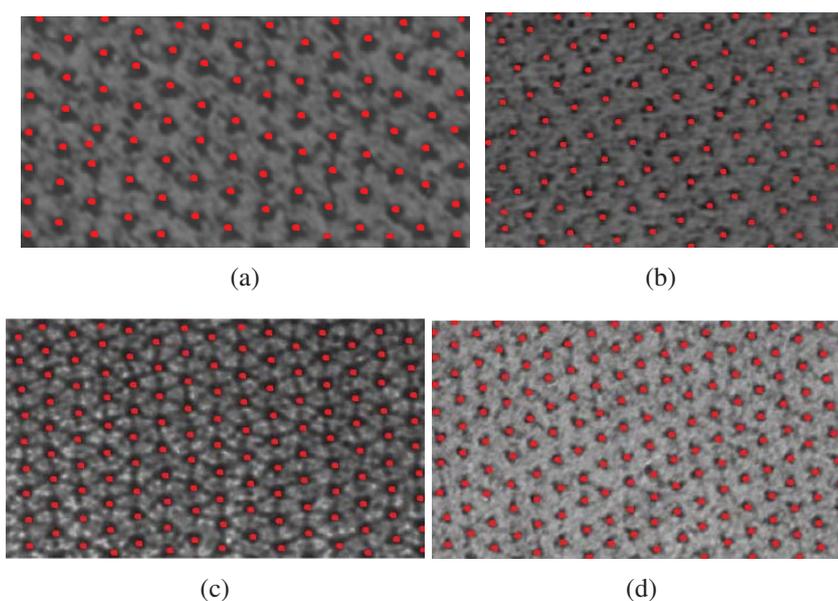


Figura 4.4: Resultados preliminares obtidos com o método apresentado neste trabalho para imagens de micrografias eletrônicas muscular [79]. Os pontos vermelhos indicam os filamentos de miosina detectados.

célula tronco "colorida" com três tipos de marcadores diferentes: marcador DAPI¹ que marca todas as células (Figura 4.5(a)); marcador β -III tubulina (Figura 4.5(b)), específico para neurônios e o marcador GFAP² (Figura 4.5(c)) que é um marcador

¹DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) 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. Como se liga ao DNA, marca todas as células.

²GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*) é um marcador específico para células gliais que são

de células gliais. Através destas imagens é possível identificar a porcentagem de células que se diferenciaram em neurônios e em células gliais (células não neuronais do sistema nervoso central que proporcionam suporte e nutrição aos neurônios).

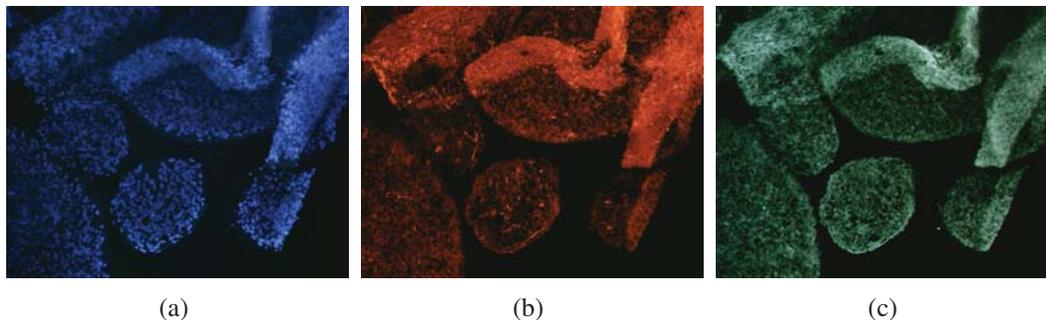


Figura 4.5: Exemplo de imagens de células tronco "coloridas" com três marcadores celulares diferentes: (a) marcador DAPI: marca todas as células; (b) β - III tubulina - marcador específico para neurônios; e (c) GFAP - marcador glial.

Estendendo o método proposto para lidar com marcadores além do DAPI como, por exemplo, β -III tubulina, GFAP, Map2, Nestina, Sox e Tuj1, torna-se possível o cálculo automático do número de células diferenciadas, não diferenciadas e de células mortas para uma única imagem e conseqüentemente de um experimento. Estas informações são fundamentais para se entender e validar o processo de diferenciação celular estabelecido para dar origem a um tipo específico de célula.

Como alguns marcadores se ligam a estruturas celulares diferentes como, por exemplo, ao núcleo ou citoplasma, trabalhar com estes marcadores pode implicar em lidar com estruturas (morfologias) diferentes, as quais podem não corresponder a CML. Desta forma, faz-se necessário uma adaptação do algoritmo de mineração para identificar corretamente o subgrafo (padrão) que corresponde a esta nova estrutura.

4.1.3

Desenvolvimento de um método para detecção do limbo do olho humano

Utilizando a metodologia apresentada nesta tese, existe a possibilidade de se desenvolver um método automático para detecção do limbo dos olhos através da posição do brilho do olho. O limbo do olho é a região de contorno entre a esclera e a íris. O brilho, ou primeira imagem de Purkinje é o reflexo luminoso gerado, a partir do Teste de Hirschberg, dentro da região do limbo [23], conforme ilustrado na Figura 4.6.

Através do método proposto, pode-se facilmente identificar o brilho do olho. A Figura 4.7 mostra alguns resultados preliminares. Nesta figura pode-se observar células não neuronais do sistema nervoso central que proporcionam suporte e nutrição aos neurônio.

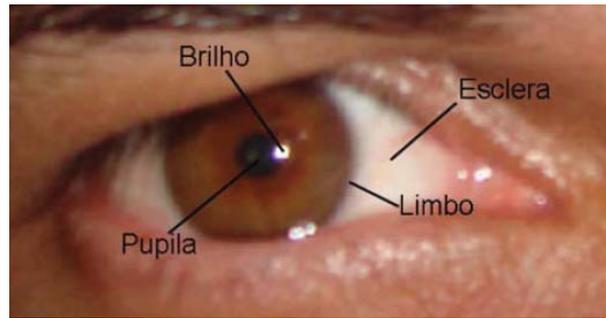


Figura 4.6: Estrutura interna do olho humano.

que além do brilho do olho, o método apresentado neste trabalho também segmentou outros pontos brilhantes, os quais devem ser eliminados. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de um passo adicional para eliminar os elementos segmentados que não corresponde a região de interesse, ou seja, a primeira imagem de Purkinje.

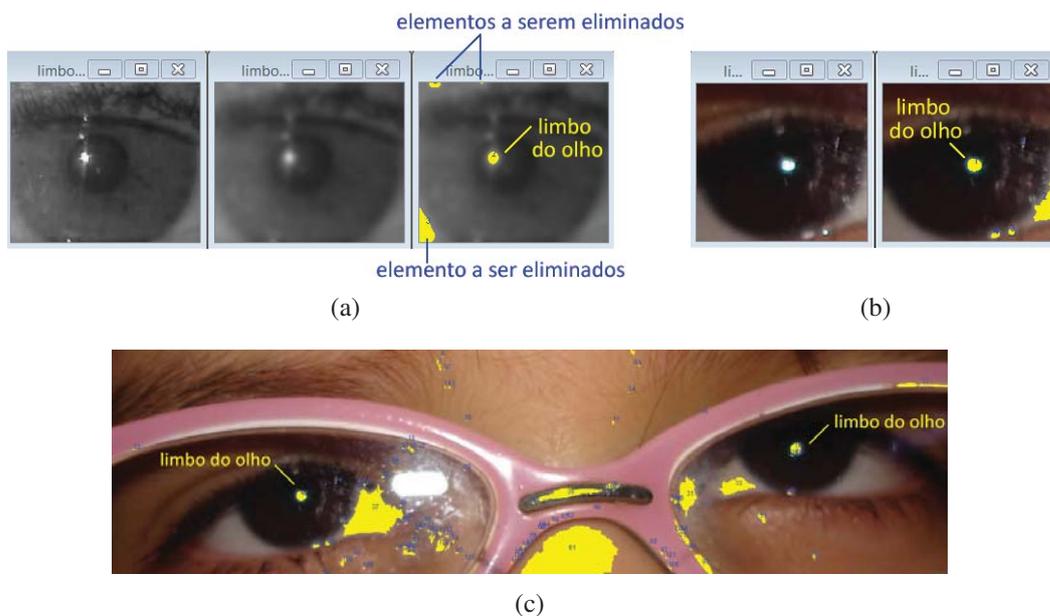


Figura 4.7: Resultados preliminares para detecção da primeira imagem de Purkinje. Note que além do brilho do olho, o método detectou outros pontos brilhantes, os quais devem ser eliminados em um passo adicional.

Para eliminar as estruturas segmentadas que não correspondem a primeira imagem de Purkinje pode-se utilizar a medida de circularidade [4] como critério, pois o brilho do olho geralmente possui uma forma bastante circular. Um CML corresponde a um conjunto de componentes conectadas encaixadas. Desta forma, a sua circularidade é dada pela circularidade da componente mais externa. Logo, analisando a circularidade dos CML encontrados pode-se facilmente identificar aqueles que não correspondem ao brilho do olho, ou seja, CML com circularidade

muito menor do que 1. Outra possibilidade é ranquear os CML de acordo com sua medida de circularidade.

4.1.4 Aplicação de outras métricas

Um estudo interessante e bastante relevante para esta tese seria a aplicação de outras métricas, tais como a métrica de Manhattan, do tabuleiro de xadrez e distância entre os grupos, dentre outras, para medir a distância entre os CML durante o processo de clusterização do grafo.

O método proposto utiliza como métrica a distância Euclidiana, mas pode ser facilmente adaptado para outra métrica. Assim, como trabalho futuro pretende-se estudar o comportamento do algoritmo desenvolvido para métricas diferentes da utilizada atualmente.

4.1.5 Desenvolvimento de um software adaptativo para detecção e contagem de células tronco em imagens de microscopia fluorescente

De modo geral, um método adaptativo é definido como aquele que possui a capacidade de ajustar o seu comportamento em resposta à sua percepção do ambiente e do próprio sistema na forma de auto-adaptação [20].

Assim, uma extensão bastante interessante para este trabalho seria melhorar a aplicação computacional desenvolvida (o ESCC) tornando-a adaptativa. A variação no ambiente é dada pela mudança no tipo de imagem de entrada. Utilizando agentes inteligentes, a nova aplicação computacional deve ser capaz de escolher, de modo automático e autônomo, o algoritmo mais apropriado para a imagem em questão. Ou seja, se auto-adaptar a variações no tipo de imagem.