

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE COMPUTAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA COMPUTAÇÃO



**MÉTODOS PARA SEGMENTAÇÃO NUCLEAR E
AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM IMAGENS
SAGITAIS DE EMBRIÕES DE *DROSOPHILA MELANOGASTER***

DANIELA JUSTINIANO DE SOUSA

Uberlândia - Minas Gerais

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE COMPUTAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA COMPUTAÇÃO



DANIELA JUSTINIANO DE SOUSA

**MÉTODOS PARA SEGMENTAÇÃO NUCLEAR E
AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM IMAGENS
SAGITAIS DE EMBRIÕES DE *DROSOPHILA MELANOGASTER***

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Computação da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciência da Computação.

Área de concentração: Banco de Dados e Imagens.

Orientador:

Prof. Dr. Bruno Augusto Nassif Travençolo

Coorientador:

Prof. Dr. Francisco José Pereira Lopes

Uberlândia, Minas Gerais
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE COMPUTAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA COMPUTAÇÃO

Os abaixo assinados, por meio deste, certificam que leram e recomendam para a Faculdade de Computação a aceitação da dissertação intitulada “**Métodos para segmentação nuclear e avaliação da expressão gênica em imagens sagitais de embriões de *Drosophila melanogaster***” por **Daniela Justiniano de Sousa** como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de **Mestre em Ciência da Computação**.

Uberlândia, 29 de Novembro de 2013

Orientador:

Prof. Dr. Bruno Augusto Nassif Travençolo
Universidade Federal de Uberlândia

Coorientador:

Prof. Dr. Francisco José Pereira Lopes
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Joaquim Cezar Felipe
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Mauricio Cunha Escarpinati
Universidade Federal de Uberlândia

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE COMPUTAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA COMPUTAÇÃO

Data: Novembro de 2013

Autor: **Daniela Justiniano de Sousa**
Título: **Métodos para segmentação nuclear e avaliação da expressão gênica em imagens sagitais de embriões de *Drosophila melanogaster***
Faculdade: **Faculdade de Computação**
Grau: **Mestrado**

Fica garantido à Universidade Federal de Uberlândia o direito de circulação e impressão de cópias deste documento para propósitos exclusivamente acadêmicos, desde que o autor seja devidamente informado.

Autor

O AUTOR RESERVA PARA SI QUALQUER OUTRO DIREITO DE PUBLICAÇÃO DESTE DOCUMENTO, NÃO PODENDO O MESMO SER IMPRESSO OU REPRODUZIDO, SEJA NA TOTALIDADE OU EM PARTES, SEM A PERMISSÃO ESCRITA DO AUTOR.

Dedicatória

*A Deus Pai,
A Maria Santíssima Mãe,
por guiar os meus passos à realização desse sonho.*

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, Senhor de minha Vida, por permitir-me sonhar e lutar pela realização dessa importante conquista. Obrigada Pai amado, por cuidar de cada detalhe, por colocar pessoas abençoadas ao meu redor e fortalecer-me nos momentos difíceis. Obrigada pela benção prestada na conclusão de mais um ciclo importante em minha vida, pela misericórdia e amor infinito. A Ti meu Senhor toda honra e glória!

Ao meu estimado orientador-professor Bruno Augusto Nassif Travençolo, agradeço a paciência, dedicação e orientação concebida. Um sábio tutor, o respeito e confiança em mim depositados, com certeza, foram essenciais para a conclusão dessa pesquisa. Obrigada pela serenidade e segurança dispensada em meus momentos de ansiedade e dúvidas. De ti levarei muito além dos ensinamentos científicos, fica a admiração pelo seu profissionalismo, bondade e sabedoria.

Ao coorientador Francisco José Pereira Lopes, agradeço a atenção durante a construção desse trabalho. Obrigada pelas imagens concedidas e pela disponibilidade em discuti-las.

Ao meu eterno mestre André Augusto Calabrez, por anos atrás incentivar-me a conhecer a pesquisa. Motivando-me a trilhar o caminho por onde tenho andado.

A você minha mãe, o amor mais sublime e puro que Deus poderia me dar. Minha referência e meu exemplo de vida. Obrigada por iluminar os meus dias com tuas doces palavras e teu lindo sorriso. Obrigada por sempre acreditar em mim, mesmo quando, às vezes, nem eu mesma acreditava. Obrigada pelo apoio nos momentos difíceis e de cansaço. Obrigada pela presença e vibração em cada vitória. Minha eterna gratidão pelo teu amor, incentivo e confiança absoluta, com certeza as bases que eu precisava para vencer. Essa conquista é por você!

A você meu amado esposo, agradeço o amor, dedicação e compreensão incondicional. Por ser meu fiel companheiro, mesmo nas madrugadas em claro. Agradeço-te por cuidar tão bem de mim, pelo apoio emocional, e por todos os gestos de atenção e carinho. Por ter tolerado os dias e noites de estudo em que me separei de ti, por ter esperado e me amado. Meu amor, sua presença traz luz e serenidade para os meus dias. Te amo!

Aos meus irmãos Edney e Jacqueline, lindos presentes de Deus em minha vida. Agradeço o amor, carinho e apoio. Obrigada por compreenderem minha ausência, pela paciência e incentivo constante. Não imagino minha vida sem vocês. A você minha irmã, em especial, agradeço pelos três grandes amores que trouxe às nossas vidas, meus amados sobrinhos. Com toda certeza, minha fonte de inspiração. Materialização do amor de Deus em minha vida.

À minha amada família, meus tios e tias, avós, primos e primas, sobrinhos e afilhados. Cada um a sua maneira, esteve presente e contribuiu para realização desse sonho. Louvo e agradeço a Deus por tê-los como família, amo vocês. Em especial, às minhas mãedrinhas

Ilza e Cida, obrigada por acompanharem minha trajetória e serem presença fundamental em minha vida. Agradeço-lhes pelos abraços e carinho a cada retorno ao seio familiar.

Às minhas queridas avós, Dica e Lourdes (*saudades*), por terem sido as primeiras pessoas a me incentivar, motivando-me a colocar em prática valores importantes para que eu chegasse até aqui, como a persistência, fé e a determinação. A minha amada Vó Nair, pelas orações e carinho, que apesar da distância sempre foram constantes.

Aos meus queridos amigos, de longe e de perto, a vocês, o meu sincero agradecimento pelo carinho, amizade e torcida. Em especial, às minhas irmãs de coração, anjos enviados por Deus para iluminar a minha vida. A vocês Nayara, Pollyana, Daniela e Flávia, agradeço o incentivo, mesmo que distante. Obrigada pelas longas e curtas conversas, pelos conselhos, risos, choros e alegrias.

Ao meu amigo Rondinele, que compartilhou comigo conquistas, espaços, saudades, sonhos, e alguns desafios. Agradeço a amizade e o apoio constante, e especialmente, sua alegria.

À minha companheira de jornada acadêmica, Viviane. Sou grata pela amizade, torcida e carinho. Foi maravilhoso dividir mais uma experiência com você.

Aos meus colegas do mestrado e do Grupo de Pesquisa *Banco de Dados e Imagens*, agradeço o convívio harmonioso e respeito. Vou levá-los para sempre em meu coração. De modo especial, agradeço a Cleiane, Juliete e Cícero, pela amizade e estímulos dedicados durante essa fase.

A todos os amigos do MUR, GPP e ECC, dos quais sempre pude contar com suas orações e presteza. Hoje são parte de minha família, fonte de luz e fraternidade em minha vida.

Ao corpo docente da FACOM, pelos ensinamentos acadêmicos fundamentais para a conclusão desse trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa durante o desenvolvimento da pesquisa.

A todos que estiveram presentes, direta ou indiretamente, e contribuíram para a realização desse sonho.

“A persistência é o menor caminho para o êxito.”
Charles Chaplin

Resumo

Nos últimos anos, as técnicas de processamento digital de imagens têm sido largamente utilizadas em conjunto com outras áreas da ciência, incluindo a biologia. Estas técnicas geralmente visam otimizar o tempo, aumentar a precisão e eliminar a subjetividade do processo da simples análise visual. Esse crescimento motivou-se, principalmente, por avanços importantes na Biologia Computacional e pelo aumento considerável dos bancos de imagens biológicas. O presente trabalho propõe métodos para segmentação nuclear e avaliação da expressão gênica em imagens da *Drosophila melanogaster*. O método de segmentação proposto aborda diferentes técnicas de processamento digital de imagens, e consiste em realizar a segmentação automática dos núcleos celulares contidos em imagens sagitais de embriões desse modelo biológico. O método baseia-se na estimativa de curvatura do contorno dos objetos, e consiste em separar núcleos agregados por meio de segmentos traçados entre pontos côncavos correspondentes. A abordagem apresentada é nova para esse cenário, e contribui para a solução do problema de componentes agregados, característica recorrente em aplicações voltadas à segmentação de núcleos. Os métodos de avaliação incluem abordagens para quantificação e visualização da intensidade média de proteína e RNA nas regiões intranuclear e citoplasmática dos embriões de *Drosophila*. O método de quantificação, em específico, possibilita obter o perfil de expressão gênica assumido ao longo do eixo anterior-posterior dos embriões de *Drosophila*. Por outro lado, o método de visualização inclui uma nova abordagem para exibição das imagens sagitais, capaz de organizar os núcleos celulares em uma configuração linear. O uso eficiente dos métodos de avaliação auxilia a interpretação dos dados obtidos. Em geral, os métodos para segmentação nuclear e avaliação da expressão gênica representam um passo essencial para a realização de diversas análises biológicas sobre a *Drosophila melanogaster*. Experimentos foram realizados a fim de ilustrar o desempenho da segmentação, quando comparado com outras abordagens comumente encontradas na literatura. Os resultados obtidos demonstraram que o método proposto é eficaz a nível qualitativo e quantitativo. O método pode ainda ser utilizado em diferentes aplicações e áreas, tais que envolvam configurações similares.

Palavras chave: processamento digital de imagens, segmentação de imagens, curvatura, núcleos celulares, *drosophila melanogaster*.

Abstract

In recent years, the techniques of digital image processing have been widely used in conjunction with other areas of science, including biology. These techniques generally aim to optimize time, increase accuracy and eliminate the subjectivity of the process of simple visual analysis. This increase was motivated mainly by important advances in Computational Biology and the considerable increase of databases of biological image. In this work it is presented a computational method that uses different techniques of image processing. The main objective is to achieve the segmentation of cell nuclei contained in sagittal images of *Drosophila melanogaster* embryos. This task represents an essential step for performing several analyzes about this biological model. The proposed method is based on the estimation of curvature of the object contour, and consists in separating clusters of nuclei through segments drawn between corresponding concave points. This approach is new for this scenario, and contributes to the solution of the problem of aggregated components, recurrent feature in applications related to the segmentation of nuclei. Evaluation methods include approaches to quantify and visualize the average intensity of protein and RNA in intranuclear and cytoplasmic regions of the embryo *Drosophila*. The quantification method, in particular, allows to obtain the gene expression profile taken along the anterior-posterior axis of the embryo *Drosophila*. On the other hand, the visualization method includes a new approach for the exhibition of sagittal images, in which the cell nuclei are arranged in a linear configuration. The efficient use of evaluation methods helps the interpretation of the data. In general, methods for nuclear segmentation and evaluation of gene expression represents an essential step for performing various analyzes biological on the *Drosophila melanogaster*. Experiments were performed to illustrate the performance of the segmentation, when compared to other approaches found in the literature. The results showed that the proposed method is effective qualitatively and quantitatively level. The method can also be used in various applications and fields, such that involve similar configurations.

Keywords: digital image processing, image segmentation, curvature, cell nuclei, *drosophila melanogaster*.

Sumário

Lista de Figuras	xxi
Lista de Tabelas	xxv
Lista de Abreviaturas	xxvii
1 Introdução	29
1.1 Objetivos	32
1.1.1 Objetivos Específicos	32
1.2 Principais Contribuições	32
1.3 Organização da dissertação	33
2 Conceitos biológicos	35
2.1 <i>Drosophila melanogaster</i>	35
2.2 Expressão Gênica	37
2.3 Captura dos dados	43
3 Conceitos Computacionais	45
3.1 Fundamentos de Imagem Digital	45
3.1.1 Imagem Digital	46
3.1.2 Relacionamento básico entre pixels	47
3.1.3 Rotulação de componentes conexos	49
3.1.4 Contorno paramétrico de objetos	51
3.1.5 Brilho e Contraste	53
3.2 Técnicas de pré-processamento	53
3.2.1 Técnicas de Realce	54
3.2.2 Restauração de imagens	55
3.3 Técnicas de Segmentação	57
3.3.1 Introdução	57
3.3.2 Segmentação por Similaridades	58
3.3.3 Segmentação por Descontinuidades	63
3.4 Morfologia Matemática	66

3.4.1	Elemento Estruturante	67
3.4.2	Operadores morfológicos	68
3.4.3	Transformadas <i>Top-hat</i> e <i>Bottom-hat</i>	76
3.5	Curvatura	77
3.6	Análise de Componentes Principais	81
3.7	Diagramas de Voronoi	82
3.8	Triangulação de Delaunay	84
4	Trabalhos correlatos	87
4.1	Introdução	87
4.2	Trabalhos correlatos	89
4.2.1	Superfície dos embriões	90
4.2.2	Plano anatômico sagital	91
4.2.3	Bases de dados	93
5	Identificação de núcleos celulares em imagens sagitais de embriões de <i>Drosophila</i>	97
5.1	Método proposto	97
5.2	Aquisição das imagens	99
5.3	Pré-processamento	100
5.3.1	Isolamento do embrião principal	101
5.3.2	Filtragem espacial	102
5.3.3	Realce de contraste	102
5.3.4	Filtragem morfológica	103
5.4	Segmentação	103
5.4.1	Contorno paramétrico	107
5.4.2	Cálculo da curvatura	108
5.4.3	Suavização da curvatura	108
5.4.4	Mínimos locais da curvatura	109
5.4.5	Correspondência entre os pontos de mínimos locais	109
5.4.6	Separação dos núcleos agregados	112
6	Quantificação e Visualização da Expressão Gênica em imagens sagitais de <i>Drosophila</i>	115
6.1	Nível de expressão gênica por núcleo	115
6.2	Nível de expressão na região do citoplasma	116
6.3	Visualização da variação de intensidade de expressão nuclear	118
7	Resultados e Discussão	125
7.1	Etapa de pré-processamento	125

7.1.1	Tratamento das imagens	125
7.2	Etapa de segmentação	131
7.2.1	Resultados da binarização da imagem	131
7.2.2	Resultados do pós-processamento	135
7.3	Avaliação e análise comparativa dos resultados	140
7.3.1	Bases de dados	140
7.3.2	Métodos avaliados	140
7.3.3	Medidas de avaliação	141
7.4	Etapa de Quantificação	151
8	Conclusão	161
8.1	Trabalhos Futuros	162
8.2	Publicações realizadas	163
	Referências Bibliográficas	165

Lista de Figuras

1.1	Máscara de segmentação nuclear.	31
1.2	Embrião de <i>Drosophila</i> no plano sagital.	32
2.1	<i>Drosophila melanogaster</i> fêmea.	36
2.2	Ciclos de clivagem da <i>Drosophila melanogaster</i>	37
2.3	Diversidade morfológica de células.	39
2.4	Padrão de expressão gênica da <i>Drosophila melanogaster</i>	41
2.5	Visualização gráfica dos planos anatômicos da <i>Drosophila</i>	42
2.6	Imagens sagitais de embriões da <i>Drosophila melanogaster</i>	42
3.1	Passos fundamentais em processamento digital de imagens.	46
3.2	Ilustração dos processos de amostragem e quantização.	48
3.3	Tipos de vizinhança.	48
3.4	Tipos de conectividade.	49
3.5	Rotulação de objetos conexos.	50
3.6	Algoritmo Seguimento de contorno (Ceguinho).	52
3.7	Vizinhança 8-conectado de p	52
3.8	Máscara de convolução gaussiana.	57
3.9	Elemento estruturante no formato “cruz”.	67
3.10	Elemento estruturante no formato “diamante”.	68
3.11	Exemplo de erosão binária.	71
3.12	Exemplo de dilatação binária.	72
3.13	O famoso “Attneave’s cat”.	78
3.14	Representação do contorno de uma forma com diferentes valores de σ	80
3.15	Entidades topológicas do Diagrama de Voronoi.	83
3.16	Triangulação de Delaunay com círculos-circundantes.	84
3.17	Diagrama de Voronoi e Triangulação de Delaunay.	85
4.1	Identificação de núcleos com base em janela deslizante retangular.	92
4.2	Identificação de núcleos com base em janela deslizante circular.	92
5.1	Esquema geral da metodologia proposta.	98

5.2	Tipos de marcação fluorescente nos embriões da <i>Drosophila</i>	99
5.3	Marcação fluorescente de diferentes embriões.	100
5.4	Plano sagital do embrião da <i>Drosophila melanogaster</i>	101
5.5	Etapas para isolamento do embrião principal.	102
5.6	Máscara de segmentação nuclear referente ao plano sagital.	103
5.7	Resultado da segmentação Otsu.	105
5.8	Etapas para limpeza da máscara Otsu.	106
5.9	Método proposto aplicado a uma forma sintética.	106
5.10	Pontos de concavidade significativa (mínimos locais).	107
5.11	Componentes gráficos de um agregado de núcleos celulares	110
5.12	Picos extremos na função de curvatura.	111
5.13	Correspondência entre os pontos de mínimos locais.	112
5.14	Resultado da separação dos núcleos celulares.	113
6.1	Intensidade média de proteína por núcleo.	116
6.2	Visão geral do método de marcação do citoplasma.	117
6.3	Resultado do processo de marcação da região do citoplasma.	118
6.4	Ilustração da abertura da imagem do embrião de <i>Drosophila</i>	119
6.5	Exemplo gráfico dos núcleos celulares em ordem não sequencial.	119
6.6	Exemplo gráfico dos núcleos celulares em ordem sequencial.	120
6.7	Indicação dos eixos anterior-posterior (AP) e dorsal-ventral (DV).	121
6.8	Ponto de partida para configuração de visualização linear.	122
6.9	Inclinações diversas dos núcleos celulares.	122
6.10	Representação esquemática da nova configuração de matriz.	123
7.1	Imagem degradada por ruído.	126
7.2	Filtro Gaussiano em diferentes tamanhos de janelas.	127
7.3	Realce linear.	128
7.4	Filtragem morfológica.	129
7.5	Influência do pré-processamento na etapa de segmentação.	130
7.6	Resultados da Limiarização global.	132
7.7	Resultados da Detecção de bordas.	133
7.8	Resultado da segmentação por <i>Watershed</i>	134
7.9	Resultado do método de segmentação Otsu.	136
7.10	Representação de um contorno e seus pontos de mínimos locais.	137
7.11	Diferentes fatores de suavização no cálculo da curvatura.	138
7.12	Diferentes fatores de suavização no cálculo da curvatura.	139
7.13	Avaliação quantitativa da máscara de segmentação nuclear.	142
7.14	Avaliação qualitativa da máscara de segmentação nuclear.	143
7.15	Resultado comparativo de máscaras de segmentação nuclear.	145

7.16 Resultados obtidos pelo método proposto.	146
7.17 Resultados obtidos pelo método proposto.	147
7.18 Resultados obtidos pelo método proposto.	148
7.19 Resultados obtidos pelo método proposto.	149
7.20 Resultados obtidos pelo método proposto.	150
7.21 Separação das regiões nuclear e citoplasma.	151
7.22 Embrião 1 - Perfil de expressão e intensidades de fluorescência nos núcleos.	152
7.23 Embrião 2 - Perfil de expressão e intensidades de fluorescência nos núcleos.	153
7.24 Embrião 3 - Perfil de expressão e intensidades de fluorescência nos núcleos.	154
7.25 Gráfico comparativo do perfil de expressão da proteína <i>Hunchback</i>	155
7.26 Gráfico de Médias para o conjunto de imagens da proteína <i>Hunchback</i>	155
7.27 Embrião 1 - Perfil de expressão e intensidades de fluorescência do citoplasma.	156
7.28 Embrião 2 - Perfil de expressão e intensidades de fluorescência do citoplasma.	157
7.29 Embrião 3 - Perfil de expressão e intensidades de fluorescência do citoplasma.	158
7.30 Gráfico comparativo do perfil de expressão do RNA de <i>Drosophila</i>	159
7.31 Gráfico de Médias para o conjunto de imagens com sinal do RNA de <i>Hunchback</i>	159

Lista de Tabelas

7.1	Resultados da aplicação do método proposto.	143
7.2	Comparação dos resultados para diferentes métodos.	144

Lista de Abreviaturas

AP	Anterior-Posterior.
2D	Bidimensional.
3D	Tridimensional.
BDGP	<i>Berkeley Drosophila Genome Project</i>
BDTNP	<i>Berkeley Drosophila Transcription Network Project</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Desoxyribonucleic acid</i>).
ES	Elemento estruturante.
ESs	Elementos estruturantes.
Eq.	Equação.
Eqs.	Equações.
Fig.	Figura.
Figs.	Figuras.
FT	Transformada de Fourier (<i>Fourier Transform</i>).
MC	Microscopia Confocal.
MM	Morfologia Matemática
PCA	Análise de componentes principais (<i>Principal Component Analysis</i>).
PDI	Processamento Digital de Imagens
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>).
Sec.	Seção.
TD	Transformada Distância
TIFF	Formato de arquivo de imagem marcado (<i>Tagged Image File Format</i>).

Capítulo 1

Introdução

Nos últimos anos, a Bioinformática e a Biologia Computacional tornaram-se essenciais para a realização de estudos biológicos, sendo crescente o desenvolvimento de ferramentas e métodos computacionais capazes de promover a aquisição, processamento, armazenamento, distribuição, análise e interpretação da informação biológica. Para [Hagen 2000], esse crescimento foi motivado, principalmente, por avanços importantes nos métodos de sequenciamento de DNA (ácido desoxirribonucleico), surgimento dos projetos genoma (que geraram volumes intensos de informações), transcriptoma e proteoma, desenvolvimento de microarranjos e biochips, e pelo aumento de bancos de dados biológicos. Aliado a esses fatores, citam-se a disponibilidade de computadores mais velozes e robustos, além do avanço da Internet.

Em particular, a aplicação de técnicas computacionais, especialmente em estudos da Biologia Molecular, possibilita o estudo da estrutura, organização e evolução de genomas; estudo da expressão diferencial de genes e proteínas; a predição da configuração tridimensional de proteínas; análise da estrutura, função e evolução moleculares, entre outros [Cattley and Arthur 2007]. Sob esse aspecto, o desenvolvimento de métodos computacionais tem permitido aos biólogos moleculares processar, interpretar e analisar automaticamente grandes quantidades de dados biológicos. Segundo [Ouzounis 2002] destacam-se os algoritmos para alinhamento de sequências, para a criação de bancos de dados de sequências proteicas (de acesso público ou privado), para análise de padrões de expressão gênica, e para anotação e comparação de genomas.

Neste cenário, os algoritmos voltados à identificação e análise de expressão gênica tem atraído grande atenção da comunidade científica, sendo amplamente utilizados em pesquisas biológicas [Lorkowski and Cullen 2004, Quackenbush 2001, de Araújo 2008]. Isso porque, a análise computacional permite obter, de forma automática e precisa, relevantes informações sobre o funcionamento de uma célula, tais como, função de cada gene ou proteína codificada, controle da expressão gênica e suas interações sob determinadas situações, identificação de genes diferencialmente expressos em condições distintas, dentre outras [Yang et al. 2006b].

Um exemplo importante, é a análise dos padrões de expressão gênica da *Drosophila melanogaster*. Estudos de bioinformática sobre esse modelo biológico fornecem as bases para compreensão de processos e fenômenos de diversos organismos, tais como desenvolvimento e diferenciação celular [Sepel and Loreto 2010, Gilbert 2003]. Além disso, o grau de conservação biológica e fisiológica com o genoma humano favorece a compreensão dos mecanismos de transmissão de características hereditárias e identificação de genes associados a distúrbios diversos (como câncer, mal de *Alzheimer*, comportamentos de aprendizagem, Parkinson e alcoolismo) [Chen and Crowther 2012, Hirth 2010]. Tais fatores tornaram a *Drosophila* um importante modelo para a identificação, caracterização e o estudo dos padrões de distribuição gênica.

Uma das formas de realizar o processamento e interpretação de dados da expressão gênica envolve a manipulação de imagens digitalizadas, para fins de avaliação e quantificação das proteínas e RNAs (ácido ribonucleico). Entretanto, essa não é uma tarefa trivial, já que envolve a identificação e estudo simultâneo de um grande número de genes [Calsa Junior et al. 2004]. Além disso, para a maioria das investigações biológicas, normalmente é necessário caracterizar diferentes padrões espaço-temporais da expressão gênica, em diferentes estágios do desenvolvimento embrionário.

Frente a essa complexidade, torna-se necessário o uso de técnicas e/ou ferramentas computacionais para a organização e processamento dos dados, bem como no auxílio de novas descobertas [Travençolo 2007]. Neste sentido, é possível encontrar variados métodos propostos na literatura. A maioria se diferencia com relação ao tipo de técnica/algoritmo utilizado, ou com relação ao tipo de investigação biológica de interesse. O grande desafio encontrado nesses trabalhos é a tarefa de segmentação automática dos núcleos celulares contidos na blastoderme de embriões da *Drosophila melanogaster*. O objetivo desta tarefa é obter a máscara de segmentação nuclear (como a mostrada na Fig.1.2), isto é, uma imagem binária em que os pixels com valor igual a 1 (um) representam os núcleos celulares do embrião, e os pixels com valor igual a 0 (zero) representam as regiões fora do núcleo e o fundo da imagem.

A máscara de segmentação nuclear é primordial para a realização de diversas tarefas subsequentes, tais como, quantificação do nível de expressão gênica em cada núcleo [Pan et al. 2006], detecção da idade de embriões de *Drosophila* [Aizenberg et al. 2002], análise das redes de regulação gênica, comparação dos padrões de expressão em diferentes estágios do desenvolvimento [Kumar et al. 2002], análise dinâmica da formação dos padrões de expressão gênica [Poustelnikova et al. 2004], análise do comportamento de um gene em função de outro [Fowlkes et al. 2008], dentre outras.

No entanto, a obtenção da máscara de segmentação nuclear não é considerada uma tarefa trivial, já que as tradicionais técnicas de segmentação existentes na literatura, quando aplicadas isoladamente, são insatisfatórias para um procedimento de segmentação eficiente e preciso. O resultado de tais técnicas não possibilita a separação total dos

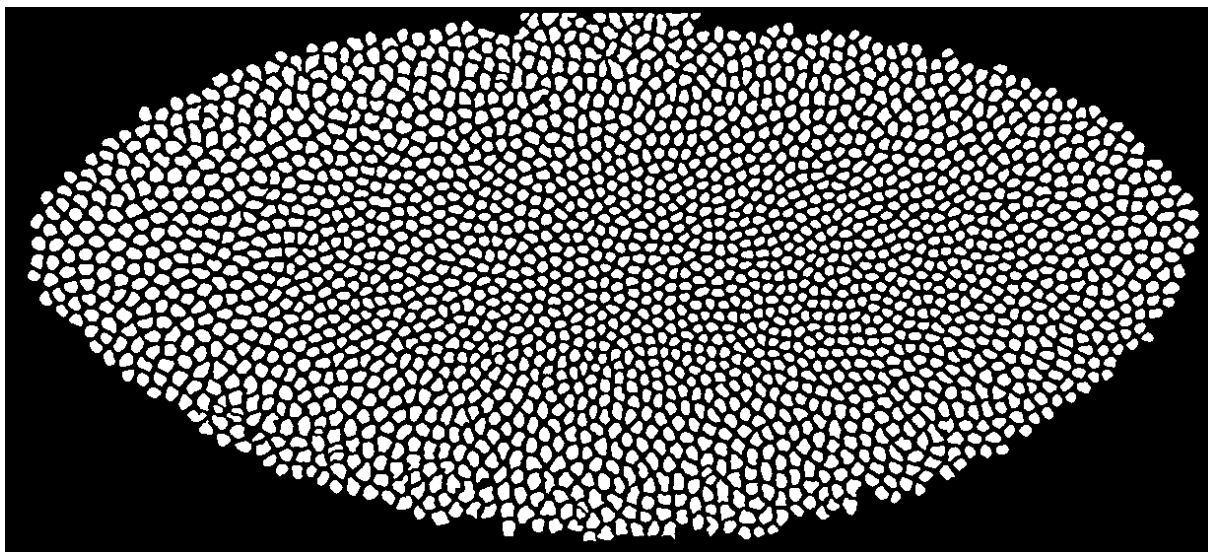


Figura 1.1: Exemplo de máscara de segmentação nuclear referente à superfície de um embrião de *Drosophila melanogaster*. Cada componente branco na imagem representa um núcleo celular. Figura obtida de [Pisarev et al. 2009].

núcleos celulares. Isso requer o desenvolvimento de novos métodos computacionais e/ou aprimoramentos dos atuais. Desta forma, ao longo dos anos, foram propostos variados métodos para a realização dessa tarefa (obtenção da máscara de segmentação nuclear). A maioria dos trabalhos desenvolvidos trata de imagens relativas à superfície dos embriões da *Drosophila* [Surkova et al. 2008, Poustelnikova et al. 2004, Janssens et al. 2005, Kosman et al. 1999], e permitem identificar (de forma individual) os núcleos celulares, conforme demonstrado na Fig.1.2. Por outro lado, verificam-se também soluções computacionais direcionadas à análise de imagens no plano anatômico sagital, as quais geralmente propõem abordagens alternativas para a construção da máscara de segmentação nuclear. Em tais casos, os métodos desenvolvidos geralmente se baseiam na técnica de janelas deslizantes, e não identificam precisamente os núcleos individualmente [Houchmandzadeh et al. 2002, Gregor et al. 2007, He et al. 2008].

As imagens sagitais apresentam algumas vantagens em relação às imagens obtidas da superfície dos embriões da *Drosophila*, tais como, não achatamento do embrião, possibilidade de estudo do eixo dorso-ventral, obtenção de dados *in vivo* e coleta de informações em diferentes locais (por exemplo, núcleo e citoplasma). Esse tipo de imagem é capaz de localizar o plano focal dentro do embrião, sendo capturado por meio da aplicação de técnicas de seccionamento virtual. Considerando a importância dessas imagens, e visando contribuir com o cenário descrito, o presente trabalho propõe um método para construção da máscara de segmentação nuclear referente ao plano sagital dos padrões de expressão gênica da *Drosophila melanogaster*, o qual seja capaz de identificar, isoladamente, cada núcleo celular. Para motivação inicial e contextualização, um breve relato acerca da *Drosophila* e dos padrões de expressão gênica é apresentado no Capítulo 2.

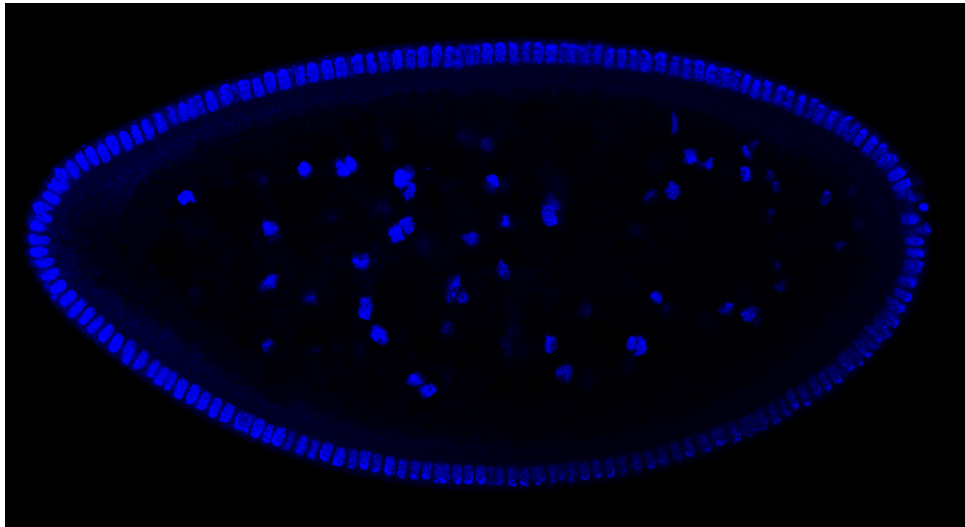


Figura 1.2: Exemplo de um embrião de *Drosophila* referente ao plano sagital. Os núcleos celulares se localizam na extremidade do embrião.

1.1 Objetivos

O objetivo deste trabalho é desenvolver métodos computacionais baseados em técnicas de processamento digital de imagens, de modo que opere como uma ferramenta de apoio aos biólogos na análise e caracterização de imagens sagitais referentes a embriões da *Drosophila melanogaster*.

1.1.1 Objetivos Específicos

1. Desenvolvimento de métodos computacionais para segmentação de imagens sagitais de padrões da expressão gênica da *Drosophila*. Pretende-se que tais métodos sejam capazes de identificar com precisão a localização dos núcleos do embrião em desenvolvimento para a construção de uma máscara. Essa máscara permitirá determinar as concentrações de proteínas e RNAs dentro e fora dos núcleos.
2. Desenvolvimento de métodos computacionais para análise das imagens sagitais, capazes de explorar diferentes propriedades geométricas dos dados biológicos. Os métodos de análise visam identificar a distribuição de proteínas, e dessa forma os padrões de expressão gênica registrados nessas imagens.

1.2 Principais Contribuições

As principais contribuições deste trabalho são relacionadas aos métodos desenvolvidos. Neste contexto, é proposto um método para segmentação de núcleos em imagens sagitais de *Drosophila*, o qual contribui para um aumento do grau de precisão nas análises biológicas, por meio da identificação automática dos núcleos celulares. A metodologia desenvolvida destaca-se por seu desempenho na geração da máscara de segmentação nuclear

com redução da taxa de super segmentação ou componentes agregados.

A partir disso, tornou-se possível apresentar uma abordagem para análise quantitativa dos padrões de expressão gênica da *Drosophila melanogaster*, capaz de determinar as concentrações de proteína e RNAs dentro e fora dos núcleos.

Outra importante contribuição refere-se ao método desenvolvido para visualização das imagens sagitais de embriões de *Drosophila*, o qual permite analisar o embrião em uma configuração linear. Essa configuração permite visualizar os núcleos celulares dispostos lado a lado, favorecendo a análise da variação espacial e temporal da intensidade média de proteína retida em cada núcleo. A nova abordagem é vantajosa e compacta, tal que, torna possível mostrar, de uma só vez, dezenas de embriões. Além disso, possibilita comparar os padrões de expressão de diferentes embriões, facilitando a análise e interpretação dos dados.

Tomados em conjunto, os métodos desenvolvidos sugerem um sistema para análise de imagens sagitais relativas a padrões da expressão gênica da *Drosophila melanogaster*, capaz de processar e extrair propriedades geométricas dos dados analisadas. A geração de resultados automáticos e precisos permite eliminar a subjetividade do processo da simples análise visual, além de permitir analisar um grande número de imagens em um curto intervalo de tempo, contribuindo assim com variadas interpretações biológicas.

1.3 Organização da dissertação

Esta dissertação está organizada nos seguintes capítulos. No primeiro capítulo foi apresentada a introdução, objetivos propostos e a motivação para realização do presente trabalho. A revisão bibliográfica está dividida em dois capítulos. No Capítulo 2 apresenta-se uma introdução dos conceitos biológicos, enfatizando questões relativas à *Drosophila* e formas de estudo padrões de expressão gênica. O Capítulo 3 descreve os conceitos e técnicas da área de processamento digital de imagens, fundamentais para a compreensão do método proposto. Inicialmente apresentam-se fundamentos básicos de imagem digital, em seguida as estratégias de realce, suavização, segmentação e análise de imagens. O Capítulo 4 apresenta trabalhos relacionados à *Drosophila melanogaster*. Os trabalhos são divididos em três categorias, sendo superfície de embriões, plano anatômico sagital e bases de imagens. O Capítulo 5 relata os recursos utilizados, bem como, o método proposto para a identificação dos núcleos celulares a partir de imagens de embriões da *Drosophila*. O Capítulo 6 apresenta a metodologia desenvolvida para avaliação e visualização da expressão gênica em imagens sagitais da *Drosophila*. O Capítulo 7 descreve os experimentos realizados, assim como, demonstra e discute os resultados obtidos pelos métodos propostos. Finalmente, o capítulo 8 trata das principais conclusões, contribuições e perspectivas para trabalhos futuros.

Capítulo 2

Conceitos biológicos

Este capítulo descreve alguns conceitos biológicos envolvidos com os principais tópicos discutidos nesta dissertação. São apresentadas informações sobre a *Drosophila* e também conceitos de expressão gênica e captura de dados de expressão por meio de imagens.

2.1 *Drosophila melanogaster*

A *Drosophila melanogaster* é um inseto díptero, com aproximadamente 3 mm de comprimento, popularmente conhecido como a “mosca da fruta” ou “mosca do vinagre” (Fig.2.1), por se encontrar normalmente em torno de frutas em putrefação. Esta espécie foi descrita inicialmente em 1830, por Johann Wihelm Meigen, e é atualmente um dos organismos mais estudados na biologia moderna, facilitando a investigação de muitos processos celulares e de desenvolvimento, comuns aos eucariotos superiores, incluindo humanos [Adams et al. 2000].

A *Drosophila* tem sido considerada, ao longo dos anos, um importante modelo para estudo do comportamento genômico e diferenciação celular, por melhor caracterizar os relacionamentos reguladores dos genes [Jäckle et al. 1992]. É vasto o campo de aplicabilidade dessa mosca, sendo também reconhecida por sua alta sensibilidade a substâncias tóxicas, sendo considerada um bioindicador para detecção de poluentes e/ou praguicidas [e Souza Rocha et al. 2013, Narciso and Nakagawa 2009], como método de triagem na detecção de resíduos de inseticida [Hirata et al. 2002], e ainda para a realização de ensaios que visam testar a ação biológica de substâncias naturais [Nichols 2006, Yang et al. 2006c]. Além disso, a *Drosophila* tem provado ser um excelente sistema biológico para estudar doenças neurodegenerativas humanas [Lu and Vogel 2009], bem como para favorecer o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas [e Souza Rocha et al. 2013, Pereira et al. 2007].

Vários aspectos justificam a preferência pelo uso da *Drosophila* em trabalhos experimentais de genética e biologia do desenvolvimento, tais como, poucas exigências nutricionais e de espaço de cultura, manutenção laboratorial à temperatura ambiente (18°–25° C),



Figura 2.1: *Drosophila melanogaster* fêmea. Figura obtida de [e Souza Rocha et al. 2013].

ciclo de vida curto (aproximadamente 15 dias), fácil conservação e manuseamento, e facilidade de visualização [Gomes 2001, Furtado and Nepomuceno 2012]. Além disso, o fato de seu genoma possuir um elevado grau de conservação em relação aos mamíferos a tornou um modelo útil para estudar, de forma eficaz e *in vivo*, processos e fenômenos de diversos organismos, tais como desenvolvimento, mecanismos de transmissão de características hereditárias [Sepel and Loreto 2010, Gilbert 2003] e identificação de genes associados a distúrbios diversos [Michno 2009, Chen and Crowther 2012], tais como, câncer, Parkinson, comportamentos de aprendizagem, alcoolismo e Mal de Alzheimer [Beckingham et al. 2005, Bagatini et al. 2011, Sepel and Loreto 2010]. Sua utilização é também observada na descoberta de compostos químicos (drogas) com potencial para prevenir ou melhorar doenças [Hirth 2010].

No decurso do seu ciclo de vida, a *Drosophila* passa por uma fase de ovo (0,5 mm) durante a qual ocorre a embriogênese, ou seja, processo através do qual o embrião é formado e se desenvolve. Após o desenvolvimento embrionário as larvas passam por três estágios larvais (*instar*) antes de empuparem e eclodir a mosca adulta. Nota-se que as imagens processadas no presente trabalho referem-se à fase da embriogênese. Durante os estágios iniciais desta fase, o núcleo zigótico sofre diversas divisões nucleares, chamadas ciclos mitóticos (Fig. (2.2)). Entre os ciclos 10-13 os núcleos resultantes das sucessivas divisões partilham um citoplasma comum, o que é conhecido como blastoderme sincicial. Nesse estágio, os núcleos migram para a periferia da célula e não há membranas plasmáticas separando-os [Gilbert 2003]. Ao final de cada um dos ciclos mitóticos, o número de núcleos celulares no embrião dobra. Completados 14 ciclos, num estágio de aproximadamente 4,5 horas após a fecundação, o embrião será uma única célula contendo aproximadamente 2^{13} núcleos. Esses núcleos, todos idênticos, estarão imersos em diferentes concentrações de proteínas cujos RNAs são depositados maternalmente, antes da fecundação. Essas proteínas, chamadas de morfógenos são reguladoras da transcrição gênica [Wolpert 1969]. Dessa forma, diferentes núcleos em diferentes regiões do embrião expressarão genes distintos. Esse processo gera o acúmulo de diferentes proteínas ao longo do embrião, gerando

padrões de expressão gênica embrionários (como ilustrado na Fig.2.4). Após o estabelecimento desses padrões, ocorre um processo chamado de celularização, no qual cada núcleo é envolto por uma membrana plasmática. Dessa forma, núcleos em diferentes regiões do embrião dão origem a células com diferentes conteúdos citoplasmáticos. Após esse estágio, as células passarão por um processo de diferenciação celular, responsável pela formação de diferentes órgãos e tecidos no organismo adulto.

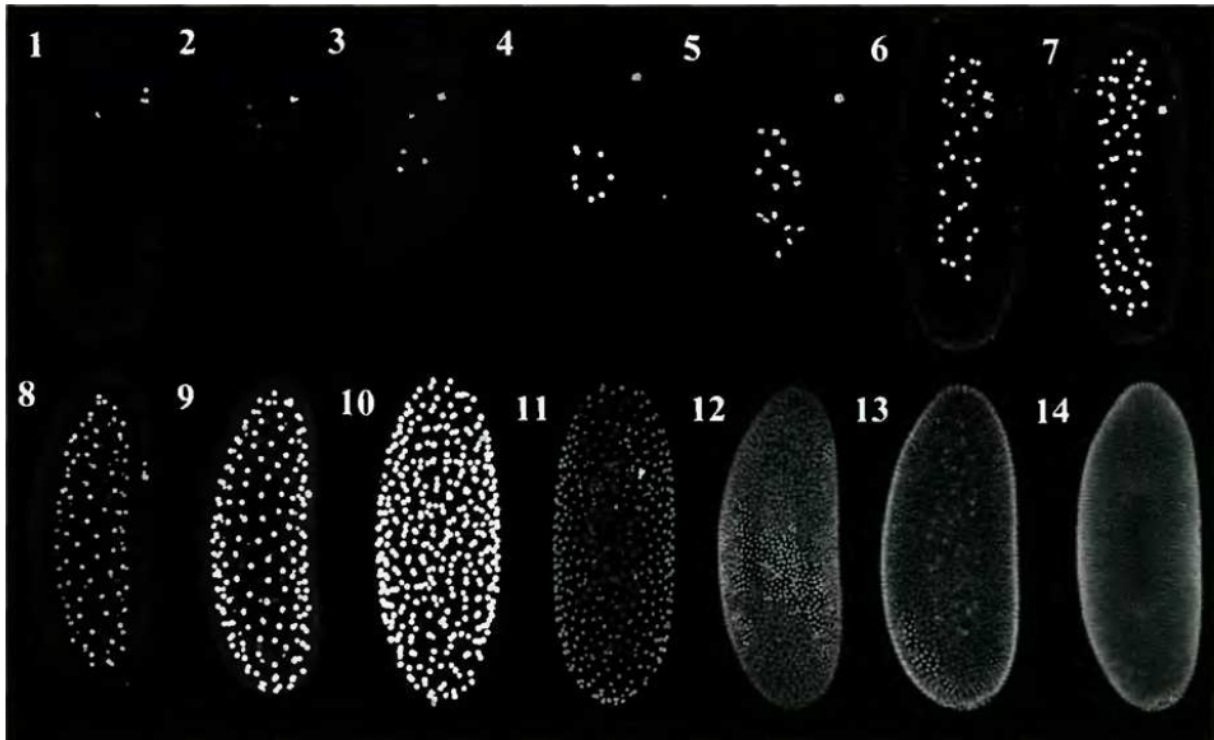


Figura 2.2: Imagem composta por uma série de embriões da *Drosophila* dispostos de forma cronológica de acordo com o número de clivagens sofridas após a fecundação do óvulo. Cada ponto claro nas imagens representa um núcleo celular. Figura obtida de [Prata 2013].

2.2 Expressão Gênica

As proteínas são os compostos orgânicos mais abundantes e diversificados em um organismo, estando presentes em todas as partes de uma célula. Elas representam cerca de 50% a 80% de seu peso seco. São peças fundamentais para o funcionamento, metabolismo e sobrevivência das células. Cada célula possui milhares de proteínas, as quais desempenham inúmeras funções distintas, tais como catalisadores (enzimas), transportadoras (transportam por exemplo, hormônios, vitaminas, metais, oxigênio (hemoglobina)), estruturais (colágeno, queratina, elastina), reserva (albumina, caseína), proteção (anticorpos, fibrinogênio, citocinas), controle do crescimento, diferenciação celular, entre outras [Lehninger et al. 1995]. Do ponto de vista funcional, as proteínas têm papel fundamental,

sendo possível afirmar que todos os processos biológicos dependem da presença ou da atividade deste tipo de biomolécula.

Quimicamente, as proteínas são polímeros de alto peso molecular, cujas unidades básicas são os aminoácidos, ligados entre si por ligações peptídicas. Os aminoácidos são moléculas orgânicas, tais que possuem ligadas ao mesmo átomo de carbono um átomo de hidrogênio, um grupo amina, um grupo carboxílico e uma cadeia lateral [Lehninger et al. 1995].

A formação das proteínas (síntese proteica) é um fenômeno relativamente rápido e muito complexo, que ocorre no interior das células. Esse processo envolve duas etapas principais, transcrição e tradução. De forma resumida, em primeiro lugar, num processo chamado *transcrição*, um trecho apropriado do DNA que codifica a proteína é replicado sob a forma de RNA. Depois, na fase de *tradução*, esta sequência de RNA é convertida em aminoácidos, para a síntese de proteínas. Nesse caso, a informação contida no RNA é traduzida numa sequência de aminoácidos, que se ligam uns aos outros numa cadeia polipeptídica, formando as proteínas. Esse processo ocorre em todos os seres vivos e, devido a sua universalidade e importância é definido como o “dogma central da biologia molecular” [Alberts et al. 2002]. É importante ressaltar que esse processo é bem complexo, envolvendo diversas etapas como, por exemplo, o *splicing*. Uma explicação detalhada desse fluxo de informações foge ao escopo desse texto, mas pode ser encontrado na literatura [Alberts et al. 2002].

Todas as células de um ser vivo compartilham o mesmo DNA, sendo assim, a princípio possuem a informação genética utilizada para codificar todas as proteínas necessárias para a definição e funcionamento do organismo. No entanto, cada célula de um organismo ao longo de seu desenvolvimento embrionário, dependendo da sua função, expressa apenas um subconjunto específico de genes, ou seja, tornam-se especializadas no que diz respeito à forma e função [Lewin 2001]. Esse processo define o conceito de diferenciação celular, após isso, surgem no indivíduo populações de células distintas, formando estruturas, órgãos e sistemas capazes de interagir entre si e desempenhar funções necessárias à sua sobrevivência [Fumia 2010].

A Fig. 2.3 ilustra o conceito de diferenciação celular. Ela apresenta a formação dos folhetos embrionários (a) ectoderma, (b) mesoderma e (c) endoderma, compostos por células que por meio dos mecanismos de multiplicação e diferenciação originam todos os órgãos e tecidos de organismos multicelulares. A partir dessa imagem é possível observar a diversidade morfológica existente entre as células [Gilbert 2003]. Além de distintas morfológicamente, as células diferem-se em relação às funcionalidades requeridas por órgãos e tecidos do corpo [Travençolo 2007].

A diferenciação celular explica a grande diversidade de fenótipos observada, ou seja, existência de células com divergências funcionais e estruturais, apesar de serem originadas a partir de uma única célula e apresentarem o mesmo código genético [Fumia 2010].

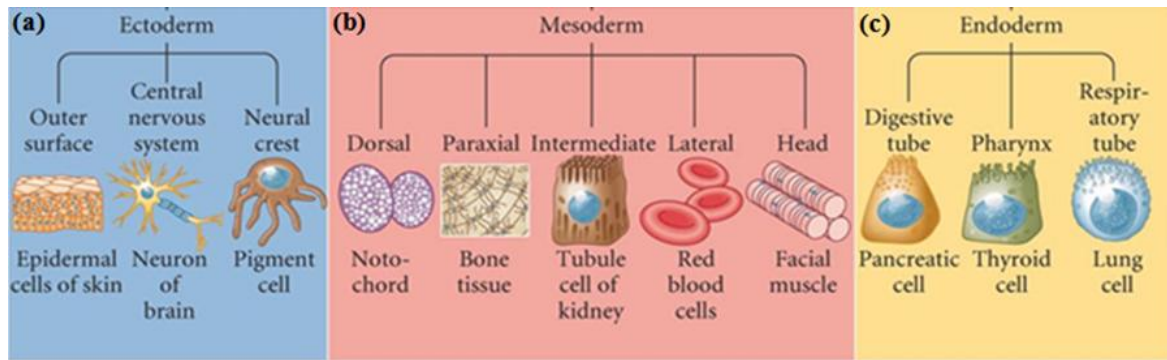


Figura 2.3: Exemplificação da diversidade morfológica de células presentes em organismos multicelulares. (a) Folheto embrionário externo, composto por células que origina o sistema nervoso e a epiderme. (b) Folheto embrionário intermediário, dá origem a diversos órgãos (coração, rins, gônadas), tecidos conjuntivos (ossos, músculos, tendões, vasos sanguíneos) e células sanguíneas. (c) Folheto embrionário interno, produz o revestimento do tubo digestivo, respiratório, e órgãos associados, como o pâncreas e fígado. Figura obtida de [Gilbert 2003].

Em cada célula, apenas uma parte do seu genoma é expresso, desta forma, as grandes diferenças entre as células de um organismo resultam da “expressão gênica”, isto é, processo pelo qual sequências específicas de DNA são utilizadas para sintetizar e acumular diferentes conjuntos de RNA e proteínas [Sabiston and Townsend 2005]. Conclui-se que a diversidade de características observada em uma população deve-se aos diferentes genes e à diferente expressão dos genes presentes em cada indivíduo.

A expressão gênica é controlada por *genes reguladores chaves*, que direcionam a expressão e a taxa de genes específicos para a formação de cada órgão ou tecido. Este tipo de controle objetiva a restrição espacial e temporal da expressão gênica, a fim de evitar problemas decorrentes de uma expressão inadequada. Do caminho da síntese do RNA (a partir do DNA) até a síntese proteica existem diferentes pontos que podem influenciar a expressão gênica. Além disso, as células também podem modificar a expressão de seus genes em resposta às mudanças em seu ambiente (e.g. frio, calor, estresse, ferimentos), controles do desenvolvimento, sinais do ciclo celular ou presença de elementos sinalizadores [Sabiston and Townsend 2005, Travençolo 2007].

A interação e regulação entre os genes durante a expressão gênica é conhecida como Rede de Regulação Gênica, a qual, por sua vez, define como os genes influenciam uns aos outros, de maneira ativadora ou inibidora [Hasty et al. 2001, Miazaki 2012]. Por exemplo, alguns genes ativados possuem função reguladora, podendo atuar na ativação ou inativação de outros genes. Do novo conjunto de genes alguns são também reguladores, ativando ou inibindo a expressão de um terceiro conjunto de genes, e assim por diante, numa cascata que culmina com a diferenciação das células e dos tecidos.

É importante salientar que o processo de regulação gênica não ocorre somente durante o desenvolvimento embrionário, iniciando-se na formação do zigoto e estendendo-se por toda a vida de um organismo. Isso possibilita que determinados conjuntos de genes sejam

expressos apenas em um momento específico do ciclo de vida. No entanto, avaliar as similaridades e diferenças entre as células durante a fase embrionária é particularmente importante, já que, esse período possui elevada atividade mitótica e mudanças no destino das células, tornando assim as alterações nos padrões de expressão mais comuns [Fonseca 1997].

Um importante exemplo é o estudo do desenvolvimento embrionário da *Drosophila melanogaster*. Considere, por exemplo, a Fig.2.4, Nela são mostrados os núcleos de um embrião de *Drosophila*, poucas horas após a fertilização, sendo possível observar os padrões de expressão de três genes, *bicoid* (em azul), *evenskipped* (em verde) e *caudal* (em vermelho). Por meio das Figs. 2.4(b), 2.4(c) e 2.4(d) é possível identificar os padrões de expressão individuais para cada um desses genes, bem como identificar a diferença espacial na distribuição dos genes. Esses padrões correspondem ao acúmulo das proteínas codificadas por esses genes. A proteína *Bicoid*, codificada pelo gene *bicoid* concentra-se na extremidade anterior do embrião. O padrão de expressão do gene *caudal* é revelado com maior intensidade na região posterior. Por fim, o gene *even-skipped* apresenta um padrão de expressão composto por sete faixas ao longo do eixo anterior-posterior (AP). As cores evidenciam que diferentes proteínas são expressas em diferentes locais do embrião, o que forma um gradiente de concentração.

A proteína *even-skipped* pertence à um grupo de genes, denominado genes de segmentação, responsável pelo processo de segmentação do corpo da *Drosophila* [Janssens et al. 2005]. Realizar pequenas alterações na expressão tempo-espacial desses genes torna o embrião de *Drosophila* carente de certos segmentos ou partes de segmentos, o que pode levar a modificações drásticas na organização do seu plano do corpo, por exemplo, o aparecimento de estruturas em lugares indevidos, como antenas no lugar dos braços ou pernas (e vice-versa) [Gilbert 2003].

Conforme apresentado no Capítulo 4, a maioria dos trabalhos desenvolvidos no contexto da *Drosophila melanogaster* focam na análise computacional de imagens relativas a superfície dos embriões [Poustelnikova et al. 2004, Pan et al. 2006, Janssens et al. 2005, Jäckle et al. 1992]. No entanto, o plano sagital atualmente apresenta maior interesse da comunidade biológica, sendo notadamente importante a realização de variadas investigações biológica [Young et al. 1991, Kuchinke et al. 1998, Wheeler et al. 2008, Zhang et al. 1996]. Apesar disso, até o presente momento, observa-se um pequeno número de soluções computacionais propostas à esse plano.

Imagem sagital refere-se à imagem obtida a partir da aplicação de técnicas de seccionamento virtual, como por exemplo, microscopia confocal. Tais técnicas permitem localizar o plano focal dentro da amostra, o que gera a impressão de realizar um corte real (seccionamento físico). Imagens sagitais obtidas com resolução e contraste suficientes permitem a visualização de células e tecidos, localização de genes e proteínas, bem como possibilitam visualizar a dinâmica da expressão gênica em embriões fixados ou *in*

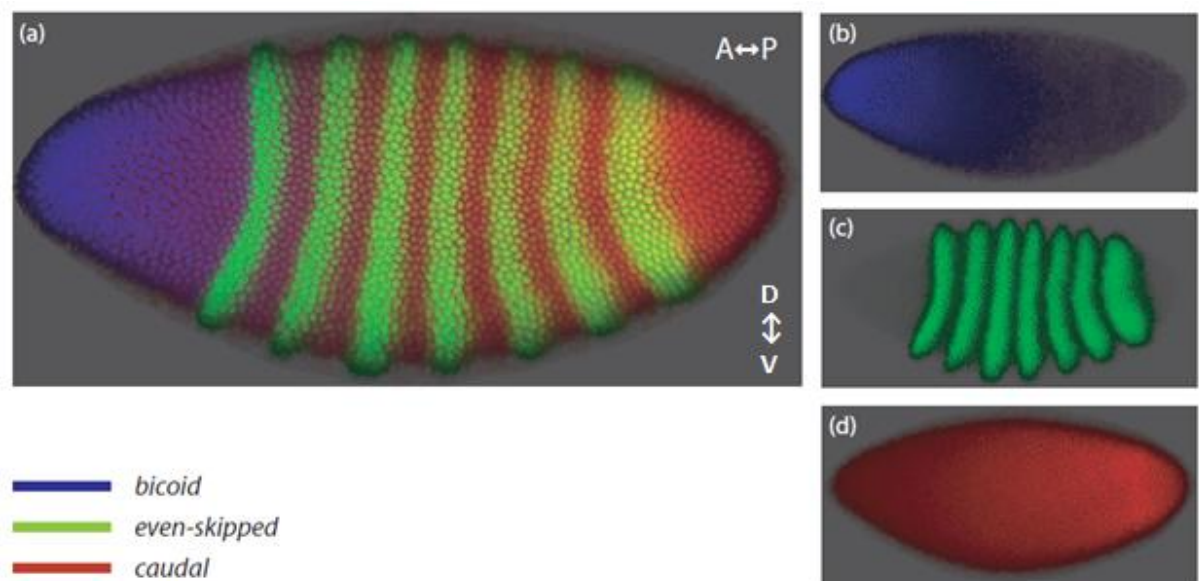


Figura 2.4: Padrão de expressão gênica da *Drosophila melanogaster*. (a) Padrões de expressão dos genes *bicoid*, *even-skipped* e *caudal* durante o estágio inicial do desenvolvimento embrionário da *Drosophila*. (b) Gradiente de concentração da proteína *Bicoid*, codificada pelo gene *bicoid*. (c) Padrão de expressão do gene *even-skipped*. Nesse estágio o gene *even-skipped* possui um padrão de expressão composto por sete faixas ao longo do eixo anterior-posterior (AP). (d) Padrão de expressão do gene *caudal*. Assim como *bicoid*, a proteína codificada pelo gene *caudal* é distribuída na forma de um gradiente. Porém, nesse caso, a concentração máxima localiza-se na região posterior do embrião A: anterior; P: posterior. D: Dorsal; V: Ventral. Figura obtida de [Travençolo 2007].

vivo [Grimm et al. 2010]. É importante mencionar que imagens sagitais podem ser obtidas a partir do eixo anterior-posterior (representado na Fig.2.5 através do plano X-Y), ou dorso-ventral, (representado na Fig.2.5 pelo plano Y-Z). A Fig.2.6 mostra um exemplo de imagem sagital de um embrião de *Drosophila*, já a Fig.2.4 apresenta a visualização da superfície desse embrião. É possível observar que o conteúdo apresentado por ambas imagens é bem distinto. A Fig.2.4 exibe a distribuição dos núcleos celulares presentes na superfície do embrião, enquanto que na Fig.2.6 os núcleos são visualizados lateralmente.

As imagens sagitais da expressão gênica de embriões da *Drosophila* apresentam algumas vantagens em relação às imagens relativas à superfície dos embriões. Como por exemplo, durante a obtenção de imagens superficiais, ocorre um problema com relação à escolha do plano focal, já que regiões diferentes geram sinais distintos. Nesse caso, é importante lembrar que proteínas e RNAs se localizam em regiões distintas. Nas imagens sagitais não há esse problema, tendo em vista que os núcleos são visualizados lateralmente e dessa forma todo seu conteúdo é registrado na imagem. Outro problema observado em imagens da superfície é o achatamento do embrião, necessário para maximizar a região analisada na superfície do embrião. Também é importante mencionar que o estudo do eixo dorso-ventral exige necessariamente a utilização de imagens sagitais, já que não é possível achatar o embrião nesse plano. Por fim, é possível descrever que as imagens sagitais são

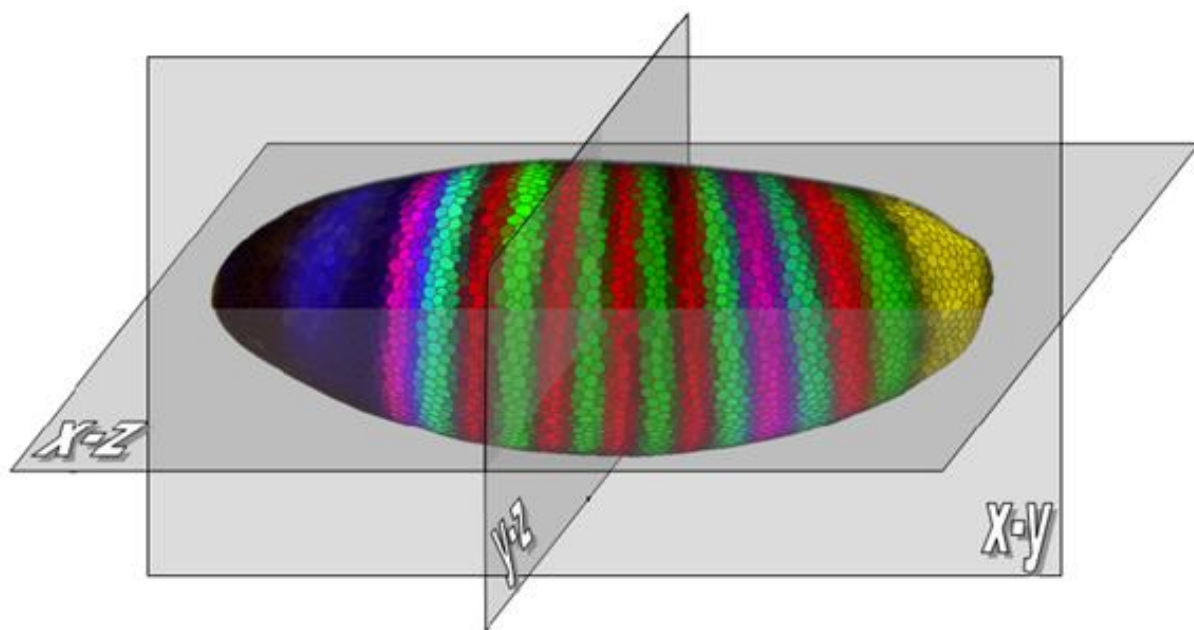


Figura 2.5: Visualização gráfica dos planos anatômicos para estudos biológicos em *Drosophila*. Os planos seccionais dividem o embrião em hemisférios. Nessa imagem, é possível visualizar três tipos de planos seccionais, X-Y (Plano sagital), X-Z (Plano frontal ou coronal), e Y-Z (Plano horizontal ou transverso) Figura obtida de [Rubel et al. 2006].

indispensáveis para a obtenção de dados *in vivo*, sendo o tipo de imagem mais valorizado atualmente.

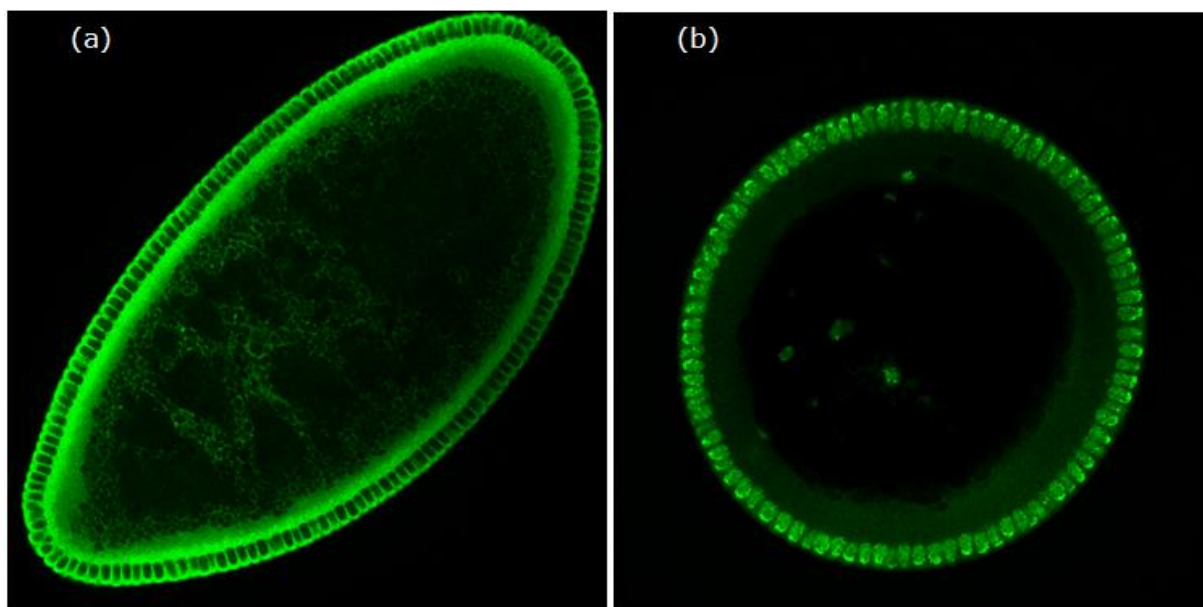


Figura 2.6: Exemplo de imagens sagitais de embriões de *Drosophila* obtidas por microscopia confocal. (a) Imagem sagital exibindo o eixo Anterior-Posterior ($A \leftrightarrow P$). (b) Imagem sagital do eixo Dorso-Ventral ($D \updownarrow V$).

2.3 Captura dos dados

A análise biológica da expressão gênica em *Drosophila melanogaster* geralmente envolve a detecção de grupos de genes que mostram expressão diferencial. A investigação dos padrões de distribuição gênica pode indicar alvos potenciais, interessantes para o desenvolvimento de drogas e vacinas [Hirth 2010], marcadores de prognóstico e diagnóstico de doenças [Michno 2009, Chen and Crowther 2012], bem como, na identificação de processos biológicos que atuam na manifestação de características de interesse [Heller 2002]. Para o processamento computacional dessas informações é primeiramente necessário obter e capturar os dados biológicos.

A etapa de obtenção refere-se à aplicação de técnicas da biologia molecular, tais como hibridização fluorescente *in situ*, gene repórter e imunolocalização. Por meio dessas é possível determinar a distribuição espacial e temporal de RNAs e proteínas. Por outro lado, a captura dos dados trata das técnicas utilizadas para geração de imagens biológicas. Tais técnicas, quando associadas a algum procedimento de detecção de expressão gênica são capazes de gerar imagens 2D ou 3D de expressão gênica e também da anatomia [Travençolo 2007]. No contexto da *Drosophila*, a expressão gênica é normalmente obtida por microscopia confocal.

A técnica de microscopia confocal (MC) é um método de captura de imagem não invasivo que permite avaliar o plano focal dentro da amostra biológica, o que gera a impressão de realizar um seccionamento físico. Esta técnica é normalmente utilizada na caracterização de materiais que possuem alguma fluorescência quando suas moléculas são excitadas por um comprimento de onda específico [Diaspro et al. 2008]. Na ausência de fluorescência é geralmente utilizado marcadores (agentes fluorescentes) para a visualização de elementos específicos da amostra.

Para formar a imagem confocal, um ou mais feixes de lasers varrem a imagem no sentido linear horizontal, ponto-a-ponto e de cima para baixo. Os lasers excitam agentes fluorescentes que então emitem luz num comprimento de onda pré-determinado. A luz emitida pela amostra é posteriormente coletada pela fotomultiplicadora. Este é um tipo de luminescência (emissão de luz) na qual o corpo absorve a luz e, após um curto intervalo de tempo, reemite-a. Nesse caso, apenas a fluorescência emitida pelo ponto focado é capturado na imagem final, sendo automaticamente eliminada a luz emitida por outras áreas, que não estão no plano de foco [Paddock 1999].

A MC proporciona uma alternativa para se observar estruturas e interações gênicas de células vivas e de tecidos em tempo real. Possibilitando assim, meios eficazes para se resolver problemas biológicos, bem como, favorecer novos esclarecimentos quanto à estrutura e função celular [Paddock 1999]. Neste trabalho, para a aquisição das imagens, utilizou-se um microscópio confocal de fluorescência por varredura a laser (Leica TCS SP5).

Capítulo 3

Conceitos Computacionais

Este capítulo apresenta os conceitos essenciais de imagem digital, bem como alguns métodos e técnicas utilizados durante o desenvolvimento deste trabalho.

3.1 Fundamentos de Imagem Digital

O processamento digital de imagens (PDI) refere-se a um conjunto de técnicas computacionais para captura, representação e manipulação de imagens. Tais técnicas são empregadas com o objetivo principal de extrair informação ou transformar as imagens, a fim de facilitar a interpretação humana e automática.

O campo de aplicação do PDI é vasto, e devido ao avanço tecnológico têm sido cada vez abrangente. É possível citar, por exemplo, áreas de conhecimento como astronomia, medicina, biologia e geografia [Gonzalez and Woods 2010].

De forma geral, um sistema de processamento e análise de imagens pode ser dividido nas etapas de aquisição, pré-processamento, segmentação, representação/descrição e reconhecimento/interpretação. A Fig.3.1 apresenta uma simplificação na forma de um diagrama de fluxo dos passos realizados no processamento de imagens, desde a aquisição de imagens até a saída de resultados [Gonzalez and Woods 2010].

Segue abaixo uma breve descrição dos elementos do sistema de processamento digital de imagens.

- **Aquisição:** A etapa de aquisição consiste em capturar a imagem e convertê-la em uma representação numérica adequada para o processamento digital subsequente.
- **Pré-processamento:** Esta etapa visa melhorar a qualidade da imagem, em caso de ruídos ou contraste e brilho inadequados. O intuito é facilitar operações subsequentes e obter resultados satisfatórios. Um exemplo típico de pré-processamento envolve técnicas para o realce de contraste, remoção de ruído e isolamento de regiões de interesse.

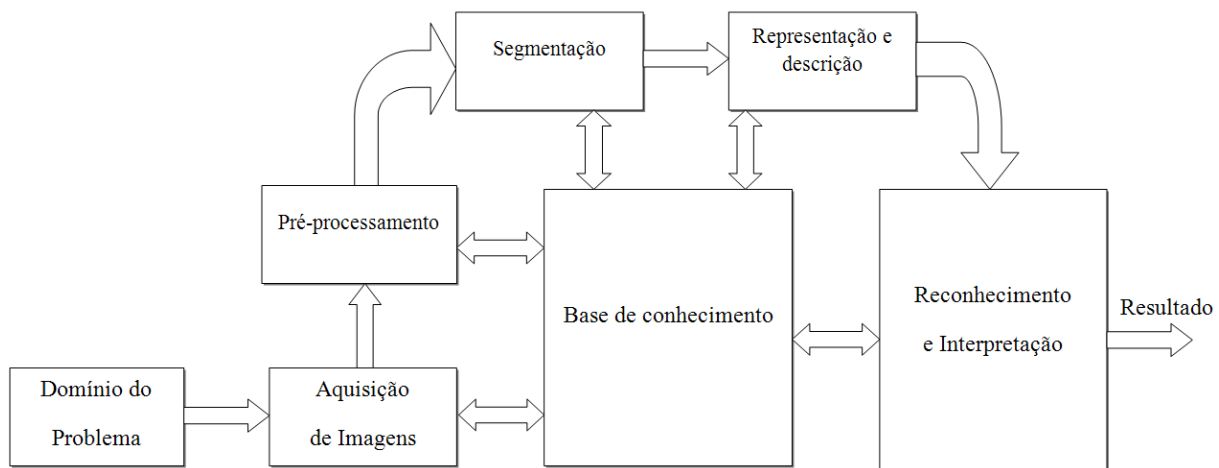


Figura 3.1: Passos fundamentais em processamento digital de imagens. Imagem obtida de [Gonzalez and Woods 2010].

- **Segmentação:** A etapa de segmentação busca dividir uma imagem em suas partes ou objetos constituintes, visando o isolamento das áreas de interesse contidas na imagem. Em geral, essa etapa representa uma das tarefas mais difíceis no processamento de imagens digitais. Ela é fundamental para o sucesso dos procedimentos posteriores de análise computadorizada, pois a partir dela serão realizadas as demais tarefas.
- **Representação e Descrição:** O objetivo da representação é estruturar os dados obtidos da etapa de segmentação de uma forma adequada para o processamento computacional. Segundo [Gonzalez and Woods 2010] a representação de uma região pode ser realizada em termos de suas características externas (fronteiras/bordas) ou de suas características internas (pixels que compõem o objeto). Em algumas aplicações essas representação são complementares. O processo de descrição trata da extração de características que resultam em alguma informação quantitativa de interesse [Gonzalez and Woods 2010].
- **Reconhecimento e Interpretação:** O processo de reconhecimento atribui identificadores ou rótulos aos objetos, baseado em suas características, isto é, informação traduzida pelo seu descritor. A tarefa de interpretação consiste em atribuir significado ao conjunto de objetos reconhecidos. Esta etapa permite a compreensão final da imagem analisada.

3.1.1 Imagem Digital

Uma imagem pode ser descrita como uma função de intensidade luminosa $f(x, y)$, cujo valor ou amplitude nas coordenadas espaciais (x, y) representa a intensidade ou brilho da imagem naquele ponto. Segundo [Gonzalez and Woods 2010], um modelo físico para intensidade de uma cena pode ser expresso pelo produto dos componentes iluminância

(característica do ambiente) e reflectância (característica do objeto), os quais representam, respectivamente, a quantidade de luz incidente na cena e a quantidade de luz refletida pelos objetos presentes na cena, tal como expresso pela Eq.3.1.

$$f(x, y) = i(x, y)r(x, y). \quad (3.1)$$

onde $i(x, y)$ representa a luz que incide sobre o objeto e $r(x, y)$ representa a luz que é refletida pelo mesmo.

Para processamento computacional a função $f(x, y)$ deve ser convertida para a forma discreta. Isto é realizado por um processo denominado *digitalização*, o qual envolve os conceitos de *amostragem* e *quantização*. A amostragem consiste em discretizar coordenadas espaciais da cena nas direções x e y , gerando uma matriz de $M \times N$ amostras. Sendo assim, uma imagem amostrada pode ser vista basicamente como um vetor de números, com tamanho finito, cada um representando um pixel da imagem.

A quantização consiste em escolher um número inteiro L de níveis de cinza permitidos para cada ponto da imagem, isto é, consiste no número máximo de níveis de intensidade ou cores que a imagem pode apresentar.

O resultado da aplicação dessas duas operações pode ser representado e organizado em uma matriz $M \times N$ (Eq.3.2), na qual, cada elemento da matriz corresponde a um pixel da imagem, o qual armazena o valor da intensidade de luz naquela coordenada.

$$f(x, y) = \begin{bmatrix} f(0, 0) & f(0, 1) & \cdots & f(0, N-1) \\ f(1, 0) & f(1, 1) & \cdots & f(1, N-1) \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ f(M-1, 0) & f(M-1, 1) & \cdots & f(M-1, N-1) \end{bmatrix} \quad (3.2)$$

A Fig.3.2 mostra um exemplo de uma imagem analógica após os processos de amostragem (Fig.3.2(a)) e quantização (Fig.3.2(b)). É possível verificar a manutenção da forma geral do objeto, porém, perda de pequenos detalhes após a amostragem.

A quantização comumente empregada na maioria das aplicações de análise computadorizada (em imagens monocromáticas) é a de 256 níveis de cinza. Esse valor é suficiente para permitir a observação de contraste e detalhes na imagem analisada.

3.1.2 Relacionamento básico entre pixels

Uma vez que uma imagem digital pode ser tratada como uma matriz, é possível estabelecer relacionamentos entre seus pixels. Alguns desses relacionamentos são utilizados no desenvolvimento de algoritmos abordados no presente trabalho. Dentre as várias relações importantes entre os pixels de uma imagem digital é possível citar vizinhança, adjacência, conectividade e caminho.

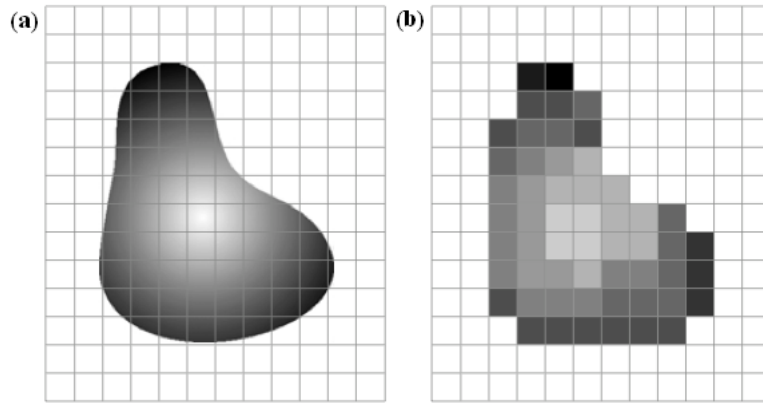


Figura 3.2: Ilustração dos processos de amostragem e quantização produzindo uma imagem digital. (a) Imagem contínua projetada e uma matriz $(M \times N)$. (b) Resultado final da amostragem e quantização da imagem.

Vizinhança

Um pixel p nas coordenadas (x, y) possui quatro vizinhos, sendo dois na horizontal e dois na vertical, cujas coordenadas são expressas conforme a Eq.3.3

$$N_4(p) = \{(x+1, y)(x-1, y)(x, y+1)(x, y-1)\}. \quad (3.3)$$

Estes pixels formam a chamada vizinhança-4 de p , expresso por $N_4(p)$, onde cada pixel está a uma unidade de distância de (x, y) . Alguns vizinhos de p podem ficar fora da imagem digital se (x, y) localizar-se na borda da imagem. As coordenadas dos quatro vizinhos diagonais de p formam a vizinhança-diagonal de p , denotado por $N_D(p)$ e expresso pela Eq.3.4

$$N_8(p) = \{(x-1, y-1)(x-1, y+1)(x+1, y-1)(x+1, y+1)\}. \quad (3.4)$$

A união da vizinhança-4 e vizinhança-diagonal gera o conjunto vizinhança-8 de p , representada por $N_8(p)$. A representação visual das vizinhanças descritas é exibida na Fig.3.3.

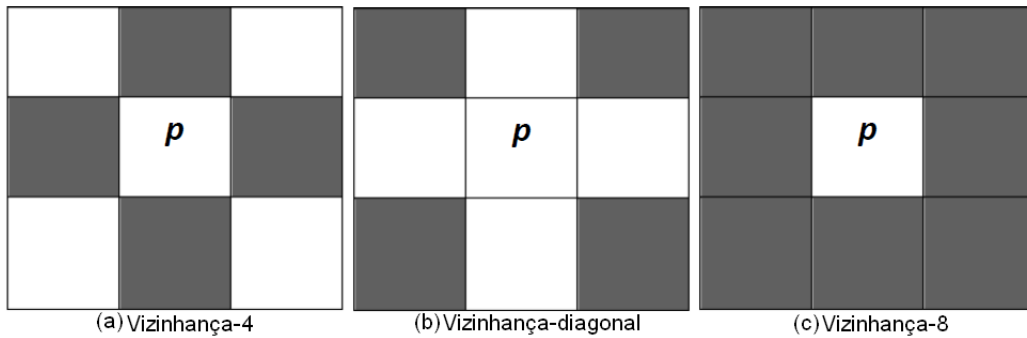


Figura 3.3: Tipos de vizinhança. (a) Vizinhança-4, (b) vizinhança diagonal e (c) vizinhança-8 [Marques Filho and Vieira Neto 1999].

Conectividade

A conectividade entre pixels é um conceito importante utilizado no estabelecimento das bordas de objetos e na localização de regiões de uma imagem. Para estabelecer se dois pixels estão conectados é necessário inicialmente determinar se eles são vizinhos segundo o tipo de vizinhança adotado, e avaliar se os níveis de cor (ou de cinza) satisfazem a algum critério de similaridade definido, tal como intensidade de cinza, cor ou textura.

Sejam p e q dois pixels de uma imagem digital, e V o conjunto de valores de intensidade utilizados para definir a conectividade, consideram-se as seguintes conectividades,

- Conectividade-4: p e q possuem conectividade-4 se ambos possuem os níveis de cinza em V e se $q \in N_4(p)$
- Conectividade-8: p e q possuem conectividade-8 se ambos possuem os níveis de cinza em V e se $q \in N_8(p)$
- Conectividade- m (conectividade mista): Dois pixels p e q com valores pertencendo a V são ditos conectados- m se

$$q \in N_4(p) \text{ ou} \\ q \in N_D(p) \quad \text{e} \quad N_4(p) \cap N_4(q) = \emptyset$$

A conectividade mista é uma modificação da conectividade-8 e é introduzida para eliminar os múltiplos caminhos que geralmente surgem quando a conectividade-8 é usada [Marques Filho and Vieira Neto 1999]. A eliminação dessa redundância é exemplificada pela Fig.3.4.

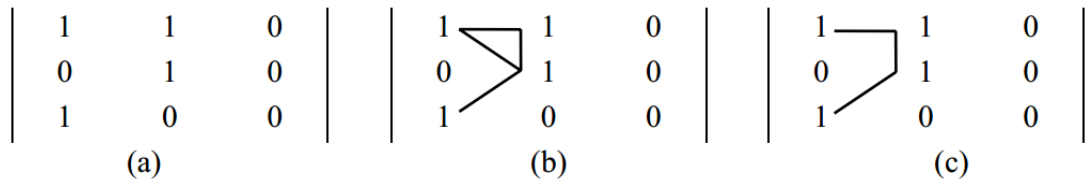


Figura 3.4: Tipos de conectividade. (a) Segmento de imagem binária, (b) 8-vizinhos do pixel central, (c) m -vizinhos do pixel central [Marques Filho and Vieira Neto 1999].

Em determinadas aplicações a conectividade mista mostra-se essencial, visto a existência de um caminho único entre dois pixels ser uma condição necessária.

3.1.3 Rotulação de componentes conexos

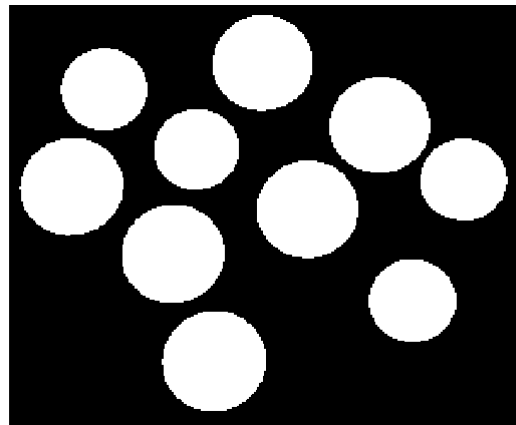
Para definir o problema da rotulação, é antes necessário abordar os conceitos de caminho conexo e componente conexo. Um caminho conexo entre p e q , respectivamente de coordenadas (x_0, y_0) e (x_n, y_n) , é uma sequência de pixels distintos de coordenadas $(x_0, y_0), (x_1, y_1), \dots, (x_n, y_n)$ em que (x_i, y_i) é adjacente a (x_{i-1}, y_{i-1}) para $1 \leq i \leq n$.

Um componente conexo G é um subconjunto de uma imagem binária, onde todos os pares (p, q) de pixels são conexos, ou seja, existe um caminho conexo de p a q e um caminho conexo de q a p , que não necessariamente são os mesmos [Gonzalez and Woods 2010].

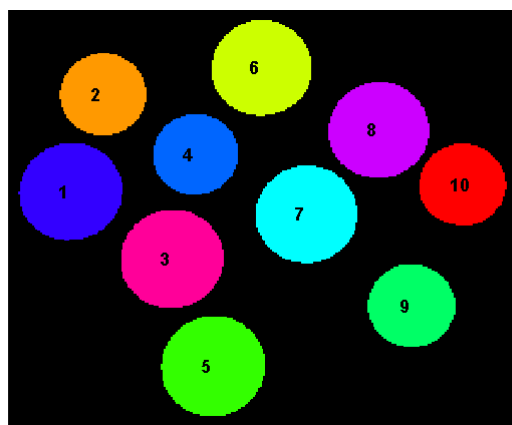
O procedimento da rotulação consiste em obter os componentes conexos que constituem a imagem binária, e conseguinte, atribuir um rótulo $l \in \mathbb{N}$ para cada componente conexo. Essa etapa é considerada de muita importância, sendo comum em aplicações de análise de imagem, a fim de extrair características essenciais da imagem. Existem várias abordagens para rotulação de componentes conexos. Basicamente, os algoritmos examinam a imagem binária, designando rótulos provisórios para cada pixel. Isso faz gerar uma imagem simbólica, a qual representa os objetos conectados, conforme exemplificado na Fig.3.5(c).



(a) Imagem original



(b) Imagem segmentada



(c) Imagem rotulada

Figura 3.5: Rotulação de objetos conexos. (b) é o resultado da segmentação da imagem exibida em (a), e (c) o resultado da rotulação, em que cada cor e número (rótulo) representa uma componente.

Em geral, os algoritmos percorrem a imagem, pixel a pixel, identificando com o mesmo

rótulo regiões com pixels adjacentes que compartilhem o mesmo valor. Abordagens tradicionais envolvem algoritmos voltados para computadores de arquitetura simples e imagens bidimensionais [L. He and Wu 2009], dentre os quais é possível citar, *multipass* [K. Suzuki and Sugie 2003], *two-pass* [L. He and Wu 2009, Haralick and Shapiro 1993] e *one-pass* [Chang et al. 2004], os quais se diferenciam pela quantidade de vezes que a imagem é percorrida. Uma explicação detalhada a respeito dos algoritmos de rotulação foge ao escopo do presente trabalho, mas pode ser encontrada na literatura [Walczyk et al. 2010].

Apresentam-se nesta seção os algoritmos de rotulação *two-pass*, os quais são considerados a abordagem clássica para rotulação de componentes conexos [Walczyk et al. 2010]. Os algoritmos *two-pass* examinam a imagem apenas duas vezes, em três fases distintas. Na primeira vez, inicialmente tem-se a fase de varredura, em que rótulos provisórios são designados para os pixels dos objetos e a informação de equivalência entre os rótulos provisórios é armazenada em uma estrutura de dados. Ainda durante essa primeira vez, realiza-se a segunda fase (denominada fase de análise). Nesta, a informação de equivalência dos rótulos é analisada, a fim de determinar rótulos finais. Na segunda vez, conclui-se a terceira fase, denominada fase de rotulagem. Nesta, os rótulos provisórios são substituídos pelos rótulos finais, usando a informação de equivalência obtida da fase de análise.

O tempo de execução dos algoritmos dessa classe varia conforme a complexidade dos componentes conexos na imagem, tendo em vista o uso de algoritmos para determinação da equivalência entre os rótulos, que por sua vez, depende da estrutura de dados que representa a equivalência [K. Suzuki and Sugie 2003].

3.1.4 Contorno paramétrico de objetos

O conceito de contorno paramétrico é análogo ao da representação paramétrica de curvas em geometria diferencial, sendo descrito em função de um único parâmetro (t), como o apresentado na Eq.3.5. Em tal caso, para cada t é definida uma posição (x, y) . Isto possibilita determinar quais pontos estão sobre o contorno, apenas substituindo o valor do parâmetro. Desta forma, obtêm-se um vetor $C(t)$ de pares ordenados (x, y) , conforme demonstrado pelas Eqs.(3.6),(3.7) e (3.8).

$$t = 1, 2, 3, \dots, n \quad (3.5)$$

$$C(t) = [x(t_1), y(t_1)], [x(t_2), y(t_2)], [x(t_3), y(t_3)], \dots, [x(t_n), y(t_n)] \quad (3.6)$$

tal que,

$$x(t) = x_1, x_2, x_3, \dots, x_n \quad (3.7)$$

$$y(t) = y_1, y_2, y_3, \dots, y_n \quad (3.8)$$

Um método simples para extração de contornos paramétricos é determinado pelo algoritmo “Seguimento de contorno” [Costa and Cesar 2009], popularmente conhecido como *Ceguinho*. Esse algoritmo consiste em varrer a imagem binária contendo um objeto de interesse, da esquerda para a direita e de cima para baixo, a fim de obter seu contorno, pixel a pixel. Ele recebe como entrada os componentes binários (convencionados de forma que o fundo seja branco (1) e o objeto preto (0)), e busca pelos pixels com valor igual a 0 (zero), ou seja, que constituam o contorno. Uma vez encontrado esse pixel inicial, o pixel imediatamente a sua esquerda é adotado como o primeiro elemento do contorno, conforme ilustrado pela Fig.3.6.

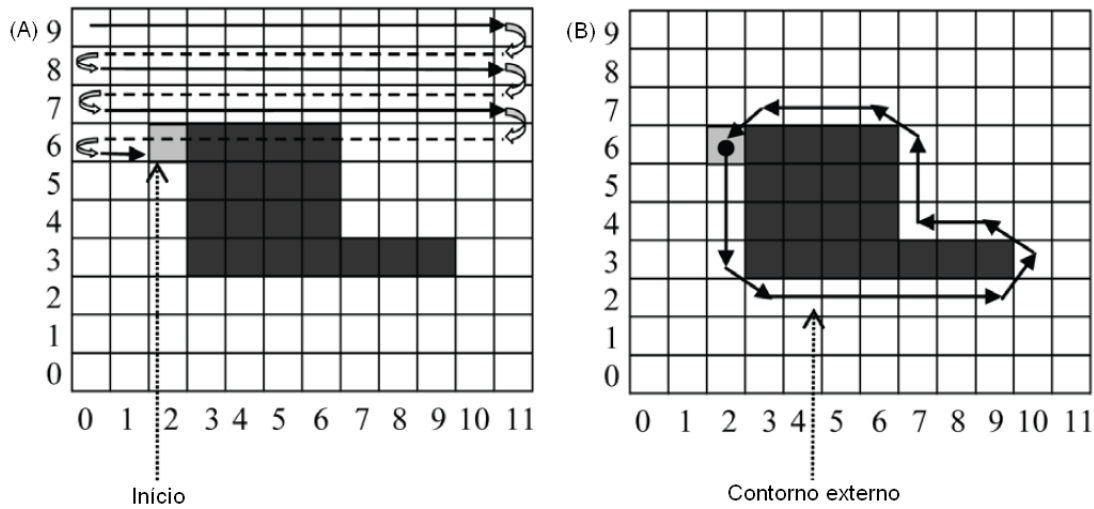


Figura 3.6: Ilustração do rastreamento do algoritmo Seguimento de Contorno (Ceguinho). Figurara adaptada de [Costa and Cesar 2009].

O método consiste em circundar a borda dos componentes binários, partindo de um pixel inicial e usando como possíveis direções de percurso as oito direções determinadas pelo pixel atual e os pixels 8-conectados a ele, até que o pixel inicial seja revisitado. Para circundar o objeto utiliza-se uma máscara com pixels 8-conectados, centralizada no pixel atual pertencente ao contorno. Com essa máscara o contorno do objeto é percorrido no sentido anti-horário, seguindo a ordem dos vizinhos ilustrada na Fig.3.7.

3	2	1
4	p	0
5	6	7

Figura 3.7: Vizinhança 8-conectado de p rotulada de 0 a 7.

3.1.5 Brilho e Contraste

O brilho e o contraste são características importantes para análise de imagem que podem ser intuitivamente percebidas pelo olho humano. O brilho é associado à intensidade de luz emitida por uma fonte, em outras palavras, quer dizer que quanto maior a intensidade da cor do pixel, maior será a sensação de brilho da imagem. Uma imagem predominantemente composta por pixels com níveis de cinza baixos, próximos a 0, é percebida como uma imagem escura, ou seja, com brilho baixo. Por outro lado, uma imagem formada predominantemente por tons de cinza próximos a 255 é considerada clara, com alto brilho. O brilho de uma imagem pode ser definido como a média dos tons de cinza dos pixels que a compõem, tal como expresso pela Eq.3.9 [Pedrini and Schwartz 2008]. Dada uma imagem $f(x, y)$ de dimensão $M \times N$, seu brilho é

$$B = \frac{1}{n} \sum_{x=0}^{M-1} \sum_{y=0}^{N-1} f(x, y), \quad (3.9)$$

onde $n = MN$ é o número total de pixels da imagem $f(x, y)$.

O contraste é uma medida da variação relativa da luminância, ou seja, da intensidade luminosa por unidade de área. Uma imagem que apresenta pixels com uma pequena variação de tons de cinza é percebida como uma imagem com baixo contraste, por outro lado, uma grande variação nos níveis de cinza de uma imagem define um alto contraste. O contraste pode ser definido como o desvio padrão dos tons de cinza de todos os pixels da imagem [Weeks 1996]. Dada uma imagem $f(x, y)$ de dimensão $M \times N$, esta medida pode ser matematicamente descrita pela Eq.3.10.

$$C = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{x=0}^{M-1} \sum_{y=0}^{N-1} [f(x, y) - B]^2}. \quad (3.10)$$

Alterações do brilho e contraste das imagens são de fundamental importância para melhorar a qualidade e tornar mais fácil a extração de informações da mesma.

3.2 Técnicas de pré-processamento

Após a etapa de aquisição, o próximo passo é o pré-processamento da imagem obtida. Essa fase consiste em modificar os valores dos pixels da imagem, o que altera suas características (cor, contraste, brilho, ruído, etc.), deixando-as mais adequadas para as demais etapas, tais como a segmentação, representação/descrição e reconhecimento/interpretação. A realização dessa etapa é de fundamental importância para normalizar imagens de um dado conjunto, quando essas são coletadas de ambientes não controlados, bem como, para otimizar operações subsequentes e obter melhores resultados [Gonzalez and Woods 2010].

O pré-processamento normalmente envolve a aplicação de técnicas que destacam de-

talhes de interesse na imagem e/ou corrigem defeitos oriundos da aquisição, como Realce de Contraste (Seção 3.2.1) e Restauração de imagens (Seção 3.2.2), respectivamente. Os procedimentos desta etapa podem ser classificados em duas categorias, domínio espacial (técnicas espaciais) e domínio da frequência (técnicas espectrais).

Os procedimentos de pré-processamento contidos no domínio espacial são realizados por meio de operações matemáticas, as quais operam diretamente sobre os pixels das imagens, de acordo com critérios pré-estabelecidos. Técnicas no domínio da frequência são aplicadas na imagem após a transformação de sua representação do domínio espacial para o domínio da frequência pela transformada de Fourier. Neste trabalho, as técnicas de pré-processamento usadas operam no domínio espacial.

3.2.1 Técnicas de Realce

Conforme descrito na Seção 3.1.5 o contraste se caracteriza pela mudança local de brilho e é definido como a razão entre o brilho médio de um objeto e o brilho do fundo. Imagens com baixo contraste podem resultar de iluminação insuficiente, limitações de escala dinâmica no sensor de imageamento, ou mesmo do incorreto manuseamento dos equipamentos de aquisição da imagem [Gonzalez and Woods 2010].

Nesse sentido, técnicas objetivando o realce do contraste da imagem se fazem necessárias, a fim de melhorar a visualização de uma cena e aumentar a quantidade de informação que pode ser extraída. Também pode apenas ter como objetivo melhorar a qualidade das imagens para a visualização do usuário. As técnicas responsáveis por tal operações são chamadas Realce de contraste. As técnicas de realce de contraste visam processar as imagens, a fim de que o resultado final seja mais adequado que a imagem original para uma aplicação específica.

O realce de contraste permite ampliar o intervalo original (valores de níveis de cinza de uma imagem digital) para toda a escala de cinza disponível, visando com isso, apresentar a mesma informação contida nos dados brutos, porém de forma mais clara ao intérprete.

Diversas técnicas de realce para imagens em tons de cinza foram desenvolvidas no domínio do espaço. É possível citar, por exemplo, realce linear, equalização de histograma, especificação de histograma, alargamento de contraste, fatiamento de níveis de intensidade, entre outros [Gonzalez and Woods 2010, Azevedo et al. 2008]. Operações realizadas neste domínio atuam diretamente sobre os pixels da imagem processada. Isto é, realçar uma imagem f significa transformá-la em uma imagem g utilizando uma função de mapeamento (transferência) T , tal como expresso pela Eq.3.11

$$g(x, y) = T[f(x, y)] \quad (3.11)$$

onde $f(x, y)$ é a imagem de entrada, $g(x, y)$ é a imagem de saída, (x, y) são as coordenadas dos pixels nas imagens e T é a função de mapeamento que age sobre a imagem.

Realce Linear

A função de mapeamento de uma operação pode ser linear ou não-linear. Uma função de mapeamento linear é uma função de primeiro grau que faz destinar novos valores de brilho e contraste para cada pixel da imagem original $f(x, y)$. Um exemplo de operação com função de mapeamento linear é o *realce linear*. O realce linear consiste na redistribuição dos níveis de cinza, com manutenção de suas posições relativas, em que a função de mapeamento é generalizada como a expressão de uma reta, tal como definido pela Eq.3.12

$$g(x, y) = af(x, y) + b \quad (3.12)$$

onde, o parâmetro $f(x, y)$ representa os pixels da imagem original e $g(x, y)$ os valores de pixels resultantes após o processamento. Sendo que a constante a (coeficiente angular) afeta juntamente o contraste e brilho da imagem processada, e a constante b (coeficiente linear), por sua vez, ajusta somente o brilho [Solomon and Breckon 2010]. Um valor positivo do parâmetro b faz o brilho aumentar, um valor negativo o reduz. Um coeficiente angular $a > 1$ resulta num aumento do brilho e contraste, ao passo que, $a < 1$ provoca redução de ambos.

3.2.2 Restauração de imagens

A restauração é um processo que tenta reconstruir ou recuperar uma imagem corrompida, se orientando na direção do modelo de degradação e da aplicação do processo inverso para recuperar a imagem original. Essa etapa possui grande importância na área de processamento de imagens, uma vez que, visa eliminar (ou até mesmo reduzir) os efeitos degradantes que afetam o conteúdo informativo de uma imagem. Assim como no Realce de Contraste, o principal objetivo das técnicas de restauração é melhorar a imagem em algum aspecto específico, e com isso, fornecer dados mais precisos para as demais etapas de processamento.

Vários tipos de ruídos podem ser encontrados em imagens digitais, tais como aleatório, aditivo e sal-e-pimenta. Tais imagens, em geral, fornecem informações errôneas durante os procedimentos de análise computadorizada. Neste contexto, técnicas estatísticas e modelos matemáticos destinadas à restauração de imagens digitais, em particular para eliminação de ruído, são notadamente importantes.

Os filtros têm sido as técnicas amplamente aplicadas nesta etapa, operando no domínio espacial ou no domínio da frequência. Alguns são mais eficientes no domínio espacial, enquanto outros se mostram mais adequadas no espectro da imagem. Por exemplo, o domínio da frequência é ideal para identificação de ruído periódico, tendo em vista que esse tipo de ruído provoca picos no espectro da imagem. Por outro lado, algumas operações de restauração, como redução de ruído aleatório aditivo são mais eficazes no domínio

espacial [Gonzalez and Woods 2010].

Filtragem espacial

Os métodos de filtragem espacial utilizam operações de convolução entre a imagem original e uma máscara especialmente construída (filtros espaciais). Os filtros espaciais podem ser classificados em passa-baixa, passa-alta e passa-banda (ou passa-faixa).

Os filtros passa-baixa atenuam (ou eliminam) as altas frequências que correspondem às transições rápidas, enquanto deixam passar as baixas frequências, sendo comumente utilizados para suavização da imagem. Por outro lado, diminuem a nitidez e a definição da imagem. Dentre as técnicas de filtragem passa-baixa existentes citam-se os filtros de média, mediana, média ponderada, moda e Gaussiano. Os filtros passa-alta, por sua vez, atenuam ou eliminam as baixas frequências, realçando as frequências altas. Muito utilizado para destacar as transições abruptas da imagem, como bordas, linhas, curvas ou manchas. Como exemplo de filtros passa-alta tem-se o filtro Laplaciano e os filtros de gradiente. Por fim, os filtros passa-banda referem-se a aplicações nas quais é abordada a filtragem seletiva, ou seja, o interesse é processar bandas específicas de frequências.

Um tipo de filtro normalmente empregado para redução de ruído são os filtros passa-baixa. Como exemplo é possível citar os filtros média, Gaussiano e mediana. O filtro utilizado no presente trabalho para redução/eliminação de ruído é o filtro Gaussiano [Gonzalez and Woods 2010].

Filtro Gaussiano

Trata-se de um filtro linear, usualmente do tipo passa-baixa e normalmente aplicado para suavizar imagens. Seu processo de filtragem pode ser feito utilizando uma máscara. Os valores da máscara são determinados a partir de uma função Gaussiana discreta.

A distribuição Gaussiana bidimensional com média zero e desvio padrão σ é descrita convenientemente, em termos das direções perpendiculares x e y , conforme definido na Eq.3.13, onde x e y são as posições na máscara e $G(x, y)$ é o valor a ser colocado na posição (x, y) da máscara.

$$G(x, y) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} e^{-\frac{(x^2+y^2)}{2\sigma^2}} \quad (3.13)$$

O filtro Gaussiano consiste basicamente em suavização de imagem e remoção de ruídos. Atribui-se um peso maior ao pixel central da máscara e reduz tal peso conforme se afasta do centro, como demonstrado pela Fig.3.8. Dessa forma, é amplamente utilizado como método de suavização de imagens, de forma ponderada e simétrica.

Após a máscara Gaussiana ser adequadamente definida, a filtragem pode ser desenvolvida utilizando métodos de convolução. O processo de filtragem Gaussiana possui dois parâmetros, a dimensão da janela ($m \times n$) e desvio padrão σ . O grau de suavização

$$10^{-3} *$$

23	34	38	34	23
34	49	56	49	34
38	56	63	56	38
34	49	56	49	34
23	34	38	34	23

Figura 3.8: Máscara de convolução gaussiana com desvio padrão $\sigma = 2$ e tamanho 5×5 .

é determinado pelo valor do desvio-padrão. Logo, quanto maior o desvio padrão, mais a imagem é suavizada. Este parâmetro depende normalmente da aplicação em estudo, sendo importante determinar um valor que suavize a textura da imagem, ao mesmo tempo em que mantenha características importantes, como o contorno.

3.3 Técnicas de Segmentação

É possível dividir as técnicas de segmentação de imagens em dois grupos principais, de acordo com as propriedades básicas dos valores de intensidade: descontinuidade e similaridade. Neste contexto, existem inúmeras técnicas científicas voltadas à segmentação de imagens. Uma abordagem geral destas foge ao escopo da presente pesquisa. [Gonzalez and Woods 2010] e [Pedrini and Schwartz 2008] apresentam em detalhes a maioria dos principais métodos propostos. O presente capítulo tem por objetivo abordar sucintamente algumas das técnicas comumente empregadas na segmentação de imagens, dentro do contexto da bioinformática.

3.3.1 Introdução

A segmentação de imagem é normalmente considerada o primeiro passo em análise de imagens. Isto porque, no processo de análise, é muito frequente a necessidade de destacar objetos, a fim de obter dados quantitativos e/ou qualitativos de sua região, além de uma visualização mais precisa.

A tarefa básica da segmentação consiste na extração ou identificação de objetos contidos na imagem, onde se entende por “objeto” toda característica com conteúdo semântico relevante para a aplicação. Geralmente, o nível de detalhe em que a subdivisão é realizada depende do problema a ser resolvido, ou seja, a segmentação deve ser interrompida quando os objetos ou as regiões de interesse forem detectados [Gonzalez and Woods 2010]. A etapa de segmentação é considerada crítica em PDI e visão computacional, uma vez que a sua qualidade representa um fator determinante para o sucesso ou fracasso final dos procedimentos de análise computadorizada.

Existem diversas formas de segmentar imagens. As técnicas de segmentação baseiam-se geralmente nas propriedades básicas dos valores de intensidade, isto é, descontinuidade e similaridade dos diferentes aspectos da imagem (por exemplo, níveis de cinza, de cores e de texturas). A descontinuidade tem como abordagem principal a partição da imagem com base nas mudanças abruptas desses valores. As principais áreas de interesse nessa categoria são a detecção de pontos isolados, linhas e bordas. Já os métodos baseados em similaridade, visam a detecção de regiões homogêneas. Encontra-se nessa categoria abordagens como limiarização e crescimento de regiões [Azevedo et al. 2008].

3.3.2 Segmentação por Similaridades

A segmentação baseada em similaridade consiste em particionar a imagem em suas regiões constituintes, de acordo com algum critério pré-estabelecido. Tal segmentação se baseia na análise dos objetos, onde se presume que os pixels que formam um objeto possuem características semelhantes, enquanto pixels de objetos distintos possuem propriedades diferentes. Nesta categoria encontram-se técnicas como limiarização e crescimento de regiões.

Limiarização (*Thresholding*)

A limiarização é a forma mais simples e rápida de segmentar imagens digitais. Além disso, é uma das abordagens mais importantes para a segmentação. A base dessa técnica consiste na classificação dos pixels de uma imagem de acordo com um ou mais limiares [Gonzalez and Woods 2010]. Matematicamente, a operação de limiarização pode ser descrita como uma técnica de particionamento do histograma de intensidade de uma imagem $f(x, y)$, de N níveis de cinza, de modo que os pixels dos objetos e os do fundo tenham seus níveis de cinza separados pela seleção de um limiar T , tal como apresentado na Eq.3.14 [Pedrini and Schwartz 2008]

$$g(x, y) = \begin{cases} \text{objeto} & \text{se } f(x, y) > T \\ \text{fundo} & \text{se } f(x, y) \leq T, \end{cases} \quad (3.14)$$

onde $g(x, y)$ é a imagem segmentada. Essa imagem também é chamada de imagem binária, pois possui somente dois níveis de intensidade. O sucesso desse método depende inteiramente do valor do limiar escolhido e de quão bem o histograma pode ser particionado [Gonzalez and Woods 2010]. No entanto, definir um limiar T não é uma tarefa trivial, já que esse valor é alterado conforme a aplicação em estudo. Para contornar esse problema são propostos na literatura variados métodos para a determinação automática de limiares. Normalmente tais métodos se diferenciam segundo a quantidade de limiares utilizados ou como os limiares são estabelecidos. Dentre os tradicionais métodos de

limiarização é possível citar os métodos de Limiarização Global, Limiarização Local e Limiarização Ótima.

Limiarização Global A Limiarização Global é utilizada em casos onde as distribuições de intensidade dos pixels de fundo e dos objetos são suficientemente diferentes, tendo em vista que o particionamento do histograma da imagem é definido por um único limiar T . Neste contexto é possível citar os métodos Manual e Iterativo.

A *Limiarização Global Manual* caracteriza-se pela definição manual do limiar T . Normalmente o usuário ou desenvolvedor do sistema define o limiar com base em conhecimento empírico, a cerca da aplicação utilizada, ou ainda com base em tentativa e erro. Outra estratégia bastante utilizada para se definir o limiar é a consulta ao histograma de dados da imagem a ser binarizada, em que o objetivo é encontrar o vale entre os picos do histograma, buscando nesse espaço um limiar que separe as duas classes.

No entanto, normalmente há uma grande variabilidade entre as imagens, o que torna necessário a utilização de um algoritmo capaz de determinar automaticamente o valor do limiar para cada imagem. Nestes casos, é possível empregar o método de *Limiarização Global Iterativo*, útil em situações em que há um vale razoavelmente claro entre os modos de histograma relacionados aos objetos e ao fundo.

Limiarização Local A Limiarização Local (ou Variável), por sua vez, realiza-se quando o valor do limiar T varia dentro de uma mesma imagem, dependendo de suas propriedades. Este método é normalmente aplicado quando a definição de um único limiar falha, por exemplo, em imagens corrompidas por ruído ou iluminação irregular. A não uniformidade da iluminação provoca alterações no histograma original da imagem, eliminando uma região de vale entre dois picos, útil para a definição de um limiar global. É possível citar diferentes abordagens para escolha dos limiares variáveis, tais como particionamento da imagem, médias de movimento, e propriedades locais da imagem [Gonzalez and Woods 2010].

A metodologia *Particionamento da imagem* consiste em dividir a imagem original em sub-imagens (retângulos que não se sobrepõem), e então utiliza um limiar diferente para cada sub-imagem. Nesse caso, cada limiar é definido com base nos pixels contidos nos retângulos, sabendo que, eles são escolhidos suficientemente pequenos para que a área de cada um seja o mais uniforme possível. O problema principal deste tipo de abordagem é a escolha do tamanho da janela para a definição do limiar local. Esse parâmetro é importante, uma vez que define o tamanho da região para estimar o limiar. Sendo assim, uma atenção deve ser dada para escolha do método a ser utilizado na determinação do limiar e ao tamanho das janelas.

A abordagem *Propriedades locais da imagem* baseia-se no cálculo de um limiar para cada pixel da imagem, utilizando para isso uma ou mais propriedades, as quais são calcu-

ladas na vizinhança do ponto analisado. Entre os parâmetros geralmente utilizados para determinação de limiares locais citam-se a média e o desvio padrão dos pixels, considerados descritores de intensidade média e contraste local.

O método *Médias de movimento* baseia-se no cálculo de uma média móvel ao longo das linhas de uma imagem. Esse método é particularmente indicado nos casos em que os objetos de interesse são pequenos (ou finos) em relação ao tamanho da imagem, ou ainda no processamento de imagens, em que a velocidade é requisito fundamental. Matematicamente define-se um limiar (média móvel) para cada pixel, o qual se baseia no tom de cinza médio dos pixels contidos em uma determinada vizinhança.

Limiarização Ótima - Método Otsu Na prática, o histograma de uma imagem nem sempre apresenta uma separação bem definida entre as classes, dificultando a escolha do intervalo de cada classe. Neste caso, portanto, erros na classificação são inevitáveis e o limiar ótimo entre duas classes vizinhas é aquele que minimiza os erros. Nessa situação a limiarização pode ser vista como um problema teórico de decisão estatística, cujo objetivo é minimizar o erro médio incorrido na atribuição de pixels para dois ou mais grupos. Existem diversos métodos estatísticos que abordam diferentes alternativas para a obtenção do valor ótimo do limiar T levando em conta seus parâmetros estatísticos, tal como o Otsu [Otsu 1979].

O método de limiarização Otsu baseia-se na análise discriminante, onde a operação de limiarização é considerada como sendo o particionamento dos pixels de uma imagem com L níveis de cinza em duas classes C_0 e C_1 , tais que representam o objeto e o fundo da imagem (ou vice-versa), sendo que esta partição se dará no nível de cinza t . O Otsu baseia-se inteiramente em cálculos realizados no histograma da imagem, e é considerado ótimo no sentido de que maximiza a variância entre classes, e minimiza a variância intraclasses. Cada classe possui suas características próprias, isto é, média e desvio padrão. Desta forma, sendo

$$C_0 = \{1, 2, 3, \dots, t\} \quad (3.15a)$$

$$C_1 = \{t + 1, t + 2, t + 3, \dots, L\} \quad (3.15b)$$

O valor ótimo do limiar t^* pode ser encontrado pela maximização do critério de separabilidade da função $\eta(T)$, conforme definido pela Eq.3.16, onde, σ_b^2 representa a variância entre classes e σ_t^2 a variância total da imagem.

$$\eta(t) = \frac{(\sigma_b^2)}{(\sigma_t^2)} \quad (3.16)$$

tal que,

$$\sigma_t^2 = \sum_{i=0}^{L-1} (i - \mu_T)^2 p_i \quad (3.17a)$$

$$\mu_T = \sum_{i=0}^{L-1} i p_i \quad (3.17b)$$

$$\sigma_b^2 = \omega_1 \omega_2 (\mu_1 \mu_2)^2 \quad (3.17c)$$

$$\omega_1 = \sum_{i=0}^t p_i \quad (3.17d)$$

$$\omega_2 = 1 - \omega_1 \quad (3.17e)$$

$$\mu_1 = \frac{\mu_S}{\omega_1} \quad (3.17f)$$

$$\mu_2 = \frac{\mu_T - \mu_S}{\omega_2} \quad (3.17g)$$

$$\mu_S = \sum_{i=0}^t i p_i \quad (3.17h)$$

$$\sum_{i=0}^{L-1} p_i = 1, \quad p_i = \frac{n_i}{n} \quad (3.17i)$$

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

Segmentação por região

A segmentação baseada em região objetiva encontrar regiões significativas dentro de uma imagem, com dois princípios básicos, extrair uma determinada região ou dividir (particionar) a imagem num conjunto de regiões disjuntas. As regiões a serem detectadas, em geral, apresentam propriedades similares, tais como intensidade de cinza, cor, informação semântica ou textura [Pedrini and Schwartz 2008]. Nesta seção são brevemente apresentados os principais métodos de segmentação baseada em regiões, tais como Crescimento de Região e *Watershed* (divisor de águas).

Crescimento de Regiões O método Crescimento de Regiões é um procedimento simples que agrega pixels com propriedades similares em regiões. A metodologia básica consiste em iniciar com um conjunto inicial de pontos (sementes), e a partir deles agregar pixels vizinhos que possuam propriedades pré-definidas semelhantes. Duas dificuldades encontradas nesse método referem-se à seleção de propriedades ideais para agregação de pontos nas várias regiões durante o processo de crescimento, bem como, à seleção das sementes apropriadas para representar as regiões de interesse. O conjunto de um ou mais pontos (sementes) é normalmente associado à natureza do problema, visto que, dependendo do problema abordado é possível coletar informação *a priori*, tal que favorece a definição destes pontos. Enquanto isso, a seleção dos critérios de similaridade, isto é, característica usada para a escolha dos vizinhos a serem adicionados à região do pixel semente depende do problema analisado e de características da imagem, como por exemplo, se a imagem de entrada é em níveis de cinzento ou colorida [Gonzalez and Woods 2010].

Watershed (Divisor de águas) A técnica de segmentação *watershed* considera o objeto a ser segmentado como sendo uma superfície topográfica, em que os níveis de intensidade dos pixels correspondem a valores de altitude ou elevação dos pontos. Sendo assim, os pixels da imagem são vistos como pontos de mínimo (que representam os vales) e pontos de máximo (que representam os picos), com diferentes elevações. O objetivo principal é produzir linhas de divisão nesta superfície (linhas de *watershed*), as quais definem o contorno dos objetos ou a separação das regiões.

Para isso, a imagem passa por um princípio físico de inundação dos vales, o qual pode ser melhor compreendido pela analogia “inundação de relevo”. O processo de inundação pode ser realizado de duas formas: (a) elevando um nível de água uniformemente na superfície e traçando as linhas nos pontos onde águas provenientes de dois mínimos regionais se tocam, ou (b) localizando os pontos onde uma gota de água pode escorrer para mínimos diferentes [Vincent and Soille 1991, Meyer and Beucher 1990]. Considerando a alternativa (a) supõe-se que cada vale tenha o seu ponto mínimo perfurado e que essa superfície topográfica passe a ser imersa em um lago com velocidade vertical constante, neste sentido a água vai penetrando regularmente através dos orifícios e começa a inundar os vales, formando bacias de retenção. Quando as águas de duas bacias vizinhas entram em contato, uma linha de contenção é criada entre elas, a fim de evitar o transbordamento das águas entre as diferentes bacias. O processo de imersão continua até toda a imagem estar inundada, tal que haverá uma linha de contenção delimitando cada bacia de retenção. Ao final do processo, observa-se que os locais onde são criadas as linhas de contenção representam as bordas das regiões. As barragens finais correspondem às linhas de *watershed*, e geralmente representa o resultado desejado da segmentação.

Vários fatores afetam a qualidade da segmentação por *watershed*. Por exemplo, o método clássico é sensível a ruído, o qual pode ocorrer na forma de valores mínimos

ou máximos na imagem. Outro fator refere-se à possíveis irregularidades nas bordas das regiões, as quais podem acarretar vazamentos de água no processo de imersão e, assim como no caso da presença de ruído, pode resultar em um excesso de regiões (super segmentação).

Uma das abordagens para evitar o problema de super segmentação é utilizar marcadores, ou seja, componentes conexos que permitem localizar as regiões de interesse, e a partir dos quais as linhas de retenção são inferidas. A definição dos marcadores pode ser realizada automaticamente ou por intervenção humana. No primeiro caso, os marcadores são normalmente detectados a partir de variadas operações morfológicas, seguidas de limiarização [Meyer and Beucher 1990]. No entanto, esse processo não é trivial, a obtenção de um marcador único por região dificilmente ocorre na prática. Outra abordagem normalmente utilizada para melhorar os resultados da segmentação *watershed* é aplicar o algoritmo sobre o gradiente morfológico da imagem original, já que este operador realça as bordas [Facon 1996, Soille 1999]. Entretanto, por ser um operador sensível a ruídos, a imagem resultante pode apresentar muitos mínimos locais. A aplicação de filtros sobre a imagem gradiente pode resolver ou reduzir esse problema, tendo em vista que reduz os dados irrelevantes, ao passo que preserva as características essenciais da forma.

É importante mencionar que existem várias definições da transformação de *watershed*, tais como rastreamento das gotas d'água que caem na superfície representando a imagem, inundação da superfície perfurada nos fundos dos vales, emersão da superfície previamente imersa, caminhos ótimos e floresta de peso mínimo. Algumas delas permitem soluções múltiplas, e portanto, segmentações diferentes. Além disso, muitos algoritmos de *watershed* foram propostos na literatura utilizando as definições clássicas para a transformada *watershed* ou aproximações dessas. Isso permite concluir que resultado da segmentação depende da definição abordada e da implementação escolhida. Um estudo mais aprofundado sobre definições e diferentes técnicas é apresentado por [Roerdink and Meijster 2001, Audigier 2007, Korbes and Lotufo 2010].

3.3.3 Segmentação por Descontinuidades

A segmentação de imagens produzida por técnicas de detecção de descontinuidades procura encontrar limites entre regiões homogêneas de diferentes propriedades. A descontinuidade em uma imagem pode ser um ponto isolado, uma linha ou a borda de um objeto. Na prática, a maneira mais comum de procurar por descontinuidades consiste em mover uma máscara ou *kernel* de convolução (Eq.3.18) pixel a pixel na imagem original.

$$\begin{bmatrix} w_1 & w_2 & w_3 \\ w_4 & w_5 & w_6 \\ w_7 & w_8 & w_9 \end{bmatrix} \quad (3.18)$$

Considerando-se uma máscara 3×3 (como a exibida na Eq.3.18) calcula-se a soma dos produtos dos coeficientes pelo nível cinza contido na região da imagem processada pela máscara. A resposta da máscara em qualquer ponto da imagem é dada segundo a Eq.3.19

$$R = w_1 z_1 + w_2 z_2 + \dots w_9 z_9 = \sum_{i=1}^9 w_i z_i \quad (3.19)$$

Onde z_i representa o nível de cinza associado com o coeficiente w_i da máscara. Sabendo que, a resposta da máscara é definida em relação a sua posição central.

Detecção de bordas

A detecção de bordas é o método mais utilizado para segmentar imagens com base nas variações abruptas de intensidade. Uma borda representa o limite entre regiões com propriedades relativamente distintas de nível de cinza. As bordas na imagem caracterizam os contornos dos objetos e são bastante úteis para segmentação e identificação de objetos na cena.

Detectar bordas significa, essencialmente, identificar as mudanças locais significativas nos níveis de cinza da imagem. Na prática, a maneira mais comum de encontrar essas mudanças é por meio do conceito de derivada (operadores diferenciais). Como uma imagem bidimensional $f(x, y)$ depende de duas coordenadas espaciais, as bordas são normalmente computadas por meio das derivadas parciais $G_x = \partial f / \partial x$ e $G_y = \partial f / \partial y$. Nesse caso, um operador comumente abordado é o gradiente, isto é, vetor utilizado para encontrar a magnitude, direção e sentido da variação dos níveis de cinza. Com o gradiente, é possível encontrar os locais em que ocorrem variações abruptas nos níveis de intensidade. Na forma matricial, o vetor gradiente $\nabla f(x, y)$ de uma imagem f na posição (x, y) pode ser definido conforme a Eq.3.20

$$\nabla f = \begin{bmatrix} g_x \\ g_y \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \frac{\partial f}{\partial x} \\ \frac{\partial f}{\partial y} \end{bmatrix} \quad (3.20)$$

Para o processo de detecção de bordas duas medidas são essencialmente importantes, a magnitude e a direção do vetor gradiente. Da análise vetorial, a magnitude (tamanho) do vetor gradiente (Eq.3.21) representa uma medida importante. Ela expressa a taxa de variação de f no local (x, y) . Denominado por $M(x, y)$ ou $mag(\nabla f)$, e geralmente chamada simplesmente gradiente, onde

$$M(x, y) = mag(\nabla f) = \sqrt{g_x^2 + g_y^2} \quad (3.21)$$

Uma aproximação empregada para $mag(\nabla f)$ estima o gradiente com valores absolutos,

tal que

$$\text{mag}(\nabla f) = |g_x| + |g_y| \quad (3.22)$$

Neste caso, um tempo menor é requerido, comparando-se à Eq.3.21. A direção do vetor do gradiente é outro dado importante. Considerando $\alpha(x, y)$ o ângulo da direção do vetor $\text{mag}(\nabla f)$ na posição (x, y) , tem-se que

$$\alpha(x, y) = \text{tg}^{-1} \left[\frac{g_y}{g_x} \right], \quad (3.23)$$

onde o ângulo é medido em relação ao eixo x . A direção de uma borda em um ponto arbitrário (x, y) é ortogonal à direção $\alpha(x, y)$ do vetor gradiente no ponto [Gonzalez and Woods 2010].

Como o cálculo das derivadas parciais envolve quantidades digitais uma aproximação digital das derivadas parciais em uma vizinhança sobre um ponto é necessária. A magnitude do gradiente (Eq.3.21) pode ser aproximada do ponto w_5 (central) de várias formas, tais como, diferenças cruzadas, valores absolutos ou diferença cruzada usando-se valores absolutos.

Para uma imagem digital $f(x, y)$, o cálculo do gradiente pode ser implementado por meio de máscaras, chamadas normalmente “operadores de gradiente”. Por facilidade de implementação são usadas máscaras 3×3 . Uma aproximação da Eq.3.22, no ponto w_5 , usando vizinhança 3×3 é apresentada na Eq.3.24

$$\nabla f \approx |(w_7 + w_8 + w_9) - (w_1 + w_2 + w_3)| + |(w_3 + w_6 + w_9) - (w_1 + w_4 + w_7)| \quad (3.24)$$

As máscaras usadas para implementar a Eq.3.24 por meio de convolução são mostradas na Eq.3.25. Essas máscaras correspondem ao operador de Prewitt para cálculo de gradiente nas direções vertical e horizontal.

$$\begin{bmatrix} -1 & -1 & -1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 1 \end{bmatrix} \quad \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -1 & 0 & 1 \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (3.25)$$

Operadores de Gradiente Entre os Operadores de Gradiente tradicionalmente utilizados para a detecção de contornos de objetos ou bordas de regiões em imagens citam-se o Prewitt, Sobel e Roberts.

O operador Prewitt detecta mudanças abruptas de tonalidades por meio da máscara 3×3 apresentada na Eq.3.25. Seu princípio de atuação define que a resposta do operador nos pixels situados no interior de regiões de valor constante seja igual a zero, e nas fronteiras ou bordas da imagem a resposta seja diferente de zero.

As derivadas baseadas no operador Prewitt são descritas pelas Eqs.3.26a e 3.26b. Na prática, o operador é aplicado em toda a imagem f , calculando-se o gradiente na vizinhança de cada pixel, por meio das máscaras vertical e horizontal (Eq.3.25).

$$g_x = \frac{\partial f}{\partial x} = (w_7 + w_8 + w_9) - (w_1 + w_2 + w_3) \quad (3.26a)$$

$$g_y = \frac{\partial f}{\partial y} = (w_3 + w_6 + w_9) - (w_1 + w_4 + w_7) \quad (3.26b)$$

A diferença entre a terceira e a primeira linha da região 3×3 aproxima a derivada na direção do eixo x , e a diferença entre a terceira e a primeira coluna da região 3×3 aproxima a derivada na direção do eixo y .

O operador Sobel (Eq.3.27) considera que os pixels mais próximos do centro da máscara possuem maior influência no gradiente, definindo assim máscaras com maior peso na região central. Este operador, além de ressaltar as bordas da imagem tem como característica suavização da imagem e melhor supressão de ruído, questão importante em casos da utilização de derivadas.

$$\begin{bmatrix} -1 & -2 & -1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 1 & 2 & 1 \end{bmatrix} \quad \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -2 & 0 & 2 \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (3.27)$$

As derivadas baseadas no operador Sobel são descritas pelas Eqs.3.28a e 3.28b.

$$g_x = \frac{\partial f}{\partial x} = (w_7 + 2w_8 + w_9) - (w_1 + 2w_2 + w_3) \quad (3.28a)$$

$$g_y = \frac{\partial f}{\partial y} = (w_3 + 2w_6 + w_9) - (w_1 + 2w_4 + w_7) \quad (3.28b)$$

3.4 Morfologia Matemática

No contexto literal, o termo morfologia refere-se ao estudo das formas e das estruturas de entidades, sendo amplamente utilizado em áreas como biologia e geografia. Em processamento de imagens ela representa o estudo da forma e estrutura de objetos digitais presentes em uma imagem, ou os arranjos e inter-relacionamentos entre suas partes [Gonzalez and Woods 2010].

A morfologia matemática (MM) foi desenvolvida inicialmente por Georges Matheron e Jean Serra, na década de 60, para imagens binárias utilizando a teoria de conjuntos, como interseção, união e complemento de conjuntos. Posteriormente, ela foi estendida ao processamento e análise de imagens em tons de cinza, utilizando a teoria de reticulados, onde uma imagem é vista como a superfície de um relevo. A sua aplicação em PDI objetiva ex-

trair informações relativas à geometria e à topologia de um conjunto desconhecido de uma imagem, por meio do uso de um elemento chave, isto é o elemento estruturante. Oferece basicamente uma abordagem não linear, unificada e poderosa, com diversas aplicações em processamento de imagens, tais como realce, segmentação, detecção de bordas, filtragem, esqueletização, afinamento, análise de formas, dentre outras [Gonzalez and Woods 2010, Matheron and Serra 2002, Luengo Hendriks 2003].

3.4.1 Elemento Estruturante

A teoria da morfologia matemática se fundamenta na utilização de um conjunto definido, cuja forma e tamanho são conhecidos, denominado “elemento estruturante (ES)”. O ES é utilizado no processo de transformação morfológica para avaliar a geometria e topologia de objetos contidos em imagens digitais. Esta transformação consiste essencialmente da comparação da imagem em estudo (conjunto desconhecido) com um ES (conjunto conhecido), o qual interage com cada pixel da imagem, preservando as características geométricas similares entre si, e suprimindo as demais. Em resumo, representa um processamento não linear para quantificar a maneira na qual um ES está (ou não) contido em uma imagem [Gonzalez and Woods 2010]. Um esboço dessa interação é demonstrado na Fig.3.9

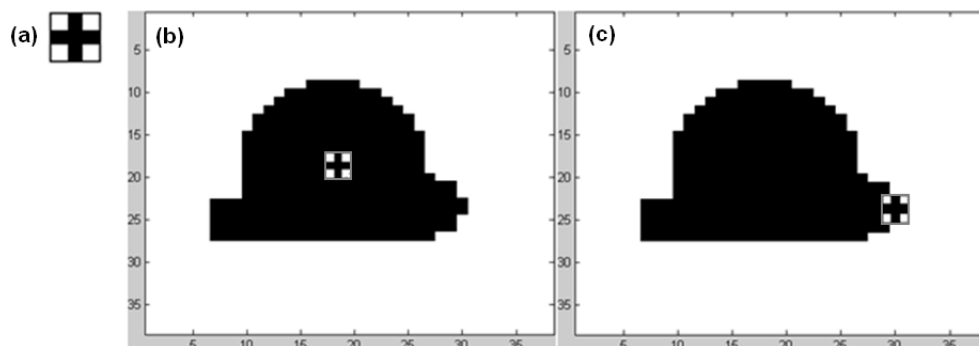


Figura 3.9: (a) Elemento estruturante no formato (cruz) e tamanho (3×3) . O formato e o tamanho do elemento estruturante permitem quantificar a maneira pela qual o ES está (ou não) contido na imagem. O ES interage com a imagem em duas posições. Na posição (b) ele está totalmente contido no objeto. Na posição (c) parte dos pixels que formam o ES fica fora do objeto analisado.

A natureza da informação extraída do processo de transformação morfológica depende necessariamente do tipo de elemento estruturante. A escolha de um ES adequado ao processo não é trivial, já que sua definição varia de acordo com as características geométricas dos objetos estudados na imagem. Nesse caso, sua forma e tamanho geralmente são adaptados às propriedades geométricas dos objetos digitais presentes na imagem analisada [Facon 1996].

Segundo [Serra 1988, Facon 1996], os ESs normalmente são definidos em função das propriedades de convexidade, não convexidade, isotropia e anisotropia. Ao trabalhar

com imagens é necessário definir sua origem, a fim de determinar seu posicionamento na imagem analisada. Além disso, é essencial organizar seus membros em um arranjo matricial retangular (Fig.3.10(b)).

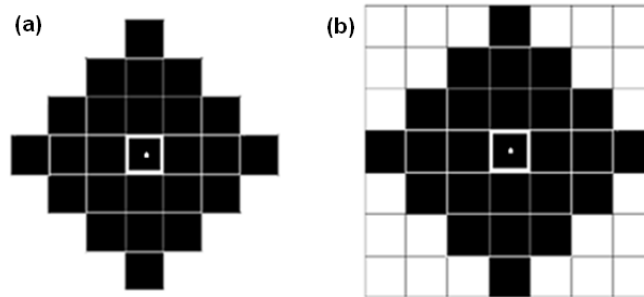


Figura 3.10: (a) Elemento estruturante do tipo “diamante” com tamanho (7×7) . (b) Elemento estruturante convertido em um arranjo matricial retangular. Neste caso, o menor número possível de elementos pertencentes ao fundo é exibido sem sombreamento. Os pontos indicam os centros dos ESs.

Os elementos estruturantes mais utilizados no processamento morfológico são os planares, ou seja, aqueles que possuem apenas duas dimensões. Esses elementos são utilizados em operações com imagens binárias. Por outro lado, os não planares possuem mais de duas dimensões, e são aplicáveis em operações com imagens em tons de cinza. Dentre os tipos de ESs planares básicos é possível citar cruz, disco, linha (horizontal, vertical e diagonal), diamante, caixa e bola, com variados tamanhos, tais como, 3×3 , 5×5 , 7×7 , 9×9 e 11×11 [Gonzalez and Woods 2010, Facon 1996].

Em suma, o elemento estruturante permite avaliar um ou mais objetos presentes em uma imagem, verificando sua coincidência com alguma região da imagem, na medida em que se desloca pela mesma. A realização de transformação (ou não) é determinada pelo tipo de operador morfológico aplicado. As seções a seguir descrevem sucintamente as principais operações da morfologia matemática, em nível binário e para imagens em tons de cinza.

3.4.2 Operadores morfológicos

Um operador morfológico determina o mapeamento entre um conjunto desconhecido (imagem) e outro conjunto conhecido (elemento estruturante), ou seja, é responsável por determinar a maneira como o ES interage com a imagem. Baseando-se na teoria de conjuntos, os operadores morfológicos podem simplificar os dados de uma imagem, preservando suas formas características e eliminando irrelevâncias, ou podem acrescentar dados a regiões específicas.

A MM possui, em seu fundamento, dois operadores primitivos, que são (a) Erosão, em que pixels que não atendem a um dado padrão são suprimidos da imagem, e (b) Dilatação, em que uma determinada área relacionada a um pixel é alterada para um dado

padrão. A partir desses, derivam-se todos os outros operadores morfológicos utilizados em transformações mais complexas [Gonzalez and Woods 2010]. Todavia, é importante mencionar que a definição de tais operadores varia de acordo com o tipo de imagem processada, por exemplo, binária, em níveis de cinza ou colorida.

Visando descrever as operações fundamentais da morfologia binária e em tons de cinza, e sabendo que essas se baseiam na teoria de conjuntos, primeiramente é importante descrever algumas definições básicas da teoria dos conjuntos matemáticos.

Define-se Conjunto como uma coleção de objetos de natureza qualquer, os quais se dizem elementos do conjunto. Representa-se simbolicamente por $x \in X$, a proposição x é um elemento do conjunto X . Em morfologia, os conjuntos representam os objetos encontrados em uma imagem. Por exemplo, em imagens binárias o conjunto de todos os pixels pretos (ou branco, dependendo da convenção) constitui uma completa descrição da imagem [Gonzalez and Woods 2010]. Em geral, a noção de morfologia matemática depende amplamente do conhecimento das operações básicas com conjuntos (por exemplo, união, interseção, complemento, disjunção e diferença).

Sejam A e B dois conjuntos, cujos componentes são pares ordenados de números reais dados por $a = (a_1, a_2)$ e $b = (b_1, b_2)$, respectivamente, tem-se:

A união de dois conjuntos A e B é o conjunto de elementos que pertence ao conjunto A , ou ao B , ou a ambos, denotado por $C = A \cup B$.

$$C = \{x | (x \in A) \text{ ou } (x \in B)\} \quad (3.29)$$

A diferença de dois conjuntos A e B é o conjunto de elementos que pertence ao conjunto A , mas não pertence ao conjunto B , denotado por $D = A - B$.

$$D = \{x | (x \in A) \text{ e } (x \notin B)\} \quad (3.30)$$

A interseção de dois conjuntos A e B é o conjunto de elementos pertencente a ambos os conjuntos, denotado por $I = A \cap B$.

$$I = \{x | (x \in A) \text{ e } (x \in B)\} \quad (3.31)$$

O complemento do conjunto A é o conjunto dos elementos não contidos em A , denotado por A^c .

$$A^c = \{w | w \notin A\} \quad (3.32)$$

Dois conjuntos A e B são disjuntos ou mutuamente exclusivos se não tiverem elementos em comum, ou seja, $A \cap B = \emptyset$.

Além das operações de conjunto descritas, os conceitos de reflexão e translação são amplamente utilizados em MM [Gonzalez and Woods 2010].

A translação de um conjunto A no ponto $z = (z_1, z_2)$ é definida pela translação de todos os elementos de A , denotada por $(A)_z$.

$$(A)_z = \{c | c = a + z, a \in A\} \quad (3.33)$$

No caso em que A representa os pixels de um objeto em uma imagem, $(A)_z$ representa o conjunto de pontos em A translado por z , ou seja, cujas coordenadas (x, y) foram substituídas por $(x + z_1, y + z_2)$.

A reflexão de um conjunto B , indicada por $\tilde{B}$ é definida como

$$\tilde{B} = \{x | x = -b, \text{ para } b \in B\} \quad (3.34)$$

No caso em que B representa os pixels de um objeto em uma imagem, $\tilde{B}$ define sua reflexão em relação à origem. A reflexão e translação de conjuntos são empregadas em operações morfológicas para definir transformações de valores em imagens, baseadas em ESs.

Uma breve revisão a respeito dos operadores morfológicos binários e em tons de cinza é introduzida nas seções 3.4.2 e 3.4.2, já detalhes da morfologia em cores fogem do escopo da presente dissertação.

Operadores morfológicos binários

Na morfologia binária uma imagem é determinada por um conjunto de pixels definido no espaço Z^n , e pode ser definida como uma função $f : Z^n \rightarrow \{0, 1\}$, em que $n = 2$. Nesse caso, cada elemento do conjunto imagem é um vetor bidimensional com coordenadas (x, y) , por exemplo, $X = \{(2, 2), (2, 3), (2, 4)\}$. Cada ponto da imagem contém apenas dois valores, sendo normalmente 0 e 1, que definem respectivamente o *background* (fundo) e o *foreground* (objeto) da imagem binária [Pedrini and Schwartz 2008].

Um operador morfológico binário corresponde a um mapeamento entre um conjunto de pixels X que representa uma imagem e um conjunto de pixels B_x que representa um ES centrado em cada pixel $x \in X$, ambos definidos no espaço Z^2 . A ideia básica é examinar a vizinhança de cada elemento $x \in X$, a partir do conjunto B_x , verificando uma possível semelhança geométrica local entre os pixels relevantes do ES e a vizinhança de cada elemento x da imagem. As transformações morfológicas (operações de conjunto) ocorrem em situações verdadeiras, ou seja, quando existe $B_x \cap x$. Nesses casos, o operador morfológico binário define o pixel da imagem como relevante, caso contrário, marca-o como irrelevante.

A seção seguinte descreve alguns operadores morfológicos binários, dentre eles as principais operações morfológicas, dilatação e erosão. Por convenção, define-se o conjunto X como sendo o total de elementos x que representa a imagem analisada, e o conjunto B_x como sendo o ES centrado em cada pixel $x \in X$.

Erosão A erosão de um conjunto X por um elemento estruturante B é definida como uma operação morfológica resultante da translação do conjunto B_x ao longo da imagem, ou seja, o elemento estruturante B , centrado em cada pixel $x \in X$, desliza sobre toda a imagem X , ativando os pixels nos quais B_x se ajusta inteiramente à imagem original, e inativando (eliminando) os demais.

Com X e B como conjuntos de Z^2 , a erosão binária indicada por $X \ominus B$, é definida como:

$$X \ominus B = \{z | (B_z) \subseteq X\} \quad (3.35)$$

Em outras palavras, a Eq.3.35 define que $X \ominus B$ representa o conjunto de pixels ativos, ou seja, todos os pontos em que B translado por z , estão contidos em X . Os demais pixels da imagem são marcados como pixels inativos, sendo equivalente ao conjunto de pixels que translado por B_x não se encaixa inteiramente ao conjunto X [Gonzalez and Woods 2010].

O resultado final da imagem binária erodida apresenta uma diminuição ou afinamento dos objetos existentes, bem como uma redução dos padrões claros e alargamento dos padrões escuros, sendo normalmente aplicada quando se deseja diminuir as dimensões dos objetos, corroer bordas, separar objetos relativamente próximos, aumentar “buracos” existentes na imagem, ou eliminar o conjunto de pixels inferiores ao ES [Gonzalez and Woods 2010, Pedrini and Schwartz 2008]. A Fig.3.11 ilustra a erosão de uma imagem binária por um elemento estruturante em formato cruz, tamanho 3x3, com origem no centro físico do elemento.

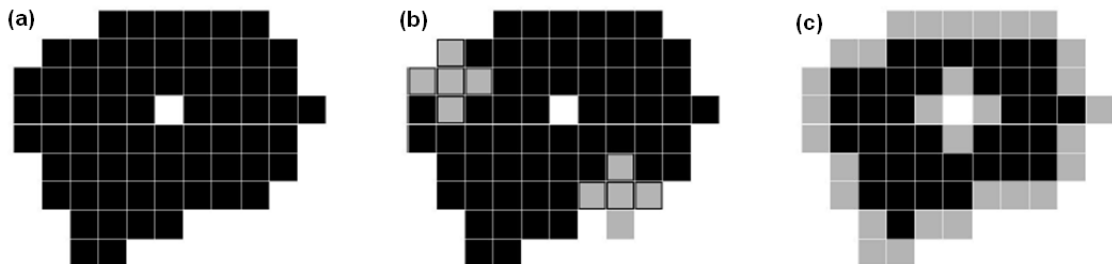


Figura 3.11: Exemplo de erosão binária. (a) Imagem original. (b) Passos intermediários da erosão obtida por meio do ES exibido na Fig.3.9. (c) Imagem erodida, os pixels em cinza foram eliminados. Imagem obtida de [Dorini 2009].

Dilatação Assim como na erosão binária, a dilatação binária de um conjunto X por um elemento estruturante B é definida como uma operação morfológica resultante da translação do conjunto B_x ao longo da imagem. No entanto, diferente da erosão, a operação de dilatação ativa os pixels nos quais B_x se ajusta parcialmente à imagem original, e inativa o conjunto de pixels que translado por B_x possuem intersecção nula (ou vazia) ao conjunto X [Gonzalez and Woods 2010, Pedrini and Schwartz 2008].

Com X e B como conjuntos de Z^2 , a dilatação binária indicada por $X \oplus B$, é definida como:

$$X \oplus B = \{z | (\tilde{B})_z \cap X \neq \emptyset\} \quad (3.36)$$

A Eq.3.36 define $X \oplus B$ como o conjunto de todos os deslocamentos z , de forma que $\tilde{B}$ (Eq.3.34) e X se interseccionem (sobreponham) pelo menos por um elemento. Ao contrário da erosão binária, que gera a diminuição ou afinamento, a dilatação “aumenta” os pixels de uma imagem, com diminuição dos padrões escuros e alargamento das regiões claras, sendo normalmente aplicada quando se deseja aumentar os objetos existentes na imagem, preencher buracos e/ou conectar objetos próximos [Gonzalez and Woods 2010, Pedrini and Schwartz 2008]. A Fig.3.12 ilustra a dilatação de uma imagem binária por um elemento estruturante em formato cruz, tamanho 3x3, com origem no centro físico do elemento.

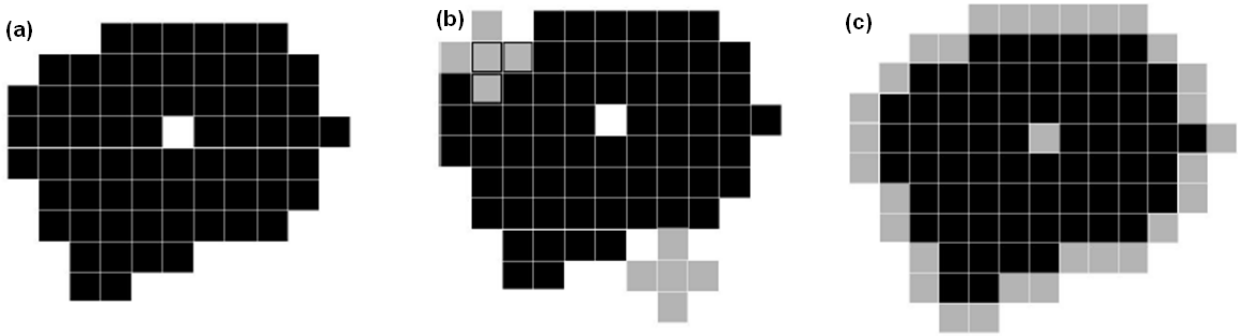


Figura 3.12: Exemplo de dilatação binária. (a) Imagem original. (b) Passos intermediários da dilatação obtida por meio do ES exibido na Fig.3.9. (c) Imagem dilatada, os pixels em cinza foram adicionados. Imagem obtida de [Dorini 2009].

Abertura Conforme descrito anteriormente, as operações de dilatação e erosão binária são utilizadas para realizar alterações nos componentes contidos em imagens digitais, tais como, diminuição de padrões escuros, alargamento de regiões claras e conexão de regiões distintas. No entanto, os conjuntos resultantes dessas operações não mantêm o tamanho dos conjuntos originais, sendo sempre maiores ou menores. Dessa forma, quando se deseja realizar operações na imagem sem modificar muito o tamanho ou a forma de seus objetos deve-se aplicar transformações morfológicas mais robustas, como, por exemplo, fechamento e abertura binária.

A abertura binária consiste em aplicar à imagem uma operação de erosão imediatamente seguida por uma dilatação, utilizando o mesmo ES. Matematicamente, a abertura do conjunto X pelo elemento estruturante B , indicada por $A \circ B$, é definida segundo a Eq.3.37.

$$A \circ B = (A \ominus B) \oplus B \quad (3.37)$$

Em geral, a operação de abertura suaviza o contorno de uma imagem, quebra conexões estreitas e elimina saliências finas, em alguns casos é também utilizada para remover ruídos da imagem. Vale a pena observar que o efeito da suavização de contorno depende da forma do elemento estruturante [Gonzalez and Woods 2010].

Fechamento O fechamento binário consiste em aplicar à imagem uma operação de dilatação imediatamente seguida por uma erosão, utilizando o mesmo ES. A sua definição matemática indicada por $A \bullet B$, é definida segundo a Eq.3.38.

$$A \bullet B = (A \oplus B) \ominus B \quad (3.38)$$

A operação fechamento afeta a imagem de modo a preencher buracos menores que o ES e lacunas no contorno de um objeto [Soille 1999]. Essa operação é útil na remoção do ruído serrilhado, normalmente formados por pixels isolados. Esse tipo de ruído geralmente aparece após a etapa de binarização e fornece um aspecto irregular à forma e ao contorno dos objetos. Em geral, a operação de fechamento suaviza o contorno de objetos, conecta partículas próximas e alarga golfos estreitos, eliminando orifícios menores que elemento estruturante [Gonzalez and Woods 2010].

Operadores morfológicos em tons de cinza

Na morfologia em tons de cinza uma imagem é determinada por um conjunto de pixels definido no espaço Z^n , com $n = 3$. Nesse caso, cada elemento do conjunto imagem é um vetor tridimensional, em que as duas primeiras componentes representam a posição de um pixel na imagem (coordenadas x e y) e a terceira componente representa uma faixa de intensidade que um pixel pode assumir [Soille 1999, Facon 1996].

Os valores das imagens em tons de cinza não são restritos a $\{0, 1\}$, podendo ser estendidos a um conjunto finito de valores não negativos inteiros. Formalmente uma imagem f em tons de cinza é definida como uma função $f : Z^n \rightarrow \{0, 1, \dots, T_{max}\}$, onde T_{max} , o valor máximo, depende do número de bits utilizado na imagem processada. Em vez de apenas valores iguais a 0 ou a 1, os pixels podem assumir valores em um intervalo $[T_{min}, T_{max}]$. Não apenas a imagem de entrada, mas o elemento estruturante também pode assumir intensidades de níveis de cinza [Pedrini and Schwartz 2008]. No entanto, ES em níveis de cinza são pouco utilizados na prática. Por fim, é bom salientar que, assim como no caso binário, a origem dos elementos estruturantes deve ser claramente identificada.

Matematicamente, uma operação morfológica em tons de cinza corresponde a um mapeamento entre um conjunto de pixels que representa uma imagem (X) e um conjunto de pixels que representa um ES (B_x) centrado em cada pixel $x \in X$, ambos definidos no espaço Z^3 .

Os elementos estruturantes na morfologia em níveis de cinza executam as mesmas funções básicas que no processamento morfológico binário, eles são utilizados como “sondas” para analisar as propriedades geométricas de uma determinada imagem. A ideia básica é examinar a vizinhança de cada elemento $x \in X$, a partir do conjunto B_x , verificando uma possível semelhança geométrica entre os pixels relevantes do ES e a vizinhança de cada elemento x analisado. As transformações morfológicas ocorrem em situações verdadeiras, ou seja, quando existe $B_x \cap x$.

A diferença fundamental com relação à transformação morfológica binária encontra-se nas operações de conjunto, já que os operadores morfológicos em escala de cinza não determinam a retirada ou inclusão de um pixel (substituição de seu valor por 0 ou 1), mas determinam uma modificação parcial de seu valor. Essa transformação se baseia nos valores de pixels mais claros (T_{max}) e mais escuros (T_{min}) considerados na vizinhança de cada pixel x analisado [Soille 1999, Facon 1996].

Sendo assim, na morfologia em níveis de cinza, não apenas a forma, mas também a tonalidade do pixel $x \in X$ é modificada pelo elemento estruturante, sendo normalmente aplicada em situações onde a perda de informações representa um fator crítico [Facon 1996].

Nas seções seguintes, apresentam-se as operações básicas da morfologia em níveis de cinza. Ao longo dessas, serão tratadas funções digitais da forma $f(x, y)$ e $B(x, y)$, em que $f(x, y)$ representa uma imagem em níveis de cinza e $B(x, y)$ define um elemento estruturante. Tais funções são consideradas discretas, isto é, as coordenadas (x, y) são inteiros do produto cartesiano Z^2 , e f e B representam funções que atribuem um valor de intensidade para cada par distinto de coordenadas (x, y) .

Erosão Para determinar as operações de erosão e dilatação, é preciso primeiramente definir duas outras funções, o máximo e o mínimo. Essas funções são equivalentes às operações de união e intersecção da morfologia binária.

O mínimo de duas funções $f(x, y)$ e $g(x, y)$, denotado por $f \wedge g$, é definido por:

$$(f \wedge g)(x) = \min\{f(x), g(x)\} \quad (3.39)$$

De forma similar, o máximo de duas funções $f(x, y)$ e $g(x, y)$, denotado por $f \vee g$, é definido por:

$$(f \vee g)(x) = \max\{f(x), g(x)\} \quad (3.40)$$

Enfim, a erosão de f por um elemento estruturante B em qualquer posição (x, y) é definida como

$$[f \ominus B_N](x, y) = \min_{(s,t) \in B_N} \{f(x-s, y-t) - B_N(s, t)\} \quad (3.41)$$

Segundo a Eq.3.41 os valores de x e y são incrementados utilizando todos os valores necessários para que a origem de B percorra por cada pixel em f . Ou seja, para calcular a erosão de f por B coloca-se a origem do ES em todas as posições dos pixels pertencentes à imagem ($\forall x \in f$). Sobre cada posição aplica-se a translação do elemento estruturante, sendo que em cada posição translada os valores do ES são subtraídos dos valores dos pixels da imagem, tomando-se o valor mínimo entre os valores da imagem f na região coincidente com B , quando a origem de B está em (x, y) [Gonzalez and Woods 2010, Pedrini and Schwartz 2008].

O resultado visual da imagem erodida em níveis de cinza apresenta-se como redução dos padrões claros, alargamento das regiões escuras, conexão dos vales próximos e separação dos picos próximos.

Dilatação A dilatação de f por um elemento estruturante B em qualquer posição (x, y) é definida como o valor máximo da imagem na região analisada por $\tilde{B}$ quando a origem de $\tilde{B}$ está em (x, y) . Ou seja,

$$[f \oplus B_N](x, y) = \max_{(s,t) \in B_N} \{f(x - s, y - t) + B_N(s, t)\} \quad (3.42)$$

Nesse caso, a dilatação consiste na translação do ES sobre todas as posições da imagem, sendo que a cada posição translada somam-se os valores do elemento estruturante aos valores dos pixels da imagem, tomando-se o valor máximo [Gonzalez and Woods 2010, Pedrini and Schwartz 2008].

O resultado visual da imagem dilatada em níveis de cinza apresenta alargamento e aumento dos padrões claros, redução e/ou eliminação das regiões escuras, conexão dos picos próximos e separação dos vales próximos.

Assim como nas operações binárias, a erosão e dilatação em níveis de cinza fornecem condições básicas o desenvolvimento de outros filtros morfológicos, tais como a abertura, fechamento, *top-hat*, *bot-hat*, entre outros.

Abertura Similarmente à morfologia binária, a abertura em níveis de cinza de um sinal f por um elemento estruturante B está relacionado com os operadores de dilatação e erosão em níveis de cinza. A abertura de f por B , indicada por $f \circ B$, é

$$f \circ B = (f \ominus B) \oplus B \quad (3.43)$$

Como definido na Eq.3.43, a expressão $(f \ominus B)$ define simplesmente a erosão de f por B , seguido pela operação de dilatação com elemento estruturante transposto B .

Seguindo a analogia da imagem vista como um relevo topográfico, onde os padrões claros são picos e os escuros são vales, é possível determinar os efeitos da operação de abertura. Esses geralmente consistem na separação de padrões claros próximos, eliminação

dos picos de tamanho inferior ao ES, conservação de padrões escuros afastados, fundição de vales próximos e eliminação de detalhes da imagem. Geralmente o conjunto aberto é mais regular que a imagem original [Gonzalez and Woods 2010, Pedrini and Schwartz 2008, Soille 1999].

Fechamento Assim como na operação de abertura, o fechamento em níveis de cinza de uma imagem f por um elemento estruturante B está relacionado com os operadores de dilatação e erosão. Inicialmente é realizada a dilatação e posteriormente a erosão. O fechamento de f por B , indicada por $f \bullet B$, é

$$f \bullet B = (f \oplus B) \ominus B \quad (3.44)$$

A Eq.3.44 define a dilatação de f por B , seguido pela operação de erosão com elemento estruturante transposto $\tilde{B}$. Seguindo a analogia da imagem vista como um relevo topográfico, o comportamento do fechamento em níveis de cinza denota a separação de vales próximos, eliminação de vales inferiores em tamanho ao elemento estruturante, conservação de padrões escuros afastados, fundição de picos próximos. Assim como na operação de abertura, o conjunto fechado geralmente é mais regular que a imagem original [Gonzalez and Woods 2010, Pedrini and Schwartz 2008, Soille 1999].

3.4.3 Transformadas *Top-hat* e *Bottom-hat*

Combinações realizadas entre uma imagem original e suas correspondentes aberta ou fechada são normalmente utilizadas para excluir padrões indesejáveis na imagem que possuam características comuns. As transformadas *top-hat* e *bottom-hat* são caracterizadas por essas combinações.

A operação *top-hat* é o resultado da diferença aritmética entre uma imagem original e sua correspondente “aberta”. O resultado dessa operação apresenta as regiões de picos da imagem original com tamanho inferior ao elemento estruturante utilizado. Uma aplicação importante consiste na correção dos efeitos da iluminação não uniforme [Gonzalez and Woods 2010, Soille 1999]. A definição matemática da transformada *top-hat* de um sinal f por um elemento estruturante g é definido conforme a Eq.3.45.

$$That(f) = f - (f \circ b) \quad (3.45)$$

De forma análoga, a transformada *bottom-hat* é a subtração realizada entre o resultado da operação morfológica “fechamento” e a respectiva imagem original f . Essa operação tem a característica de realçar os vales e preservar o fundo da imagem, sendo determinada pela Eq.3.46.

$$Bhat(f) = (f \bullet b) - f \quad (3.46)$$

Ambas as transformadas são utilizadas para remoção de objetos da imagem, utilizando na operação de abertura ou fechamento um elemento estruturante que não se encaixa nos objetos a serem removidos. Nesse caso, a operação de diferença produz uma imagem, na qual, apenas os componentes removidos permanecem. Tais operações podem ser realizadas em imagens binárias ou em tons de cinza, bastando para isto, utilizar a operação de fechamento/abertura adequada a cada caso.

As operações *top-hat* e *bottom-hat* podem ainda ser combinadas para realçar o contraste de uma imagem, por meio da adição do resultado da transformada *top-hat* à imagem original, seguido da subtração do resultado da transformada *bottom-hat* [WU et al. 2008]. Essa operação é expressa pela Eq.3.47.

$$g = f + That(f) - Bhat(f) \quad (3.47)$$

tal que, o parâmetro f representa a imagem original, $That$ e $Bhat$ o resultado das operações *Top-hat* e *Bottom-hat*, e g define a imagem resultante da filtragem morfológica.

3.5 Curvatura

Conceitualmente, a curvatura representa a medida do quanto uma curva deixa de ser uma reta [Santos and Alencar 2003], isto é, quão curvo é o contorno de uma forma, ou quanto varia essa medida ao longo do objeto analisado [Costa and Cesar 2009]. Matematicamente, é possível encontrar três diferentes interpretações: (a) taxa de variação angular do campo tangente à forma, (b) inverso do raio do círculo osculante à curva, e (c) magnitude da aceleração centrípeta de uma partícula, tal que percorre a forma com velocidade constante [Estrozi et al. 2003].

Em processamento geométrico e visão computacional a estimativa de curvatura representa uma das principais grandezas relacionadas a uma curva, sendo útil para identificação de propriedades geométricas importantes, tais como cantos, pontos dominantes, regiões côncavas e convexas, segmento de reta, e segmento de círculo [Levine 1985]. Trabalhando com este atributo, [Attneave 1954] mostrou pela primeira vez (em 1954) a importância da curvatura para obtenção dessas primitivas. Por meio de experimentos psicofísicos ele mostrou que entre os pontos de uma curva os mais relevantes são definidos pelos extremos da curvatura. O primeiro experimento foi conduzido de modo que, apresentou-se a um grupo de pessoas uma série de objetos planos, os quais deveriam ser posteriormente reconstruídos por um determinado número de pontos. Os resultados mostraram que os pontos de alta curvatura são ideais para representar a informação visual das cenas, sendo escolhidos pela grande maioria das pessoas. Um dos mais famosos exemplos é o clássico desenho “gato de Attneave” (Fig.3.13), o qual demonstra 38 pontos de alta curvatura conectados por linhas retas, capazes de guardar a informação necessária para o correto

reconhecimento do felino [Attneave 1954].



Figura 3.13: O famoso “Attneave’s cat”, reconstruído a partir dos extremos de alta curvatura [Attneave 1954].

A medida de curvatura possui forte motivação biológica, sendo considerada um aspecto importante analisado pelo sistema de visão humano [Attneave 1954, Costa and Cesar 2009]. Na literatura computacional, existem inúmeros trabalhos que abordam seu uso [Worring and Smeulders 1993, Coeurjolly and Svensson 2003, Cazals and Pouget 2003], em diferentes aplicações, tais como representação de formas [Mokhtarian and Mackworth 1992, Park and Han 1998], reconhecimento de objetos [Greene and Ogden 2012], evolução de curvas [Teixeira 2002], extração de características [Lim et al. 1995], classificação de objetos, entre outros.

Existem diferentes métodos para determinar a curvatura de objetos digitais [Beus and Tiu 1987, Liu and Srinath 1990, Rosenfeld and Weszka 1975, Koplowitz and Plante 1995], no entanto, a metodologia tradicional é realizada no caso em que o contorno do objeto é representado por um sinal paramétrico. O conceito de contorno paramétrico é análogo ao da representação paramétrica de curvas. Seja I um intervalo contido em R . Um contorno paramétrico em R^2 é uma função $C : I \rightarrow R^2$ definida por $C(t) = (x(t); y(t))$, onde x e y representam posições na curva a cada intervalo t . Ao considerar um intervalo para $t = \{1, 2, 3, \dots, n\}$, tem-se um vetor $C(t)$ de pares ordenados (x, y) .

$$C(t) = \{(x(t_1), y(t_1)), (x(t_2), y(t_2)), (x(t_3), y(t_3)), \dots, (x(t_n), y(t_n))\} \quad (3.48)$$

tal que,

$$x(t) = \{x_1, x_2, x_3, \dots, x_n\} \quad (3.49)$$

$$y(t) = \{y_1, y_2, y_3, \dots, y_n\} \quad (3.50)$$

A partir de $C(t)$ pode-se estimar a curvatura conforme definido na Eq.3.51,

$$k(t) = \frac{x'(t)y''(t) - y'(t)x''(t)}{(x'(t)^2 + y'(t)^2)^{\frac{2}{3}}}. \quad (3.51)$$

Para essa estimativa é necessário o cálculo da primeira e da segunda derivada dos sinais paramétricos $x(t)$ e $y(t)$, as quais podem ser obtidas por meio da propriedade da derivada de *Fourier* [Papoulis 1962]. Seja $X(s)$ e $Y(s)$ a transformada de *Fourier* (FT) dos sinais $x(t)$ e $y(t)$, tem-se a FT das derivadas de primeira e segunda ordem, ambas com relação à s , definida pelas Eqs.(3.52a- 3.52d), onde i representa o número complexo.

$$X'(s) = i2\pi sX(s) \quad (3.52a)$$

$$X''(s) = -(2\pi s)^2 X(s) \quad (3.52b)$$

$$Y'(s) = i2\pi sY(s) \quad (3.52c)$$

$$Y''(s) = -(2\pi s)^2 Y(s) \quad (3.52d)$$

A aplicação da propriedade seguida pela transformada inversa de *Fourier* (Eqs.3.53a-3.53d) permite estimar o valor de curvatura aplicando a Eq.3.51.

$$x'(t) = \mathfrak{F}^{-1}(X'(s)) \quad (3.53a)$$

$$x''(t) = \mathfrak{F}^{-1}(X''(s)) \quad (3.53b)$$

$$y'(t) = \mathfrak{F}^{-1}(Y'(s)) \quad (3.53c)$$

$$y''(t) = \mathfrak{F}^{-1}(Y''(s)) \quad (3.53d)$$

Dada a natureza diferencial da estimação de curvatura clássica, os sinais obtidos são geralmente ruidosos. Uma solução amplamente utilizada para resolver esse problema baseia-se na suavização dos dados durante o processo de diferenciação [Costa and Cesar 2009, Pei and Lin 1992, Pikaz and Dinstein 1994]. É possível suavizar o sinal por meio da convolução da derivada do contorno paramétrico com uma função Gaussiana bidimensional discreta com média zero e desvio padrão σ , definida no espaço das frequências s .

Seja $G(s)$ uma função gaussiana e σ o valor da variância que define a largura de banda do filtro (i.e., a porção do espectro envolvida no cálculo), tem-se

$$G(s) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(\frac{-s^2}{2\sigma^2}\right) \quad (3.54)$$

Sendo assim, os sinais suavizados podem ser obtidos por meio da inclusão do termo

$G(s, \sigma)$ às Eqs.3.52a-3.52d, conforme expresso pelas Eqs.3.55a-3.55d.

$$X'(s) = i2\pi sX(s)G(s, \sigma) \quad (3.55a)$$

$$X''(s) = -(2\pi s)^2 X(s)G(s, \sigma) \quad (3.55b)$$

$$Y'(s) = i2\pi sY(s)G(s, \sigma) \quad (3.55c)$$

$$Y''(s) = -(2\pi s)^2 Y(s)G(s, \sigma) \quad (3.55d)$$

Observe que a escolha do valor do parâmetro σ interfere na resolução da representação da curvatura de um contorno. A Fig.3.14(b,c,d) apresenta os gráficos da curvatura, para diferentes valores de σ , referente à forma binária exibida na Fig.3.14(a). Conforme pode ser visto, um aumento excessivo do parâmetro de suavização ocasiona a perda de informações sobre o contorno. Por outro lado, um valor mínimo permite capturar detalhes finos, como convexidades e concavidades redundantes do contorno.

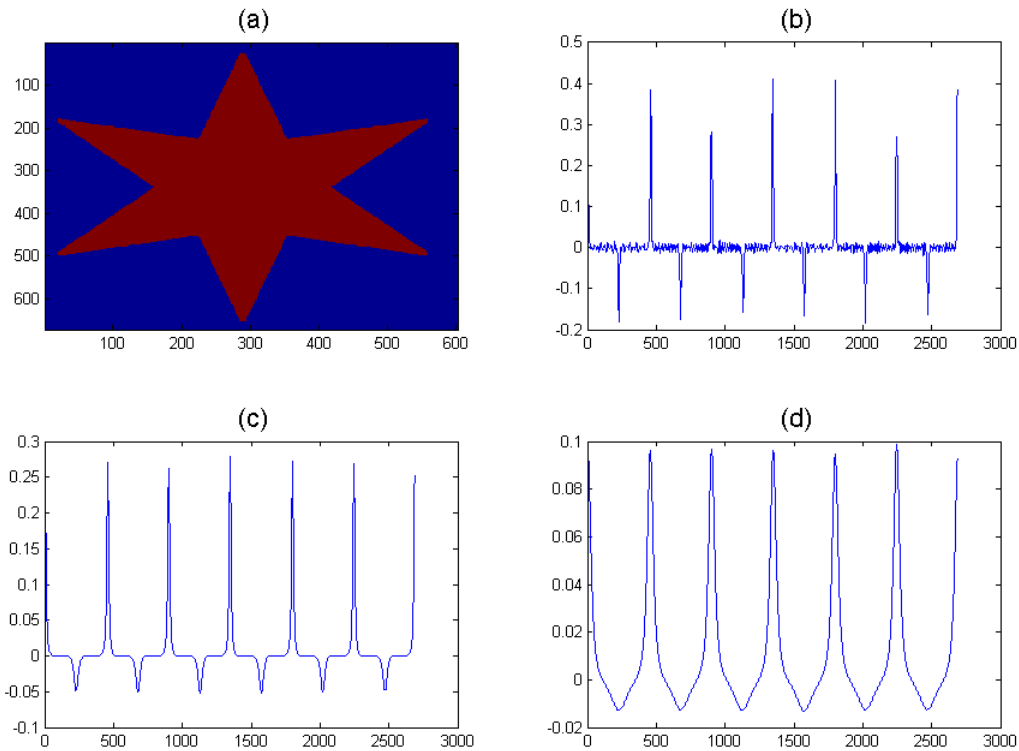


Figura 3.14: (a) Contorno de um objeto sintético. (b-d) Representação gráfica do contorno para diferentes valores de σ no cálculo da curvatura, sendo (b) $\sigma = 5$, (c) $\sigma = 20$ e (d) $\sigma = 80$. A figura (a) tem 2687 pontos de contorno.

Especificamente no caso desse trabalho, um valor ideal para o fator de suavização σ é

aquele capaz de capturar somente os pontos de mínimos e máximos relativos da curvatura obtida do contorno da forma, excluindo os ruídos. Entretanto, encontrar o valor de σ “ideal” não é uma tarefa trivial. Visando solucionar esse problema, foram propostos ao longo dos anos diferentes trabalhos [Rosenfeld and Johnston 1973, Sohn et al. 1994, Ray and Pandyan 2003]. No entanto, a diversidade de formas no contexto de heterogêneas bases de dados, dificulta a busca por um σ genérico, e em vários casos, torna esse problema insolucionável [Arica and Yarman-Vural 2003].

O valor do parâmetro σ adotado nesse trabalho foi escolhido com base em testes e experimentos realizados, e mostrou-se ideal para o total de imagens processadas, conforme pode ser observado na Seção 5.4.3.

3.6 Análise de Componentes Principais

A Análise de Componentes Principais (PCA) é uma técnica estatística multivariada utilizada para análise, interpretação e representação de dados. É considerado um método de transformação linear ótima, cujo principal objetivo é transformar um grande volume de informações em um conjunto reduzido de novas variáveis relevantes, destacando o subespaço que tem a maior variância [Costa and Cesar 2009]. Ela permite transformar um conjunto de variáveis originais, intercorrelacionadas, num novo conjunto de variáveis não correlacionadas, denominado componentes principais [Jolliffe 2002].

A PCA objetiva mapear um sistema composto por p variáveis em combinações lineares. Essas combinações lineares são chamadas de componentes principais e são não-correlacionadas entre si. Cada componente principal gerada é uma combinação linear de todas as variáveis originais. Ou seja, tomando-se p variáveis aleatórias $X = \{X_1, X_2, \dots, X_p\}$ é possível encontrar p componentes principais $CP_i = \{CP_1, CP_2, \dots, CP_p\}$ [Mingoti 2005]. As componentes obtidas são ortogonais e fornecidas na ordem de importância da variação dos dados, de tal modo que, a primeira componente principal seja responsável pela maior variação possível existente no conjunto de dados, a segunda componente pela segunda maior variação possível e assim por diante, até que toda a variação do conjunto seja computada.

Neste sentido, o método transforma um vetor $x \in \mathbb{R}^m$ em outro vetor $y \in \mathbb{R}^n$, projetando o vetor original nas n direções ortogonais preservando a máxima variância possível. A primeira maior variância é normalmente nomeada como eixo principal (e_1), a segunda maior variância como eixo secundário (e_2).

Para encontrar as componentes principais, é necessário calcular a matriz de variância-covariância (Σ), encontrar os autovalores e os autovetores e, por fim, escrever as combinações lineares. A matriz de covariância é simétrica e quadrada, sendo expressa pelas covariâncias entre as p variáveis, tomadas duas a duas. Conforme [Regazzi 2001], denota-

se a matriz de covariância da seguinte forma,

$$\Sigma = \begin{bmatrix} Var(X_1) & c_{12} & \dots & c_{1p} \\ c_{21} & Var(X_2) & \dots & c_{2p} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ c_{p1} & c_{p2} & \dots & Var(X_p) \end{bmatrix} \quad (3.56)$$

O termo situado na intercessão da i -ésima linha e da j -ésima coluna representa a covariância (Σ_{ij}) , e os termos da diagonal principal são as variâncias (Var_i^2) . Para um vetor $x = [x_1, \dots, x_n]^T$ com média $\bar{x}$, a matriz de covariância é dada por,

$$\Sigma_{ij} = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n (x_i - \bar{x}_i)(x_j - \bar{x}_j) \quad \text{para } j, i = 1 \dots p \quad (3.57)$$

Sendo a matriz da covariância real e simétrica torna-se sempre possível encontrar um conjunto de n autovalores e os correspondentes autovetores ortonormais.

3.7 Diagramas de Voronoi

O diagrama de Voronoi é uma estrutura fundamental da Geometria Computacional utilizada para partição do plano m -dimensional ($\mathbb{R}^m$) em regiões, determinada pelas distâncias entre um conjunto de pontos. Isto é, para um conjunto de pontos de interesse, o diagrama de Voronoi representa um conjunto de células (uma para cada ponto), de modo que cada célula contém uma parte do plano que é a mais próxima de seu ponto do que qualquer outro [Preparata and Shamos 1985, Aurenhammer and Klein 2000]. Formalmente, dado o conjunto $P = \{p_1, p_2, \dots, p_n\}$ com n pontos no plano ($\mathbb{R}^2$ ou em dimensões maiores), o diagrama de Voronoi $Vor(P)$ é o particionamento do plano, de modo que, cada ponto p_i de P seja associado a uma região $V(p_i)$, tal como definido pela Eq.3.58

$$V_{(p_i)} = \{x \in \mathbb{R}^m, i = 1, \dots, n \mid d(p_i, x) \leq d(p_j, x) \quad \forall p_j \in \mathbb{R}^m - p_i\}. \quad (3.58)$$

onde d denota a distância Euclidiana em $\mathbb{R}^m$. Dado dois pontos $P = (p_1, \dots, p_n)$ e $Q = (q_1, \dots, q_n)$ em um espaço m -dimensional, a distância Euclidiana pode ser definida pela Eq.3.59

$$d(p, q) = \sqrt{(p_x - q_x)^2 + (p_y - q_y)^2 + \dots + (p_n - q_n)^2} \quad (3.59)$$

Portanto, o diagrama de Voronoi V do conjunto P é a coleção de todos os elementos V_{p_i} [Okabe et al. 2000], tal como

$$V = \{V_{p_1}, V_{p_2}, V_{p_3}, \dots, V_{p_n}\} \quad (3.60)$$

Uma célula de Voronoi (ou polígono de Voronoi) é um polígono formado por quatro componentes principais, sendo (a) os pontos geradores, (b) as arestas de Voronoi, (c) os vértices de Voronoi, e (d) as regiões de Voronoi. A Fig.3.15 exemplifica graficamente tais entidades.

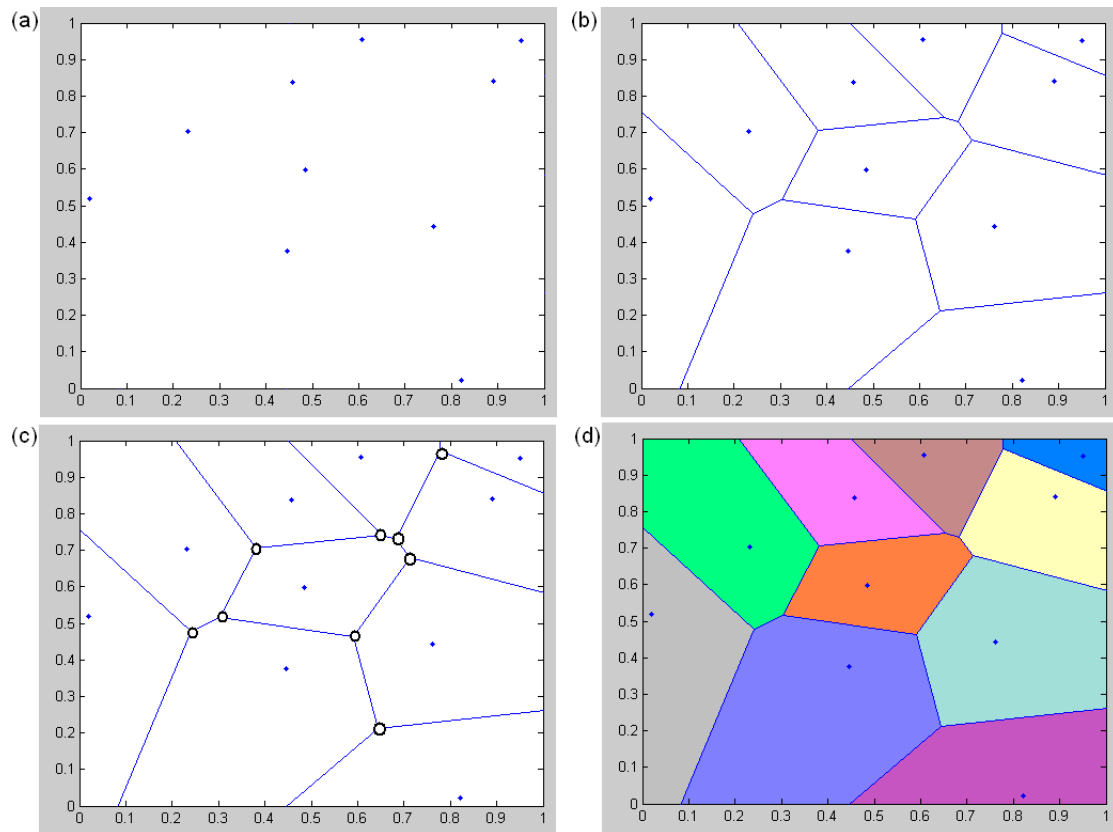


Figura 3.15: Entidades topológicas do Diagrama de Voronoi. (a) pontos geradores; (b) arestas de Voronoi; (c) vértices de Voronoi; (d) regiões de Voronoi.

As arestas do diagrama de Voronoi (b) são formadas pelas bissetrizes perpendiculares às linhas que ligam pontos vizinhos, os vértices (c) indicam interseções entre as duas ou mais arestas, de modo que, cada vértice é o circuncentro do triângulo formado por três pontos geradores. As células (d) indicam as regiões de Voronoi, as quais podem ser fechadas ou semiabertas.

As primeiras aplicações do diagrama de Voronoi ocorreram nas áreas de meteorologia, mineralogia, química e cristalografia. Este conceito tem sido assunto de investigações teóricas consideráveis e têm encontrado numerosos domínios de aplicação. Em ciências é possível encontrar aplicações na área de biologia [Gellatly and Finney 1982], química [Serrano et al. 2002], geologia [Stora et al. 1999, Christie et al. 2002], medicina, entre outras. Aplicações envolvendo a análise de dados espaciais geralmente abordam áreas como geografia, planejamento de rotas, áreas de vizinhança ou dominância e determinação de fronteiras entre áreas de interesse. Este conceito é normalmente resumido como “problema do vizinho mais próximo”. O uso dos diagramas de Voronoi tem sido extensivamente estudado para este contexto [Kolahdouzan and Shahabi 2004, Okabe et al. 2000]. Em visão

computacional a utilização dos diagramas de Voronoi é diversificada, suas principais contribuições remetem aplicações com foco, por exemplo, na segmentação de imagens [Dryden et al. 2006] e reconhecimento de padrões.

Uma variedade de algoritmos para criação dos diagramas de Voronoi é descrita na literatura. A metodologia clássica é denominada diagrama de Voronoi ordinário, em que a métrica de distância utilizada é a Euclidiana, com sub-regiões formadas por polígonos convexos. Generalizações do diagrama de Voronoi ordinário incluem, por exemplo, diagrama de Voronoi com pesos multiplicativos (Voronoi-PM), diagrama de Voronoi com pesos aditivos (Voronoi-PA), diagrama de Voronoi com pesos combinados (Voronoi-PC) e diagrama de Voronoi de potência (Voronoi-PT). Uma visão geral de tais métodos é apresentada em [Aurenhammer and Klein 2000, Okabe et al. 2000]. A implementação destas estruturas de dados foge ao escopo deste trabalho, no entanto sua compreensão é relevante.

3.8 Triangulação de Delaunay

A triangulação de Delaunay introduzida em 1934 pelo matemático russo Boris Nikolaevich Delone (ou Boris Delaunay) é um tipo de tecelagem obtida a partir da triangulação de um conjunto de pontos geradores, de forma que o círculo circundante que passa pelos três vértices do triângulo não contenha nenhum outro ponto do conjunto de dados [Berg et al. 2008]. Essa regra característica dos triângulos de Delaunay, ilustrada na Fig.3.16, é nomeada propriedade do círculo-circundante vazio. Em outras palavras, ela estabelece que o círculo circundante a cada triângulo não deve conter outros pontos além dos pontos do triângulo. Este critério permite maximizar o ângulo mínimo e minimizar o ângulo máximo de todos os triângulos na triangulação, construindo-os o mais próximo possível da forma equilátera [Okabe et al. 2000].

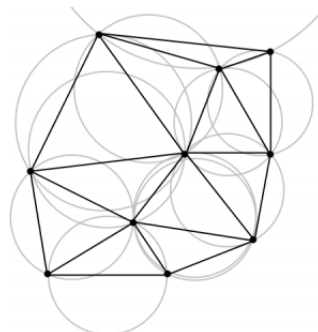


Figura 3.16: Triangulação de Delaunay com círculos-circundantes sobrepostos [Borouchaki et al. 1997].

A triangulação de Delaunay tem como dual o diagrama de Voronoi, isto é, o diagrama pode ser criado a partir da triangulação, e vice-versa. Como apresentado na Fig.3.17 os

pontos geradores de Voronoi correspondem aos vértices da triangulação de Delaunay, e as linhas sólidas determinam as arestas de Delaunay.

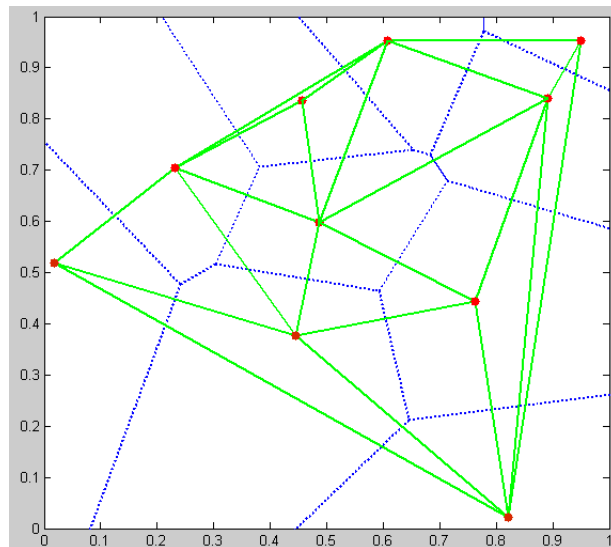


Figura 3.17: Diagrama de Voronoi (azul pontilhado) e Triangulação de Delaunay (verde sólido).

A triangulação de Delaunay pode ser construída por meio de variados métodos. No entanto, conforme descrito acima, a metodologia tradicional envolve a criação do diagrama de Voronoi inicialmente e, por meio da dualidade dos conceitos, interligam os pontos geradores vizinhos com segmentos de reta formando os triângulos [Preparata and Shamos 1985, Tang 1992]. Outros métodos geram a triangulação diretamente, utilizando a propriedade do circuncírculo, podendo basear-se na divisão do espaço [Maus 1984], na recursão [Lee and Schachter 1980], ou em construção incremental [Guibas and Stolfi 1985].

Capítulo 4

Trabalhos correlatos

Este capítulo descreve alguns trabalhos correlatos sobre a análise computacional de imagens referentes a embriões da *Drosophila melanogaster*. Considerando escopo e proposta desse trabalho, focou-se na descrição dos métodos de segmentação desenvolvidos e principais bases de imagens utilizadas.

4.1 Introdução

Uma importante aplicação do processamento digital de imagens é a segmentação de componentes em imagens biológicas. Uma fração desses trabalhos aborda a segmentação de núcleos celulares contidos em imagens fluorescentes ou confocais. A segmentação automática de tais componentes é um passo essencial para a realização de diversas análises biológicas [Elowitz et al. 2002, Megason and Fraser 2007]. Os resultados desta etapa visam obter a forma individual dos núcleos, importante característica fenotípica, indicativa do estado fisiológico de uma célula, e muitas vezes utilizada para análise de processos intracelulares ou de sociologia celular [Meijering 2012]. Por exemplo, a segmentação eficiente permite gerar características morfométricas sobre os núcleos celulares (tais como forma, tamanho, simetria, orientação, distribuição da intensidade dos níveis de cinza, entre outros). Tais informações são essenciais para realização de variadas investigações biológicas envolvendo contagem de células, identificação do tipo e fases celulares, estudos da migração e interação celular, sociologia celular e organização celular [Rittscher 2010].

A segmentação de núcleos celulares, apesar de fundamental, não é uma tarefa fácil em visão computacional, e não apresenta robustez no que concerne às mudanças de qualidade da imagem. Geralmente essa característica é devido à grande variabilidade e complexidade dos dados biológicos. Por exemplo, diferentes aplicações mostram uma variação na aparência dos núcleos, em termos de tamanho, formas e texturas. Além disso, a concentração de núcleos dentro das imagens não é consistente. As imagens analisadas podem conter de uma a poucas dezenas de núcleos. Alguns núcleos são isolados, outros se localizam próximos a núcleos vizinhos, podendo ser distinguíveis à olho humano, ou

não. Finalmente, outro importante tipo de variação refere-se às condições de iluminação das imagens, em que apresentam normalmente iluminação irregular, com alternância no número de picos e vales das intensidades, nas regiões dentro ou fora dos núcleos [Restif 2006]. Estes fatores (naturais de imagens fluorescentes confocal) dificultam inclusive a realização da segmentação manual.

Consequentemente, muitas ferramentas automáticas de segmentação têm sido propostas ao longo dos anos [Peng 2008, Swedlow and Eliceiri 2009, Rittscher 2010, Danuser 2011], as quais visam encontrar métodos generalizados, capazes de serem utilizados em grande escala e aplicados em diferentes tipos de estruturas celulares. Em casos simples, isto é, quando os núcleos são bem separados e com formas definidas, técnicas básicas como limiarização [Gonzalez and Woods 2010], crescimento de região [Gonzalez and Woods 2010], detecção de bordas [Azevedo et al. 2008], ou algoritmo divisor de águas (*Watershed*) [Vincent and Soille 1991] são suficientes.

No entanto, este cenário não é padrão, sendo comumente encontradas aplicações envolvendo imagens degradadas ou com a presença de estruturas complexas [Kothari et al. 2009, Bai et al. 2009]. Um exemplo disso são as imagens de padrões de expressão relativas à embriões da *Drosophila melanogaster*. As propriedades ópticas de tais imagens limita a aplicação das tradicionais técnicas existentes, uma vez que, por meio dessas obtêm-se imagens com núcleos agregados, ausentes ou super segmentados. Segundo [Wahlby C FAU Sintorn et al. 2004], tais características têm geralmente três causas, sendo baixa discriminação visual entre o *foreground* e *background*, variações de intensidade nas regiões dos núcleos celulares e transição difusa entre os componentes da imagem.

Sendo assim, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos computacionais específicos. Tais métodos envolvem normalmente a combinação ou melhoramento de técnicas convencionais de PDI, aliada à inserção de informação morfológica a respeito dos núcleos celulares [Lin et al. 2003, Wahlby C FAU Sintorn et al. 2004]. Segundo [Cheng and Rajapakse 2009], a maioria dos trabalhos propostos visando abordar o desafio de núcleos agregados incluem adaptações do algoritmo *Watershed*, o qual tem sido considerado uma poderosa técnica para segmentar e reconhecer núcleos celulares em imagens biológicas [Chen and Crowther 2012, Chan et al. 2012]. Além deste, destaca-se a utilização da morfologia matemática para separar regiões sobrepostas em imagens binarizadas [Metzler et al. 2000, Matula et al. 2008]. Para [Qi et al. 2012], as adaptações abordam, por exemplo, inserção de marcadores controlados, seguidos por uma sequência de operações morfológicas [Pinidiyaarachchi and Wählby 2005, Yang et al. 2006a, Malpica et al. 1997, Bala 2012, Ferreira Costa et al. 1997], estratégias baseadas em regras [Wahlby et al. 2002, Yu et al. 2009], e ainda fusão de regiões super segmentadas [Lin et al. 2005].

Embora isso, alguns desafios ainda persistem, por exemplo, a inclusão de marcadores (etapa fundamental para o bom desempenho do método) é normalmente condicionada a um conjunto de parâmetros que precisam ser configurados a fim de obter os chamados

“pixels sementes”. Em geral, estes parâmetros se baseiam na forma ou no tamanho dos componentes da imagem [Lin et al. 2005, Chen et al. 2006]. Além disso, outras adaptações não são adequadas para as amostras que contêm um grande número de células com extensas áreas de sobreposição [Qi et al. 2012]. Tais fatores limitam a utilização generalizada do algoritmo, já que sua utilização não regulada gera super segmentação. Uma alternativa para contornar o problema de núcleos agregados ou clusterizados tem sido o estudo da concavidade das formas analisadas [Kutalik et al. 2004, Wang and Song 2007, Bai et al. 2009]. Este estudo cumpre um papel importante na identificação de propriedades geométricas interessantes, como cantos, regiões côncavas e convexas e linhas retas [Levine 1985].

As propostas de segmentação existentes sob a perspectiva da *Drosophila melanogaster* revelam diferentes abordagens para a identificação dos núcleos celulares. Uma descrição sucinta a respeito de alguns relevantes trabalhos é apresentada na Seção 4.2.

4.2 Trabalhos correlatos

Na literatura é possível encontrar diversas pesquisas relativas ao processamento computacional de imagens da *Drosophila melanogaster*. Os trabalhos descritos abordam problemas diversos, especialmente para fins de estudos de processos biológicos, tais como diferenciação e desenvolvimento celular. Uma questão fundamental nesses trabalhos é o processo de segmentação das imagens, etapa crucial para o sucesso ou fracasso dos procedimentos de análise e interpretação da informação biológica.

A segmentação de imagens relativas à da *Drosophila melanogaster* possui dois objetivos principais, sendo (a) o isolamento do embrião principal contido em imagens biológicas [Pan et al. 2006, Peng et al. 2007] e (b) a identificação individual dos núcleos celulares presentes na amostra de cada embrião [Poustelnikova et al. 2004, Kosman et al. 1999].

No primeiro caso, é possível dizer que, imagens fluorescentes ou confocais obtidas durante experimentos de embriogênese geralmente detectam mais de um embrião (os quais podem se tocar ou não), sendo o embrião de interesse geralmente localizado no centro da imagem. Neste caso, o processo de segmentação é utilizado para extrair o embrião principal do conjunto obtido, visando padronizar a imagem resultante para a realização de posteriores análises computadorizadas. Por outro lado, a tarefa (b) é direcionada às imagens de embriões em nível de resolução celular, onde o objetivo é obter a máscara de segmentação nuclear.

Neste capítulo são abordados alguns desses trabalhos, os quais propõem ferramentas computacionais para análise automática de imagens de embriões da *Drosophila*. O estudo focou-se nos procedimentos desenvolvidos para a identificação dos núcleos celulares. Visa-se com isso realizar um levantamento das principais características desses sistemas, a fim de compará-las ao novo método proposto. Os trabalhos estudados foram descritos

sucintamente, em três seções distintas, a fim de facilitar a compreensão do leitor, sendo:

- Seção 4.2.1 - Pesquisas que abordam a análise de imagens referentes à superfície dos embriões da *Drosophila melanogaster*;
- Seção 4.2.2 - Pesquisas que abordam a análise de imagens referentes ao plano sagital dos embriões da *Drosophila melanogaster*;
- Seção 4.2.3 - Descrição das principais bases de imagens referentes à temática em estudo.

4.2.1 Superfície dos embriões

A grande maioria dos trabalhos existentes na literatura, sob a perspectiva da *Drosophila*, propõem métodos para segmentação de imagens obtidas da superfície dos embriões. Nesta seção são descritos alguns trabalhos que abordam esta tarefa, a nível de resolução celular [Kosman et al. 1999, Janssens et al. 2005, Surkova et al. 2008] e resolução do embrião [Pan et al. 2006].

A pesquisa apresentada por [Kosman et al. 1999] apresenta um pipeline de métodos para aquisição de dados quantitativos a partir de imagens confocais dos padrões de expressão gênica da *Drosophila*. O pipeline proposto compreende três etapas principais, sendo pré-processamento (equalização de histograma e filtro mediana), segmentação (algoritmo Shen Castan, transformada de distância, erosão e dilatação morfológica e algoritmo *watershed*) e análise (cálculo da intensidade média dos pixels por núcleo). Uma combinação específica das técnicas descritas permite obter a máscara de segmentação nuclear (Fig.1.2).

O estudo proposto por [Janssens et al. 2005] descreve um método eficiente para quantificação dos níveis de proteína por núcleo em padrões de expressão gênica de embriões da *Drosophila melanogaster*. O método descrito sugere uma evolução da ideia proposta por [Kosman et al. 1999]. O componente central do método é a identificação automática de núcleos por detecção de borda, com a utilização do algoritmo *Watershed* em uma fase de correção de erro. Este método fornece quantificação de alto rendimento em resolução celular.

Em seu trabalho, [Surkova et al. 2008] apresentam uma nova abordagem para quantificação da expressão gênica contida em imagens de embriões da *Drosophila*. O contexto do método aborda cinco etapas principais: segmentação da imagem, remoção do fundo, caracterização temporal do embrião, registro de dados e cálculo da média de intensidade dos dados. A aplicação destes métodos em imagens da *Drosophila* torna possível revelar novos mecanismos para a formação de domínios da expressão de genes de segmentação, bem como para a construção de um atlas espaço-temporal da expressão do gene de segmentação.

O trabalho de [Pan et al. 2006] descreve um sistema automático para análise da expressão gênica de imagens da *Drosophila melanogaster*. O sistema proposto foca-se na

análise automática e comparação de imagens de embriões da *Drosophila*. O fluxo de trabalho contém três etapas principais, (a) Processamento das imagens, em que os autores realizam a segmentação e registro das imagens, (b) extração de características, e (c) a mineração dos dados, com aplicações tais como, classificação, clusterização e recuperação de imagens baseada em conteúdo. A etapa de segmentação objetivou identificar, isoladamente, cada embrião contido nas imagens analisadas. Para isso, os autores utilizaram técnicas tradicionais do PDI, como limiarização local, operação morfológica binária e algoritmo *Watershed*.

4.2.2 Plano anatômico sagital

A análise computacional de imagens referentes ao plano sagital de embriões da *Drosophila melanogaster* são notadamente importantes para a realização de variados estudos da biologia moderna [Young et al. 1991, Kuchinke et al. 1998, Wheeler et al. 2008, Zhang et al. 1996]. Conforme descrito no Capítulo 2, esse tipo de imagem apresenta algumas vantagens em relação às imagens obtidas da superfície dos embriões.

Assim como no primeiro caso (Seção 4.2.1), os trabalhos desenvolvidos nesse cenário contêm uma etapa de segmentação, cujo objetivo é a construção da máscara de segmentação nuclear, útil para identificação dos núcleos celulares contidos nas amostras processadas [Lopes et al. 2008, Morrison et al. 2012]. No entanto, algumas soluções propostas incluem abordagens alternativas para a formação dessa máscara, como por exemplo, os trabalhos de [Houchmandzadeh et al. 2002], [Grimm et al. 2010], [Gregor et al. 2007] e [He et al. 2008].

Por exemplo, em seu trabalho, [Houchmandzadeh et al. 2002] visando estudar a precisão e proporção do gradiente *bicoid* no processo de formação dos domínios de expressão de genes gap (como *Hunchback*, *Kruppel* e *Giant*), apresentam um sistema baseado na imposição de janelas deslizantes. As janelas são no formato retangular, e percorrem a borda do embrião no sentido perpendicular aos componentes rotulados (núcleos celulares), conforme mostrado na Fig.4.1. O deslizamento de uma janela (do tamanho de um núcleo) permite calcular a média de intensidade dos pixels contidos na região sobreposta, e extrair os respectivos perfis de intensidade.

[Gregor et al. 2007] visando estudar a estabilidade e dinâmica nuclear do gradiente morfogênico *bicoid* também utilizaram o sistema de janelas retangulares deslizantes, a qual foi percorrida sobre o comprimento da borda dos embriões analisados. Nesse caso, o tamanho da janela configurado aborda vários núcleos e suas respectivas ilhas citoplasmáticas.

[He et al. 2008] em seu estudo quantitativo sobre o gradiente *bicoid* e seu alvo *Hunchback* também utilizaram o método de janelas deslizantes para computar a média dos valores da intensidade de fluorescência por núcleo. No entanto, o formato da janela

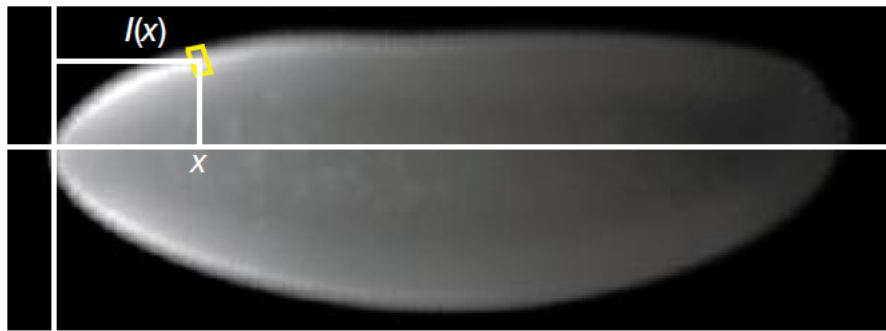


Figura 4.1: Identificação de núcleos contidos no plano sagital de embriões da *Drosophila melanogaster*, obtida com base no deslizamento de janela retangular sobre a imagem marcada do embrião. Figura obtida de [Houchmandzadeh et al. 2002].

utilizado nesse caso foi circular, com tamanho de 61 pixels. Os autores consideraram ser este um valor menor que o tamanho dos componentes celulares. As imagens foram processadas automaticamente, sendo a intensidade média do *bicoid* e *Hunchback* extraídas pela sobreposição da janela ao longo da borda da imagem do embrião, como ilustra a Fig.4.2.



Figura 4.2: Identificação de núcleos contidos no plano sagital de embriões da *Drosophila melanogaster*, obtida com base no deslizamento de janela circular sobre a imagem marcada do embrião. Figura adaptada de [He et al. 2008].

No trabalho proposto por [Lopes et al. 2008] os autores propõem identificar os núcleos celulares a partir de uma máscara de segmentação nuclear, criada por meio de um algoritmo de detecção de bordas. A fim de corrigir os núcleos clusterizados uma fase de pós-processamento é aplicada. A máscara nuclear resultante permite computar a intensidade média fluorescente por núcleo, bem como, possibilita a extração dos perfis de intensidade, a partir de uma faixa central definida ao longo do eixo Anterior-Posterior (AP).

Por fim, é interessante citar o trabalho de [Morrison et al. 2012], o qual se destina ao estudo quantitativo do gradiente morfogênico *bicoid* em embriões *in vivo*. Para obtenção da máscara de segmentação nuclear os autores utilizam uma operação com base em três passos principais, sendo (a) binarização da imagem por limiarização manual, (b) suavi-

zação da imagem original por filtro de Média e (c) combinação da imagem binarizada e imagem suavizada, em que um anel de pixels (centrado nos núcleos e com diâmetros igual a largura de aproximadamente dois núcleos) é criado por erosão da máscara.

A variedade de trabalhos desenvolvidos (com relação ao plano sagital ou superfície dos embriões) evidencia a importância da temática em estudo. No campo de pesquisas referente à superfície dos embriões de *Drosophila* [Surkova et al. 2008, Poustelnikova et al. 2004, Janssens et al. 2005, Kosman et al. 1999], nota-se que a metodologia proposta para segmentação de núcleos celulares é bem definida, sendo capaz de identificar, isoladamente, cada componente rotulado das imagens analisadas. Por outro lado, nas pesquisas direcionadas ao plano anatômico sagital observa-se uma carência de soluções automáticas e precisas, para a tarefa de construção da máscara de segmentação nuclear. Sendo assim, visando contribuir com o estado da arte, o presente trabalho propõe um sistema computacional para o processamento e análise de imagens sagitais voltadas ao estudo do desenvolvimento embrionário da *Drosophila melanogaster*. O sistema proposto é detalhadamente descrito nos Capítulos 5 e 6.

4.2.3 Bases de dados

Esta seção descreve três importantes bases de dados referentes a projetos que fornecem acesso a imagens *online* da expressão gênica da *Drosophila melanogaster* e que apoiam a realização de pesquisas (referentes à biologia de sistemas e métodos computacionais) voltadas ao estudo do desenvolvimento embrionário dessa espécie.

FlyEx

O *FlyEx* trata-se de um projeto de desenvolvimento de um banco de dados *online*, criado para dar suporte ao estudo dos padrões de expressão gênica da mosca *Drosophila melanogaster*. Contém atualmente 4.490 imagens 2D de padrões da expressão gênica obtidas a partir de cerca de 1.580 embriões, que podem ser conferidas na página <http://urchin.spbcas.ru/flyex/> [Pisarev et al. 2009]. Devido à alta resolução espacial e temporal, esse conjunto de imagens é amplamente utilizado para estudar os mecanismos de formação de padrões, inferir interações reguladoras durante o processo de diferenciação celular e segmentação do embrião bem como para o desenvolvimento de modelos matemáticos.

A base de dados *FlyEx* pode ser usada para examinar a qualidade dos dados, analisar a dinâmica da formação de domínios de segmentação de expressão dos genes, bem como estimar a variabilidade dos padrões de expressão gênica [Pisarev et al. 2009]. Possibilita ainda o *download* de imagens, bem como o acesso a variadas informações quantitativas. Na Figura 2.4(a) é possível observar um embrião obtido a partir dessa base.

O *FlyEx* foi descrito inicialmente por Poustelnikova et al. no artigo “*A database for*

management of gene expression data in situ" [Poustelnikova et al. 2004]. Nesse trabalho os autores descrevem os passos necessários para o desenvolvimento do projeto *FlyEx*, bem como descrevem técnicas de PDI utilizadas em algumas fases do processo. Por exemplo, os autores descrevem algumas técnicas de pré-processamento, segmentação e análise utilizadas no processamento das imagens de padrões de expressão gênica da *Drosophila*. Na etapa de pré-processamento buscou-se restaurar as imagens dos padrões de expressão por meio da utilização das técnicas equalização de histograma, filtragem mediana e operações de dilatação. Na etapa de segmentação objetivou-se obter a identificação individual dos núcleos celulares (máscara nuclear) presentes nos padrões de expressão, para isso os autores utilizaram técnicas de limiarização, detecção de bordas e o método *Watershed*. Por fim, os autores descrevem o uso de operações de erosão e reconstrução, aplicadas na fase de pós-processamento, para obtenção da máscara nuclear definitiva.

A partir da base de dados *FlyEx* foi possível o desenvolvimento de vários trabalhos científicos referentes ao estudo de embriões de *Drosophila*, tendo em vista a disponibilidade de imagens e dados quantitativos [Ashyraliyev et al. 2008, Ay et al. 2008, Papatsenko et al. 2009].

Berkeley Drosophila Transcription Network Project

O *Berkeley Drosophila Transcription Network Project* (BDTNP) [Fowlkes et al. 2008] é um projeto destinado ao estudo dos padrões de expressão gênica em *Drosophila melanogaster*, cujo objetivo é obter uma compreensão mais rigorosa das redes de regulação gênica animal. Em geral, o BDTNP utiliza a blastoderme da *Drosophila* como modelo de estudo do comportamento genômico animal, por ser espécie que melhor caracteriza os relacionamentos reguladores dos genes [Jäckle et al. 1992, Fowlkes et al. 2008]. O BDTNP busca decifrar como os padrões de expressão gênica de desenvolvimento animal são direcionados pelas informações contidas na transcrição das extensas sequências regulatórias de DNA. Para isso, baseia-se em um conjunto de métodos computacionais que realizam a análise quantitativa de imagens da expressão gênica da *Drosophila*.

O BDTNP permite acesso a uma base de imagens *online* [Fowlkes et al. 2008], em que possibilita a obtenção de imagens da expressão gênica de embriões de *Drosophila*, obtidas por microscopia confocal, em três dimensões (3D) e com resolução celular. Além disso, o BDTNP permite a busca e recuperação de três tipos de arquivos principais que descrevem a expressão gênica e a morfologia dos embriões, sendo o arquivo *Pointcloud*, o arquivo *VirtualEmbryo* e o arquivo Correspondência. Para facilitar a visualização e análise desses arquivos, [Rubel et al. 2006] propuseram a ferramenta *PointCloudXplore*. Trata-se de uma ferramenta de visualização desenvolvida para ajudar os biólogos a compreenderem a relação entre padrões de expressão gênica em 3D. Essa ferramenta integra múltiplas visões para facilitar a análise de complexos padrões de expressão gênica. Cada visão enfatiza diferentes propriedades dos dados, e a interação entre essas visões possibilita realização

de análise detalhada dos dados apresentados.

O BDTNP emite periodicamente novas versões dos dados e imagens da expressão gênica 3D. A versão atual 2.0 contém arquivos *pointcloud* de 2830 embriões gerados a partir dos algoritmos de segmentação desenvolvidos pela equipe de desenvolvimento do projeto [Huang et al. 2008]. A obtenção de imagens digitais e dos dados quantitativos pode ser conferida na página <http://bdtnp.lbl.gov> [Fowlkes et al. 2008].

Berkeley Drosophila Genome Project

O *Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP)* [Tomancak et al. 2007] representa um conjunto de projetos relacionados à *Drosophila melanogaster* que envolvem importantes pesquisas, tais como sequenciamento genômico [Adams et al. 2000, Hoskins et al. 2007], sequenciamento de EST'S (Etiquetas de Sequência Expressa) [Stapleton et al. 2002], análise de expressão gênica [Tomancak et al. 2002, Tomancak et al. 2007] e coleção de genes [Wan et al. 2006].

Essa última vertente refere-se ao foco de estudo do presente trabalho, ou seja, análise de imagens dos padrões de expressão gênica em *Drosophila melanogaster*. Diferenciando-se no que diz respeito à resolução da imagem, já que os trabalhos do BDGP não possibilitam a visualização dos núcleos celulares existentes nas imagens dos embriões de *Drosophila*, enquanto que, a pesquisa em questão utiliza imagens sagitais da expressão gênica com resolução em nível celular.

O BDGP contém imagens 2D da expressão gênica de embriões individuais de *Drosophila* obtidas por hibridização fluorescente *in situ*, que permite detectar a distribuição de RNA. Além disso, inclui um conjunto de métodos que suportam a análise dessas imagens durante a embriogênese. Outra vertente do projeto refere-se à documentação e padronização de dados referentes à anatomia do desenvolvimento embrionário. Atualmente a base de imagens BDGP possui 7583 genes documentados com 113501 imagens digitais armazenadas. Os padrões de expressão de genes caracterizados e descritos podem ser conferidos na página <http://insitu.fruitfly.org/cgi-bin/ex/insitu.pl> [Tomancak et al. 2007].

Capítulo 5

Identificação de núcleos celulares em imagens sagitais de embriões de *Drosophila*

Este capítulo apresenta o método proposto para a identificação de núcleos celulares a partir de imagens de embriões de *Drosophila*. A metodologia desenvolvida é descrita em detalhes, juntamente com as técnicas utilizadas.

5.1 Método proposto

O presente trabalho objetiva obter um sistema computacional para o processamento e análise de imagens sagitais relativas a embriões da *Drosophila melanogaster*. O desenvolvimento da abordagem proposta é dividida em quatro etapas principais, sendo (a) aquisição, (b) pré-processamento, (c) segmentação e (d) análise. Para o desenvolvimento dos diversos algoritmos de processamento de imagens utilizou-se a linguagem Matlab e as rotinas foram executadas em um computador desktop comum (Quad-Core 2.66 Ghz, 8 GB de RAM).

Na etapa *Aquisição* formou-se a base de imagens a ser utilizada no presente trabalho. Nesta etapa foram selecionadas imagens com resolução e nitidez consideradas adequadas para análise e desenvolvimento dos algoritmos. Foram eliminadas imagens em que os níveis de intensidade de cinza das regiões de interesse se assemelham ao valor de intensidades do *background*. Assim como foram descartadas as imagens com alto grau de ruído, as quais inviabilizam etapas posteriores.

A etapa *pré-processamento* visou modificar os pixels das imagens coletadas, a fim de normalizá-los e otimizar os resultados das operações subsequentes, tais como, segmentação e análise. Para isso, foram utilizadas técnicas de redução de ruído e realce de contraste, como filtragem espacial (filtro Gaussiano) e manipulação de realce (transformação de in-

tensidade linear e realce morfológico). O processo de minimização de ruído é necessário pelo fato das imagens processadas normalmente apresentarem ruído aleatório na região circundante aos núcleos celulares (extremidade interna), o que gera uma aparência granular e dificulta a separabilidade entre os núcleos celulares contidos na imagem. A alteração de contraste possibilita normalizar o realce dos componentes da imagem, além de enfatizar e melhorar a aparência das regiões degradadas pela perda de contraste.

A fase *segmentação* objetivou identificar os objetos de interesse, nesse caso, os núcleos celulares. Essa etapa é de fundamental importância para a construção de máscaras nucleares. Os resultados dessa etapa definem o sucesso ou fracasso dos procedimentos de análise computadorizada.

Após isolar os componentes da imagem, a fase *análise* foi responsável pela extração e interpretação de características morfométricas presentes nas imagens processadas, tais como a intensidade média de proteínas e RNAs dentro e fora dos núcleos. Essa fase permite a obtenção de dados quantitativos. Um esquema geral do método proposto pode ser visualizado na Fig.5.1.

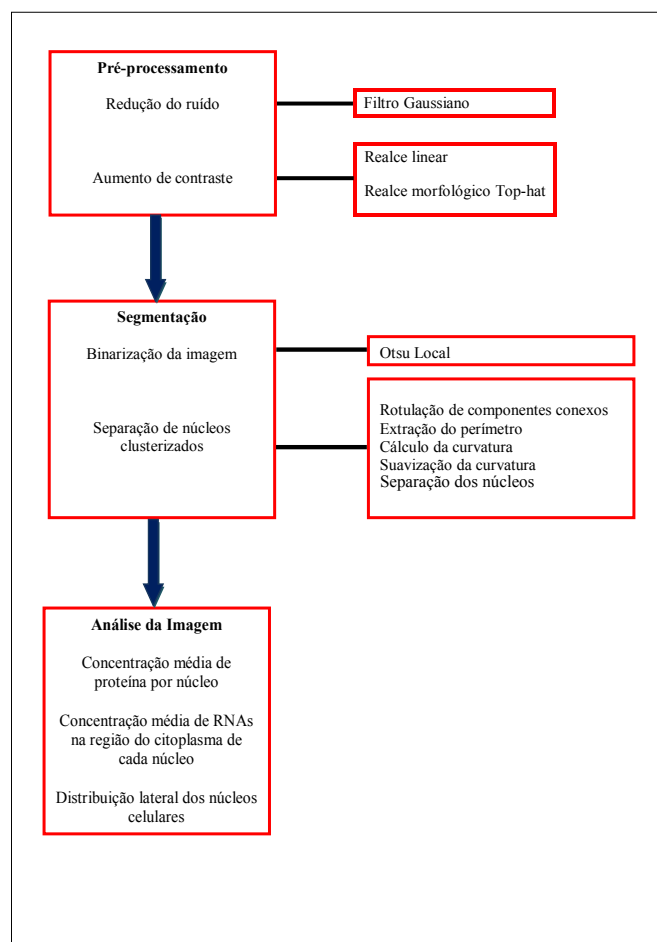


Figura 5.1: Esquema geral da metodologia adotada para desenvolvimento do método proposto.

5.2 Aquisição das imagens

As imagens utilizadas neste trabalho foram adquiridas no Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, por meio da técnica Microscopia confocal, em que foi utilizado o microscópio confocal Leica TCS SP5. O microscópio permite analisar genes e proteínas no interior das células, assim como possibilita visualizar a dinâmica de expressão gênica em embriões vivos. As células de interesse das amostras analisadas foram capturadas nos canais do DAPI, proteína azul fluorescente, tal que, quando introduzida na célula se liga aos núcleos, tornando-os fluorescentes quando iluminados por um laser. Os experimentos de fluorescência foram realizados por uma equipe formada pelo Dr. Francisco José Pereira Lopes e pela MSc. Maíra Arruda Cardoso, ambos do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

As imagens são capturadas no formato *TIFF*, que é o formato padrão de imagens adquiridas por meio dos programas de aquisição instalados no microscópio confocal utilizado. Possuem dimensão 1024×1024 pixels e são representadas numa escala de 256 níveis de cinza.

Cada embrião de *Drosophila* capturado gerou três tipos de imagens, sendo (a) imagem com marcação do DNA, (b) imagem com marcação do RNA do *Hunchback* e (c) imagem com marcação da proteína *Hunchback*, conforme exemplificado pela Fig.5.2. As imagens em questão possuem objetivos específicos, por exemplo, a *imagem DNA* (Fig.5.2(a)) serve para marcar os núcleos que compõem o embrião de *Drosophila*, e é fundamental para gerar a máscara nuclear. A *imagem RNA* (Fig.5.2(b)) é utilizada para extrair informação de expressão gênica da região do citoplasma, e por fim, a *imagem proteína* (Fig.5.2(c)) possibilita analisar a intensidade média da proteína *Hunchback* codificada em cada núcleo. É importante mencionar que as imagens citadas são obtidas simultaneamente do mesmo embrião, não necessitando de nenhuma operação de registro.

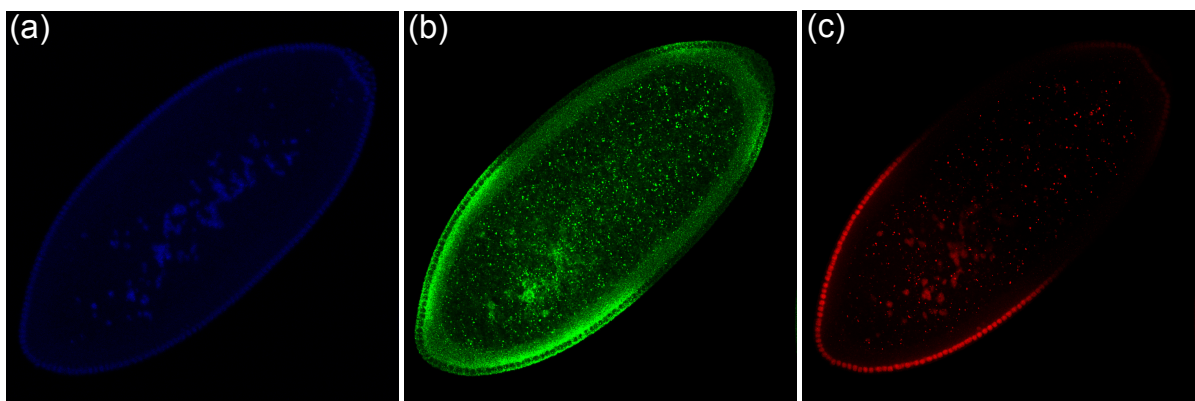


Figura 5.2: Tipos de marcação fluorescente nos embriões da *Drosophila melanogaster*. Em (a) é exibido a marcação do DNA, em (b) a marcação do RNA, e em (c) a marcação da proteína *Hunchback*.

5.3 Pré-processamento

Após a etapa *aquisição* realizou-se o pré-processamento das imagens obtidas. Essa fase objetiva preparar as imagens para a etapa posterior, isto é, a *segmentação*. Para isso, abordou-se basicamente duas tarefas, sendo (a) isolamento do embrião principal e (b) transformação das imagens.

A tarefa (a) objetivou solucionar o problema da existência de imagens com dois ou mais artefatos capturados. Isto é, ao obter a expressão de um embrião de *Drosophila*, o microscópio confocal pode capturar sinais de expressão não desejados, como por exemplo, partes de outros embriões contidos na amostra biológica. Essas regiões não devem ser consideradas no procedimento de segmentação automática. Na Fig.5.3 são exemplificados alguns casos encontrados.

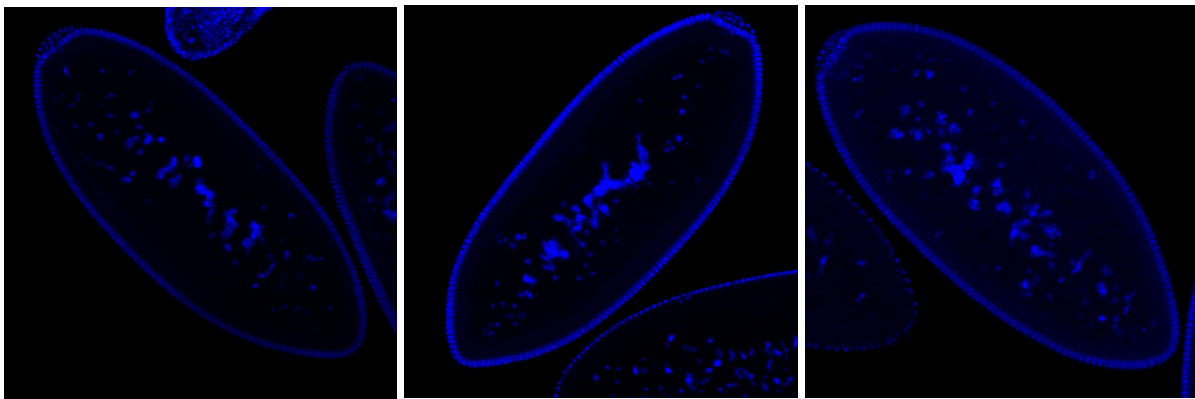


Figura 5.3: Exemplos de imagens com marcação do corante nuclear DAPI (azul). Por meio dessas é possível perceber a captura de diferentes embriões, em uma mesma imagem, além do embrião de interesse (principal).

Por outro lado, a tarefa (b) buscou reduzir os ruídos e manipular o contraste das imagens. Os ruídos podem ser introduzidos na imagem no processo de sua aquisição e podem ser causados pelos processos de quantização e amostragem. Em imagens confocais, além dos marcadores fluorescentes, diferentes artefatos existentes na amostra e em seu entorno podem ser excitados e emitir luz, gerando assim uma fluorescência não correspondente à desejada. Esses sinais são considerados ruídos e se caracterizam como um conjunto de pixels dispersos pela imagem, inicialmente definidos como sinal fluorescente, mas que não correspondem à fluorescência desejada. Esse tipo de ruído, no caso das imagens coletadas, é a expressão do citoplasma, localizado na extremidade interna dos núcleos celulares, como pode ser visto na Fig. 5.4.

Outro tipo de ruído comumente encontrado em imagens obtidas por microscopia confocal é a ocorrência de pixels (com diferença de luminosidade) distribuídos aleatoriamente pela imagem, que não compõem os objetos de interesse nela contidos. A existência desse ruído pode prejudicar os resultados da segmentação, como por exemplo, obtenção de formas com detalhes espúrios ou pequenos orifícios em sua formação.

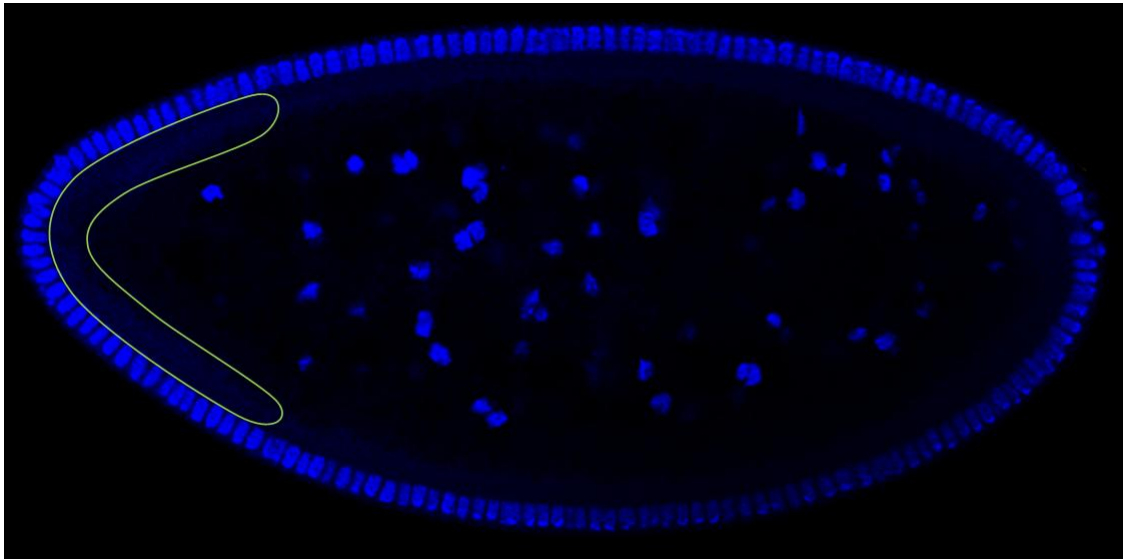


Figura 5.4: Plano sagital do embrião da *Drosophila melanogaster*. Por meio da região destacada na imagem é possível verificar a expressão referente ao sinal do citoplasma, considerada ruído.

Comumente, em casos onde a imagem é corrompida pelo ruído descrito utilizam-se técnicas de filtragem espacial. Tais métodos visam a suavização de imagens, utilizando para isso operações de convolução entre a imagem original e uma máscara especialmente construída (filtros espaciais). No caso da pesquisa em questão, aplicou-se o filtro Gaussiano [Gonzalez and Woods 2010] para redução do ruído encontrado.

A realização da tarefa (b) justifica-se também para a manipulação de contraste, visto que, em algumas imagens foi observado baixa discriminação visual entre os objetos da imagem. Esse tipo de característica torna difícil a visualização ou interpretação da imagem por um intérprete humano ou por um sistema de processamento digital.

Em suma, a etapa de pré-processamento envolveu a aplicação de técnicas que destacam os objetos de interesse na imagem e corrigem defeitos oriundos da aquisição, ou ainda, técnicas para correção de problemas como os ilustrados na Fig.5.4. Para isso, o *pré-processamento* é composto por uma sequência de quatro operações principais, sendo isolamento do embrião principal, filtragem espacial, realce de contraste e filtragem morfológica. As seções seguintes descrevem detalhadamente a metodologia de pré-processamento implementada.

5.3.1 Isolamento do embrião principal

A primeira operação do pré-processamento consistiu em padronizar a base de dados, ou seja, preparar as imagens de modo que, cada uma contenha somente o embrião de interesse.

Para realização dessa tarefa utilizou-se uma abordagem simples, com base em operações morfológicas e nas técnicas TD e limiarização [Janssens et al. 2005]. A partir

dessas é possível remover os objetos indesejados em função de seu tamanho. As operações morfológicas aplicadas (dilatação, erosão e preenchimento) visam remover detalhes espúrios, preencher os objetos e suavizar as bordas da imagem binarizada (Fig.5.5(a)). Após isso, o resultado da TD (Fig.5.5(b)) é processado de modo que represente um marcador adequado para reconstruir o objeto de interesse. Isto é, a região capturada pela TD é filtrada a um tamanho pré-estabelecido de forma empírica (Fig.5.5(c)). A *máscara embrião* (Fig.5.5(d)) é obtida a partir da reconstrução morfológica da imagem marcador sobre a imagem TD. Por fim, a *máscara embrião* é combinada com a *imagem DNA* (Fig.5.2(a)), o que possibilita eliminar as regiões indesejadas. A Fig.5.5 ilustra as etapas do processo descrito.

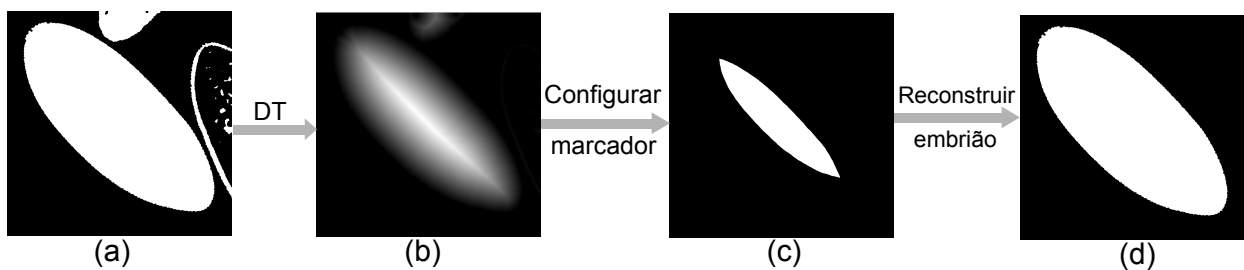


Figura 5.5: Etapas para isolamento do embrião principal. A figura (a) exibe a imagem binarizada, após remoção de detalhes espúrios e preenchimento do embrião. A figura (b) apresenta o resultado da transformada distância, o qual é processado para definir o marcador da figura (c). A imagem (d) ilustra o resultado obtido após a reconstrução morfológica.

5.3.2 Filtragem espacial

Após o isolamento do embrião principal, a segunda operação do pré-processamento baseou-se na Filtragem espacial (descrito na Seção 3.2.2), que consistiu da aplicação de um filtro Gaussiano. A implementação deste filtro é realizada pelo processo de convolução discreta, em que o valor da intensidade de um pixel é substituído pelo valor da média ponderada dele com seus vizinhos. A máscara utilizada nesse processo foi determinada por meio da função Gaussiana discreta definida na Eq. 3.13.

A aplicação da filtragem Gaussiana objetivou atenuar o ruído de determinadas regiões das imagens, além de suavizar as regiões de interesse. O ruído existente caracteriza-se por um padrão ou textura granulada aleatória, de modo que reduz o contraste e a definição de pequenos detalhes da imagem.

5.3.3 Realce de contraste

A terceira operação do pré-processamento procurou uniformizar a distribuição da intensidade luminosa das imagens degradadas pela perda de contraste, a fim de torná-las

mais adequadas para a aplicação específica ou processamentos subsequentes. Para isso, o estudo em questão baseou-se na técnica *Realce linear*, detalhada na seção 3.2.1.

Essa técnica permitiu manipular a intensidade luminosa das imagens, por meio da função de mapeamento definida na Eq.3.12, tornando possível aumentar, comprimir ou modificar o contraste e o brilho das imagens.

5.3.4 Filtragem morfológica

Por fim, abordou-se para o pré-processamento das imagens a técnica de Filtragem Morfológica, descrita na Seção 3.4.3. A filtragem em questão, consistiu na aplicação do operador *Top-hat* (expresso na Eq.3.45) e foi realizada com base na diferença aritmética entre a imagem resultante do realce linear e sua correspondente “aberta”. O resultado final permitiu acentuar as regiões de máximo local (picos) da imagem, as quais caracterizam os objetos de interesse, i.e., os núcleos celulares.

5.4 Segmentação

O método de segmentação proposto visa oferecer rotinas eficientes para a obtenção da máscara de segmentação nuclear referente ao plano sagital de padrões da expressão gênica da *Drosophila melanogaster*, em diferentes estágios do ciclo do desenvolvimento embrionário (e.g. Fig 5.6(b)).

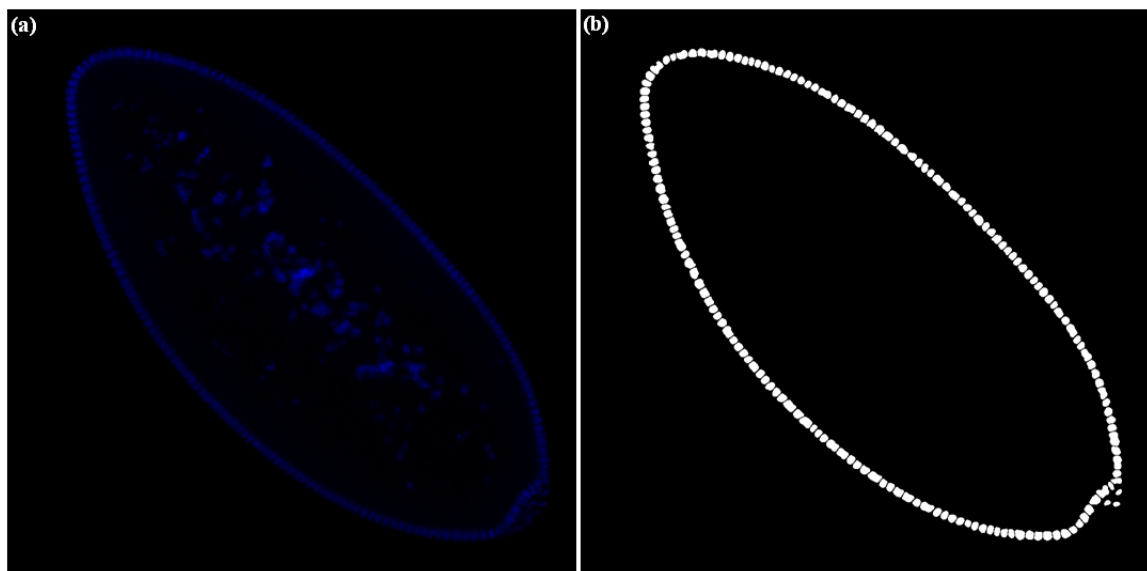


Figura 5.6: Máscara de segmentação nuclear referente ao plano sagital. Em (a) apresenta-se um exemplo de imagem original do embrião de *Drosophila*, e em (b) a máscara binária com identificação individual dos núcleos celulares contidos na figura (a).

O objetivo principal consiste em oferecer uma solução para contornar os problemas normalmente encontrados nesse tipo de imagem, tais como núcleos agregados ou sobrepostos, contornos nucleares mal definidos, iluminação irregular e ruídos de aquisição.

Para isso, o método baseia-se em um conjunto de técnicas de processamento digital de imagens. Primeiramente realizou-se um estudo e análise de tradicionais técnicas de segmentação existentes na literatura computacional, tais como Limiarização, Detecção de Bordas e Crescimento de Região (descritos na seção 3.3). Nesse sentido, por meio de implementação e experimentos computacionais verificou-se a performance de oito técnicas, onde foram analisados quatro operadores de detecção de bordas e quatro técnicas baseadas na similaridade dos valores de intensidade (limiarização manual e automática, Otsu e *Watershed*). Objetivou-se com isso, encontrar uma técnica com o melhor desempenho para a tarefa de segmentação dos núcleos celulares. Os resultados, publicados em [de Sousa et al. 2012], demonstraram que a aplicação isolada de tais técnicas em imagens da superfície dos embriões não promovem uma segmentação eficiente, tendo em vista a grande parcela de núcleos celulares unificados ou super segmentados resultantes.

Segundo [de Sousa et al. 2012], a utilização dos algoritmos clássicos de segmentação não se adapta ao contexto estudado pelo fato dos objetos de interesse apresentarem textura heterogênea e pequeno contraste em relação ao fundo da imagem. Apesar deste resultado ter sido obtido a partir de imagens da superfície do embrião, o mesmo ocorre com imagens sagitais.

Visando solucionar esse problema, o método de segmentação proposto foi dividido em dois passos principais, sendo (a) binarização da imagem e (b) pós-processamento. No primeiro passo (a), objetivou-se definir uma técnica de segmentação com maior desempenho para segmentar grande parte dos núcleos identificados na imagem original. Neste caso, definiu-se a limiarização por Otsu. Essa é uma abordagem amplamente utilizada para a segmentação de núcleos celulares contidos em imagens obtidas por técnicas de microscopia fluorescente [Xiong et al. 2006b, Quelhas et al. 2010, Xiong et al. 2006a, Yan et al. 2008]. A imagem resultante dessa aplicação é nomeada como *Máscara Otsu* (Fig. 5.8(a)).

A limiarização Otsu mostrou-se rápida, estável e apresentou maior taxa de eficácia na binarização, quando comparada com as demais técnicas abordadas, uma vez que melhor preservou a forma dos objetos de interesse. Entretanto, ainda assim, é obtido um grande número de núcleos agregados (grudados), como ilustrado nas Figs. 5.7(b), 5.7(d) e 5.7(f).

Visando contornar esse problema propôs-se adicionar um pós-processamento (ou seja, passo (b)) sobre a máscara Otsu. Antes disso, é interessante realizar a limpeza da máscara, i.e., eliminar os componentes conexos internos ao embrião binarizado no passo (a). Os componentes em questão expressam artefatos biológicos da blastoderme sincial de *Drosophila*, e não representam interesse para a presente pesquisa, devendo assim serem removidos. Esse procedimento é essencial para otimizar os cálculos envolvidos no passo (b), uma vez que evita o desperdício de tempo no processamento de componentes insignificantes.

Para realização dessa tarefa abordou-se a operação morfológica de dilatação e multiplicação de matrizes. A dilatação é aplicada sobre a máscara Otsu (Fig. 5.8(a)), com

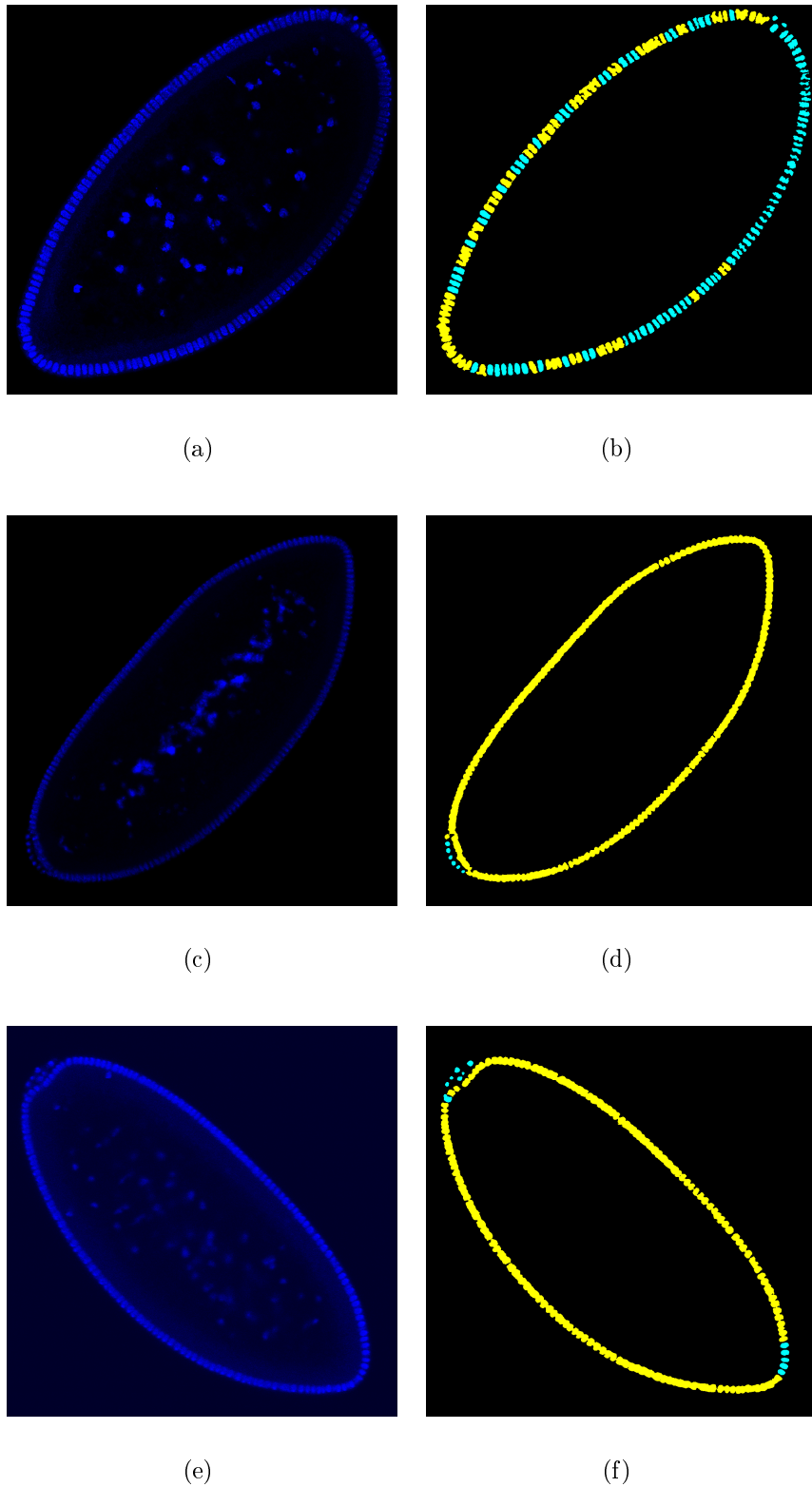


Figura 5.7: Resultado da segmentação Otsu aplicado em imagens do plano sagital. As figuras (a), (c) e (e) são exemplos de imagens contidas na base. As figuras (b), (d) e (f) demonstram o resultado da segmentação Otsu. A cor amarela destaca os componentes formados por núcleos agregados. A cor ciano evidencia núcleos individuais.

um ES de formato “disco” e raio 5. Após essa operação os núcleos da extremidade do embrião unificam-se, tornando-se um único componente conexo. Isso permite aplicar uma operação lógica, em que elementos de tamanho inferior são ignorados, formando-se uma nova imagem (Fig.5.8(b)). A máscara Otsu limpa (Fig.5.8(c)) é obtida a partir de multiplicação entre as matrizes das máscaras “Otsu” e “dilatada”. Esse processo é ilustrado na Fig.5.8.

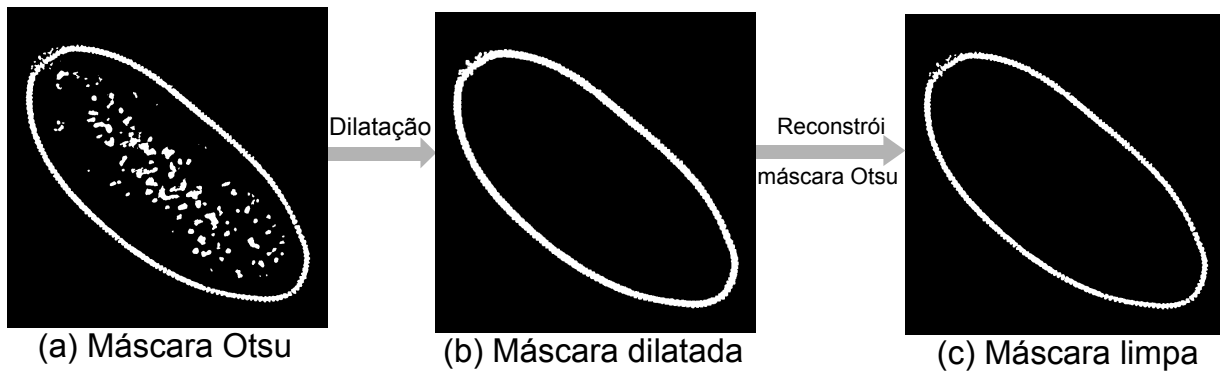


Figura 5.8: Etapas para limpeza da máscara Otsu. Em (a) é exibido o resultado inicial da binarização Otsu. Em (b) é mostrado a eliminação de componentes conexos internos à máscara Otsu. Em (c) apresenta-se a máscara Otsu limpa e reconstruída, de forma totalmente automática.

Após obter a máscara Otsu “limpa” é possível realizar o pós-processamento (passo (b)). A solução proposta consiste em separar os núcleos agregados passando uma reta entre pontos côncavos correspondentes, conforme ilustrado na Fig.5.9.

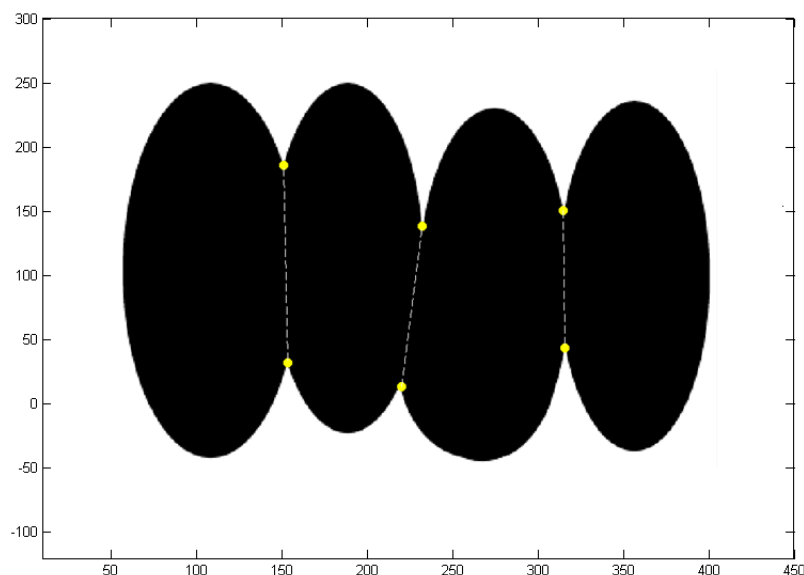


Figura 5.9: Método proposto aplicado a uma forma sintética. É possível observar a separação dos núcleos grudados por meio da identificação de curvatura da forma, e posterior ligação dos pontos côncavos correspondentes.

Esse problema de núcleos ou células grudadas é bem comum na biologia. A Fig.5.10 ilustra a detecção de pontos côncavos em grupos de núcleos celulares contidos em imagens

de imunofluorescência.

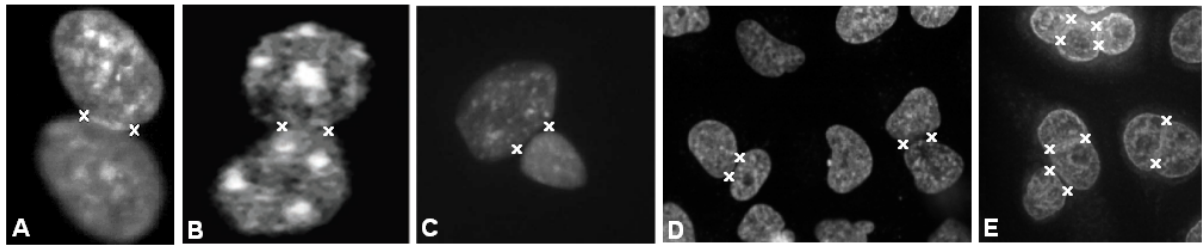


Figura 5.10: Pontos de concavidade significativa (mínimos locais) em grupos de núcleos celulares. (a)-(e) Imagens de imunofluorescência com diferentes formas e tamanhos na configuração de núcleos celulares agregados, obtidas respectivamente de (a) [Cloppet and Boucher 2010], (b) [Indhumathi et al. 2011], (c) [Cheng and Rajapakse 2009], (d) [Song et al. 2012], (e) [Daněk et al. 2009].

A detecção de tais pontos envolve a estimativa da curvatura $k(t)$ ao longo do contorno dos objetos analisados. Em geral, objetiva-se mapeá-los por meio de uma função linear, isto é, busca-se uni-los a fim de encontrar linhas (segmentos) que podem servir como fronteiras de divisão entre os componentes agregados (Fig.5.9).

Dessa forma, o procedimento descrito consiste basicamente de três passos principais, estimar a medida de curvatura, localizar os pontos extremos de mínimos locais dessa medida, e mapear os pontos de curvatura mínima correspondentes. Esse procedimento envolve os seguintes passos:

1. Obtenção do contorno paramétrico;
2. Extração da medida diferencial deste contorno, isto é, cálculo da curvatura;
3. Suavização da curvatura obtida no passo anterior;
4. Localização dos mínimos locais da curvatura;
5. Definição dos pares de pontos correspondentes;
6. Operação linear para separação dos núcleos agregados

5.4.1 Contorno paramétrico

Para definir o contorno paramétrico primeiramente foi necessário rotular e extrair os componentes conexos das imagens segmentadas. Trata-se do procedimento de atribuição de um *label* único a grupos de pixels, com base em um critério de conectividade. No caso em questão, a conectividade utilizada para determinar a vizinhança dos pixels ao calcular os componentes conexos foi 8-adjacente. Utilizou-se o algoritmo de rotulação descrito por [Haralick and Shapiro 1991] em que é abordado o método *two-pass*, descrito na Seção 3.1.3.

O resultado desse processo consiste em uma imagem simbólica, na qual, as regiões que identificam núcleos celulares são representadas por diferentes níveis de intensidade.

Cada uma dessas regiões pode ser um núcleo celular individual ou um aglomerado de núcleos. Nesse passo, torna-se essencial diferenciá-los. Uma análise do tamanho médio dos componentes rotulados mostrou-se suficiente para esta etapa, isto é, objetos com tamanho superior a um valor pré-determinado são considerados como grudados. Esse tipo de análise é importante, uma vez que a identificação incorreta dos núcleos agregados compromete o resultado final da segmentação. Em casos de núcleos agregados procede-se a extração do contorno paramétrico, o qual descreve as bordas dessas regiões.

Seja $P = \{p_1, \dots, p_n\}$ o conjunto formado pelos pontos do contorno de uma forma, ordenados percorrendo o contorno no sentido horário (ou anti-horário), onde $p_i = (x_i, y_i)$, para $i = 1, \dots, n$, n representa o número de pontos do contorno e x_i e y_i representam as coordenadas do ponto p_i na imagem. A Fig. 5.11(b-c) mostra as curvas x_i e y_i para o contorno mostrado na Fig. 5.11(a).

A extração do contorno paramétrico é realizada por meio do algoritmo “Ceguinho”, descrito na Seção 3.1.4. Após a finalização do algoritmo obtém-se como resultado um vetor ordenado com as coordenadas do contorno da forma bidimensional, de maneira parametrizada ou ordenada, na forma $C(t) = (x(t), y(t))$.

5.4.2 Cálculo da curvatura

O próximo passo consiste em computar a medida de curvatura para cada objeto (Seção 3.5). Este cálculo é realizado sobre o vetor de coordenadas parametrizadas ($C(t)$) de cada componente conexo. Essa abordagem é obtida por meio da Eq. (5.1). Sendo, $x'(t)$ e $y'(t)$ as derivadas de 1ª ordem em relação a x e y , e $x''(t)$ e $y''(t)$ as derivadas de 2ª ordem em relação a x e y , respectivamente [Costa and Cesar 2009].

$$k(t) = \frac{x'(t)y''(t) - y'(t)x''(t)}{(x'(t)^2 + y'(t)^2)^{\frac{3}{2}}}. \quad (5.1)$$

As derivadas de primeira ($x'(t)$ e $y'(t)$) e segunda ordem ($x''(t)$ e $y''(t)$), foram obtidas aplicando-se a propriedade da derivada de *Fourier* [Costa and Cesar 2009].

5.4.3 Suavização da curvatura

O uso da Eq. 5.1 para funções discretas normalmente gera derivadas com muitos ruídos. A filtragem Gaussiana é comumente usada para resolver esse problema. Esta operação é realizada por meio da inclusão do termo $G(s, \sigma)$ (Gaussiana bidimensional discreta com média zero e desvio padrão σ , definida no espaço das frequências s) às Eqs.3.52a-3.52d, conforme expresso pelas Eqs.3.55a-3.55d (Seção 3.5).

O efeito deste filtro é o de suavização, em que é reduzida (ou até mesmo eliminada) a influência de ruídos ou pequenos detalhes existentes no contorno das formas analisadas, conforme um valor de desvio padrão σ é adotado. A estimativa da curvatura suavizada

é realizada para todo componente conexo com dois ou mais núcleos unificados. Após isso, buscou-se identificar os pontos mínimos da curvatura, focando-se na localização dos pontos de mínimos locais (ou mínimos relativos).

5.4.4 Mínimos locais da curvatura

A mudança de sinal nos valores de curvatura $k(t)$ identifica a alternância entre intervalos de pontos, isto é, no intervalo entre dois valores máximos locais consecutivos sempre existe um valor mínimo. Sendo assim, a fim de localizar os pontos de mínimos locais realizou-se um teste comparativo do valor da função de curvatura em um ponto com os seus vizinhos, para todo intervalo de valores negativos.

Seja uma função f e $x_0 \in \text{Dom}(f)$, diz-se que x_0 é um ponto de mínimo local de f se $f(x) \geq f(x_0)$ para todo x em algum intervalo aberto I , contendo x_0 , tal que

$$f(x) \geq f(x_0), \forall x \in I \cap \text{Dom}(f) \quad (5.2)$$

A aplicação da Eq.5.2 para todo $I \cap \text{Dom}(f)$ possibilitou identificar os pontos de mínimos locais (ou mínimos relativos) da curvatura, isto é, pontos da função curvatura cujo valor seja menor que os valores em suas adjacências. Tais pontos caracterizaram-se por determinar posições candidatas à divisões dos núcleos celulares, conforme ilustrado na Fig.5.9. Após identificá-los torna-se fundamental estabelecer a correspondência entre si, já que a ideia principal consiste em unir pares de pontos correspondentes por meio de retas definidas na imagem, visando criar fronteiras de divisão entre os componentes grudados.

5.4.5 Correspondência entre os pontos de mínimos locais

Definir a correspondência entre os pontos de mínimos locais consiste em definir pares de pontos, os quais são fundamentais para a etapa de separação dos núcleos celulares (descrito na Seção 5.4.6). Esse processo consiste em identificar para cada ponto de mínimo local no contorno da forma um ponto correspondente, isto é, um ponto no lado oposto do contorno que esteja na mesma região de unificação de seus núcleos vizinhos. Por meio da Fig.5.11 é possível compreender melhor o procedimento descrito.

A Fig.5.11(a) ilustra uma forma sintética, a qual representa quatro núcleos celulares grudados. Para esse agregado foram identificados seis pontos de mínimos locais, P_1 à P_6 . Imagine um problema em que fosse procurado o ponto correspondente ao ponto P_1 . Nesse caso, os núcleos vizinhos de tal ponto são “núcleo 1” e “núcleo 2”. O ponto no lado oposto do contorno que se encontra na região de interseção desses núcleos é o ponto P_6 , sendo assim definido como o par correspondente de P_1 .

Visando automatizar esse processo é primeiramente importante dividir o contorno das

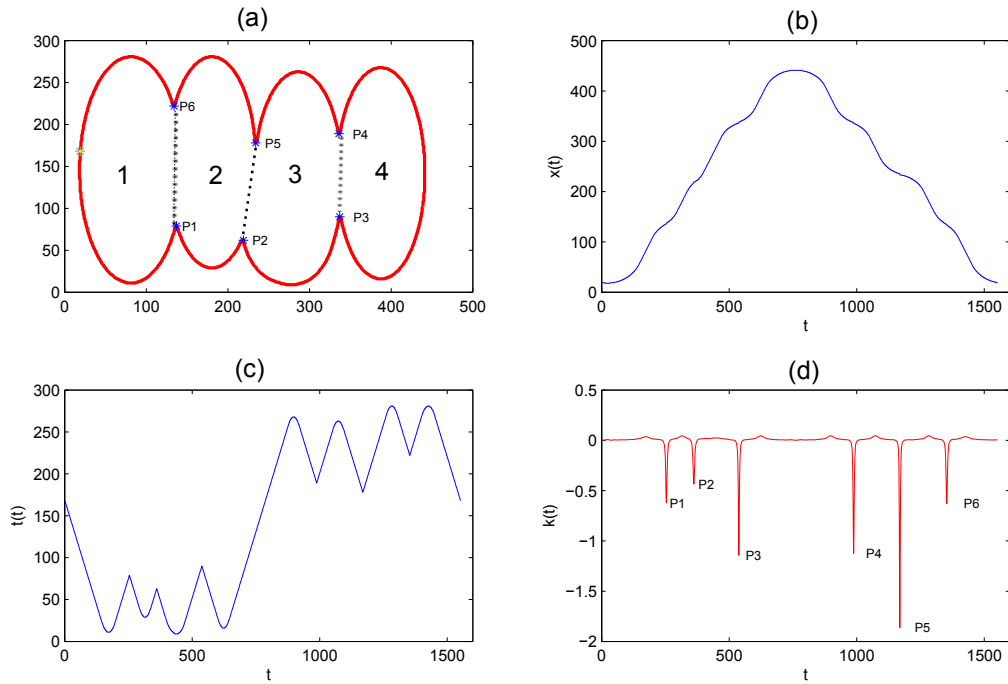


Figura 5.11: Componentes gráficos de um agregado de núcleos celulares. A figura (a) exhibe o contorno paramétrico de uma imagem sintética, em que são identificados os núcleos e os pontos de mínimos locais. As figuras (b) e (c) exibem os gráficos das coordenadas x e y do contorno, respectivamente. Em (d) é apresentada a função de curvatura $k(t)$ do contorno apresentado em (a), sendo destacados os respectivos picos de mínimos locais.

formas em duas regiões, buscando separar os pontos de mínimos locais em dois grupos (conforme o lado que ocupam nos componentes de núcleos agregados). A divisão do contorno consiste em identificar dois picos extremos na função de curvatura, os quais permitem identificar as extremidades dos componentes agregados, conforme exemplificado na Fig.5.12. A partir desses picos é possível dividir o contorno em dois lados distintos, no exemplo em questão, Lado A (representado pelo contorno em vermelho) e Lado B (contorno na cor azul).

Os picos podem ser encontrados a partir de uma versão super-suavizada da curvatura (por exemplo, curvatura do contorno suavizada pela aplicação de um filtro Gaussiano com $\sigma = 50$). A separação dos pontos de mínimos relativos em dois lados distintos permite otimizar o cálculo realizado para definir a correspondência entre os pares de pontos, já que reduz o espaço de busca.

Para iniciar o processo um dos lados é escolhido aleatoriamente (“Lado A” ou “Lado B” na Fig.5.12), e para cada ponto contido no lado escolhido calcula-se seu ponto oposto correspondente. Este cálculo baseia-se na análise do ângulo formado entre (a) *vetor normal* (do ponto corrente), por exemplo, $\vec{V}_n$ na Fig.5.13, em relação à (b) respectivos *vetores entre pontos*, por exemplo, $\vec{V}_{p_i}$ na Fig.5.13. Os vetores entre pontos ($\vec{V}_{p_i}$) são construídos considerando-se um ponto corrente e todos os pontos do lado oposto. O menor ângulo θ_i

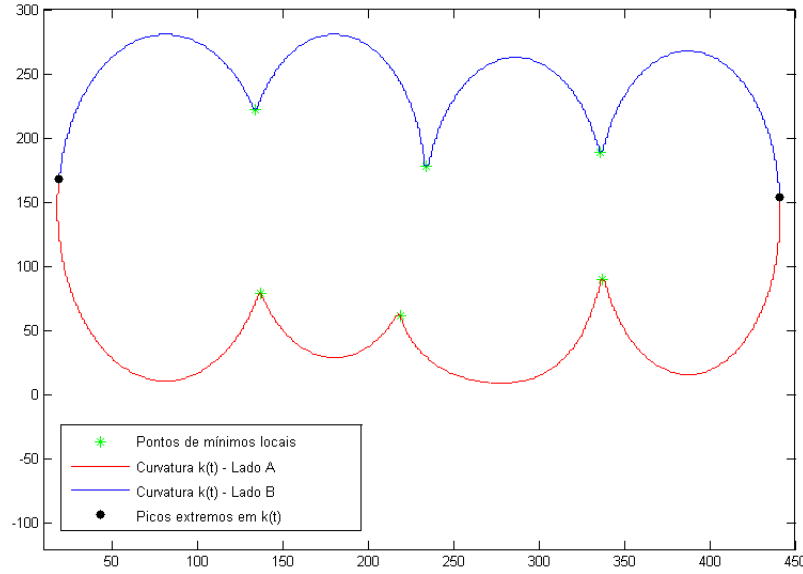


Figura 5.12: Picos extremos na função de curvatura. Localização dos picos extremos na função de curvatura. É possível verificar a separação dos pontos de mínimos locais em dois lados, conforme o lado que ocupam nos componentes agregados. Lado A representado pelo contorno em vermelho, e Lado B identificado pelo contorno na cor azul.

encontrado entre os vetores (a) e (b), de cada ponto contido no lado escolhido, define os pares correspondentes.

A análise dos ângulos foi realizada por meio da expressão do produto escalar entre vetores, apresentada na Eq. (5.3).

$$\cos \theta = \frac{\langle \vec{u}, \vec{v} \rangle}{|\vec{u}| |\vec{v}|} \quad (5.3)$$

$$\theta = \arccos\left(\frac{\langle \vec{u}, \vec{v} \rangle}{|\vec{u}| |\vec{v}|}\right) \quad (5.4)$$

Para compreender melhor, considere o exemplo da Fig. 5.13, a qual representa um imagem sintética formado pela agregação (unificação) de quatro núcleos, sendo exibido os respectivos pontos de mínimos locais (isto é, P_1 à P_6). Por meio dessa figura é possível observar o processo realizado para determinar o ponto correspondente à P_1 . Inicialmente são definidos os *vetores entre pontos*, neste caso $\vec{V}_{p_1}$, $\vec{V}_{p_2}$ and $\vec{V}_{p_3}$, os quais são construídos considerando P_1 e todos os pontos do lado oposto (i.e., P_4 , P_5 and P_6). Então, procede-se à análise do ângulo θ_i , ou seja, avalia-se o valor do ângulo formado entre o vetor $\vec{V}_n$ e cada vetor entre pontos existentes (no caso mostrado, $\vec{V}_{p_1}$, $\vec{V}_{p_2}$ e $\vec{V}_{p_3}$). Como resultado, P_6 é identificado como o ponto correspondente à P_1 , já que o menor ângulo θ_i é encontrado entre os vetores $\vec{V}_n$ (vetor normal do ponto P_1) e $\vec{V}_{p_1}$ (vetor entre os pontos P_1 e P_6).

A distância mínima entre pontos opostos (d_i) também foi analisada no processo de correspondência entre os pontos. Entretanto, esse critério não foi considerado, já que o mesmo não foi robusto às variações dos contornos de núcleos agregados. Por exemplo,

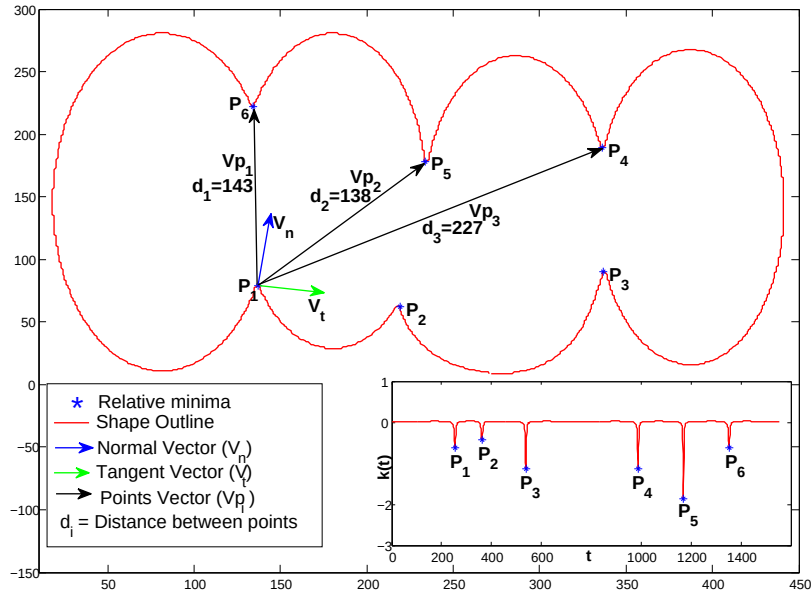


Figura 5.13: Elementos avaliados no processo de correspondência entre os pontos de mínimos locais. Os pontos P_1 à P_6 representam os mínimos locais da curvatura $k(t)$. Os vetores $\vec{V}_{p1}$, $\vec{V}_{p2}$ e $\vec{V}_{p3}$ são formados considerando-se o ponto de partida P_1 e seus pontos opostos (P_6 , P_5 e P_4), respectivamente. Os parâmetros d_1 à d_3 definem a distância do ponto P_1 em relação aos pontos opostos (P_6 , P_5 e P_4). O gráfico na parte inferior à direita exibe a função de curvatura $k(t)$ do contorno analisado, em que são destacados os respectivos picos de mínimos locais.

na Fig.5.13 a distância d_2 é menor que a distância d_1 e, no entanto, o par de pontos correspondentes é definido pela distância d_1 .

5.4.6 Separação dos núcleos agregados

Finalmente, após a correspondência entre os pontos ser estabelecida, os pares são unidos por meio de um segmento de reta (linha) desenhada na imagem, a fim de separar os núcleos agregados, isto é, os pixels sobre a linha traçada são ajustados para zero, gerando uma fronteira de divisão entre os núcleos. Neste caso, é utilizada a equação vetorial da reta R , definida na Eq. (5.5).

$$R(x, y) = P_0 + \alpha \vec{V}_D \quad (5.5)$$

O fundamental na determinação dessa equação é definir um dos ponto de mínimo local da curva como ponto de partida (P_0), assim como, conhecer o vetor direção da reta ($\vec{V}_D$), i.e, um vetor definido pela Eq. (5.6) responsável por determinar a direção da linha a ser traçada. O parâmetro α é qualquer número R_+^* que descreve a variação da distância de um ponto à outro. Cada valor do parâmetro $R(x, y)$ fornece a posição de um ponto na reta R . Sendo assim, o cálculo é realizado iterativamente até que a reta alcance o

comprimento do vetor $\vec{V}_D$.

$$\vec{V}_D = (x_f - x_i, y_f - y_i) \quad (5.6)$$

Segundo a Eq.5.6 os valores x_i e y_i representam as coordenadas do ponto P_0 , ou seja, o ponto de mínimo local definido como ponto inicial da reta R . Assim como, x_f e y_f representam as coordenadas do ponto P_F , i.e, o último ponto da reta R . Sabendo que, os valores de P_0 e P_F coincidem com os pontos de mínimos locais correspondentes entre si (definidos na seção 5.4.5).

Neste estágio é possível obter a total separação dos núcleos. Este procedimento é aplicado para todos os pontos localizados no mesmo lado do primeiro ponto analisado (ponto de partida). Por exemplo, no caso da Fig.5.13, também para P_2 and P_3 . Se após a primeira iteração dois ou mais núcleos permanecerem unificados o processo pode ser reaplicado, a fim de obter o resultado esperado.

Ao final dessa etapa é possível obter a máscara nuclear, em que os núcleos celulares são identificados individualmente, conforme pode ser visto na Fig.5.6 e na Fig.5.14.

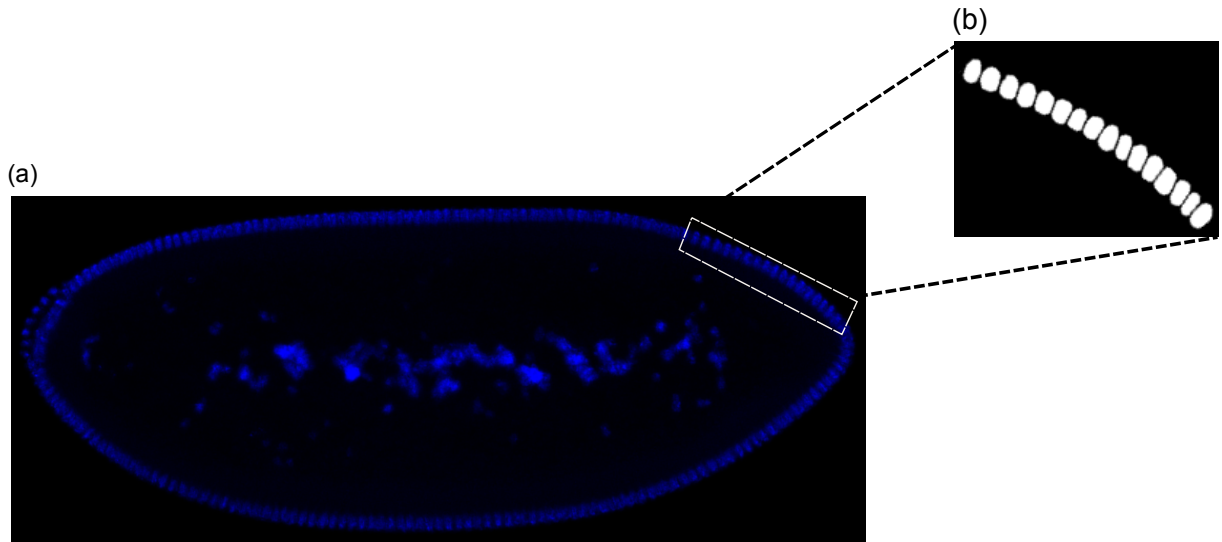


Figura 5.14: Resultado da separação dos núcleos celulares, ilustrado em um pequeno trecho de imagem sagital da *Drosophila*. (a) Canal DAPI do embrião. Em (b) é possível ver a total separação dos núcleos para o caso do trecho destacado.

Capítulo 6

Quantificação e Visualização da Expressão Gênica em imagens sagitais de *Drosophila*

Após a etapa de segmentação descrita no capítulo anterior, a imagem resultante é uma máscara nuclear (como a mostrada na Fig. 5.6 (b)). A partir dessa máscara podem ser obtidas diversas propriedades, tais como área, perímetro, eixo principal e eixo secundário. A extração de características, úteis e precisas, é fundamental para realização de procedimentos posteriores, tais como reconhecimento, interpretação e classificação.

Além disso, a partir das características extraídas, é possível obter informações da anatomia e expressão gênica dos objetos segmentados, o que possibilita realizar estudos biológicos diversos. No caso do presente estudo, a análise realizada focou-se em três estudos principais, sendo (a) quantificação do nível de expressão gênica por núcleo, (b) quantificação da intensidade média de RNAs na região do citoplasma associada a cada núcleo, e (c) visualização da variação de intensidade de expressão nuclear.

6.1 Nível de expressão gênica por núcleo

A partir da máscara nuclear, é possível determinar a intensidade média de proteína na região intranuclear. Essa operação pode ser realizada multiplicando, ponto a ponto, a máscara nuclear pela imagem com os dados de expressão da proteína. A Fig. 6.1 ilustra esse processo.

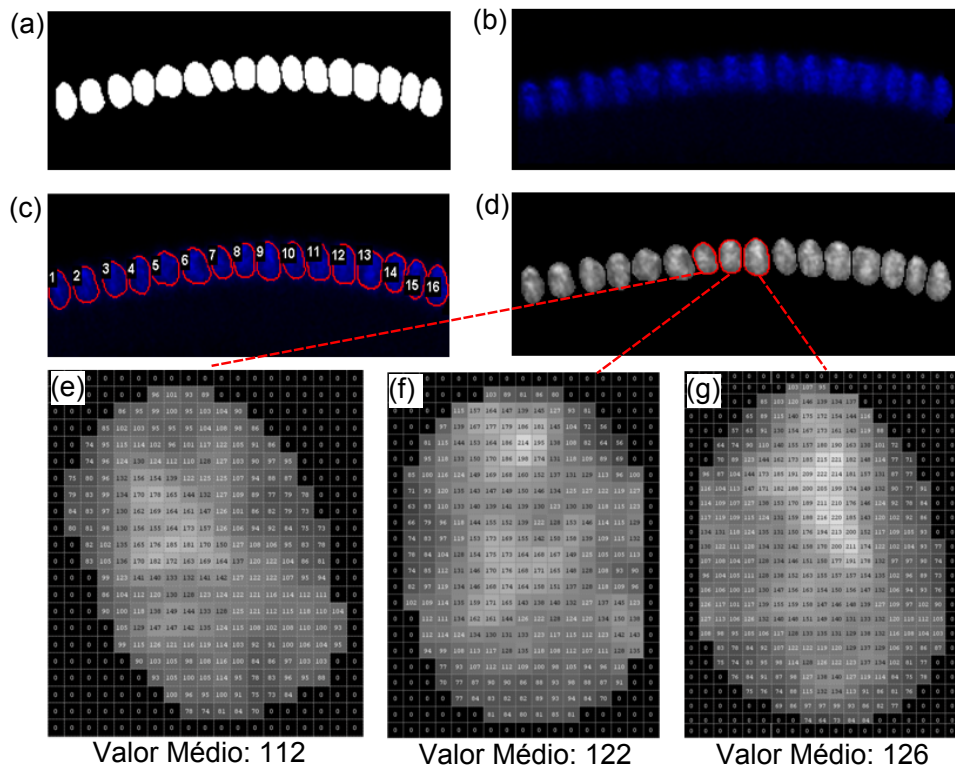


Figura 6.1: Cálculo da intensidade média de proteína por núcleo. Em (a) é exibido a máscara nuclear referente a um pequeno trecho de imagem de *Drosophila*. (b) Imagem original indicando a intensidade do canal DAPI. Em (c) são apresentados os valores de pixels agrupados (rotulados) com base na combinação da máscara de segmentação nuclear (a) com o canal de entrada DAPI (b). A resposta de saída é a representação matricial para cada núcleo e a média da intensidade de fluorescência expressa por núcleo, conforme exemplificado nas figuras (d)-(g).

6.2 Nível de expressão na região do citoplasma

Para determinar a intensidade média de RNAs no citoplasma associada a cada núcleo foi inicialmente necessário definir o entorno da região de cada núcleo. Para isso, aplicou-se à máscara de segmentação nuclear a operação geométrica transformada distância (TD), com base na métrica Euclideana. O resultado dessa técnica permitiu estender a região dos núcleos celulares nas direções basal e apical. É importante mencionar que a região foi estendida de modo a propagar o rótulo de cada núcleo, isto é, cada região definida no citoplasma foi associada a um núcleo celular. Esse processo é importante para estabelecer o nível de expressão citoplasmática para cada núcleo individualmente.

O tamanho da região capturada pela TD foi pré-estabelecido com base na análise visual do citoplasma expresso em várias amostras de imagens. A Fig. 6.2(c) mostra a transformada distância da máscara nuclear. O resultado da TD possibilita dividir cada célula em três regiões, sendo apical, nuclear e basal.

A investigação biológica de interesse dessa pesquisa focou-se nas regiões nuclear (Fig.6.2(d)) e basal (Fig.6.2(e)). A região apical não foi considerada, uma vez que não faz parte do

embrião. Essa é uma característica particular dos embriões de *Drosophila* nos estágios que estão sendo analisados. Sendo assim, o nível de expressão da região citoplasmática foi posteriormente estimado considerando a região basal. O núcleo do embrião fica localizado na superfície do embrião, ao passo que a região do citoplasma fica na parte interna. Isso fica evidente nas imagens apresentadas na Fig.2.6.

Para obter a região do citoplasma foram necessários dois passos, identificados no esquema ilustrativo da Fig. 6.2. O passo (1) realizou duas operações morfológicas sobre a *Máscara nuclear*, sendo uma operação de *fechamento* seguida por uma operação *preenchimento de região*. No caso da operação fechamento foi utilizado um ES no formato “disco” e tamanho 5. O conjunto de tais operações permitiu obter a imagem *Máscara embrião*, isto é, uma imagem binária em que os pixels do fundo da imagem (região externa do embrião) são assinalados para 0 (zero), e todo o embrião (regiões dos núcleos juntamente com o interior do embrião) são rotulado como 1 (um).

No passo (2) realizou-se uma operação de multiplicação entre as imagens *Máscara embrião* (Fig.6.2(b)) e *Citoplasma completo* (Fig.6.2(d)). A imagem *Citoplasma completo* é obtida a partir da transformada de distância (Fig.6.2(c)), ao desconsiderar os pixels localizados a uma distância inferior a 2.

A combinação entre as imagens *Máscara embrião* e *Citoplasma completo* permite anular a região superior do citoplasma (apical), já que os pixels correspondentes a essa região são multiplicados pelos zeros da matriz *Máscara embrião*. Por outro lado, essa combinação conserva a região de interesse do citoplasma, isto é, a região inferior (Fig.6.2(f)), as quais são multiplicadas pelos pixels de valor 1 (um) da matriz *Máscara embrião*.

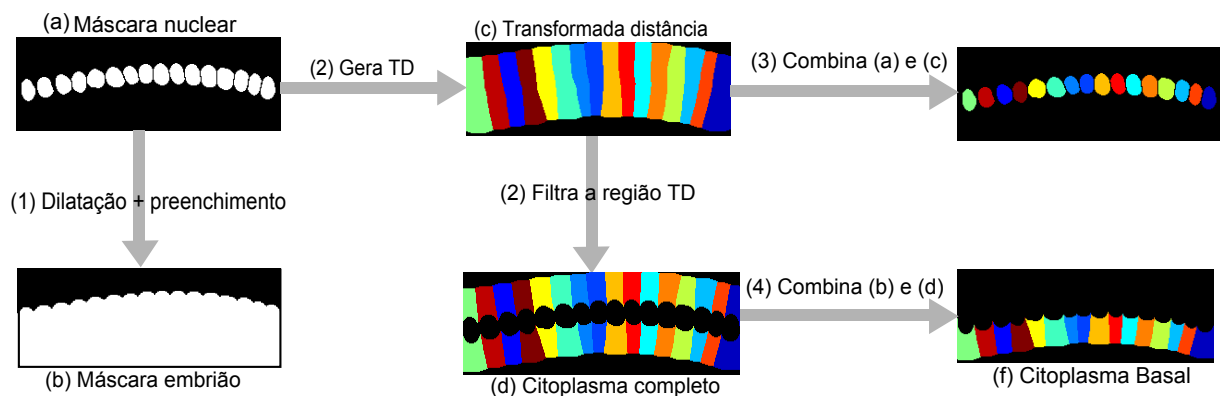


Figura 6.2: Visão geral do método utilizado para capturar a região referente ao citoplasma do embrião, ilustrado em um pequeno trecho de uma imagem sagital. Em (a) é possível visualizar a máscara de segmentação nuclear. Em (d) é exibido o resultado da operação geométrica Transformada Distância euclideana, aplicada sobre a imagem rotulada (c). Uma operação de multiplicação entre a máscara embrião (b) e a região filtrada da TD (e) resulta no citoplasma basal (f).

A Fig.6.3 ilustra o resultado do processo descrito em uma imagem aleatória da base de dados. A região do citoplasma detectada é sobreposta à respectiva máscara nuclear.

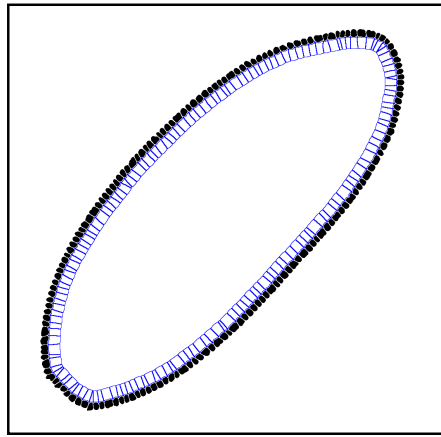


Figura 6.3: Resultado do processo de marcação da região do citoplasma sobreposto à respectiva máscara de segmentação nuclear.

6.3 Visualização da variação de intensidade de expressão nuclear

A quantificação da expressão gênica nas regiões intranuclear e citoplasmática fornece importantes informações a respeito do comportamento da expressão dos genes e da regulação gênica da *Drosophila*, além de servir de entrada em modelos matemáticos para simulação de redes de regulação gênica [Gilbert 2003]. Toda essa informação quantitativa é fundamental para a compreensão dos fenômenos em estudo. Mas, pode-se ir além. O uso de eficientes técnicas de visualização de dados pode auxiliar na interpretação dos dados obtidos. Nesse sentido, é proposto neste trabalho uma nova forma de visualização das imagens sagitais de embriões de *Drosophila*.

Para alcançar o objetivo propôs-se uma nova abordagem para exibição dos núcleos celulares. Para isso, desenvolveu-se um algoritmo capaz de organizar os núcleos celulares lado a lado, em uma direção horizontal, como se o embrião fosse “aberto” e colocado em uma linha. A Fig. 6.4 ilustra esse processo.

O algoritmo desenvolvido buscou, primeiramente, identificar a ordem dos núcleos celulares exibidos na imagem segmentada. Para isso, foi necessário rotular os componentes da imagem (seção 3.1.3). O resultado da rotulação demonstrou, inicialmente, uma ordem não sequencial (tal como, demonstrado na Fig.6.5).

Para que seja possível visualizar os núcleos de forma linear, é necessário estabelecer a vizinhança entre eles, isto é, estabelecer quem são os vizinhos de cada núcleo. Como mostrado, a rotulação dos componentes conexos não funciona para este propósito. Dessa forma, utilizou-se uma combinação das técnicas Diagramas de Voronoi (Seção 3.7) e Triangulação de Delaunay (Seção 3.8). A combinação baseou-se em uma filtragem de arestas, ou seja, aplicação de um filtro às arestas geradas pela triangulação de Delaunay ([Amenta et al. 1998]), o qual permite obter a superfície externa da triangulação. A partir dessa, tornou-se possível determinar os pontos da fronteira do embrião (núcleos), e posterior-

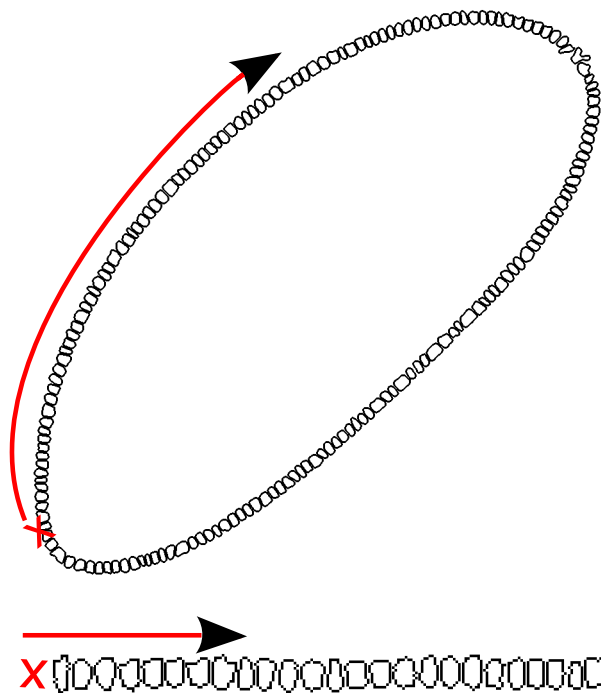


Figura 6.4: Ilustração da abertura da imagem do embrião de *Drosophila*. O “x” na cor vermelha indica o ponto de início para varredura do algoritmo. A partir desses pontos os núcleos são dispostos de forma linear.

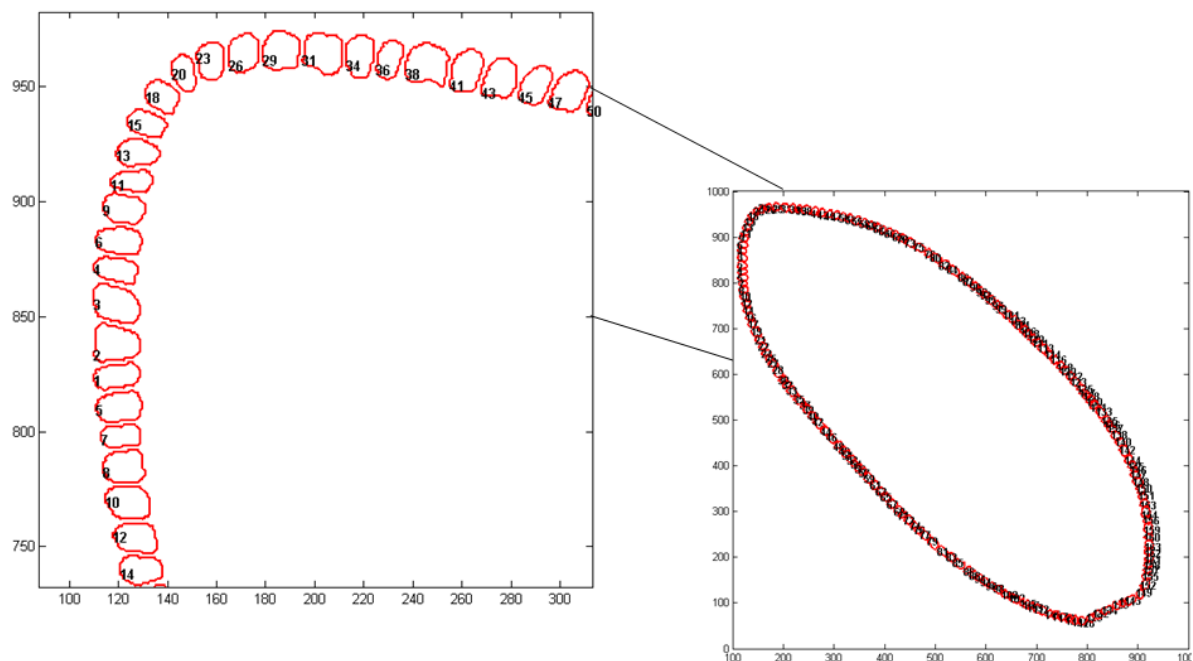


Figura 6.5: Exemplo gráfico da rotulação inicial dos núcleos celulares em uma amostra de embrião da *Drosophila melanogaster*. Note que os números (rótulos) associados aos núcleos não obedecem uma ordem sequencial, i.e., núcleos vizinhos possuem rótulos não necessariamente sequenciais.

mente, inferir a sua ordem de vizinhança. As definições e teoremas relacionados ao filtro implementado podem ser melhor compreendidos na literatura [Gois 2004, Amenta et al. 1998].

Com o valor obtido dessa etapa, cada componente conexo foi novamente rotulado, nesse ponto, em uma ordem sequencial, conforme pode ser observado na Fig.6.6.

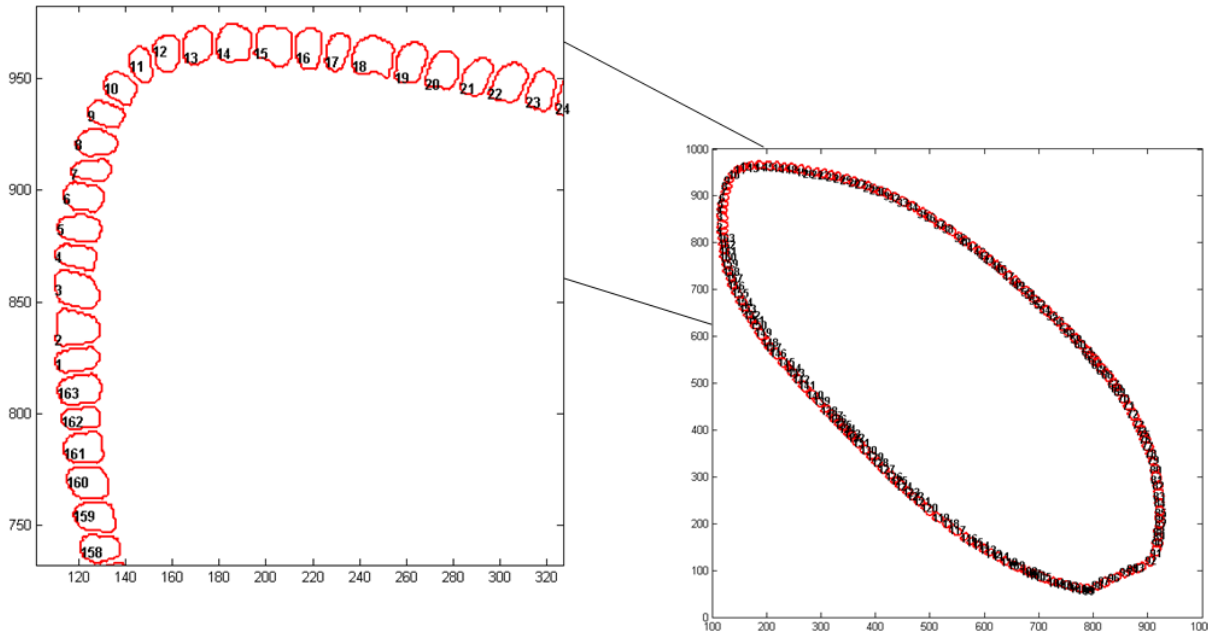


Figura 6.6: Exemplo gráfico da rotulação final dos núcleos celulares em uma amostra de embrião da *Drosophila melanogaster*. Nessa fase, note que os números (rótulos) associados aos núcleos obedecem uma ordem sequencial.

Com a imagem corretamente rotulada inicia-se o segundo passo, que tem como objetivo efetuar o reposicionamento dos componentes conexos na nova configuração linear. Para obter uma padronização no alinhamento e distribuição dos núcleos celulares, foi necessário definir um ponto de partida, isto é, o núcleo a partir do qual, o reposicionamento será iniciado. Para isso, utilizou-se a técnica estatística PCA (descrita na seção 3.6). A PCA foi aplicada visando encontrar os componentes “principal” e “secundário”, que melhor se ajustam ao conjunto de pixels que forma a imagem analisada. O componente principal corresponde ao eixo de maior variância dos dados, e o componente secundário define o eixo de segunda maior variância, sendo perpendicular ao primeiro.

O componente principal posiciona-se ao longo do eixo anterior-posterior (AP) dos embriões de *Drosophila*, e aponta no sentido da região posterior, visto que, o início da região anterior (pertencente à cabeça) possui um aspecto geométrico mais afinado, com menor variabilidade de dados. Por outro lado, o componente secundário indica o eixo dorsal-ventral (DV), e pode apontar o sentido superior ou inferior dos embriões, de acordo com a variação dos dados. A Fig.6.7 ilustra o esquema descrito. Vale observar que em algumas imagens sagitais o vetor principal acaba apontando para região anterior do

embrião. Isso ocorre pois alguns embriões não apresentam uma distinção morfológica no eixo AP tão evidente quanto à apresentada na Fig.6.7.

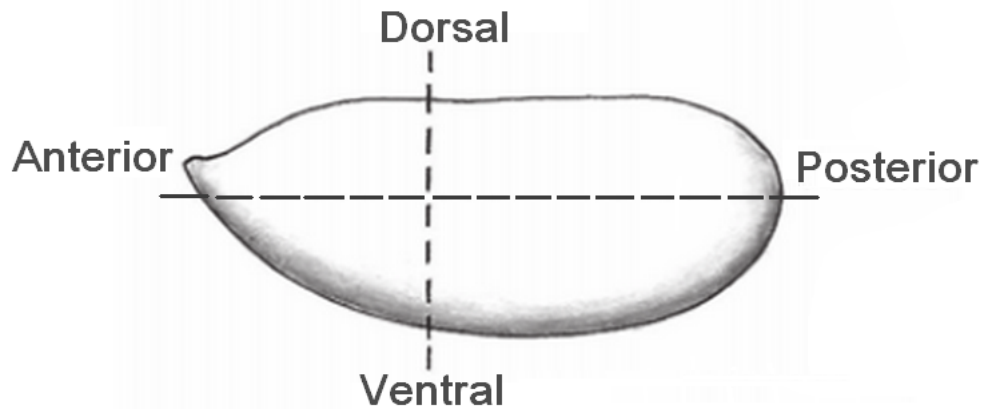


Figura 6.7: Embrião de *Drosophila* com indicação dos eixos anterior-posterior (AP) e dorsal-ventral (DV). O eixo AP se divide em cabeça, tórax e abdômen da larva. É possível verificar na região da cabeça um aspecto geométrico mais afinado. Os eixos descritos podem ser determinados por meio da técnica PCA. Figura adaptada de [Fernandez 2003].

Nesse caso, visando iniciar o reposicionamento dos núcleos pela região anterior do embrião, considerou-se o eixo principal em seu sentido contrário, de forma que fosse apontado a região anterior do embrião. A partir dessa etapa, para cada imagem, definiu-se como ponto de partida o objeto binário mais próximo ao eixo principal. Esse cálculo baseou-se na análise do ângulo formado entre o “vetor principal” ($-\vec{V}_p$) em relação aos “vetores núcleos” ($\vec{V}_{n_i}$), isto é, um vetor construído considerando-se a subtração entre as coordenadas do centróide do embrião (C) pelas coordenadas do centróide de cada núcleo celular (Cn_i), tal como ilustrado na Fig.6.8, os “vetores núcleos” variam de 1 ao total de núcleos, onde i é o rótulo do núcleo na imagem. O menor ângulo θ encontrado entre o vetor $-\vec{V}_p$ e os vetores $\vec{V}_{n_i}$ define o ponto de partida.

Outro problema comum encontrado nessa etapa foi a inclinação dos objetos segmentados, tendo em vista que os núcleos apresentam inclinações diferentes, conforme ilustrado na Fig.6.9. No intuito de abordar esse problema, foi realizada a rotação dos mesmos, de forma que todos ficassem na posição vertical, possibilitando, com isso, uma padronização na nova configuração. Isso é feito encontrando o eixo principal de cada núcleo e alinhando-o ao eixo vertical.

Por fim, os núcleos ficam dispostos ao longo de uma linha horizontal. A distância entre eles é a mesma que eles possuem no embrião. A Fig. 6.10 mostra os resultados para vários embriões. Essa nova configuração permite ao pesquisador observar detalhes da variação de intensidade luminosa existente em cada componente conexo, isto é, a variação do nível de expressão em cada núcleo celular.

Essa forma de visualização é vantajosa pois é compacta, e permite mostrar de uma

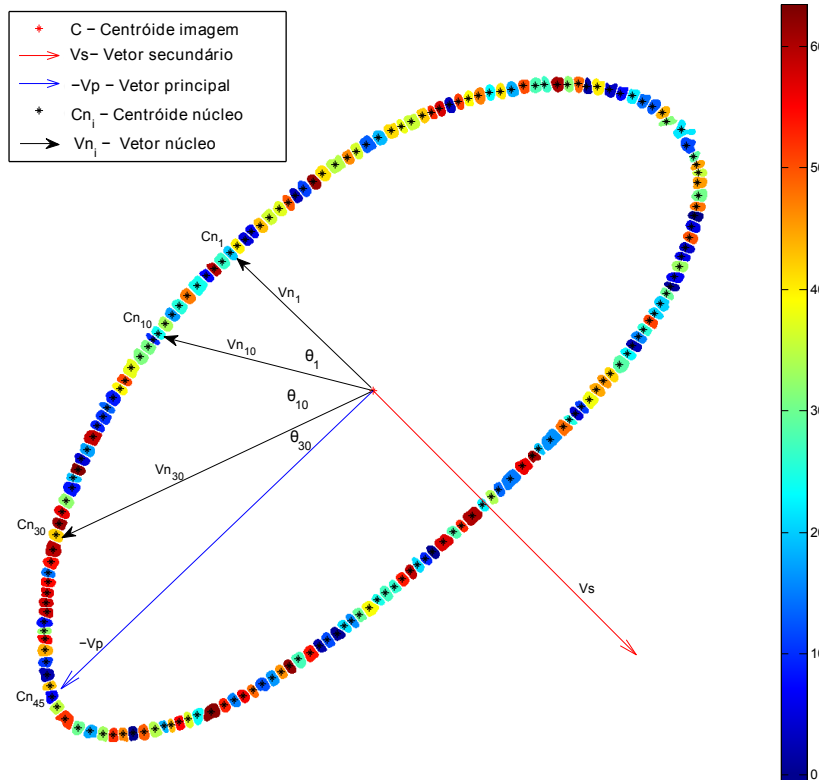


Figura 6.8: Ilustração do cálculo realizado para definição do ponto de partida, isto é, o primeiro núcleo a ser inserido na configuração de visualização linear. O exemplo demonstra a análise do ângulo para quatro núcleos aleatórios, cujos centróides são Cn_1 , Cn_{10} , Cn_{30} e Cn_{45} . Neste caso, o núcleo com centróide de índice 45 (Cn_{45}) apresenta o menor ângulo θ , sendo considerado o núcleo mais próximo ao vetor $-\vec{V}_p$, e portanto, definido como o ponto de partida. Note que, o ângulo entre o vetor núcleo (Vn_{45}) e o vetor principal ($-\vec{V}_p$) é praticamente nulo, e, por isso, o vetor Vn_{45} não é mostrado na figura.

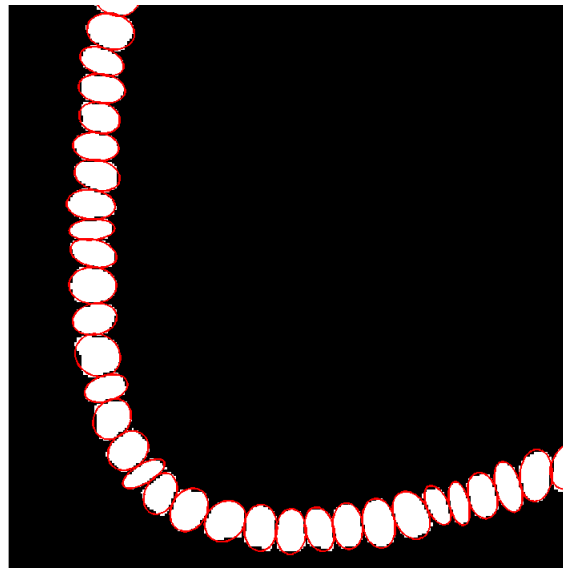


Figura 6.9: Ilustração ampliada da região anterior de um embrião de *Drosophila* exibindo diferentes inclinações dos núcleos celulares.

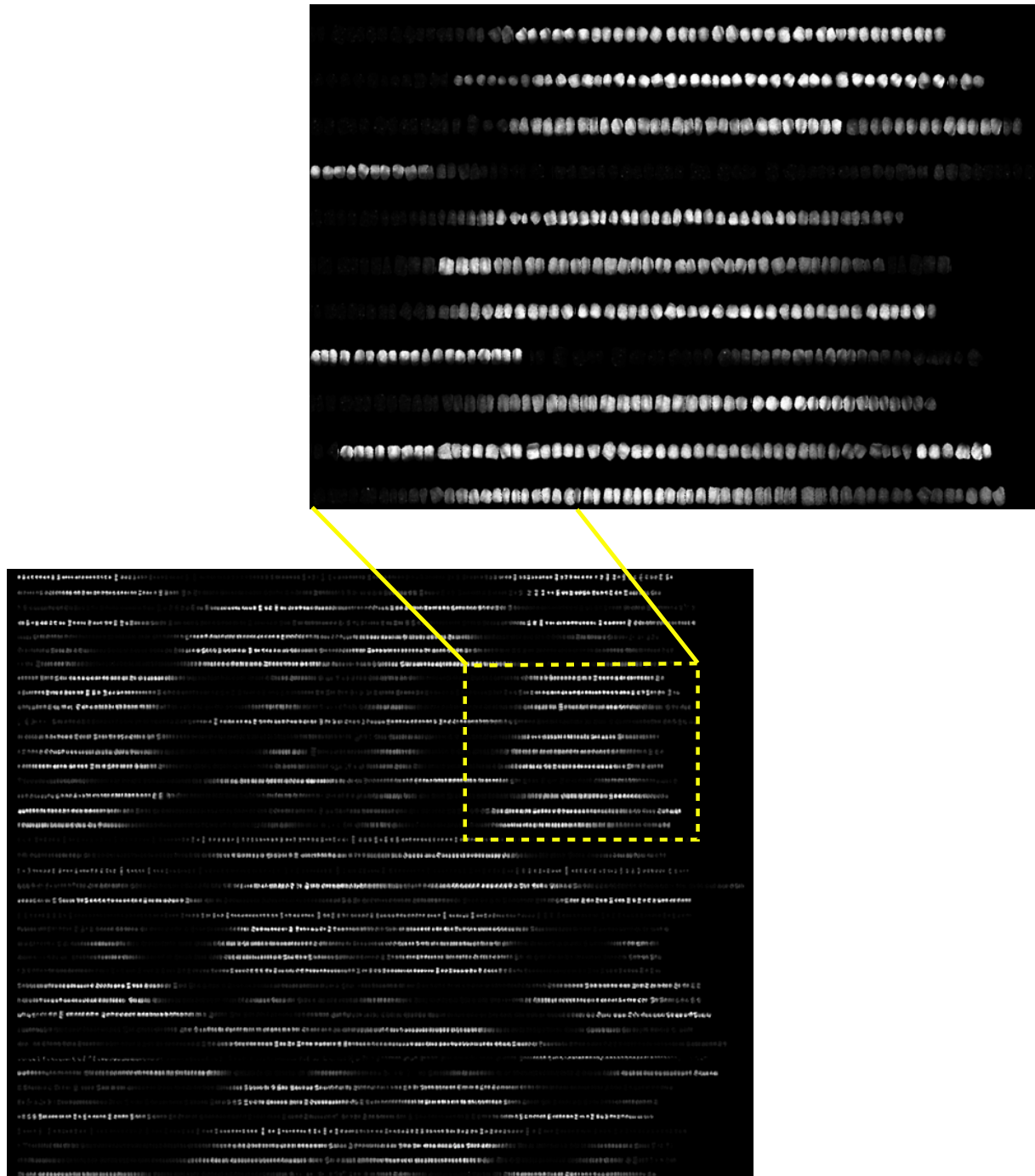


Figura 6.10: Representação esquemática da nova configuração de visualização nuclear. Cada linha representa uma imagem de embrião da *Drosophila*, onde cada núcleo é redistribuído horizontalmente e sequencialmente na nova matriz.

só vez, dezenas de embriões. Permite também comparar os padrões de expressão de diferentes embriões, facilitando a análise e interpretação dos dados. Essa visualização pode ser ainda melhorada, levando em consideração o perímetro do embrião, de forma a normalizar o tamanho total do embrião mostrado de forma linear, e também aprimorando a forma de detecção do eixo AP. Essa técnica também pode ser prontamente estendida para considerar a região citoplasmática dos embriões.

Capítulo 7

Resultados e Discussão

Neste trabalho foram desenvolvidos algoritmos computacionais orientados para o estudo do desenvolvimento embrionário da *Drosophila melanogaster*, os quais auxiliam o estudo de diferentes investigações sobre esse importante modelo biológico. A partir disso, propôs-se uma abordagem para análise computacional de imagens referentes à blastoderme sincial de embriões da *Drosophila*, na qual, tais imagens podem ser tratadas, segmentadas e interpretadas, a partir de diferentes técnicas de processamento digital.

7.1 Etapa de pré-processamento

A etapa de pré-processamento objetivou melhorar as imagens, visando torná-las mais adequadas para uma aplicação específica. O pré-processamento envolveu, basicamente, duas tarefas, sendo (a) isolamento do embrião principal e (b) tratamento das imagens por técnicas de filtragem e realce.

Conforme descrito na Seção 5.3.1, a operação (a) objetivou padronizar a base de dados, ou seja, preparar as imagens de modo que, cada uma contenha a expressão somente do embrião de interesse. A sequência de operações abordada (apresentada na Seção 5.3.1) permite alcançar o objetivo definido.

Por outro lado, a operação (b) buscou reduzir os ruídos e manipular o contraste das imagens. A seção seguinte apresenta alguns resultados obtidos e detalhes de implementação.

7.1.1 Tratamento das imagens

O tratamento das imagens objetivou modificar os valores dos pixels da imagem, por meio da utilização de filtros de suavização e técnicas de realce. A aplicação de filtros de suavização visou reduzir os ruídos, sem comprometer informações importantes, tais como a forma dos objetos. Nas imagens analisadas, considerou-se como ruído os pixels com valores discrepantes, os quais geram um aspecto granuloso no interior e nas proximidades

dos núcleos celulares (Fig. 7.1). Em tais casos, o filtro Gaussiano mostrou-se mais apropriado para a filtragem.

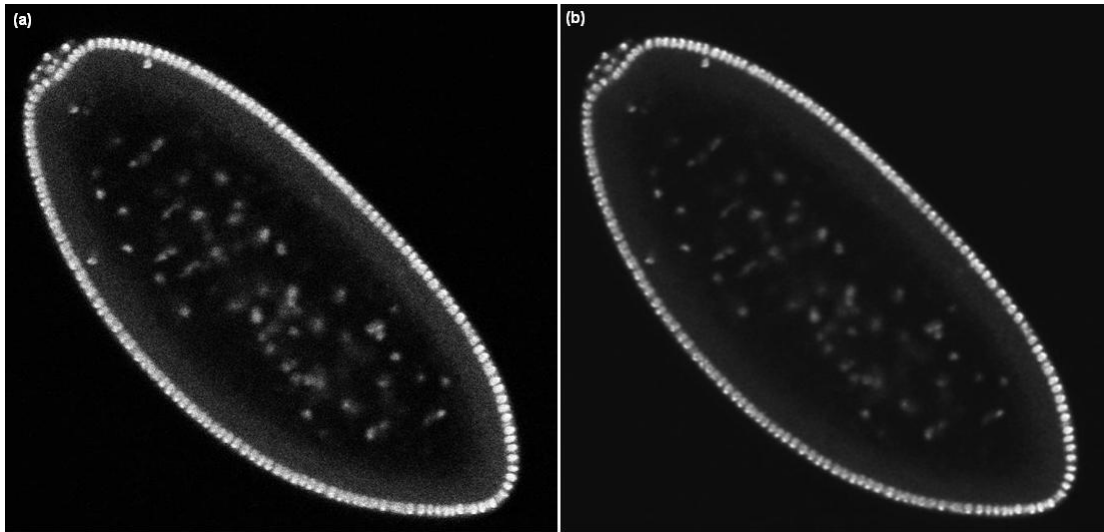


Figura 7.1: (a) Imagem original degradada por ruído, característico por apresentar variações de intensidade no sinal da imagem, gerando a aparência de “chuvisco”, especialmente nas regiões de interesse (núcleos celulares). (b) Resultado da imagem após a aplicação do filtro Gaussiano. É possível perceber a suavização do ruído, o que permite obter melhores resultados na etapa de segmentação.

Conforme descrito na Seção 5.3.2 são necessários dois parâmetros para a filtragem Gaussiana, a dimensão da janela e um valor para o desvio padrão σ . O desvio padrão definido para a aplicação em estudo foi $\sigma = 2$. Esse valor permitiu manter o equilíbrio entre a suavização do ruído e perda de informações. Usualmente, o tamanho da máscara depende do tamanho dos objetos em estudo. Para o caso em questão, definiu-se um filtro de tamanho 5×5 , com os valores da máscara definidos pela função Gaussiana discreta (Eq.3.13). Quanto maior as dimensões da máscara, maior a abertura do filtro e maior a suavização da imagem. As Figs. 7.2(a)-7.2(c) mostram o resultado do filtro Gaussiano com diferentes tamanhos de máscaras.

É possível observar que valores maiores no tamanho da máscara provocaram um borramento excessivo, o que faz perder a forma geométrica dos objetos. Os parâmetros escolhidos para o processamento das imagens foram ideais, uma vez que permitiram eliminar o aspecto serrilhado e detalhes espúrios nos objetos.

Ainda com relação à transformação (b) aplicaram-se as técnicas Realce Linear e Filtragem morfológica. A técnica Realce Linear permitiu ajustar o brilho e contraste das imagens, por meio da função de mapeamento linear (Eq.3.12), descrita na Seção 3.2.1. As imagens da Fig. 7.3 demonstram o resultado da técnica em duas amostras de imagem.

Foram selecionadas para realce as imagens suavizadas pela filtragem gaussiana. O valor ajustado para o brilho, referente à base de imagens utilizada nesse trabalho, foi $b = -10$. Esse valor influenciou, especificamente, os pixels com baixos valores de intensidade

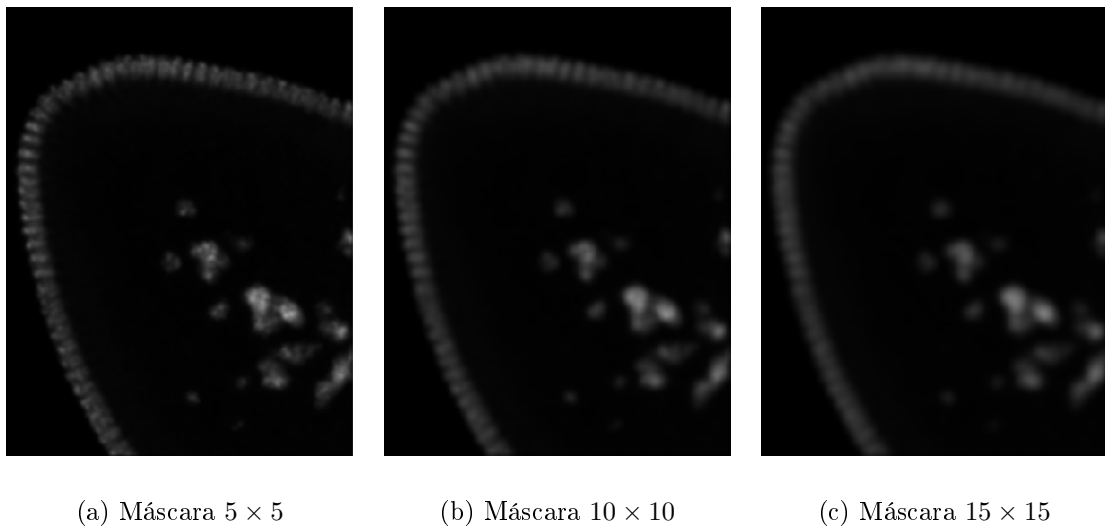


Figura 7.2: Suavização gerada usando um filtro Gaussiano com tamanho da janela (a) 5×5 , (b) 10×10 e (c) 15×15 .

luminosa. Tais pixels são característicos da região circundante aos núcleos celulares. Esta etapa melhorou significativamente os resultados da segmentação, onde a presença de objetos irregulares foi amplamente reduzida.

Por fim, aplicou-se a Filtragem Morfológica, a qual visou melhorar o contraste das imagens degradadas pela fraca condição de iluminação. A filtragem morfológica permite realçar as regiões de interesse de uma imagem. Um exemplo simples da aplicação dessa técnica pode ser observada na Fig. 7.4.

Para o trabalho em questão, o operador de filtragem morfológica utilizado foi o *Top-hat*. Durante os experimentos realizados utilizou-se um ES com formato “disco” e raio 15. Em geral, os resultados mostraram a capacidade desse operador de ressaltar as regiões de picos das imagens, sem aumentar possíveis ruídos, mostrando-se útil para o realce da imagem antes da segmentação.

Em geral, o tratamento digital foi aplicado para garantir melhores resultados na etapa de segmentação. A sequência adotada permitiu melhorar o contraste, atenuar ou eliminar pixels considerados ruídos, bem como, possibilitou suprimir ou eliminar boa parte do *background* da imagem. Esse resultado pode ser observado na Fig. 7.5.

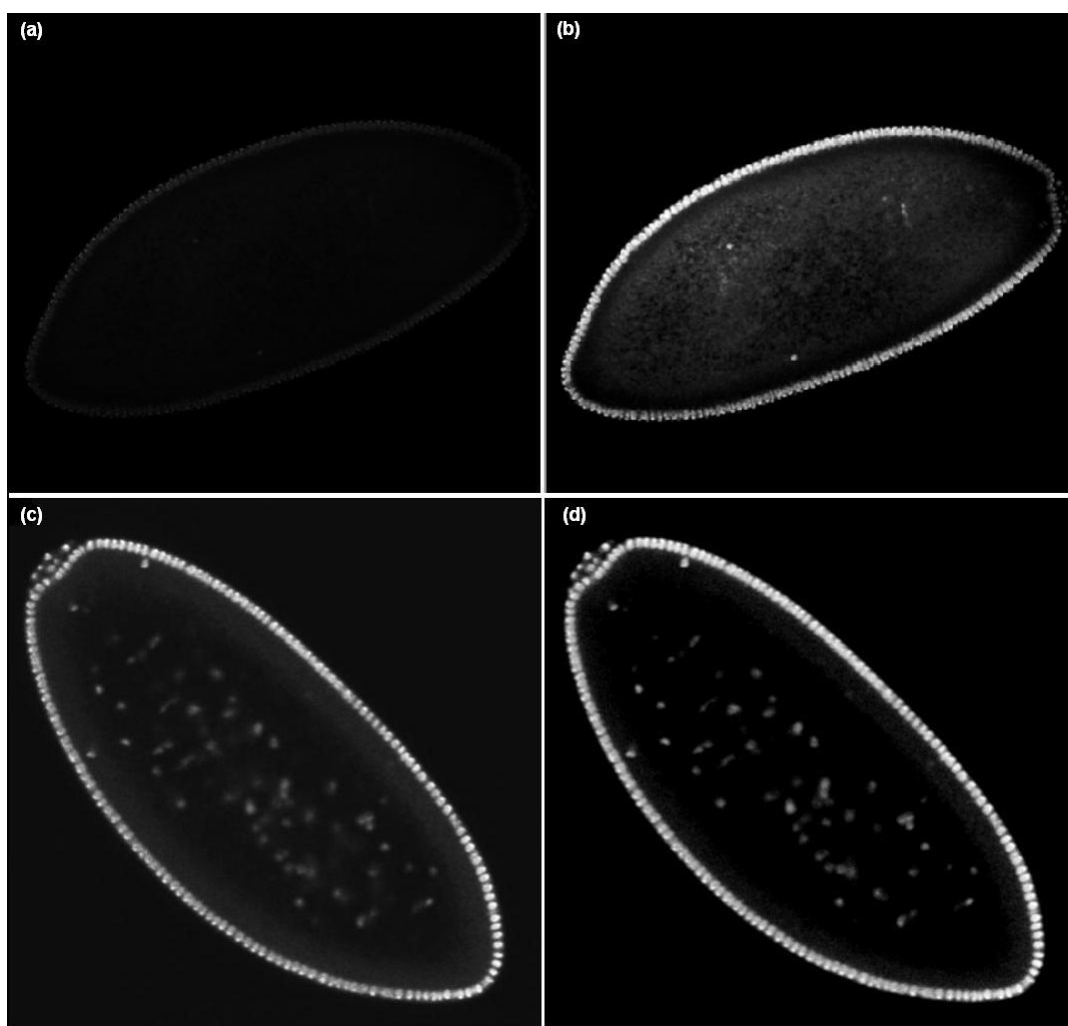


Figura 7.3: Resultado da técnica Realce Linear em duas imagens distintas. (a) e (c) são imagens originais contidas na base. Em (a) é possível verificar que a imagem possui baixo contraste e pouco brilho, dificultando distinguir os objetos do fundo da imagem. Já a figura (c) apresenta um alto brilho, o que aumenta a ocorrência de pixels com valores discrepantes de intensidade luminosa dispersos pela imagem. As figuras (b) e (d) exibem o resultado do processamento após a alteração do contraste e brilho, respectivamente.

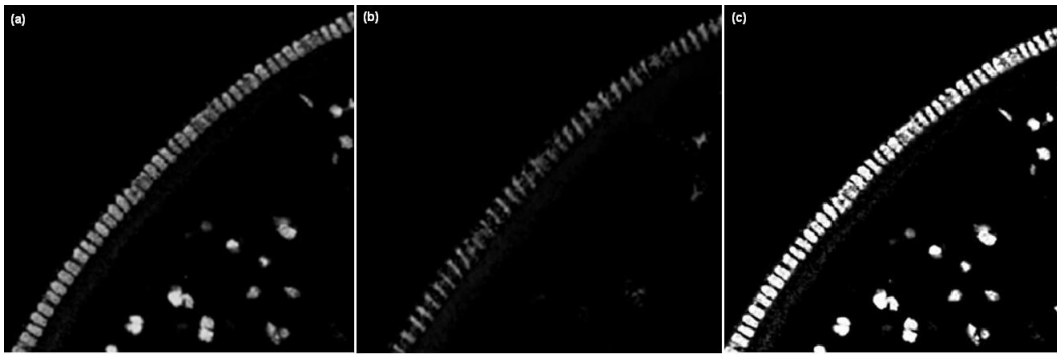


Figura 7.4: Resultado da filtragem morfológica. (a) Imagem resultante da transformada *top-hat*. É possível perceber o isolamento das regiões de máximo local (picos da imagem). (b) Resultado da transformada *bottom-hat*, em que se verifica o isolamento das regiões de mínimo local (vales) existentes na imagem. (c) Resultado expresso pela combinação das transformadas *Top-hat* e *Bottom-hat*.

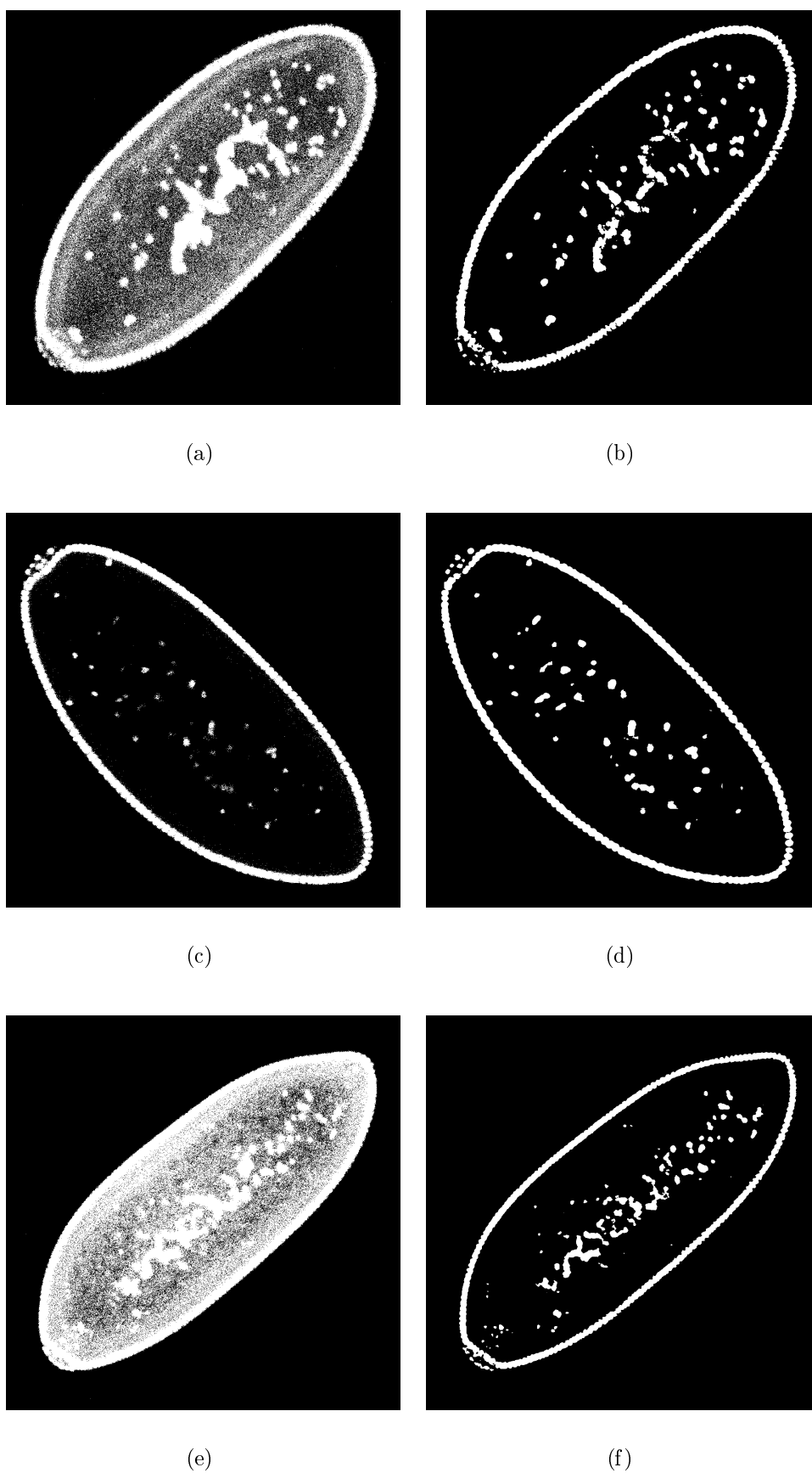


Figura 7.5: Influência do pré-processamento na etapa de segmentação. Resultado da binarização em três amostras de imagens, sem aplicação das técnicas de filtragem e realce ((a), (c) e (e)), e com aplicação dessas ((b), (d) e (f)).

7.2 Etapa de segmentação

A etapa de segmentação teve como objetivo a construção da máscara nuclear, isto é, uma imagem binária capaz de obter a forma individual dos núcleos celulares. A obtenção dessa máscara permite extrair os núcleos celulares (contidos em imagens da blastoderme sincial da *Drosophila*) de seu contexto, ou seja, separá-los do restante da imagem. Conforme descrito na Seção 5.1, a metodologia consiste nos tópicos apresentados na Fig. 5.1, e se baseia em dois passos principais, sendo (a) binarização da imagem e (b) pós-processamento.

Nessa seção são apresentados alguns testes que foram realizados para definir a etapa de binarização do método proposto, e também detalhes do processo de pós-processamento, o qual utiliza a curvatura do contorno dos objetos binarizados.

7.2.1 Resultados da binarização da imagem

A etapa de binarização consistiu, primeiramente, em um estudo e análise de tradicionais técnicas de segmentação existentes na literatura computacional, tais como Limiarização, Detecção de Bordas e Crescimento de Região. O objetivo foi investigar a existência de uma técnica capaz de gerar um bom limiar, para correta binarização das imagens.

Inicialmente verificou-se o desempenho dos algoritmos de limiarização global (a) manual e (b) iterativo, descritos na Seção 3.3.2. O resultado esperado foi obter uma clara definição dos objetos contidos na imagem (núcleos celulares), em que os pixels correspondentes ao fundo sejam representados pela cor preto e os pixels restantes pela cor branco. No entanto, observou-se que as técnicas descritas não foram suficientes para realização dessa tarefa. As variadas condições de iluminação das imagens dificultaram a busca manual por um limiar considerado adequado. Alguns valores com bom desempenho encontrados não se mostraram globalmente satisfatórios, uma vez que, quando aplicado ao conjunto total de imagens não foram capazes de ignorar as mudanças da intensidade de iluminação. Os resultados da limiarização global iterativo também não foram satisfatórios. Diversas imagens obtidas apresentaram formas bastante irregulares, conforme pode ser visto nas Figs. 7.6(a)-7.6(d).

Após os algoritmos de limiarização global, verificou-se o desempenho dos métodos para detecção de bordas da imagem. Os resultados apresentados pelas técnicas convencionais, como Roberts, Prewitt, Sobel e Canny não foram satisfatórios para o tipo de imagem tratadas nesse trabalho, conforme pode ser observado nas Figs. 7.7(a)-7.7(d).

Na grande maioria dos casos não foi possível extrair um conjunto de bordas fechadas para os objetos de interesse, ou seja, não se obteve o contorno esperado dos núcleos celulares. O problema recorrente nesse tipo de segmentação foi a presença de arestas (pixels) onde não existia fronteira do objeto (falsas arestas), bem como a ausência de arestas onde continha uma fronteira real do objeto. Esse fator deveu-se principalmente à

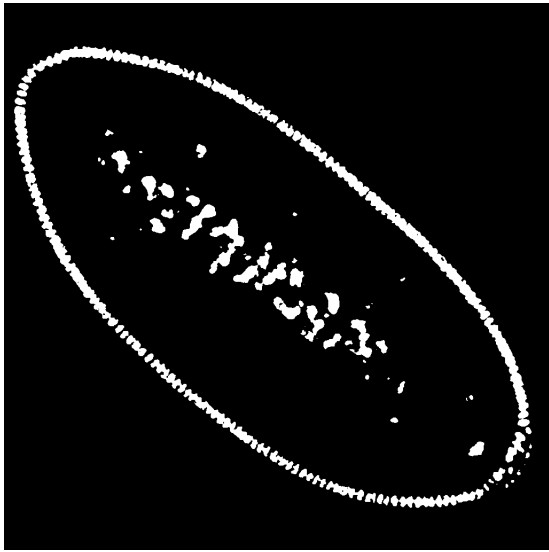
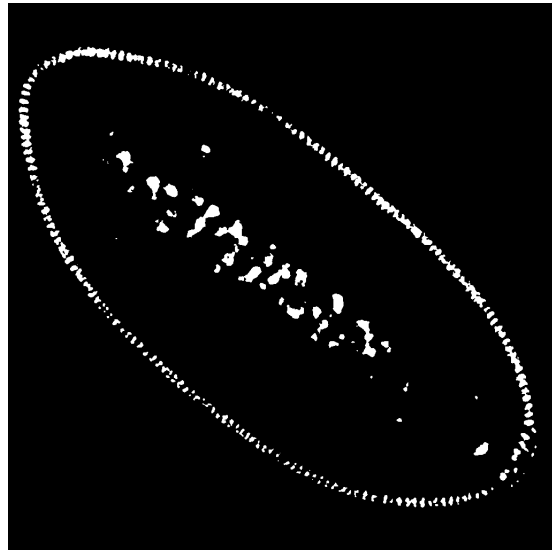
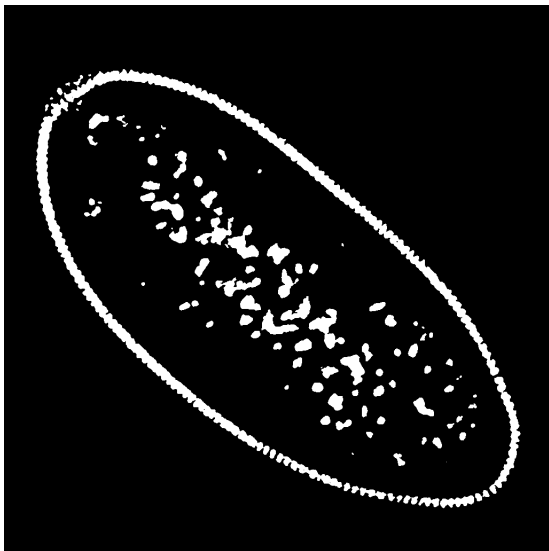
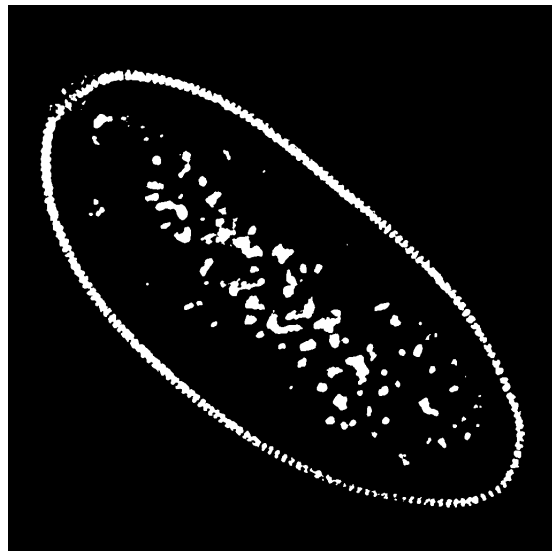
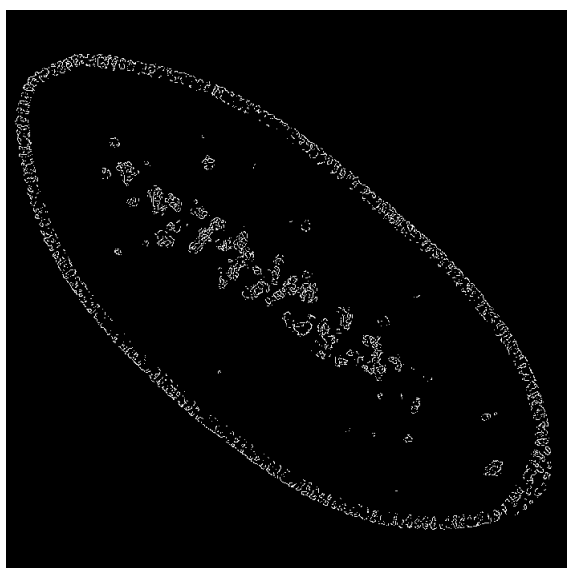
(a) Limiarização manual, com $T = 0.0900$ (b) Limiarização Iterativo, com $T = 0.1315$ (c) Limiarização manual, com $T = 0.1550$ (d) Limiarização Iterativo, com $T = 0.1959$

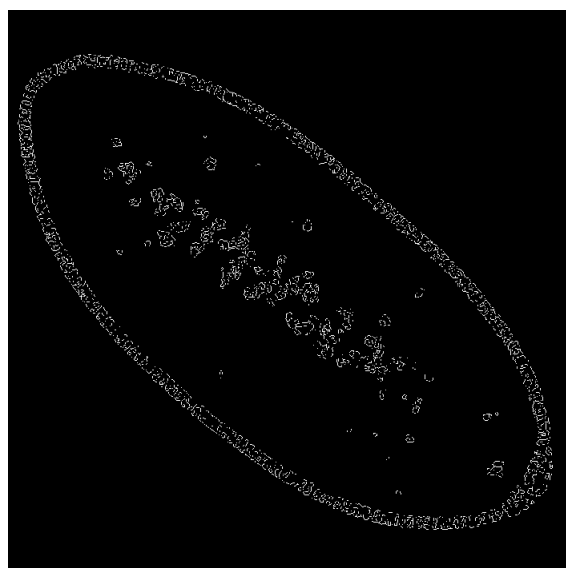
Figura 7.6: Resultado da limiarização global aplicada em duas amostras de imagem sagital da base. (a) e (c) *limiarização manual*, (b) e (d) *limiarização iterativo*.

textura da imagem, marcada pela não-uniformidade das regiões de interesse.

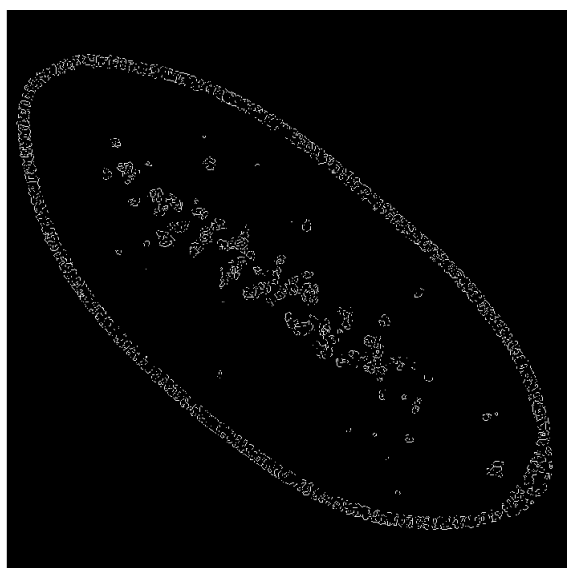
Consequente, o desempenho do método crescimento de região por *Watershed* foi avaliado. O algoritmo em questão foi estudado e implementado em duas abordagens distintas, sendo, (a) convencional e (b) gradiente morfológico. No caso da abordagem (a) aplicou-se o algoritmo proposto por [Meyer 1994], o qual se baseia no processo da transformada distância. A abordagem (b) foi utilizada visando encontrar melhores resultados na etapa de detecção dos contornos, através do operador gradiente morfológico convencional. Na prática uma realização direta da transformada *watershed* sobre a imagem gradiente produ-



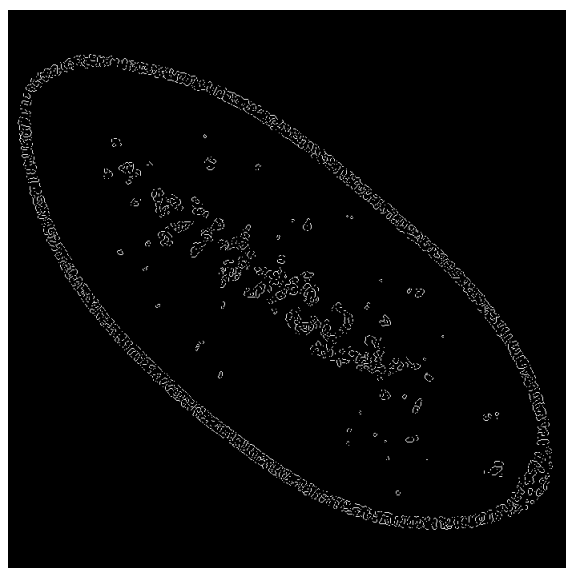
(a) Operador Roberts



(b) Operador Prewitt



(c) Operador Sobel



(d) Filtro de Canny

Figura 7.7: Resultados da detecção de bordas com base nos operadores de gradiente (a) Roberts, (b) Prewitt, (c) Sobel e (d) Canny.

ziu uma super segmentação, devido à presença de mínimos locais não significativos. Para reduzir esse problema aplicou-se um filtro morfológico formado por abertura e fechamento na imagem gradiente. Esse procedimento diminuiu consideravelmente os mínimos locais da imagem, no entanto, ainda assim permaneceu grande a taxa de super segmentação. O resultado da aplicação das duas técnicas pode ser conferido na Fig. 7.8.

Outro método de segmentação testado foi o Otsu, descrito na Seção 3.3.2, o qual usa um limiar global ótimo para maximizar a separabilidade entre as classes dos objetos.

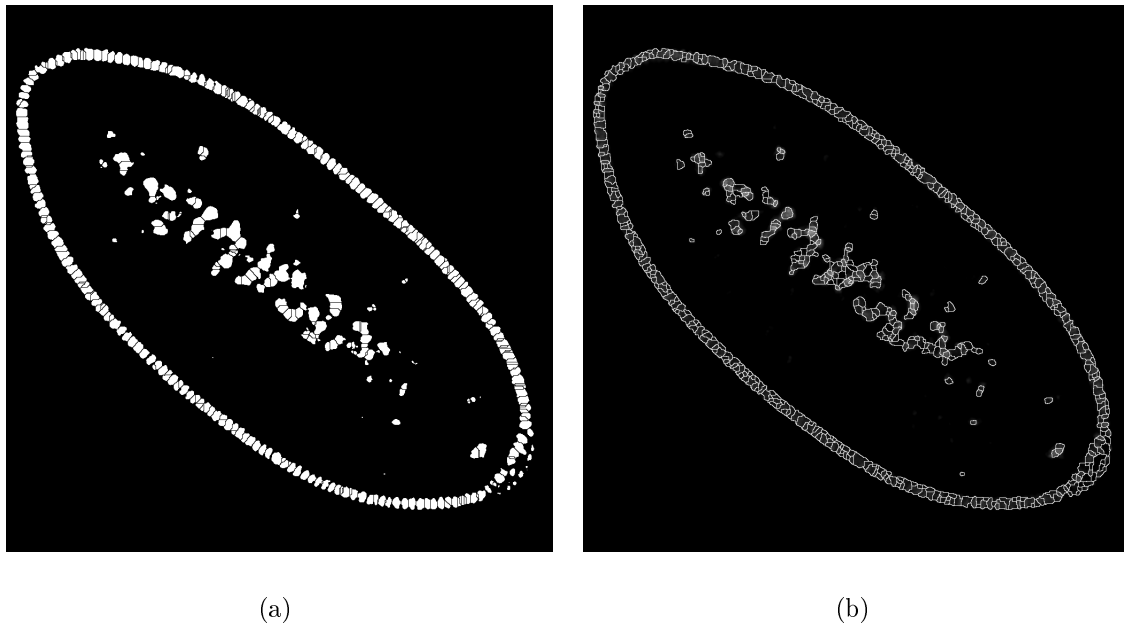


Figura 7.8: Resultado da segmentação por *Watershed*. Em (a) é apresentado o resultado do algoritmo convencional proposto por [Meyer 1994], baseado na transformada distância da imagem. Em (b) é exibido o resultado do algoritmo baseado no gradiente morfológico da imagem.

Este algoritmo também não obteve o resultado esperado, isto é, a construção eficiente da máscara de segmentação nuclear. Isto porque, ele não foi capaz de obter uma clara definição dos objetos contidos nas imagens. Os resultados mostraram uma grande parcela de núcleos agregados, os quais se deveram, principalmente, às condições de iluminação e às variações dos níveis de intensidade quando analisada a região de interesse das imagens. Por outro lado, o algoritmo Otsu apresentou os melhores resultados, no que se refere à conservação da forma dos componentes segmentados.

Detectar e analisar os núcleos celulares não se mostrou uma tarefa fácil. Características peculiares das imagens, tais como baixo contraste, grande variação na intensidade dos níveis de cinza e pequena distância entre os objetos de interesse dificultaram a obtenção de segmentação eficiente. Além disso, as imagens em estudo apresentam características diferentes uma das outras, como por exemplo, contraste, brilho e até mesmo a distribuição de ruídos. Durante os testes realizados, encontrou-se dificuldade, até mesmo para realizar a segmentação visual dos objetos.

Em geral, os métodos testados não identificaram um limiar capaz de realizar a binarização esperada em todas as imagens da base. O que corrobora com os resultados obtidos em [de Sousa et al. 2012], isto é, a inviabilidade da aplicação isolada das tradicionais técnicas de segmentação na tarefa de construção da máscara de segmentação nuclear, referente às imagens da superfície de embriões da *Drosophila melanogaster* (a nível celular).

Dentre os métodos testados, o que apresentou a melhor relação entre desempenho e falhas foi o método Otsu. Por isso, foi o método escolhido para realizar a etapa (a)

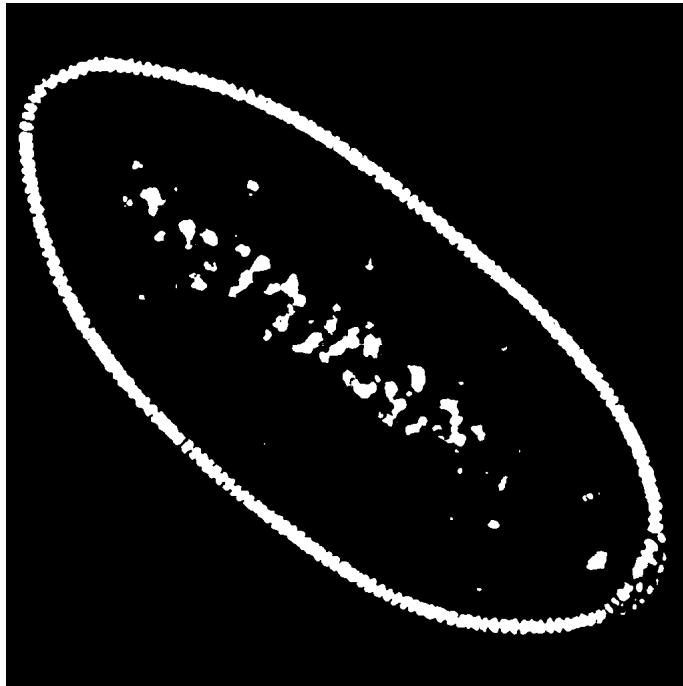
da metodologia proposta, isto é, a *binarização da imagem*. Considerando a iluminação irregular das imagens, advinda da marcação diferenciada dos padrões de expressão gênica, ou da falta de padronização no processo de captura, aplicou-se o algoritmo Otsu com limiar local. Essa abordagem divide a imagem pré-processada em sub-imagens $M \times N$ (retângulos não sobrepostos), e para cada região define-se um valor de limiar ótimo. As imagens foram divididas em blocos de tamanho 256×256 . Esse valor foi útil para suprir os problemas ocorridos na limiarização global, conforme pode ser observado na Fig.7.9.

A segmentação local por Otsu preservou melhor a forma dos objetos binarizados, no entanto, não permitiu a separação total dos núcleos celulares, tendo em vista, a grande parcela de núcleos celulares agregados, conforme exemplificado na Fig.5.7. Objetivando solucionar esse problema, aplicou-se a etapa (b), i.e., *pós-processamento*. A metodologia adotada para realização dessa tarefa consiste na sequência de passos descrita na Seção 5.4. A seção seguinte apresenta os resultados obtidos após a aplicação dessa etapa.

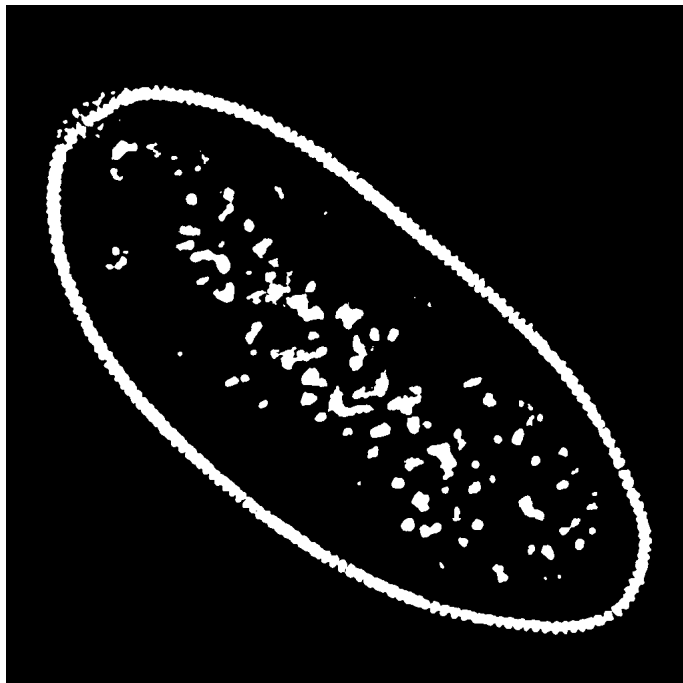
7.2.2 Resultados do pós-processamento

A fase de pós-processamento baseou-se, primeiramente, na estimativa de curvatura $k(t)$ dos contornos de núcleos celulares agregados. Conforme descrito na Seção 5.4.2, o cálculo foi realizado por meio do método de diferenciação numérica através da transformada de *Fourier*. O filtro Gaussiano (no domínio da frequência), incorporado após o processo de diferenciação, mostrou-se suficiente para controlar a influência de ruído no sinal $k(t)$. O grau de suavização adotado foi $\sigma = 5$, o qual permitiu destacar os pontos de curvatura negativa mínima, conforme demonstrado na Fig.7.10. Esse valor foi grande o suficiente para filtrar os ruídos, e o menor possível para não remover detalhes de pequena escala que indicam o local de união dos núcleos celulares agregados, em relação ao restante dos pontos da curva. A adoção de escalas muito altas ou muito baixas implicam numa filtragem incorreta do contorno, o que diminui a precisão da identificação das inflexões (picos ou vales) da imagem. Os resultados apresentados nas Figs.7.11(a) e 7.12(a) são obtidos a partir da variação do parâmetro σ .

Em geral, o método proposto permitiu obter eficientes e precisas máscaras de segmentação nuclear, em que o problema de núcleos clusterizados é eliminado, ou amplamente minimizado. A solução obtida constitui uma nova solução para o cenário abordado, sendo robusta a variações de rotação e translação.

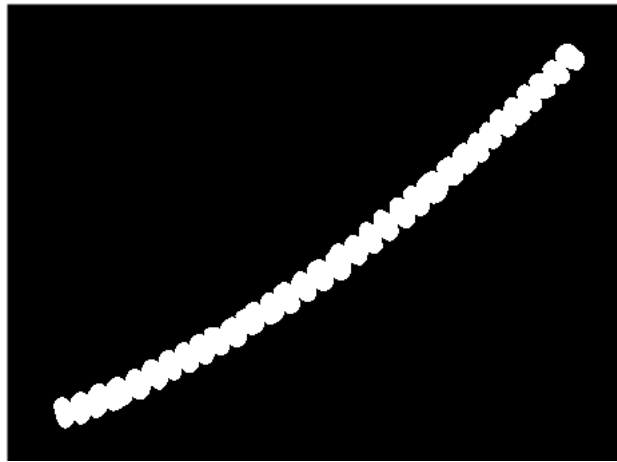


(a) Limiarização Otsu, com $T = 0.0706$

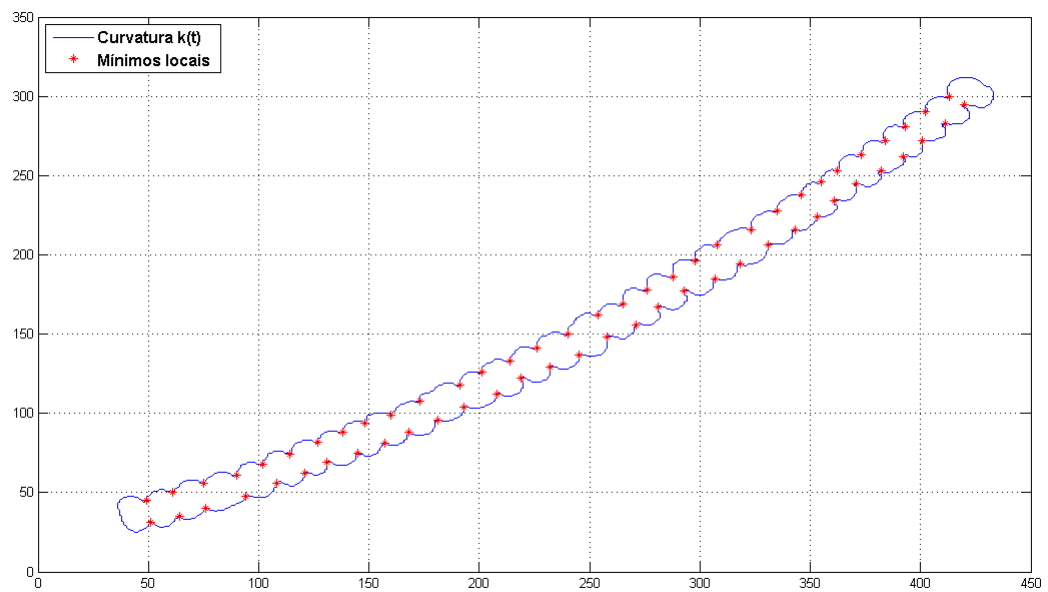


(b) Limiarização Otsu, com $T = 0.1451$

Figura 7.9: Resultado do método de segmentação Otsu, aplicado em duas imagens sagitais contidas na base.



(a) Imagem de entrada



(b) Representação do contorno da figura (a)

Figura 7.10: Representação de um contorno e seus pontos de mínimos locais. (a) Contorno referente a um agregado de núcleos celulares e (b) seus pontos de mínimos locais destacados, obtidos a partir de $\sigma = 5$.

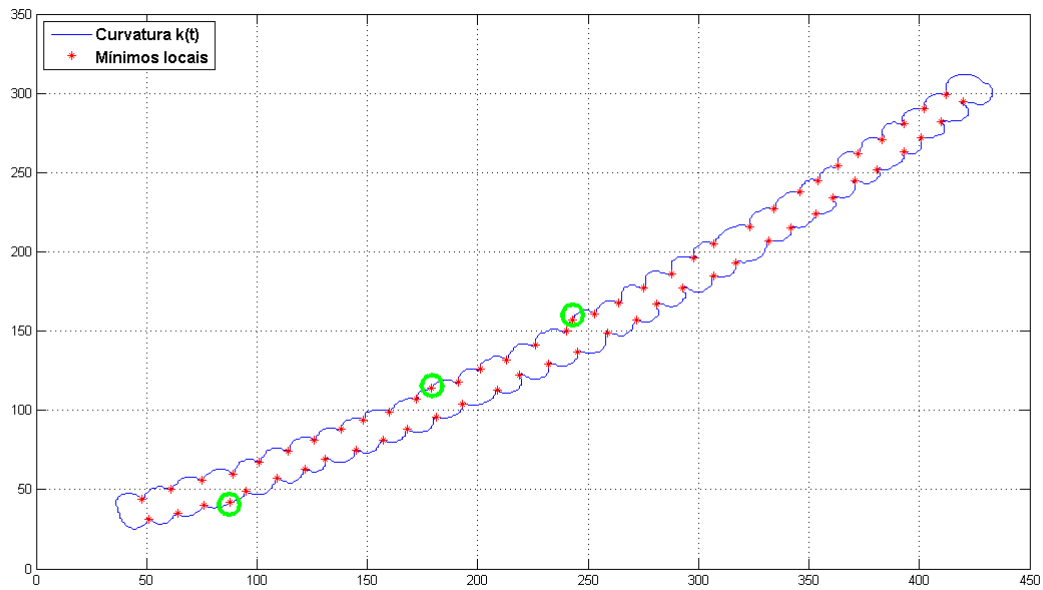
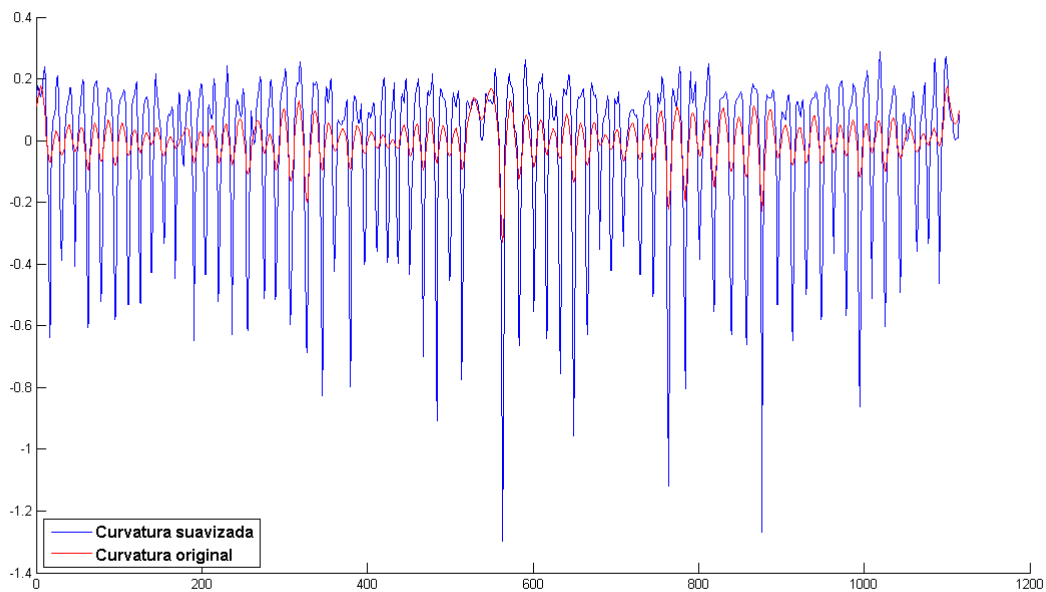
(a) $\sigma = 2$ (b) Comparação $\sigma = 5$ e $\sigma = 2$

Figura 7.11: Representação gráfica do contorno da figura (a) e seus respectivos pontos de mínimos locais, para um fator de suavização $\sigma = 2$ no cálculo da curvatura. Em (a) os círculos verdes destacam os pontos de mínimos locais incorretamente detectados, devido ao baixo valor do parâmetro de suavização. A figura (b) exibe a comparação entre dois sinais de curvatura, onde a linha vermelha representa o sinal de curvatura suavizado com o valor $\sigma = 5$, isto é, o valor escolhido para realização dos experimentos. Ao passo que, a linha azul exibe a curvatura suavizada com $\sigma = 2$.

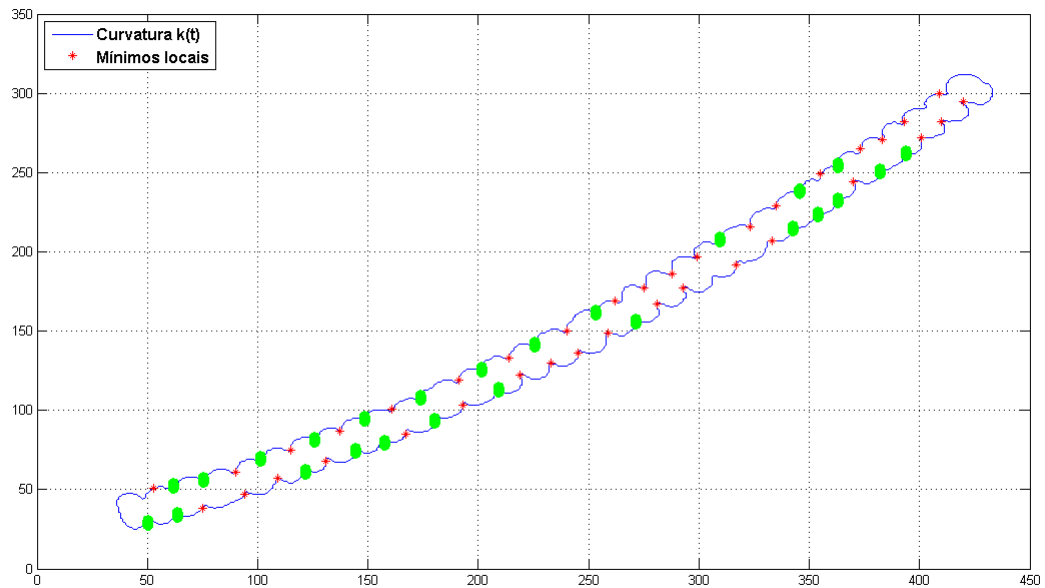
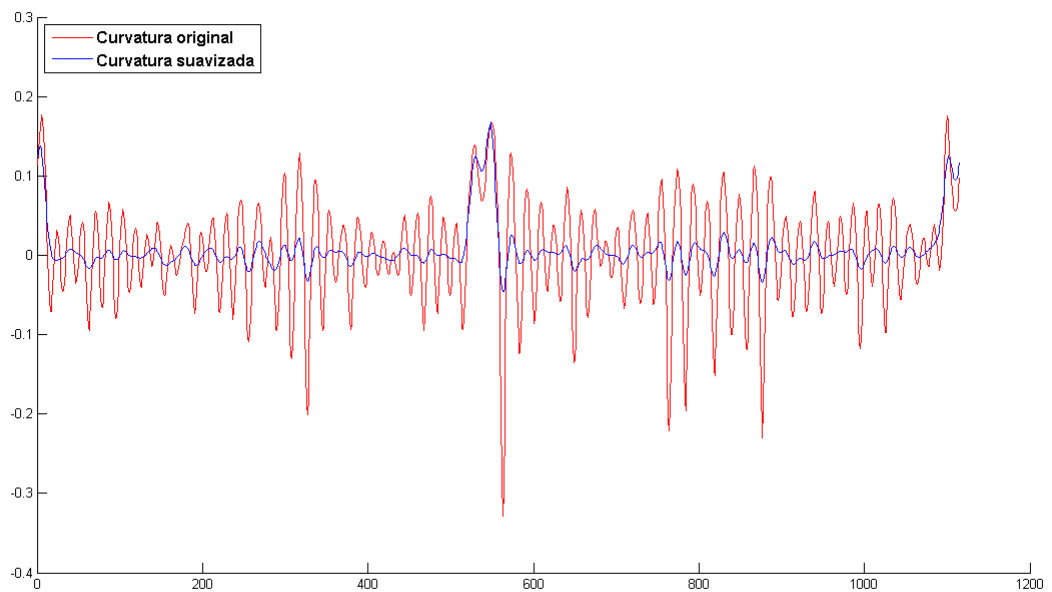
(a) $\sigma = 8$ (b) Comparação $\sigma = 5$ e $\sigma = 8$

Figura 7.12: Representação gráfica do contorno da figura (a) e seus respectivos pontos de mínimos locais, para um fator de suavização $\sigma = 8$ no cálculo da curvatura. Em (a), elipses preenchidas (na cor verde) identificam os pontos de mínimos locais que não foram detectados, quando era esperado. Em (b) apresenta-se uma comparação entre dois sinais de curvatura, onde a linha vermelha representa o sinal de curvatura suavizado com o valor $\sigma = 5$, isto é, o valor escolhido para realização dos experimentos. Ao passo que, linha azul exibe a curvatura suavizada com $\sigma = 8$.

7.3 Avaliação e análise comparativa dos resultados

Este capítulo apresenta os resultados do método de segmentação proposto. O objetivo é avaliar o desempenho do método na tarefa de identificação dos núcleos celulares contidos em imagens de padrões da expressão gênica da *Drosophila melanogaster*, bem como exibir os resultados finais das máscaras de segmentação nuclear obtidas e comparar com outras técnicas existentes na literatura.

7.3.1 Bases de dados

Foram utilizadas imagens bidimensionais da base de dados construída durante o desenvolvimento desse trabalho, conforme descrito na Seção 5.2. A base em questão reuniu um total de 126 imagens. Todas as imagens são constituídas por amostras de embriões relativas ao plano sagital, e coletadas durante a 14ª fase do ciclo de vida.

7.3.2 Métodos avaliados

Para assegurar a qualidade do método proposto seus resultados foram comparados com os resultados obtidos por quatro diferentes trabalhos existentes na literatura, dos quais citam-se Costa et al. [Ferreira Costa et al. 1997], Malpica et al. [Malpica et al. 1997], Kosman et al. [Kosman et al. 1999] e Anju Bala [Bala 2012]. Ambas as propostas abordam variações do algoritmo de segmentação *Watershed*, o qual tem sido considerado uma poderosa técnica para isolar e reconhecer núcleos celulares em imagens biológicas [Chan et al. 2012, Chen et al. 2012].

1. *Applying Watershed Algorithms to the Segmentation of Clustered Nuclei* ([Malpica et al. 1997])
2. *Cell nuclei segmentation in noisy images using morphological watersheds* ([Ferreira Costa et al. 1997])
3. *Automated assay of gene expression at celular resolution* ([Kosman et al. 1999])
4. *An Improved Watershed Image Segmentation Technique using MATLAB* ([Bala 2012])

[Malpica et al. 1997] descrevem um método para segmentação de núcleos contidos em imagens de microscopia fluorescente. O método proposto baseia-se no algoritmo *Watershed* com imposição de marcadores e em operações morfológicas simples. A propagação dos marcadores é feita através da transformação morfológica *H-dome*, a qual permite a detecção dos mínimos da imagem com base na intensidade dos pixels. O trabalho em questão provê uma ferramenta útil para aplicação em imagens transformadas pela técnica

gradiente morfológico ou transformada de distância, com bons resultados para os tipos de imagens testadas.

O trabalho de [Ferreira Costa et al. 1997] apresenta um método para segmentação de núcleos celulares em imagens digitais ruidosas. O trabalho consiste no algoritmo *Watershed* com uma estratégia para imposição de marcadores internos e externos, a qual se baseia em uma sequência de operações morfológicas. Diversos operadores são abordados, dentre os quais se citam filtros, transformada de distância, esqueleto por afinamento, gradiente morfológico e transformação top-hat. Os autores apresentam essa estratégia como uma, dentre as inúmeras soluções para o problema de super segmentação, muito comum em imagens ruidosas.

[Kosman et al. 1999] descrevem um método para análise automática de imagens biológicas da *Drosophila melanogaster*. O objetivo principal do trabalho é a segmentação dos núcleos celulares contidos em imagens obtidas da superfície dos embriões da *Drosophila*. Essa tarefa é realizada por meio de uma sequência de algoritmos, cuja etapa central baseia-se no algoritmo Shen Castan para detecção de bordas, e na Transformada de *Watershed* clássica para correção de possíveis erros. Operações morfológicas e filtros são aplicados durante o processo, a fim de melhorar os resultados. Esse método provê uma forma eficiente para quantificação dos perfis de expressão das amostras analisadas.

[Bala 2012] apresenta um método de segmentação que se baseia na técnica *Watershed* com imposição de marcadores. O método consiste em quatro etapas, sendo pré-processamento, extração de marcadores, imposição dos marcadores e segmentação. Os marcadores são extraídos da imagem original processada pelas operações “gradiente morfológico” e “abertura por reconstrução”. Na etapa de segmentação, o autor descreve ainda, o uso da transformada distância.

É válido mencionar que para realização dos experimentos tornou-se necessário implementar os métodos descritos. Dessa forma, os algoritmos necessários foram desenvolvidos conforme proposto pelos artigos [Malpica et al. 1997, Ferreira Costa et al. 1997, Bala 2012]. A exceção refere-se ao trabalho de [Kosman et al. 1999], tendo em vista que seu algoritmo é disponibilizado pelos autores.

7.3.3 Medidas de avaliação

O método de segmentação proposto foi avaliado quantitativamente e qualitativamente. A abordagem utilizada depende da comparação dos resultados por ele obtidos com uma imagem de referência. Essa imagem visa representar uma identificação adequada dos objetos presentes na cena. Entretanto, no caso das imagens tratadas nesse trabalho, não existe um acervo disponível para obtenção de imagens de referência, sendo necessário criá-las. As imagens de referência foram construídas com base em uma interpretação visual das imagens originais, onde cada núcleo foi devidamente marcado. Essa operação permitiu

estimar a quantidade total de núcleos celulares (QTN) de cada imagem de embrião contida na base. Por meio dessa medida foi possível comparar, numericamente, os resultados do método proposto com quatro diferentes trabalhos existentes na literatura, a partir dos parâmetros (a) núcleos corretamente segmentados, (b) núcleos unificados (c) núcleos ausentes e (d) núcleos super segmentados. Altos valores do parâmetro (a) evidenciam um bom desempenho do método analisado, ao passo que, valores altos dos parâmetros (b), (c) e (d) demonstram um baixo desempenho.

Para favorecer a realização de comparações, foi realizada uma sobreposição baseada em região de interesse. Esse procedimento permitiu estimar os parâmetros de avaliação citados acima. O esquema da Fig.7.13 demonstra o processo descrito.

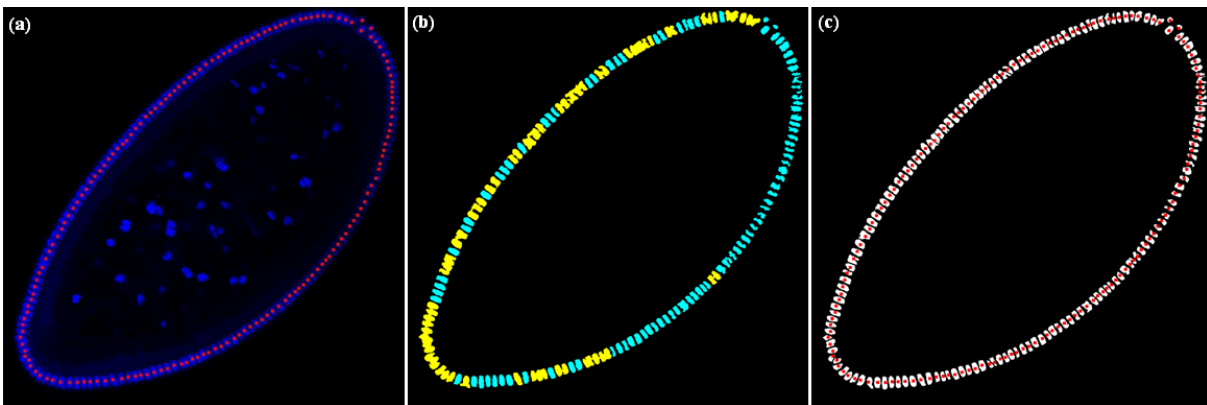


Figura 7.13: Sobreposição baseada em região de interesse para avaliação dos resultados obtidos. (a) Imagem original de um embrião de *Drosophila*. Cada marcação (pixel vermelho) identifica o local de um núcleo celular. (b) Resultado da binarização Otsu. Os componentes na cor amarela representam agregados de núcleos celulares, ao passo que, os elementos em ciano destacam os núcleos identificados isoladamente. (c) Resultado final do método de segmentação proposto. É possível observar que, para este exemplo, a máscara de segmentação obtida apresenta um núcleo para cada local marcado manualmente.

A qualidade final da máscara de segmentação foi também aferida visualmente, considerando-se adequada aquela com divisão precisa entre os objetos de interesse. Para isso, foi realizada uma sobreposição do contorno da imagem segmentada à imagem original, conforme ilustrado na Fig.7.14. Esse procedimento facilita a observação de detalhes importantes, tais como dimensão, preservação de formas e regularidade dos objetos segmentados.

A Tabela 7.1 sumariza o resultado quantitativo obtido. Esses valores foram alcançados a partir de experimentos computacionais em 10 imagens iniciais da base. Essas imagens contêm de 61 a 183 núcleos, sendo 1452 no total. O método apresentou, com relação ao número de núcleos, 94,4% de acerto.

A maioria dos núcleos foi corretamente identificada, uma vez que apenas 3,9% dos núcleos não foram devidamente separados (núcleos unificados). Estes foram o caso de blocos de núcleos agregados com regiões de vales indefinidas. Esta característica dificulta a localização dos mínimos locais de curvatura, impossibilitando a separação correta dos componentes.

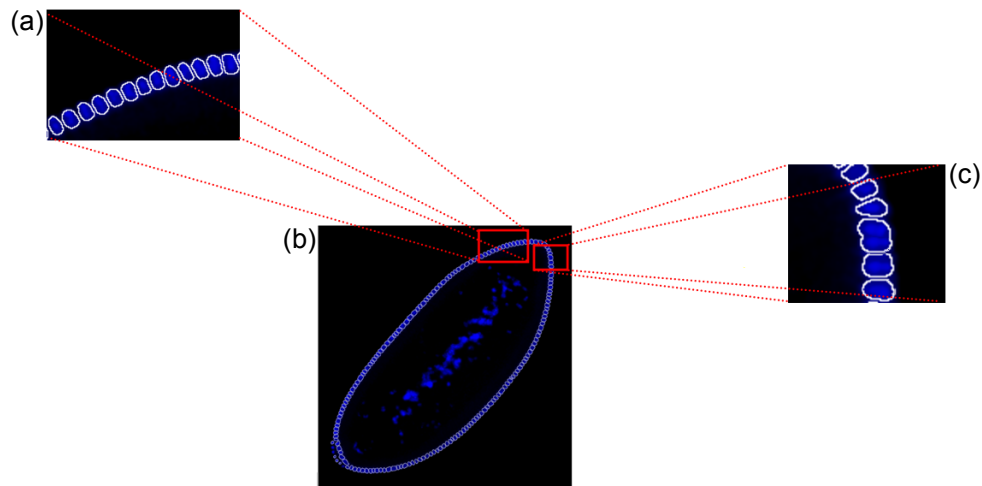


Figura 7.14: Avaliação qualitativa da máscara de segmentação nuclear. Em (b) é apresentado um embrião de *Drosophila* com a sobreposição do contorno da sua respectiva máscara de segmentação nuclear. A figura (a) demonstra um corte ampliado de uma região aleatória do embrião, em que é possível ver o contorno corretamente sobreposto aos núcleos celulares do canal DAPI. Por outro lado, a figura (c) amplifica uma região específica do embrião, em que é possível observar um erro da máscara de segmentação que representa um agregado de dois núcleos celulares, isto é, dois componentes que não foram separados no processo de segmentação.

Tabela 7.1: Resultados da aplicação do método proposto.

Núcleos corretamente segmentados	94,4%
Núcleos unificados	3,9%
Núcleos não-detectados	0,9%
Núcleos super segmentados	0,8%

Uma pequena porção de núcleos celulares, aproximadamente, 0,9%, não foi detectada com precisão (núcleos ausentes). Esse foi o caso de regiões da imagem com baixo contraste e fraca luminosidade, em que o algoritmo Otsu não foi capaz de identificar o núcleo.

A taxa de super segmentação (isto é, núcleos individuais que foram subdivididos em dois ou mais componentes) é muito baixa (0,8%). Esse fator destaca a eficácia do método proposto, principalmente quando comparado com técnicas baseadas em *watershed*.

É importante notar que a maioria dos erros verificados foi gerada a partir de imagens com pouca qualidade, e consequente baixo contraste nas fronteiras das regiões de interesse. Em tais imagens é difícil até mesmo a segmentação manual dos núcleos. Na Tab.7.2 é possível visualizar o resultado comparativo entre o método proposto e os similares estudados.

A escolha da abordagem de [Kosman et al. 1999] foi motivada por apresentar uma aplicação voltada à análise de imagens de padrões de expressão gênica da *Drosophila melanogaster*. Esse método foi utilizado na construção das máscaras de segmentação disponibilizadas pela base de dados FlyEx [Pisarev et al. 2009].

Tabela 7.2: Comparação da segmentação de núcleos celulares para diferentes métodos.

	1-Proposto	2-[Kosm99]	3-[Ferr97]	4-[Malp97]	5-[Bala12]
Segmentados	1371 (94,4%)	937 (64,5%)	680 (46,8%)	982 (67,6%)	1043 (71,8%)
Unificados	56 (3,9%)	48 (3,3%)	613 (42,2%)	192 (13,2%)	122 (8,4%)
Não-detectados	13 (0,9%)	200 (13,8%)	138 (9,5%)	247 (17,0%)	263 (18,1%)
Super segmentados	12 (0,8%)	267 (18,4%)	21 (1,4%)	31 (2,1%)	24 (1,7%)

A comparação do método desenvolvido com os trabalhos de [Ferreira Costa et al. 1997], [Malpica et al. 1997] e [Bala 2012] é justificada porque ambos apresentam variações do algoritmo *Watershed*. A pesquisa concluiu essa técnica como a abordagem mais utilizada para segmentação de núcleos celulares em imagens fluorescentes (2D ou 3D) [Peng 2008, Chen and Crowther 2012, Chan et al. 2012, Du and Dua 2010, Hukkanen et al. 2010, Cloppet and Boucher 2010].

O método de [Ferreira Costa et al. 1997], comparado aos métodos 2, 4 e 5 (Tab. 7.2) mostrou a menor taxa de super segmentação. Entretanto, ele gerou o maior número de núcleos agregados, principalmente em componentes com baixo contraste nas fronteiras de divisão.

O trabalho de [Bala 2012] obteve bons resultados na métrica 1 (Núcleos corretamente segmentados (Tab. 7.2)). Por outro lado, similarmente ao método de [Malpica et al. 1997], esse método mostrou grande porção de núcleos ausentes (18,1% - Tab. 7.2). Esses erros de binarização ocorreram devido à variação de intensidade dos pixels pertencentes aos núcleos, e por sua vez, dificultou a extração de marcadores para o algoritmo *Watershed*. Entretanto, vale observar que mesmo se esse problema não estivesse presente, o número de núcleos agregados apresentado por essas técnicas é bem alto.

Uma clara dificuldade com os trabalhos analisados é o esforço necessário para ajustá-los, por meio da seleção de parâmetros apropriados para as diferentes imagens. Em geral, os resultados dos experimentos mostram que o método proposto é mais eficaz e altamente competitivo, ambos qualitativo e quantitativo. Por meio da Fig.7.15 é possível comparar a máscara nuclear resultante do método proposto (Fig.7.15(f)) em relação aos similares abordados (Fig.7.15(b-e)).

Outros resultados obtidos podem ainda ser visualizados por meio das Figs.7.16-7.20, as quais exibem dez máscaras de segmentação nuclear resultantes da aplicação do método proposto em dez imagens da base.

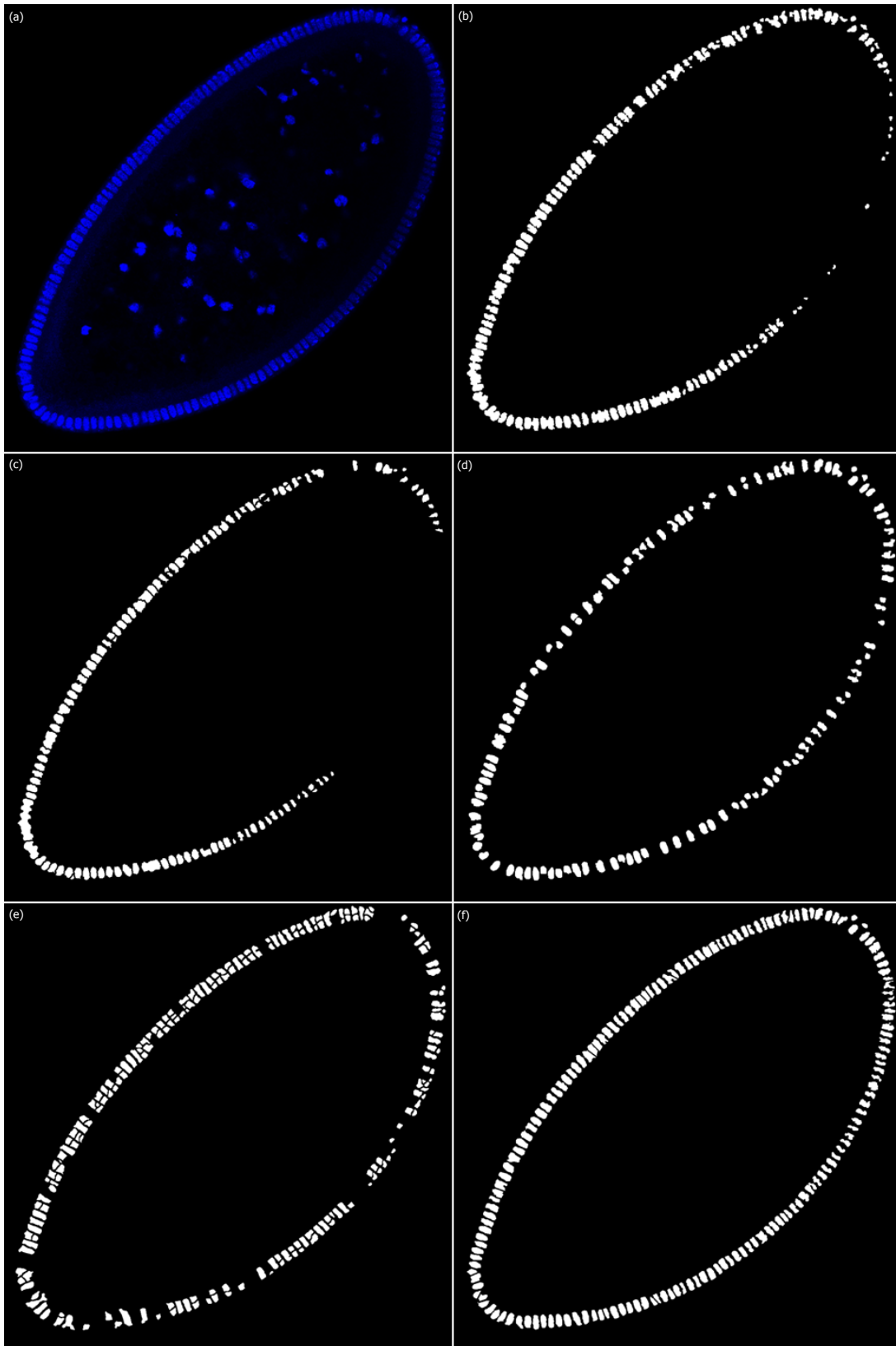
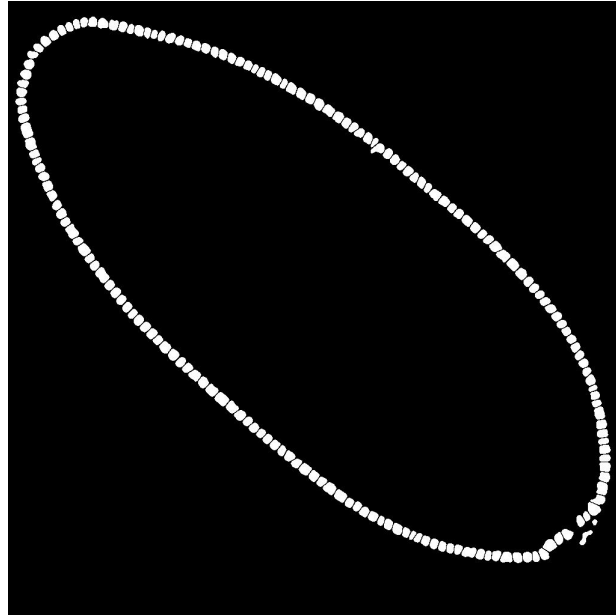
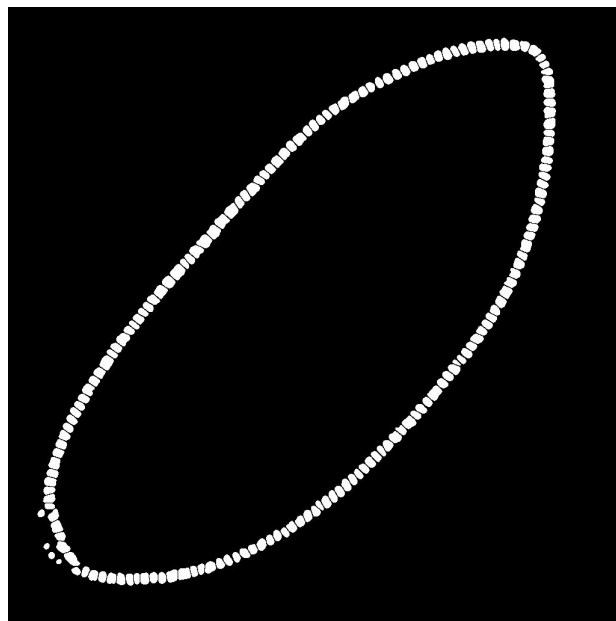


Figura 7.15: Resultado comparativo das máscaras de segmentação nuclear obtidas por diferentes técnicas. (a) Imagem original. (b) Resultado da segmentação obtida por [Ferreira Costa et al. 1997]. (c) Resultado da segmentação obtida por [Malpica et al. 1997]. (d) Resultado da segmentação obtida por Bala [Bala 2012]. (e) Resultado da segmentação obtida por [Kosman et al. 1999]. (f) Resultado da segmentação obtida pelo método proposto.



(a) Máscara nuclear 1

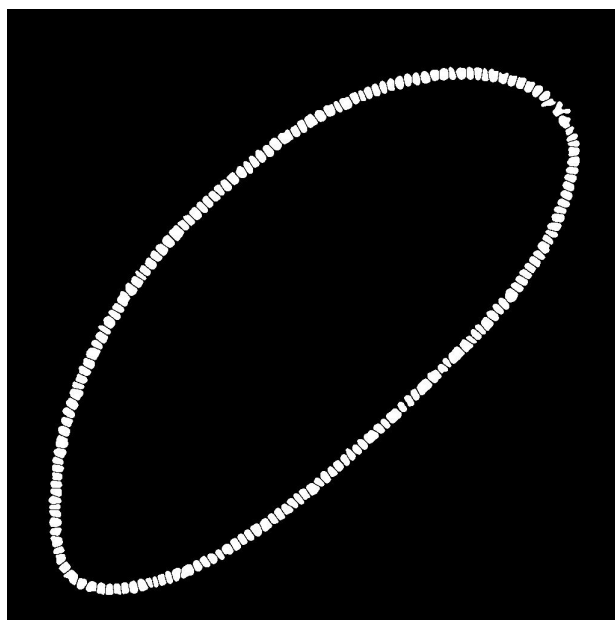


(b) Máscara nuclear 2

Figura 7.16: Resultado das máscaras de segmentação nuclear obtidos pelo método proposto.



(a) Máscara nuclear 3

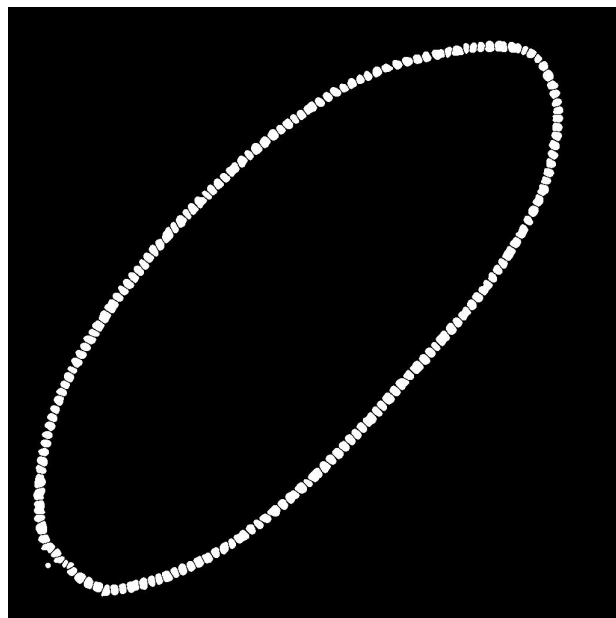


(b) Máscara nuclear 4

Figura 7.17: Resultado das máscaras de segmentação nuclear obtidos pelo método proposto.

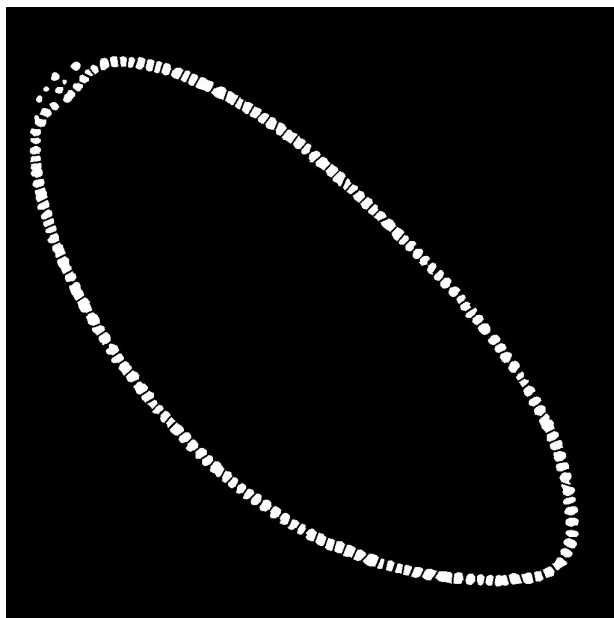


(a) Máscara nuclear 5

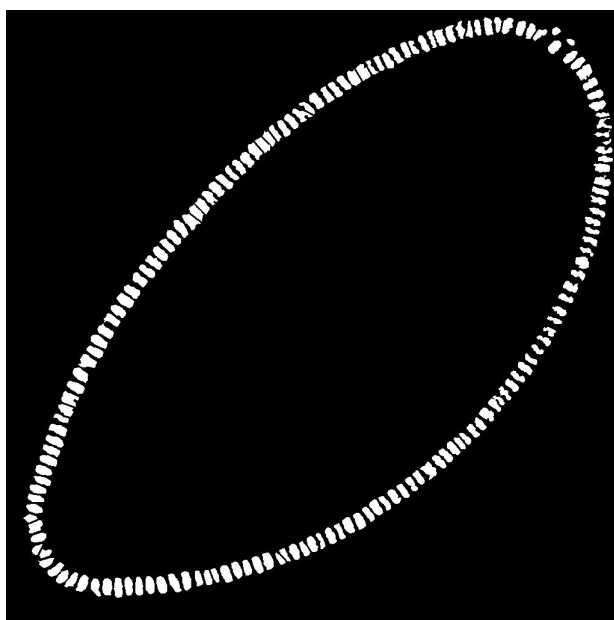


(b) Máscara nuclear 6

Figura 7.18: Resultado das máscaras de segmentação nuclear obtidos pelo método proposto.



(a) Máscara nuclear 7

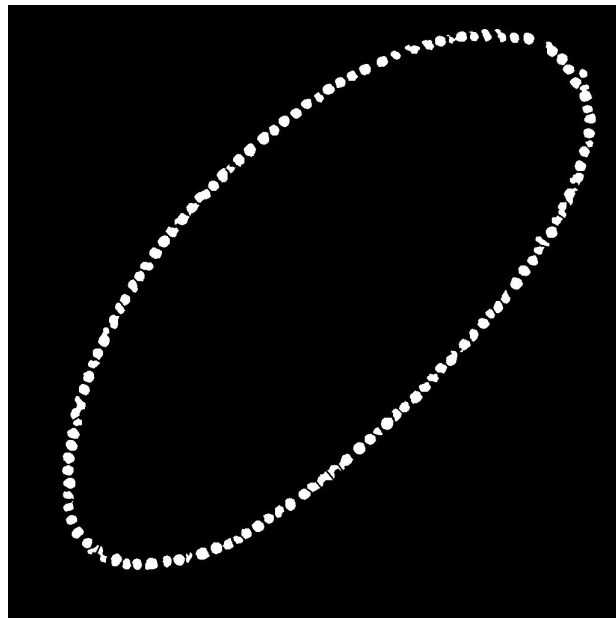


(b) Máscara nuclear 8

Figura 7.19: Resultado das máscaras nucleares obtidos pelo método proposto.



(a) Máscara nuclear 9



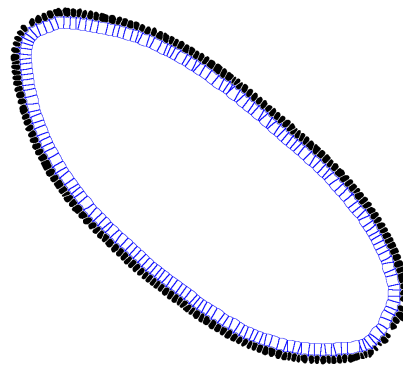
(b) Máscara nuclear 10

Figura 7.20: Resultado das máscaras nucleares obtidos pelo método proposto.

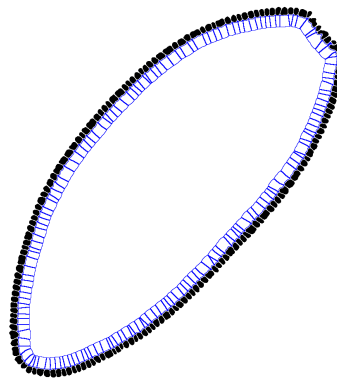
7.4 Etapa de Quantificação

Essa seção apresenta os resultados obtidos pela fase de quantificação, em que se objetivou caracterizar diferentes padrões de expressão gênica dos transcritos e da proteína codificada pelo gene *Hunchback*. Essa tarefa foi realizada a partir das máscaras de segmentação nuclear e basal, conforme os procedimentos descritos no Capítulo 6.

As Figs.7.21(a)-(b) exibem a sobreposição entre as máscaras de segmentação nuclear e basal, em duas amostras de imagens contidas na base.



(a) Sobreposição de máscaras - Embrião 1



(b) Sobreposição de máscaras - Embrião 2

Figura 7.21: Separação das regiões nuclear e citoplasma (basal) em duas amostras de imagens contidas na base. O contorno marcado pela cor azul define a região do citoplasma associada a cada núcleo da máscara.

Cada máscara nuclear obtida que, superposta à marcação da proteína *Hunchback* permite determinar o nível médio de fluorescência por núcleo. Esse procedimento torna possível obter os níveis de expressão proteica ao longo do embrião. De forma análoga, cada máscara basal que, superposta à marcação do RNA *Hunchback* possibilita determinar a intensidade média de transcrito no citoplasma associada a cada núcleo.

As Figs.7.22-7.24 exibem os perfis de expressão da proteína *Hunchback* em três amostras de embriões da *Drosophila*, bem como, os respectivos gráficos da intensidade de fluorescência. No eixo vertical do gráfico está representada a escala de intensidade de fluorescência e, no eixo horizontal está representada a posição dos núcleos no eixo Anterior-Posterior do embrião. O processamento é tal que as intensidades de fluorescência apresentadas nos gráficos correspondem às intensidades médias emitidas por cada núcleo.

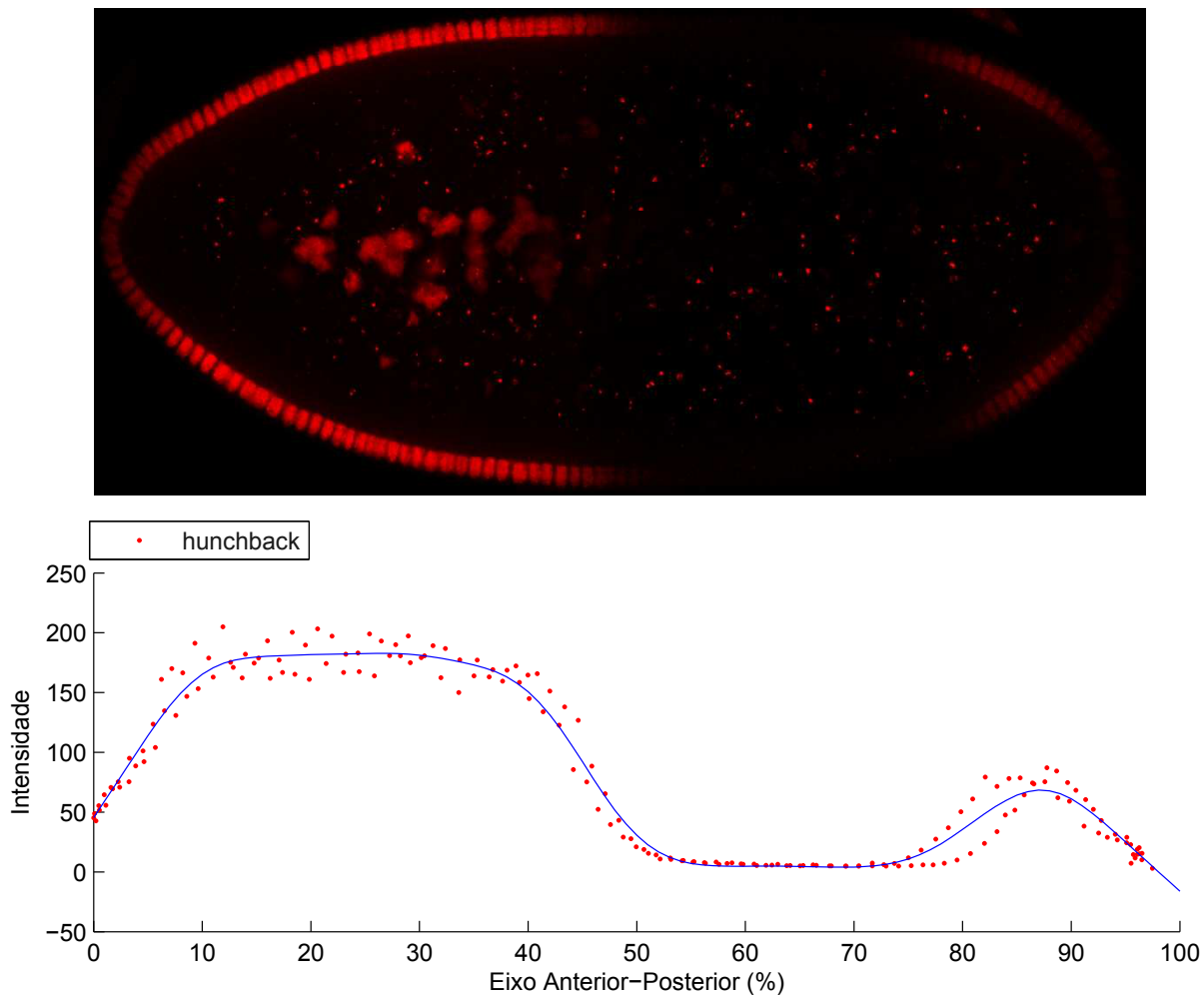


Figura 7.22: Embrião 1 - Perfil de expressão e intensidades de fluorescência correspondentes à proteína *Hunchback*.

O gráfico da Fig.7.25 mostra o perfil de expressão da proteína *Hunchback* assumido ao longo do eixo AP, para o conjunto total de imagens processadas.

A Fig.7.26 demonstra o Gráfico de Médias referente ao conjunto de imagens com sinal da proteína *Hunchback*. Esse gráfico exibe as intensidades médias para cada ponto das curvas exibidas na Fig.7.25. Cada barra na cor preta evidencia um intervalo de desvio padrão (mais/menos) em torno da respectiva média.

As Figs.7.27-7.29 exibem os perfis de expressão do RNA de *Drosophila*, em três amostras de embriões contidas na base, bem como, os respectivos gráficos da intensidade de fluorescência. O processamento é tal que as intensidades de fluorescência apresentadas

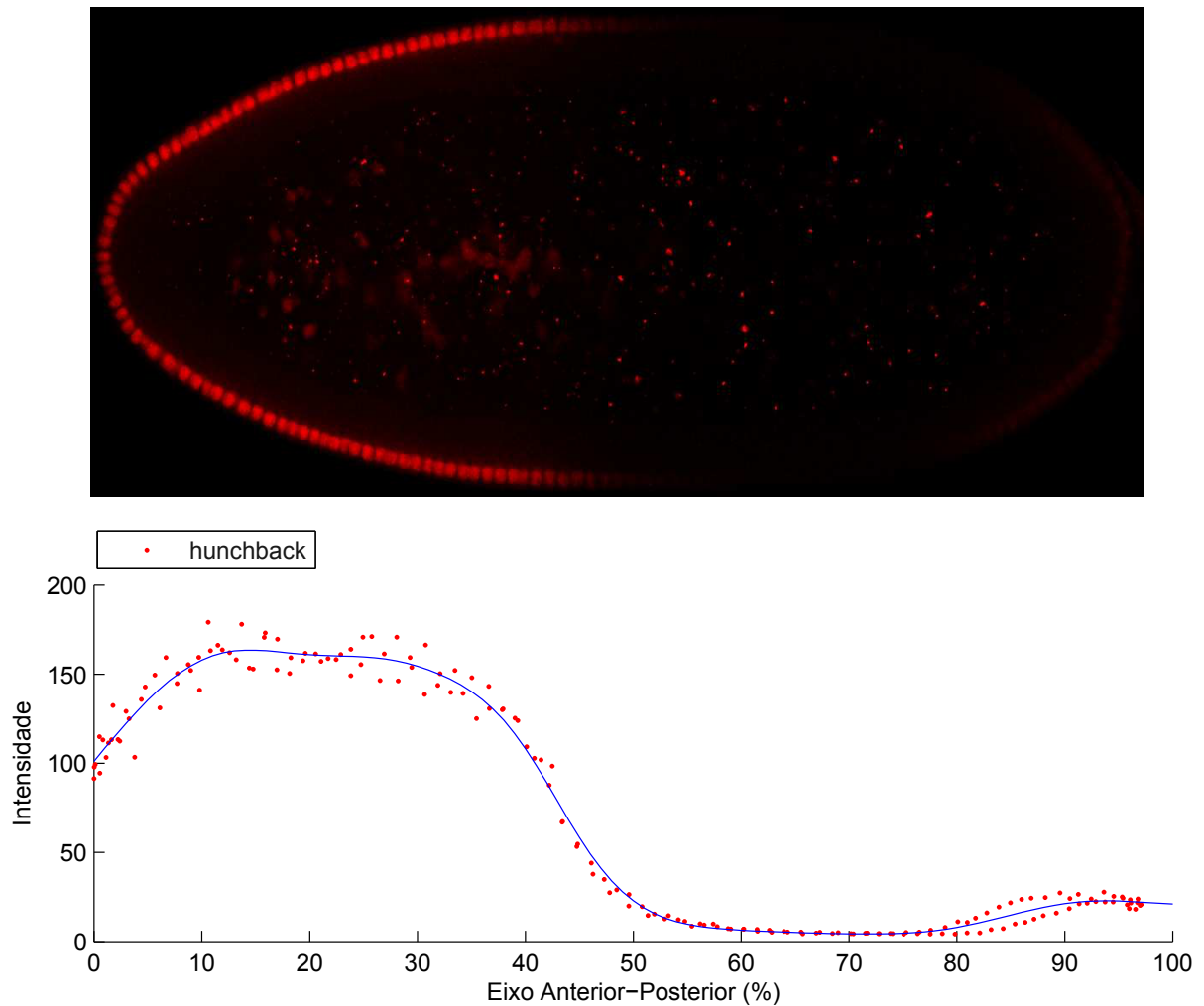


Figura 7.23: Embrião 2 - Perfil de expressão e intensidades de fluorescência correspondentes à proteína *Hunchback*.

nos gráficos correspondem às intensidades médias emitidas por cada região do citoplasma associada ao núcleo.

O gráfico da Fig.7.30 mostra os perfis de expressão do RNA de *Drosophila* assumido ao longo do eixo AP, para o conjunto total de imagens processadas.

A Fig.7.31 demonstra o Gráfico de Médias referente ao conjunto de imagens com sinal do RNA de *Hunchback*. Esse gráfico exhibe as intensidades médias para cada ponto das curvas exibidas na Fig.7.30. Cada barra na cor preta evidencia um intervalo de desvio padrão (mais/menos) em torno da respectiva média.

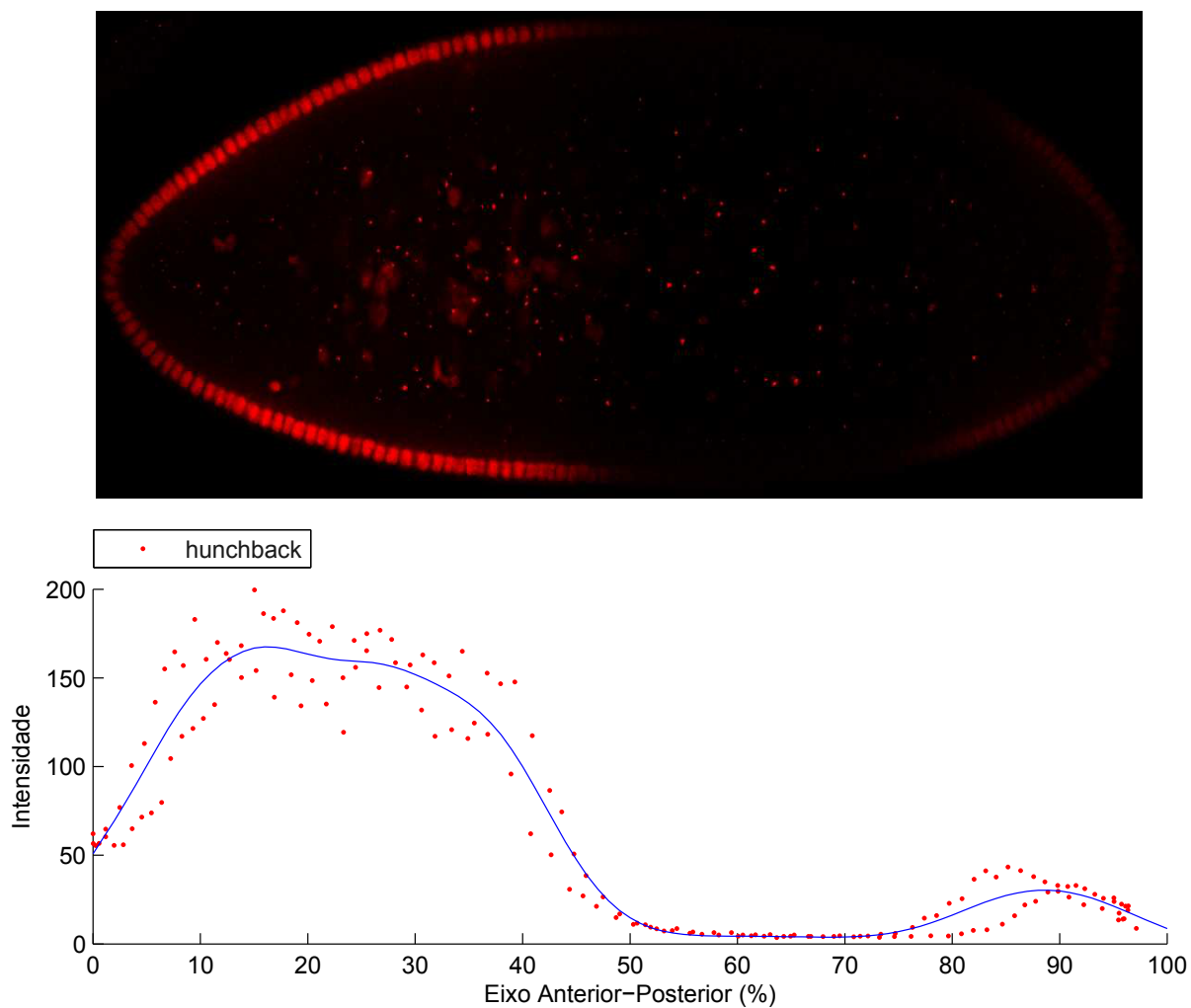


Figura 7.24: Embrião 3 - Perfil de expressão e intensidades de fluorescência correspondentes à proteína *Hunchback*.

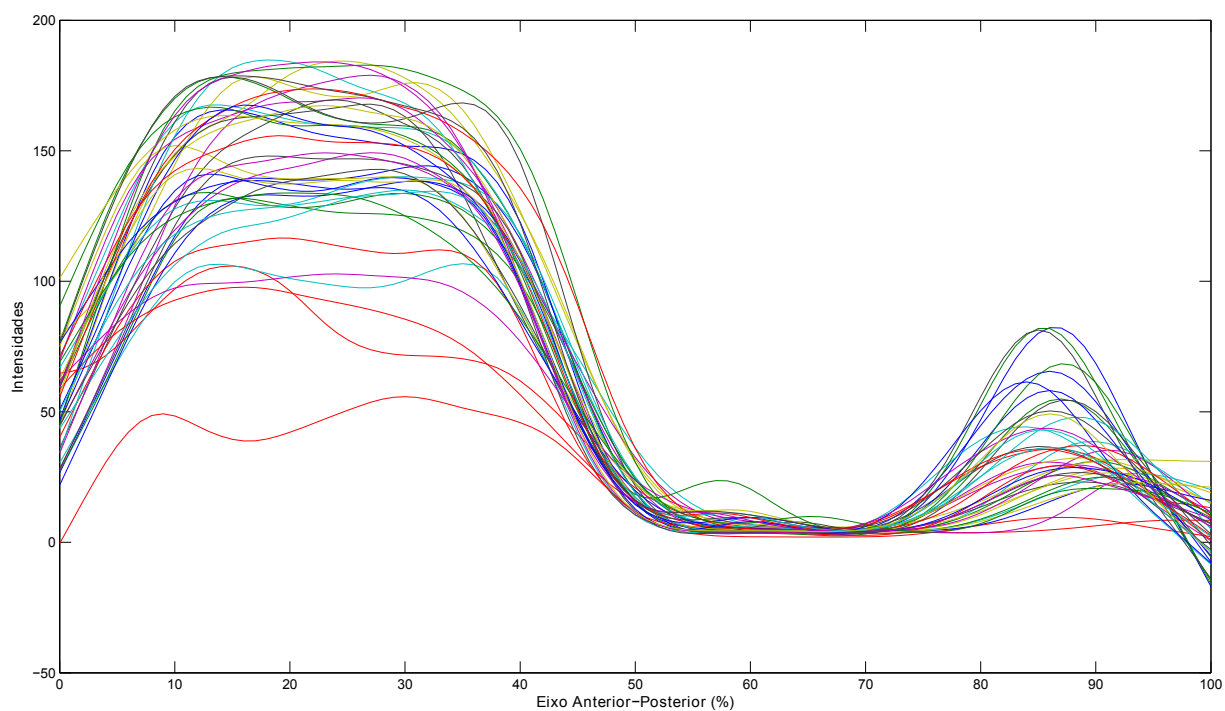


Figura 7.25: Perfil de expressão da proteína *Hunchback* assumido nos núcleos, ao longo do eixo AP, para o conjunto total de imagens processadas. Cada cor da curva representa o perfil de uma imagem.

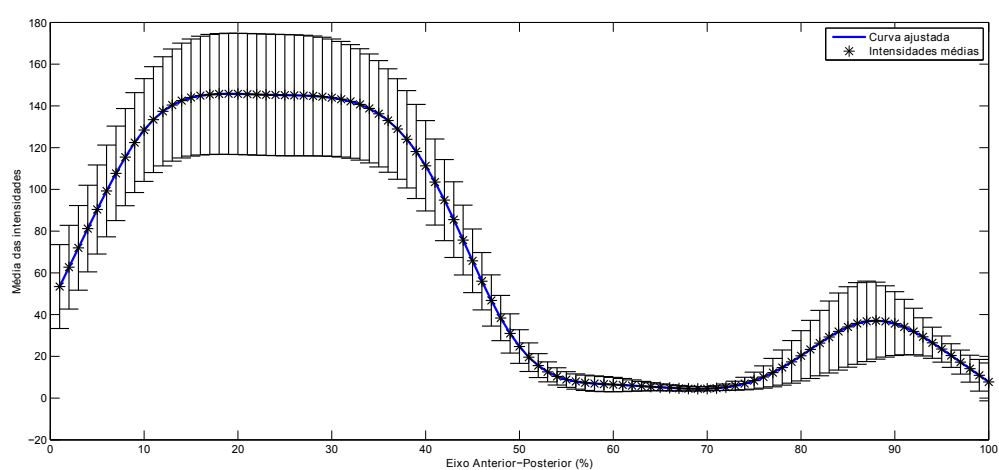


Figura 7.26: Gráfico de Médias para o conjunto de imagens da proteína *Hunchback*. Nele são mostradas as intensidades médias de cada ponto das curvas, com intervalos (mais/menos) dos respectivos desvios-padrões.

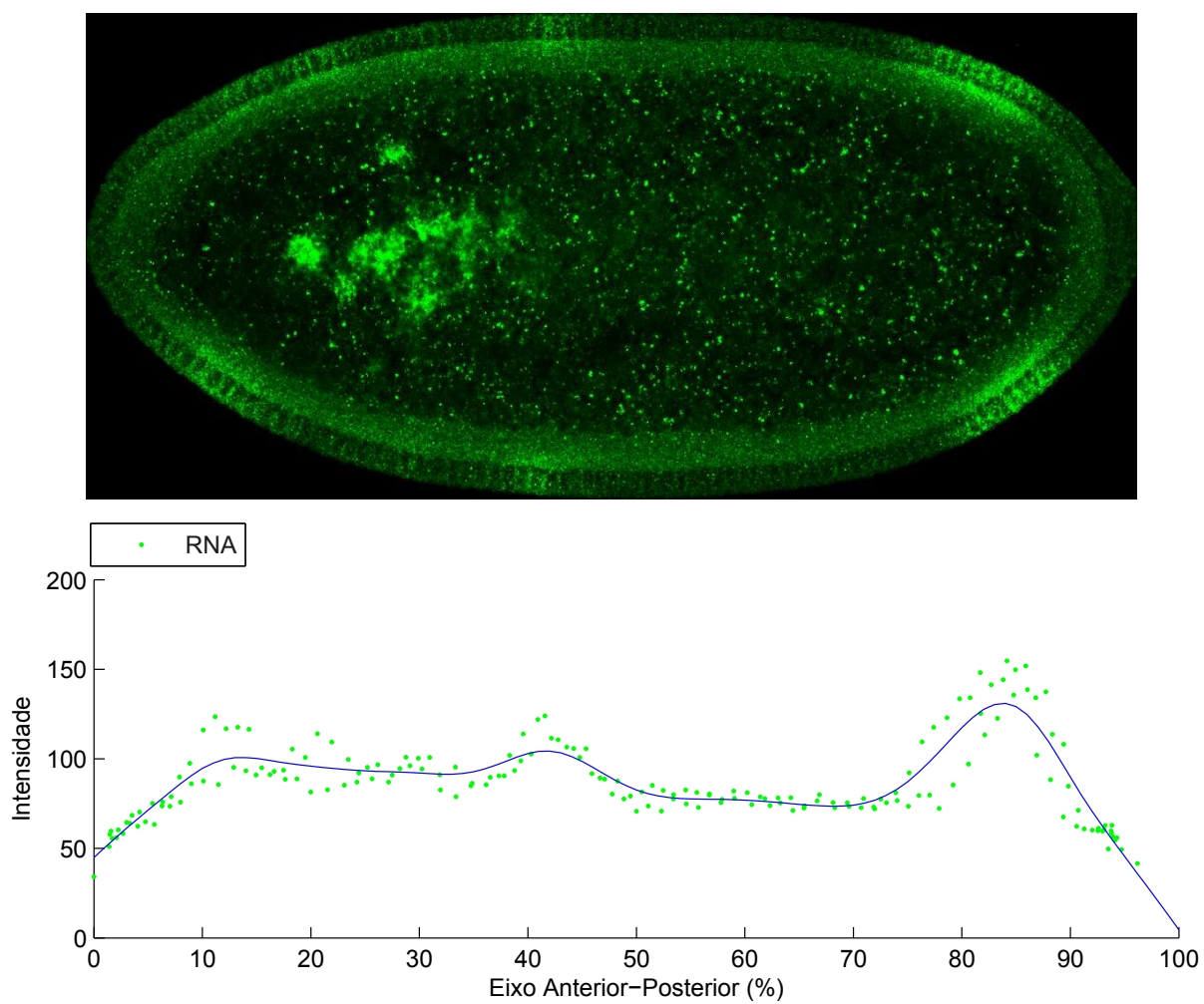


Figura 7.27: Embrião 1 - Perfil de expressão e intensidades de fluorescência correspondentes ao RNA no citoplasma.

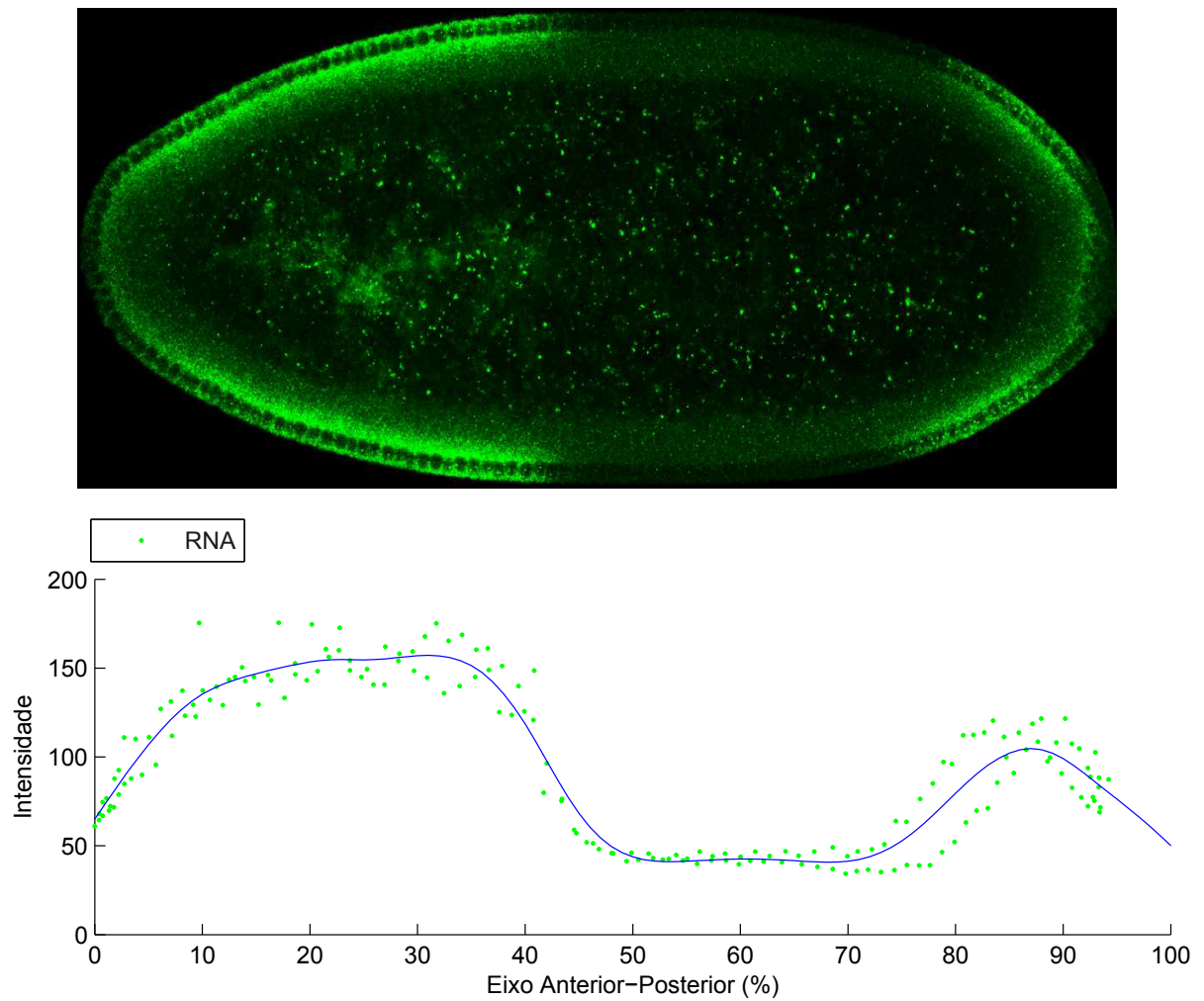


Figura 7.28: Embrião 2 - Perfil de expressão e intensidades de fluorescência correspondentes ao RNA no citoplasma.

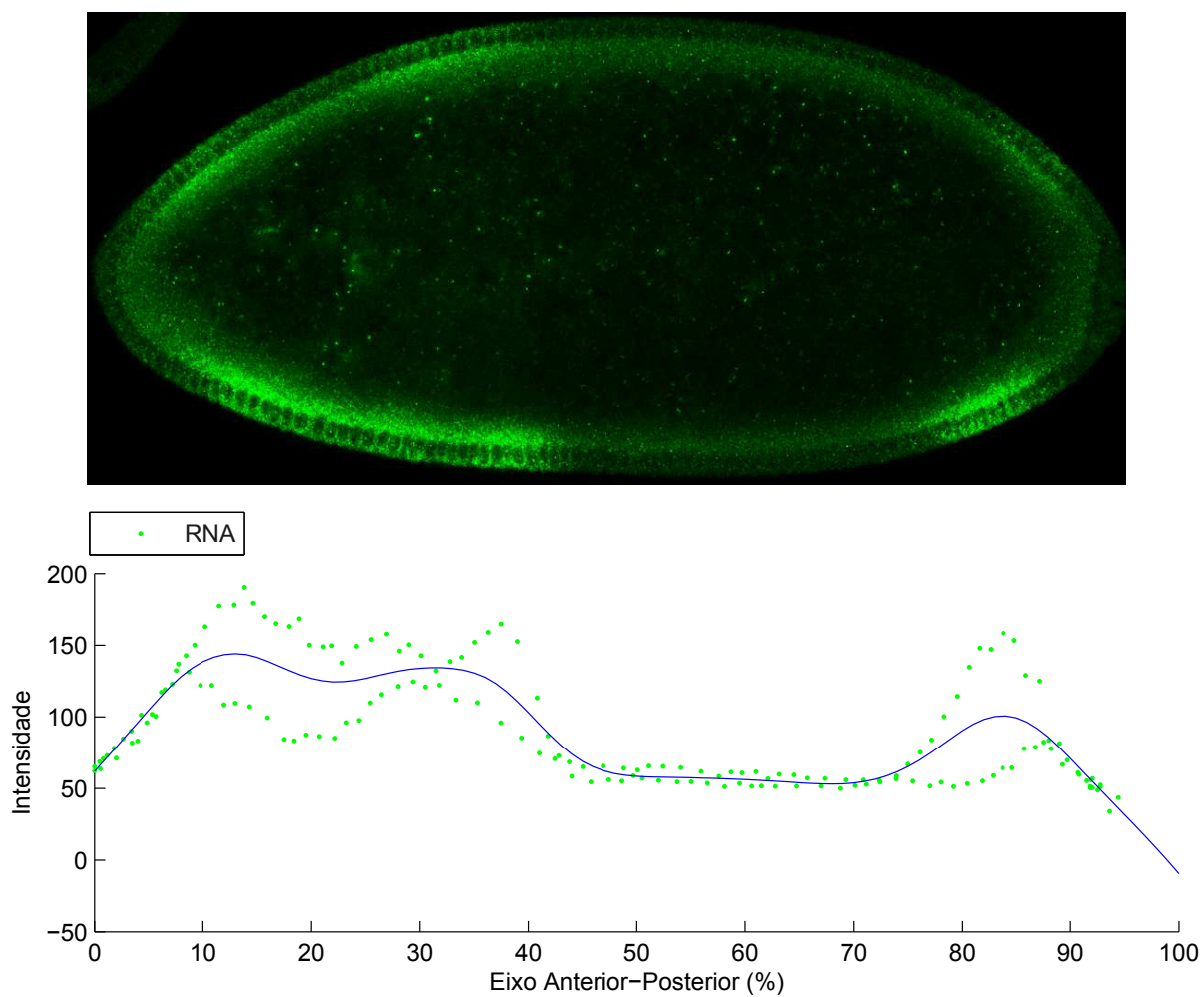


Figura 7.29: Embrião 3 - Perfil de expressão e intensidades de fluorescência correspondentes ao RNA no citoplasma.

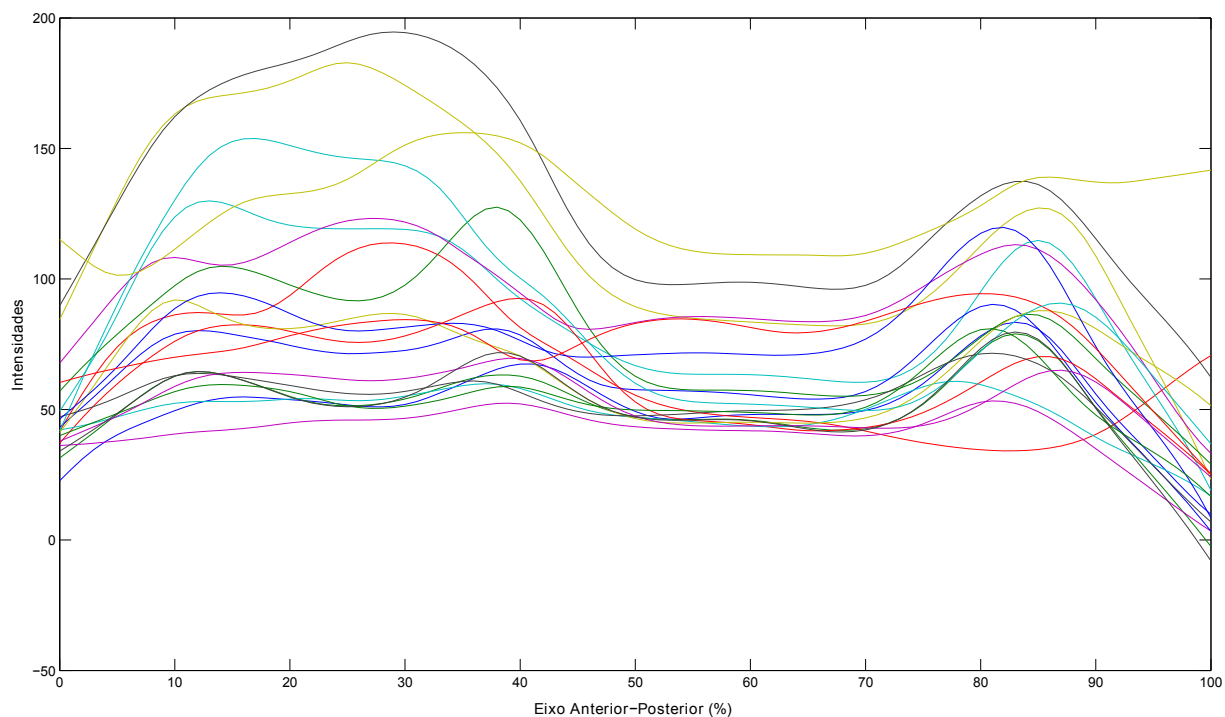


Figura 7.30: Perfil de expressão do RNA de *Drosophila* assumido no citoplasma, ao longo do eixo AP, para o conjunto total de imagens processadas. Cada cor da curva representa o perfil de uma imagem.

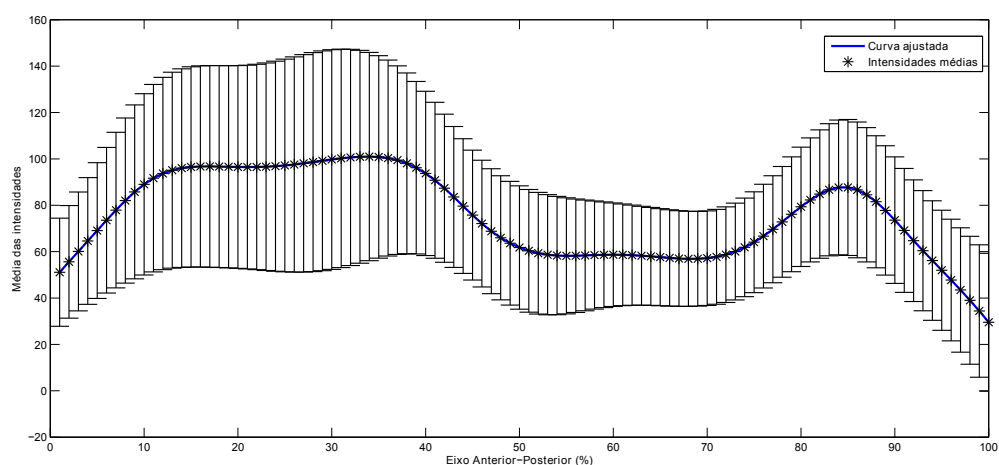


Figura 7.31: Gráfico de Médias para o conjunto de imagens com sinal do RNA de *Hunchback*. Nele são mostrados as intensidades médias para cada ponto das curvas, com intervalos (mais/menos) dos respectivos desvios-padrões.

Capítulo 8

Conclusão

O estudo em questão apresentou métodos computacionais para a segmentação nuclear e avaliação da expressão gênica em imagens da *Drosophila melanogaster*. A metodologia desenvolvida consistiu em uma combinação de técnicas de processamento digital de imagens, geometria diferencial e morfologia matemática.

O método de segmentação proposto visa realizar a segmentação automática dos núcleos celulares contidos em imagens sagitais de embriões da *Drosophila*. Por sua vez, baseia-se na estimativa de curvatura de contornos fechados, e consiste em separar núcleos agregados por meio de segmentos traçados entre pontos côncavos correspondentes.

Essa abordagem apresentou uma solução eficaz para o problema de componentes agregados, característica recorrente em aplicações voltadas à segmentação de núcleos ou células. Por sua vez, propôs uma forma eficiente e precisa para a construção da máscara de segmentação nuclear, característica primordial para a realização de estudos biológicos diversos, tais como, quantificação do nível de expressão gênica em cada núcleo, detecção da idade dos embriões de *Drosophila*, análise das redes de regulação gênica, comparação dos padrões de expressão em diferentes estágios do desenvolvimento, análise dinâmica da formação dos padrões de expressão, dentre outras. As máscaras de segmentação aumentam o grau de precisão, proporcionam confiabilidade e automação, e eliminam a subjetividade das análises biológicas.

O método proposto é novo para esse cenário, e mostrou-se robusto a variações de rotação e translação. Alcançou-se resultados satisfatórios na delimitação dos núcleos, assim como bom desempenho na separação dos componentes agregados, com mínima taxa de super segmentação.

Os métodos desenvolvidos para avaliação da expressão gênica incluem abordagens para (1) quantificação e (2) visualização da intensidade média de proteína e RNA's dentro e fora dos núcleos.

O método de quantificação, em específico, possibilitou obter o perfil de expressão gênica assumido ao longo do eixo anterior-posterior dos embriões de *Drosophila*, a partir de duas operações principais sendo (a) quantificação do nível médio de proteína por núcleo e

(b) quantificação da intensidade média de RNA's nas regiões apical e basal do citoplasma, associadas a cada núcleo.

Por outro lado, o método de visualização propõe uma nova abordagem para exibição das imagens sagitais, capaz de organizar os núcleos celulares em uma configuração linear. Essa configuração permite visualizar os núcleos celulares organizados lado a lado, favorecendo a observação visual da variação espacial e temporal da intensidade de proteína retida em cada núcleo. A nova abordagem mostrou-se vantajosa e compacta, uma vez que permite analisar um grande número de imagens em um curto intervalo de tempo. Além disso, possibilita comparar padrões de expressão de diferentes embriões, facilitando a análise e interpretação dos dados.

Em geral, os métodos para segmentação nuclear e avaliação da expressão gênica representam um passo essencial para a realização de diversas análises biológicas sobre a *Drosophila melanogaster*. Experimentos foram realizados a fim de ilustrar o desempenho da segmentação, quando comparado com outras abordagens comumente encontradas na literatura. Os resultados demonstraram vantagem competitiva do método proposto, ambos a nível qualitativo e quantitativo. É importante citar a possibilidade de utilização do método de segmentação em diferentes áreas e aplicações. Neste aspecto, deverá ser considerada a necessidade de implementação de novos procedimentos, em conformidade com a aplicação pretendida.

Em suma, espera-se que a partir dos métodos propostos seja possível construir uma ferramenta genérica, capaz de lidar com diversos formatos e padrões de imagens, e com isso permitir a obtenção de resultados precisos, com mínima dependência da supervisão do usuário.

8.1 Trabalhos Futuros

A continuação do trabalho apresentado nesta dissertação inclui adaptações no método proposto, com o objetivo de fornecer propriedades robustas a variações na imagem. Além disso, envolve investigações mais profundas, as quais buscam propor extensões com o intuito de aumentar o espectro de aplicação do método. Nesse sentido, são sugeridas as seguintes atividades futuras:

- **AUMENTAR O ESPECTRO DE APLICAÇÃO:** As imagens processadas apresentam simples variações no que diz respeito à forma geométrica dos núcleos. Sendo assim, propõem-se estender o método, a fim de aplicá-lo em formas geométricas mais complexas, tais que representem diferentes aplicações ou áreas. A presença de elementos agregados (e.g., células, núcleos, tecidos) é muito comum em imagens biológicas. A técnica usada neste trabalho poderia ser estendida para outras aplicações.

- DESENVOLVIMENTO FERRAMENTA DE SOFTWARE: A implementação do método foi realizada a partir de diferentes algoritmos. Nesse caso, como trabalho futuro sugere-se reuni-los em uma ferramenta de software, tal que seja capaz de processar e analisar as imagens biológicas de forma prática e interativa, e facilitar o uso por outros pesquisadores.
- EXPLORAR DIFERENTES GENES: Aplicar a metodologia desenvolvida a uma gama maior de genes, permitindo comparar o padrão de expressão sagital de diferentes genes, e em embriões com idades distintas.
- BASE DE IMAGENS: Propor uma base de imagens sagitais na web, a exemplo do que ocorre com a FlyEx, e disponibilizar os resultados obtidos pela técnica proposta.
- NOVA PROPOSTA DE VISUALIZAÇÃO DOS NÚCLEOS: aprimorar os resultados descritos na seção 6.3, incluindo mais exemplos e publicar essa nova proposta de visualização.

8.2 Publicações realizadas

Os trabalhos completos publicados frutos desta pesquisa são citados abaixo.

- SOUSA, D. J.; CARDOSO, M. A.; BISCH, P. M.; Lopes, F. J. P.; TRAVENÇOLO, B. A. N. A Segmentation Method for Nuclei Identification from Sagittal Images of *Drosophila melanogaster* Embryos. In: WSCG - International Conference in Central Europe on Computer Graphics, Visualization and Computer Vision, 2013, Pilsen. 21st WSCG 2013 Full Papers Proceedings, 2013. p. 133-142.
- SOUSA, D. J.; GULIATO, D.; CARDOSO, M. A.; Lopes, Francisco J. P.; TRAVENÇOLO, B. A. N. Análise de algoritmos para a segmentação de imagens de padrões de expressão gênica da *Drosophila melanogaster*. In: XV Encontro de Modelagem Computacional & III Encontro de Ciência e Tecnologia de Materiais, 2012, Uberlândia. Anais do XV Encontro de Modelagem Computacional & III Encontro de Ciência e Tecnologia de Materiais, 2012.

Referências Bibliográficas

- [Adams et al. 2000] Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., and et al. (2000). The genome sequence of drosophila melanogaster. *Science*, 287(5461):2185–2195.
- [Aizenberg et al. 2002] Aizenberg, I., Myasnikova, E., Samsonova, M., and Reinitz, J. (2002). Temporal classification of drosophila segmentation gene expression patterns by the multi-valued neural recognition method. *Mathematical Biosciences*, 176(1):145–159.
- [Alberts et al. 2002] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science, 4 edition.
- [Amenta et al. 1998] Amenta, N., Bern, M., and Kamvysselis, M. (1998). Crust: A new voronoi-based surface reconstruction algorithm. In *Proceedings of the 25th annual conference on Computer graphics and interactive techniques*, SIGGRAPH '98, pages 415–421, New York, NY, USA. ACM.
- [Arica and Yarman-Vural 2003] Arica, N. and Yarman-Vural, F. T. (2003). A compact shape descriptor based on the beam angle statistics. In Bakker, E., Lew, M., Huang, T., Sebe, N., and Zhou, X., editors, *Image and Video Retrieval*, volume 2728 of *Lecture Notes in Computer Science*, pages 152–162. Springer Berlin Heidelberg.
- [Ashyraliyev et al. 2008] Ashyraliyev, M., Jaeger, J., and Blom, J. G. (2008). Parameter estimation and determinability analysis applied to drosophila gap gene circuits. *BMC Syst Biol*, 2:83.
- [Attneave 1954] Attneave, F. (1954). Some informational aspects of visual perception. *Psychological Review*, 61(3):183–193.
- [Audigier 2007] Audigier, R. M. M. (2007). *Zona de empate: o elo entre definições da transformada de watershed e entre elas e a segmentação via conexidade nebulosa*. PhD thesis, Universidade Estadual de Campinas.
- [Aurenhammer and Klein 2000] Aurenhammer, F. and Klein, R. (2000). *Voronoi Diagrams*. Karl-Franzens-Univ. Graz & Techn. Univ. Graz, Amsterdam:North Holland, 5 edition.
- [Ay et al. 2008] Ay, A., Fakhouri, W., Chiu, C., and Arnosti, D. (2008). Image processing and analysis for quantifying gene expression from early drosophila embryos. *Tissue Engineering Part A*, 14(9):1517–1526.
- [Azevedo et al. 2008] Azevedo, E., Conci, A., and Leta, F. (2008). *Computação Gráfica: Teoria e Prática*. Elsevier.

- [Bagatini et al. 2011] Bagatini, P., Saur, L., Rodrigues, M., Bernardino, G., Paim, M., Coelho, G., Silva, D., Oliveira, R., Schirmer, H., Souto, A., Vianna, M., and Xavier, L. (2011). The role of calcium channel blockers and resveratrol in the prevention of paraquat-induced parkinsonism in drosophila melanogaster: a locomotor analysis. *Invertebrate Neuroscience*, 11(1):43–51.
- [Bai et al. 2009] Bai, X., Sun, C., and Zhou, F. (2009). Splitting touching cells based on concave points and ellipse fitting. *Pattern Recogn*, 42(11):2434–2446.
- [Bala 2012] Bala, A. (2012). An improved watershed image segmentation technique using matlab. *International Journal Of Scientific and Engineering Research*, 3(6):1206–1206.
- [Beckingham et al. 2005] Beckingham, K., Armstrong, D., Texada, M., Munjaal, R., and Baker, D. (2005). Drosophila melanogaster: The model organism of choice for the complex biology of multicellular organisms. *Gravitational and Space Biology*, 18(2):17–30.
- [Berg et al. 2008] Berg, M. d., Cheong, O., Kreveld, M. v., and Overmars, M. (2008). *Computational Geometry: Algorithms and Applications*. Springer-Verlag TELOS, Santa Clara, CA, USA, 3rd ed. edition.
- [Beus and Tiu 1987] Beus, H. L. and Tiu, S. S. (1987). An improved corner detection algorithm based on chain-coded plane curves. *Pattern Recognition*, 20(3):291–296.
- [Borouchaki et al. 1997] Borouchaki, H., George, P. L., Hecht, F., Laug, P., and Saltel, E. (1997). Delaunay mesh generation governed by metric specifications. part i. algorithms. *Finite Elements in Analysis and Design*, 25:61–83.
- [Calsa Junior et al. 2004] Calsa Junior, T., Benedito, V. A., and Figueira, A. V. O. (2004). Análise serial da expressão gênica (sage) na genômica de plantas. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Ano 7(33):88–100.
- [Cattley and Arthur 2007] Cattley, S. and Arthur, J. (2007). Biomanager: the use of a bioinformatics web application as a teaching tool in undergraduate bioinformatics training. *Brief Bioinform*, 8(6):457–65.
- [Cazals and Pouget 2003] Cazals, F. and Pouget, M. (2003). Estimating differential quantities using polynomial fitting of osculating jets. In *Proceedings of the 2003 Eurographics/ACM SIGGRAPH symposium on Geometry processing*, SGP '03, pages 177–187, Aire-la-Ville, Switzerland, Switzerland. Eurographics Association.
- [Chan et al. 2012] Chan, Y.-K., Pai, P.-Y., Liu, C.-C., Wang, Y.-S., Li, C.-W., and Wang, L.-Y. (2012). Fluorescence microscopic image cell segmentation. *International Journal of Future Computer and Communication*, 1:72–75.
- [Chang et al. 2004] Chang, F., jen Chen, C., and jen Lu, C. (2004). A linear-time component-labeling algorithm using contour tracing technique. *Computer Vision and Image Understanding*, 93:206–220.
- [Chen and Crowther 2012] Chen, K. and Crowther, D. C. (2012). Functional genomics in drosophila models of human disease. *Brief Funct Genomics*, 11(5):405–15.

- [Chen et al. 2012] Chen, S., Zhao, M., Wu, G., Yao, C., and Zhang, J. (2012). Recent advances in morphological cell image analysis. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2012:10.
- [Chen et al. 2006] Chen, X., Zhou, X., and Wong, S. T. (2006). Automated segmentation, classification, and tracking of cancer cell nuclei in time-lapse microscopy. *IEEE Trans Biomed Eng*, 53(4):762–766.
- [Cheng and Rajapakse 2009] Cheng, J. and Rajapakse, J. C. (2009). Segmentation of clustered nuclei with shape markers and marking function. *IEEE Trans. Biomed. Engineering*, 56(3):741–748.
- [Christie et al. 2002] Christie, M., Subbey, S., and Sambridge, M. (2002). Prediction under uncertainty in reservoir modeling. In *European Conference on the Mathematics of Oil Recovery*.
- [Cloppet and Boucher 2010] Cloppet, F. and Boucher, A. (2010). Segmentation of complex nucleus configurations in biological images. *Pattern Recogn. Lett.*, 31(8):755–761.
- [Coeurjolly and Svensson 2003] Coeurjolly, D. and Svensson, S. (2003). Estimation of curvature along curves with application to fibres in 3d images of paper. In *Proceedings of the 13th Scandinavian conference on Image analysis*, SCIA’03, pages 247–254, Berlin, Heidelberg. Springer-Verlag.
- [Costa and Cesar 2009] Costa, L. F. and Cesar, R. (2009). *Shape classification and analysis: theory and practice*. CRC Press, 2 edition.
- [Danuser 2011] Danuser, G. (2011). Computer vision in cell biology. *Cell*, 147(5):973–978.
- [Daněš et al. 2009] Daněš, O., Matula, P., Ortiz-De-Solórzano, C., Muñoz Barrutia, A., Maška, M., and Kozubek, M. (2009). Segmentation of touching cell nuclei using a two-stage graph cut model. In *Proceedings of the 16th Scandinavian Conference on Image Analysis*, SCIA ’09, pages 410–419, Berlin, Heidelberg. Springer-Verlag.
- [de Araújo 2008] de Araújo, D. S. A. (2008). *Algoritmos de Agrupamento Aplicados a Dados de Expressão Gênica de Câncer: Um Estudo Comparativo*. Programa de pós-graduação em sistemas e computação (departamento de informática e matemática aplicada), Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- [de Sousa et al. 2012] de Sousa, D. J., Guliato, D., Lopes, F. J. P., and Travençolo, B. A. N. (2012). Análise de algoritmos para a segmentação de imagens de padrões de expressão gênica da drosophila melanogaster. In *XV Encontro de Modelagem Computacional e Encontro de Ciência e Tecnologia de Materiais*, Uberlândia. Anais do XV Encontro de Modelagem Computacional e III Encontro de Ciência e Tecnologia de Materiais.
- [Diaspro et al. 2008] Diaspro, A., Faretta, M., and Sapuppo, P. (2008). *Confocal Microscopy*. Leica Microsystems. Mannheim, Alemanha.
- [Dorini 2009] Dorini, L. (2009). *Transformações de imagens baseadas em Morfologia Matemática*. PhD thesis, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

- [Dryden et al. 2006] Dryden, I. L., Farnoosh, R., and Taylor, C. C. (2006). Image segmentation using voronoi polygons and mcmc, with application to muscle fibre images. *Journal of Applied Statistics*, 33:609.
- [Du and Dua 2010] Du, X. and Dua, S. (2010). Segmentation of fluorescence microscopy cell images using unsupervised mining. *The open medical informatics journal*, 4:41–49.
- [e Souza Rocha et al. 2013] e Souza Rocha, L. D. L., de Menezes Faria, J. C. N., da Silva Cruz, A. H., da Silva Reis, A. A., and da Silva Santos, R. (2013). *Drosophila*: um importante modelo biológico para a pesquisa e o ensino de genética. *Scire Salutis*, 3(1):37–48.
- [Elowitz et al. 2002] Elowitz, M. B., Levine, A. J., Siggia, E. D., and Swain, P. S. (2002). Stochastic gene expression in a single cell. *Science*, 297(5584):1183–1186.
- [Estrozi et al. 2003] Estrozi, L. F., Rios-Filho, L. G., Bianchi, A. G. C., Cesar-Jr., R., and da F. Costa, L. (2003). 1D and 2D Fourier-based approaches to numeric curvature estimation and their comparative performance assessment. *Digital Signal Processing*, 13:172–197.
- [Facon 1996] Facon, J. (1996). *Morfologia Matemática: Teoria e exemplos*. Universitária Champagnat da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.
- [Fernandez 2003] Fernandez, S. (2003). *Embriologia*. Artmed Editora.
- [Ferreira Costa et al. 1997] Ferreira Costa, J. A., Mascarenhas, N. D. A., and de Andrade Netto, M. L. (1997). Cell nuclei segmentation in noisy images using morphological watersheds. *Proc. SPIE, Applications of Digital Image Processing XX*, 3164:314–324.
- [Fonseca 1997] Fonseca, P. M. S. (1997). *Caracterização da y-TUBALINA23C em Drosophila melanogaster*. PhD thesis, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto.
- [Fowlkes et al. 2008] Fowlkes, C., Luengo Hendriks, C. L., Keranen, S., Weber, G., Rubel, O., Huang, M.-Y., Chatoor, S., DePace, A., Simirenko, L., Henriquez, C., Beaton, A., Weiszmam, R., Celniker, S., Hamann, B., Knowles, D., Biggin, M., Eisen, M., and Malik, J. (2008). A quantitative spatiotemporal atlas of gene expression in the drosophila blastoderm. *Cell*, 133(2):364–374.
- [Fumia 2010] Fumia, A. F. (2010). *Um modelo para regulação gênica e a diferenciação celular nos estágios iniciais da embriogênese*. PhD thesis, Pós-Graduação em Física Aplicada, Universidade Federal de Viçosa (UFV).
- [Furtado and Nepomuceno 2012] Furtado, S. G. and Nepomuceno, J. C. (2012). Redução de tumor epitelial em drosophila melanogaster, pela enzima metaloprotease isolada da peçonha da serpente bothrops pauloensis, por meio de teste wts (warts). *Revista Perquirere*, 1(9):224–240.
- [Gellatly and Finney 1982] Gellatly, B. and Finney, J. (1982). Calculation of protein volumes: An alternative to the voronoi procedure. *Journal of Molecular Biology*, 161:305–322.
- [Gilbert 2003] Gilbert, S. (2003). *Developmental Biology*. Sinauer Associates, 7 edition.

- [Gois 2004] Gois, J. P. (2004). *Reconstrução de superfícies a partir de nuvens de pontos*. Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação, São Paulo. 155 p.
- [Gomes 2001] Gomes, R. A. P. L. (2001). Utilização de *Drosophila* em genética. *Departamento de Biologia Vegetal*, (Faculdade de Ciências) - Universidade de Lisboa, Campo Grande- Lisboa:8p.
- [Gonzalez and Woods 2010] Gonzalez, R. and Woods, R. (2010). *Processamento de imagens digitais*. Prentice Hall, 3 edition.
- [Greene and Ogden 2012] Greene, E. and Ogden, R. (2012). Evaluating the contribution of shape attributes to recognition using the minimal transient discrete cue protocol. *Behav Brain Funct*, 8(1):53.
- [Gregor et al. 2007] Gregor, T., Wieschaus, E., McGregor, A., Bialek, W., and Tank, D. (2007). Stability and nuclear dynamics of the bicoid morphogen gradient. *Cell*, 130(1):141–152.
- [Grimm et al. 2010] Grimm, O., Coppey, M., and Wieschaus, E. (2010). Modelling the bicoid gradient. *Development*, 137(0950-1991 (Linking)):2253–2264.
- [Guibas and Stolfi 1985] Guibas, L. and Stolfi, J. (1985). Primitives for the manipulation of general subdivisions and the computation of voronoi. *ACM Trans. Graph.*, 4(2):74–123.
- [Hagen 2000] Hagen, J. (2000). The origins of bioinformatics. *Nature Reviews Genetics*, 1(3):231–6.
- [Haralick and Shapiro 1991] Haralick, R. and Shapiro, L. (1991). *Computer and Robot Vision*. Computer and Robot Vision. Addison-Wesley.
- [Haralick and Shapiro 1993] Haralick, R. M. and Shapiro, L. G. (1993). *Computer and Robot Vision*. Addison-Wesley Longman Publishing Co., Inc., Boston, MA, USA.
- [Hasty et al. 2001] Hasty, J., Mcmillen, D., Isaacs, F., and Collins, J. J. (2001). Computational studies of gene regulatory networks: in numero molecular biology. *Nature Reviews Genetics*, 2(4):268–279.
- [He et al. 2008] He, F., Wen, Y., Deng, J., Lin, X., Lu, L. J., Jiao, R., and Ma, J. (2008). Probing intrinsic properties of a robust morphogen gradient in *Drosophila*. *Dev Cell*, 15(4):558–567.
- [Heller 2002] Heller, M. (2002). Dna microarray technology: Devices, systems, and applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 4:129–153.
- [Hirata et al. 2002] Hirata, R., Dias, S. S., and Rosa, A. R. (2002). Detecção de inseticidas por bioensaio com *Drosophila melanogaster*. *Arq. Inst. Biol*, 69(3):97–102. São Paulo.
- [Hirth 2010] Hirth, F. (2010). *Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 9(4):504–523.

- [Hoskins et al. 2007] Hoskins, R. A., Carlson, J. W., Kennedy, C., Acevedo, D., Evans-Holm, M., Frise, E., Wan, K. H., Park, S., Mendez-Lago, M., Rossi, F., Villasante, A., Dimitri, P., Karpen, G. H., and Celniker, S. E. (2007). Sequence finishing and mapping of drosophila melanogaster heterochromatin. *Science*, 316(5831):1625–1628.
- [Houchmandzadeh et al. 2002] Houchmandzadeh, B., Wieschaus, E., and Leibler, S. (2002). Establishment of developmental precision and proportions in the early drosophila embryo. *Nature*, 415(0028-0836 (Linking)):798–802.
- [Huang et al. 2008] Huang, M.-Y., Rübel, O., Weber, G., Hendriks, C., Biggin, M., Hagen, H., and Hamann, B. (2008). Segmenting gene expression patterns of early-stage drosophila embryos. In Linsen, L., Hagen, H., and Hamann, B., editors, *Visualization in Medicine and Life Sciences, Mathematics and Visualization*, pages 313–327. Springer Berlin Heidelberg.
- [Hukkanen et al. 2010] Hukkanen, J., Hategan, A., Sabo, E., and Tabus, I. (2010). Segmentation of cell nuclei from histological images by ellipse fitting. In *Proc. of the European Signal Processing Conference, Aalborg, Denmark*, pages 1219–1223.
- [Indhumathi et al. 2011] Indhumathi, C., Cal, Y., Guan, Y., and Opas, M. (2011). An automatic segmentation algorithm for 3d cell cluster splitting using volumetric confocal images. *Journal of Microscopy*, 243(1):60–76.
- [Janssens et al. 2005] Janssens, H., Kosman, D., Vanario-Alonso, C., Jaeger, J., Samsonova, M., and Reinitz, J. (2005). A high-throughput method for quantifying gene expression data from early drosophila embryos. *Development genes and evolution*, 215(7):374–381.
- [Jäckle et al. 1992] Jäckle, H., Hoch, M., Pankratz, M. J., Gerwin, N., Sauer, F., and Brönner, G. (1992). Transcriptional control by drosophila gap genes. *J Cell Sci Suppl*, 16:39–51.
- [Jolliffe 2002] Jolliffe, I. (2002). *Principal Component Analysis*. Springer, New York, 2 edition.
- [K. Suzuki and Sugie 2003] K. Suzuki, I. H. and Sugie, N. (2003). Linear-time connected-component labeling based on sequential local operations. *Computer Vision Image Understanding*, 89:1–23.
- [Kolahdouzan and Shahabi 2004] Kolahdouzan, M. and Shahabi, C. (2004). Voronoi-based k nearest neighbor search for spatial network databases. In *Proceedings of the Thirtieth international conference on Very large data bases*, volume 30 of *VLDB '04*, pages 840–851. VLDB Endowment.
- [Koplowitz and Plante 1995] Koplowitz, J. and Plante, S. (1995). Corner detection for chain coded curves. *Pattern Recognition*, 28(6):843–852.
- [Korbes and Lotufo 2010] Korbes, A. and Lotufo, R. A. (2010). *Análise de Algoritmos da Transformada Watershed*. PhD thesis, Universidade Estadual de Campinas.
- [Kosman et al. 1999] Kosman, D., Reinitz, J., and Sharp, D. H. (1999). Automated assay of gene expression at cellular resolution. In *Proceedings of the 1998 Pacific Symposium on Biocomputing*, pages 6–17.

- [Kothari et al. 2009] Kothari, S., Chaudry, Q., and Wang, M. D. (2009). Automated cell counting and cluster segmentation using concavity detection and ellipse fitting techniques. In *IEEE International Symposium on Biomedical Imaging*, pages 795–798.
- [Kuchinke et al. 1998] Kuchinke, U., Grawe, F., and Knust, E. (1998). Control of spindle orientation in *Drosophila* by the par-3-related pdz-domain protein bazooka. *Current biology*, 8(25):1357–1365.
- [Kumar et al. 2002] Kumar, S., Jayaraman, K., Panchanathan, S., Gurunathan, R., Marti-Subirana, A., and Newfeld, S. (2002). Best: A novel computational approach for comparing gene expression patterns from early stages of *Drosophila melanogaster* development. *Genetics*, 162(4):2037–2047.
- [Kutalik et al. 2004] Kutalik, Z., Razaz, M., and Baranyi, J. (2004). Automated spatial and temporal image analysis of bacterial cell growth. In *BMVA One Day Symposium on Spatiotemporal Image Processing*.
- [L. He and Wu 2009] L. He, Y. Chao, K. S. and Wu, K. (2009). Fast connected-component labeling. *Pattern Recognition*, 42:1977–1987.
- [Lee and Schachter 1980] Lee, D. and Schachter, B. (1980). Two algorithms for constructing a delaunay triangulation. *International Journal of Computer & Information Sciences*, 9(3):219–242.
- [Lehninger et al. 1995] Lehninger, A. L., Nelson, D. L., and Cox, M. M. (1995). *Princípios de bioquímica*. Sarvier, São Paulo.
- [Levine 1985] Levine, M. D. (1985). *Vision in man and machine*. McGraw-Hill. NY.
- [Lewin 2001] Lewin, B. (2001). *Genes VII*. Porto Alegre: Artmed. Tradução H. B. Ferreira.
- [Lim et al. 1995] Lim, K. B., Xin, K., and Hong, G. S. (1995). Detection and estimation of circular arc segments. *Pattern Recognition Letters*, 16(6):627–636.
- [Lin et al. 2003] Lin, G., Adiga, U., Olson, K., Guzowski, J. F., Barnes, C. A., and Roysam, B. (2003). A hybrid 3d watershed algorithm incorporating gradient cues and object models for automatic segmentation of nuclei in confocal image stacks. *Cytometry A*, 56(1):23–36.
- [Lin et al. 2005] Lin, G., Chawla, M. K., Olson, K., Guzowski, J. F., Barnes, C. A., and Roysam, B. (2005). Hierarchical, model-based merging of multiple fragments for improved three-dimensional segmentation of nuclei. *Cytometry A*, 63(1):20–33.
- [Liu and Srinath 1990] Liu, H.-C. and Srinath, M. (1990). Corner detection from chain-code. *Pattern Recognition*, 23(1-2):51–68.
- [Lopes et al. 2008] Lopes, F., Vieira, F., Holloway, D., Bisch, P., and Spirov, A. (2008). Spatial bistability generates hunchback expression sharpness in the *drosophila* embryo. *PLoS Comput Biol*, 4(9):1–14.
- [Lorkowski and Cullen 2004] Lorkowski, S. and Cullen, P. (2004). High-throughput analysis of mrna expression: microarrays are not the whole story. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 14(3):377–403.

- [Lu and Vogel 2009] Lu, B. and Vogel, H. (2009). Drosophila models of neurodegenerative diseases. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 4(1):315–342.
- [Luengo Hendriks 2003] Luengo Hendriks, C. L. (2003). *Structure characterization using mathematical morphology*. PhD thesis, Pattern Recognition Group, Delft University of Technology, Delft, The Netherlands.
- [Malpica et al. 1997] Malpica, N., de Solórzano, C. O., Vaquero, J. J., Santos, A., Vallcorba, I., García-Sagredo, J. M., and Pozo, F. D. (1997). Applying watershed algorithms to the segmentation of clustered nuclei. *Cytometry*, 28(4):289–297.
- [Marques Filho and Vieira Neto 1999] Marques Filho, O. and Vieira Neto, H. (1999). *Processamento digital de imagens*. Brasport,.
- [Matheron and Serra 2002] Matheron, G. and Serra, J. (2002). The birth of mathematical morphology. In *Proc. 6th Intl. Symp. Mathematical Morphology*, pages 1–16.
- [Matula et al. 2008] Matula, P., Kumar, A., Wörz, I., Harder, N., Erfle, H., Bartenschlager, R., Eils, R., and Rohr, K. (2008). Automated analysis of sirna screens of virus infected cells based on immunofluorescence microscopy. In Tolxdorff, T., Braun, J., Deserno, T., Horsch, A., Handels, H., and Meinzer, H.-P., editors, *Bildverarbeitung für die Medizin*, Informatik aktuell, pages 453–457. Springer Berlin Heidelberg.
- [Maus 1984] Maus, A. (1984). Delaunay triangulation and the convex hull ofn points in expected linear time. *BIT Numerical Mathematics*, 24(2):151–163.
- [Megason and Fraser 2007] Megason, S. and Fraser, S. (2007). Imaging in systems biology. *Cell*, 130(5):784–795.
- [Meijering 2012] Meijering, E. (2012). Cell segmentation: 50 years down the road [life sciences]. *IEEE Signal Process. Mag.*, 29(5):140–145.
- [Metzler et al. 2000] Metzler, V., Lehmann, T. M., Bienert, H., Mottaghy, K., and Spitzer, K. (2000). Scale-independent shape analysis for quantitative cytology using mathematical morphology. *Computers in Medicine and Biology*, 30(3):135–151.
- [Meyer 1994] Meyer, F. (1994). Topographic distance and watershed lines. *Signal Processing*, 38(1):113–125.
- [Meyer and Beucher 1990] Meyer, F. and Beucher, S. (1990). Morphological segmentation. *Journal of Visual Communication and Image Representation*, 1(1):21–46.
- [Miazaki 2012] Miazaki, M. (2012). *Estudo da forma, função e expressão gênica em neurociência*. PhD thesis, Instituto de Física da Universidade de São Paulo (USP).
- [Michno 2009] Michno, K. (2009). *Drosophila Melanogaster as a Model Organism to Study Human Neurodegenerative Diseases*. University of Toronto.
- [Mingoti 2005] Mingoti, S. (2005). *Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada*. Editora UFMG.
- [Mokhtarian and Mackworth 1992] Mokhtarian, F. and Mackworth, A. (1992). A theory of multiscale, curvature-based shape representation for planar curves. *Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on*, 14(8):789–805.

- [Morrison et al. 2012] Morrison, A. H., Scheeler, M., Dubuis, J., and Gregor, T. (2012). Quantifying the bicoid morphogen gradient in living fly embryos. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2012(4):398–406.
- [Narciso and Nakagawa 2009] Narciso, E. S. and Nakagawa, L. E. (2009). Análise de praguicidas por bioensaio com mosca drosophila melanogaster e cromatografia em camada delgada. *Arq. Inst. Biol*, 76(2):313–316.
- [Nichols 2006] Nichols, C. D. (2006). Drosophila melanogaster neurobiology, neuropharmacology, and how the fly can inform central nervous system drug discovery. *Pharmacol Ther*, 112(3):677–700.
- [Okabe et al. 2000] Okabe, A., Boots, B., Sugihara, K., and Chiu, S. N. (2000). *Spatial tessellations: Concepts and applications of Voronoi diagrams*. Probability and Statistics. Wiley, NYC, 2nd edition. 671 pages.
- [Otsu 1979] Otsu, N. (1979). A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics*, 9(1):62–66.
- [Ouzounis 2002] Ouzounis, C. (2002). Bioinformatics and the theoretical foundations of molecular biology. *Bioinformatics*, 18, n.3:377–8.
- [Paddock 1999] Paddock, S. (1999). *Confocal Microscopy: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology Series. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey.
- [Pan et al. 2006] Pan, J., Balan, A., Xing, E., Traina, A., and Faloutsos, C. (2006). Automatic mining of fruit fly embryo images. In *Proceedings of the 12th ACM SIGKDD international conference on Knowledge discovery and data mining*, pages 693–698.
- [Papatsenko et al. 2009] Papatsenko, D., Goltsev, Y., and Levine, M. (2009). Organization of developmental enhancers in the Drosophila embryo. *Nucleic Acids Res*, 37(17):5665–5677.
- [Papoulis 1962] Papoulis, A. (1962). *The Fourier integral and its applications*. McGraw-Hill electronic sciences series. McGraw-Hill.
- [Park and Han 1998] Park, J. S. and Han, J. H. (1998). Contour matching: a curvature-based approach. *Image and Vision Computing*, 16(3):181–189.
- [Pedrini and Schwartz 2008] Pedrini, H. and Schwartz, W. R. (2008). *Análise de Imagens Digitais: princípios, algoritmos e aplicações*. Thomson Learning. São Paulo.
- [Pei and Lin 1992] Pei, S.-C. and Lin, C.-N. (1992). The detection of dominant points on digital curves by scale-space filtering. *Pattern Recognition*, 25(11):1307 – 1314.
- [Peng 2008] Peng, H. (2008). Bioimage informatics: a new area of engineering biology. *Bioinformatics*, 24(17):1827–1836.
- [Peng et al. 2007] Peng, H., Long, F., Zhou, J., Leung, G., Eisen, M., and Myers, E. (2007). Automatic image analysis for gene expression patterns of fly embryos. *BMC Cell Biology*, 8(Suppl 1):S7.

- [Pereira et al. 2007] Pereira, M. C. L., Suzuki, D. E., Janjoppis, L., and Okamoto, O. K. (2007). Estratégias para neuro-restauração em modelos experimentais de doença de parkinson. *Einstein*, 5(4):387–391.
- [Pikaz and Dinstein 1994] Pikaz, A. and Dinstein, I. (1994). Using simple decomposition for smoothing and feature point detection of noisy digital curves. *Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on*, 16(8):808–813.
- [Pinidiyaarachchi and Wählby 2005] Pinidiyaarachchi, A. and Wählby, C. (2005). Seeded watersheds for combined segmentation and tracking of cells image analysis and processing. In Roli, F. and Vitulano, S., editors, *Int. Conf. Image Anal. Process (ICIAP)*, volume 3617 of *Lecture Notes in Computer Science*, chapter 41, pages 336–343. Springer Berlin / Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- [Pisarev et al. 2009] Pisarev, A., Poustelnikova, E., Samsonova, M., and Reinitz, J. (2009). Flyex, the quantitative atlas on segmentation gene expression at cellular resolution. *Nucleic Acids Research*, 37(suppl 1):D560–D566.
- [Poustelnikova et al. 2004] Poustelnikova, E., Pisarev, A., Blagov, M., Samsonova, M., and Reinitz, J. (2004). A database for management of gene expression data in situ. *Bioinformatics*, 20(14):2212–2221.
- [Prata 2013] Prata, G. N. (2013). *Um modelo estocástico para a transcrição do gene even-skipped de Drosophila melanogaster*. PhD thesis, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo (USP).
- [Preparata and Shamos 1985] Preparata, F. P. and Shamos, M. I. (1985). *Computational geometry: an introduction*. Springer-Verlag New York, Inc., New York, NY, USA.
- [Qi et al. 2012] Qi, X., Xing, F., Foran, D. J., and Yang, L. (2012). Robust segmentation of overlapping cells in histopathology specimens using parallel seed detection and repulsive level set. *IEEE Trans. Biomed. Engineering*, 59(3):754–765.
- [Quackenbush 2001] Quackenbush, J. (2001). Computational analysis of cdna microarray data. *Nature Reviews*, 6(2):418–428.
- [Quelhas et al. 2010] Quelhas, P., Marcuzzo, M., and Mendonça, A. M. (2010). Cell nuclei and cytoplasm joint segmentation using the sliding band filter. *IEEE Transaction on Medical Imaging*, 29(8):1463–1473.
- [Ray and Pandyan 2003] Ray, B. K. and Pandyan, R. (2003). Acord an adaptive corner detector for planar curves. *Pattern Recognition*, 36(3):703 –708.
- [Regazzi 2001] Regazzi, A. J. (2001). *Análise multivariada*. PhD thesis, Universidade Federal de Viçosa, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas. Departamento de Informática.
- [Restif 2006] Restif, C. (2006). *Segmentation and Evaluation of Fluorescence Microscopy Images*. PhD thesis, Oxford Brookes University.
- [Rittscher 2010] Rittscher, J. (2010). Characterization of biological processes through automated image analysis. *Annu Rev Biomed Eng*, 12:315–44.

- [Roerdink and Meijster 2001] Roerdink, J. B. T. M. and Meijster, A. (2001). The watershed transform: Definitions, algorithms and parallelization strategies. *Fundamenta Informaticae*, 41(1–2):187–228.
- [Rosenfeld and Johnston 1973] Rosenfeld, A. and Johnston, E. (1973). Angle detection on digital curves. *Computers, IEEE Transactions on*, C-22(9):875–878.
- [Rosenfeld and Weszka 1975] Rosenfeld, A. and Weszka, J. S. (1975). An improved method of angle detection on digital curves. *Computers, IEEE Transactions on*, C-24(9):940–941.
- [Rubel et al. 2006] Rubel, O., bel, O., Weber, G., Keranen, S., Fowlkes, C., Hendriks, C., Simirenko, L., Shah, N., Eisen, M., Biggin, M., Hagen, H., et al. (2006). Pointcloudxplore: Visual analysis of 3d gene expression data using physical views and parallel coordinates. In *Data Visualization*, pages 203–210.
- [Sabiston and Townsend 2005] Sabiston, D. C. and Townsend, C. M. (2005). *Tratado de Cirurgia: a base biológica da moderna prática cirúrgica*. Rio de Janeiro: Elsevier. Tradução Ione Ferreira Araújo.
- [Santos and Alencar 2003] Santos, W. and Alencar, H. (2003). *Geometria diferencial das curvas planas*. IMPA.
- [Sepel and Loreto 2010] Sepel, L. M. N. and Loreto, E. L. S. (2010). Um século de drosophila na genética. *Departamento de Biologia e PPG Educação em Ciências, CCNE. Artigos, Santa Maria-RS*, 2:43–47.
- [Serra 1988] Serra, J. (1988). *Image Analysis and Mathematical Morphology*, volume 2. Theoretical Advances: Academic Press.
- [Serrano et al. 2002] Serrano, M., De Fabritiis, G., Español, P., Flekkoy, E. G., and Coveney, P. V. (2002). Mesoscopic dynamics of voronoi fluid particles. *Journal of Physics A: Mathematics and General*, 35(7):1605–1625.
- [Sohn et al. 1994] Sohn, K., Alexander, W. E., Kim, J. H., and Snyder, W. E. (1994). A constrained regularization approach to robust corner detection. *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics*, 24(5):820–828.
- [Soille 1999] Soille, P. (1999). *Morphological Image Analysis: principles and applications*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [Solomon and Breckon 2010] Solomon, C. and Breckon, T. (2010). *Fundamentals of Digital Image Processing: A Practical Approach with Examples in Matlab*. Wiley-Blackwell.
- [Song et al. 2012] Song, Y., Cai, W., and Feng, D. D. (2012). Microscopic image segmentation with two-level enhancement of feature discriminability. In *DICTA*, pages 1–6. IEEE.
- [Stapleton et al. 2002] Stapleton, M., Liao, G., Brokstein, P., Hong, L., Carninci, P., Shiraki, T., Hayashizaki, Y., Champe, M., Pacleb, J., Wan, K., Yu, C., Carlson, J., George, R., Celniker, S., and Rubin, G. M. (2002). The drosophila gene collection: identification of putative full-length cdnas for 70 *Genome Res*, 12(8):1294–1300.

- [Stora et al. 1999] Stora, D., Agliati, P.-O., Cani, M.-P., Neyret, F., and Gascuel, J.-D. (1999). Animating lava flows. In *Graphics Interface*, pages 203–210.
- [Surkova et al. 2008] Surkova, S., Myasnikova, E., Janssens, H., Kozlov, K., Samsonova, A., Reinitz, J., and Samsonova, M. (2008). Pipeline for acquisition of quantitative data on segmentation gene expression from confocal images. *Fly (Austin)*, 2(2):58–66.
- [Swedlow and Eliceiri 2009] Swedlow, J. R. and Eliceiri, K. W. (2009). Open source bioimage informatics for cell biology. *Trends Cell Biol*, 19(11):656–660.
- [Tang 1992] Tang, L. (1992). Raster algorithms for surface modelling. *International Archives of Photogrammetry and Remote Sensing*, 29(3):566–573. Commission III, Washington, D.C., USA.
- [Teixeira 2002] Teixeira, R. (2002). Medial axes and mean curvature motion i: Regular points. *JVCIR*, 13(1/2):135–155.
- [Tomancak et al. 2002] Tomancak, P., Beaton, A., Weiszmam, R., Kwan, E., Shu, S., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Hartenstein, V., Celniker, S. E., and Rubin, G. M. (2002). Systematic determination of patterns of gene expression during drosophila embryogenesis. *Genome Biol*, 3(12):RESEARCH0088.
- [Tomancak et al. 2007] Tomancak, P., Berman, B. P., Beaton, A., Weiszmam, R., Kwan, E., Hartenstein, V., Celniker, S. E., and Rubin, G. M. (2007). Global analysis of patterns of gene expression during drosophila embryogenesis. *Genome Biol*, 8(7):R145.
- [Travençolo 2007] Travençolo, B. (2007). *Métodos computacionais para a caracterização e análise da relação entre anatomia e expressão gênica em sistemas biológicos*. PhD thesis, Programa Interunidades em Bioinformática, Universidade de São Paulo (USP).
- [Vincent and Soille 1991] Vincent, L. and Soille, P. (1991). Watersheds in digital spaces: An efficient algorithm based on immersion simulations. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, 13(6):583–598.
- [Wahlby et al. 2002] Wahlby, C., Lindblad, J., Vondrus, M., Bengtsson, E., and Lenart, B. (2002). Algorithms for cytoplasm segmentation of fluorescence labelled cells. *Analytical Cellular Pathology*, 24(2-3):101–11.
- [Wahlby C FAU Sintorn et al. 2004] Wahlby C FAU Sintorn, I.-M., Sintorn IM FAU Erlandsson, F., Erlandsson F FAU Borgefors, G., Borgefors G FAU Bengtsson, E., and E, B. (2004). Combining intensity, edge and shape information for 2d and 3d segmentation of cell nuclei in tissue sections. *Journal of Microscopy*, 215(0022-2720 (Linking)):67–76.
- [Walczyk et al. 2010] Walczyk, R., Armitage, A., and Binnie, T. D. (2010). Comparative study on connected component labeling algorithms for embedded video processing systems. In Arabnia, H. R., Deligiannidis, L., Schaefer, G., and Solo, A. M. G., editors, *IPCV*, pages 853–859. CSREA Press.
- [Wan et al. 2006] Wan, K. H., Yu, C., George, R. A., Carlson, J. W., Hoskins, R. A., Svirskas, R., Stapleton, M., and Celniker, S. E. (2006). High-throughput plasmid cdna library screening. *Nat Protoc*, 1(2):624–632.

- [Wang and Song 2007] Wang, W. and Song, H. (2007). Cell cluster image segmentation on form analysis. In *Proceedings of the Third International Conference on Natural Computation - Volume 04*, ICNC '07, pages 833–836, Washington, DC, USA. IEEE Computer Society.
- [Weeks 1996] Weeks, J. A. R. (1996). *Fundamentals of Electronic Image Processing*. SPIE.
- [Wheeler et al. 2008] Wheeler, S., Stagg, S., and Crews, S. (2008). Multiple notch signaling events control Drosophila cns midline neurogenesis, gliogenesis and neuronal identity. *Development*, 135(18):3071–3079.
- [Wolpert 1969] Wolpert, L. (1969). Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *Journal of theoretical biology*, 25(1):1–47.
- [Worring and Smeulders 1993] Worring, M. and Smeulders, A. W. M. (1993). Digital curvature estimation. *CVGIP: Image Underst.*, 58(3):366–382.
- [WU et al. 2008] WU, Q., Merchant, F. A., and Castleman, K. R. (2008). *Microscope image processing*. Academic Press: Elsevier. Amsterdam.
- [Xiong et al. 2006a] Xiong, G., Zhou, X., and Ji, L. (2006a). Automated segmentation of drosophila rnai fluorescence cellular images using deformable models. *IEEE Transactions on Circuits and Systems*, 53(11):2415–2424.
- [Xiong et al. 2006b] Xiong, G., Zhou, X., Ji, L., Bradley, P., Perrimon, N., and Wong, S. (2006b). Segmentation of drosophila rnai fluorescence images using level sets. In *Image Processing, 2006 IEEE International Conference on*, pages 73–76.
- [Yan et al. 2008] Yan, P., Zhou, X., Shah, M., and Wong, S. T. (2008). Automatic segmentation of high-throughput rnai fluorescent cellular images. *IEEE Transactions on Information Technology in Biomedicine*, 12(1):109–117.
- [Yang et al. 2006a] Yang, X., Li, H., and Zhou, X. (2006a). Nuclei segmentation using marker-controlled watershed, tracking using mean-shift, and kalman filter in time-lapse microscopy. *Microscopy*, 53(11):2405–2414.
- [Yang et al. 2006b] Yang, X., Scheffler, B., and Weston, L. (2006b). Recent developments in primer design for dna polymorphism and mrna profiling in higher plants. *Plant Methods*, 2(1):4.
- [Yang et al. 2006c] Yang, Y., Gehrke, S., Imai, Y., Huang, Z., Ouyang, Y., Wang, J.-W., Yang, L., Beal, M. F., Vogel, H., and Lu, B. (2006c). Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of drosophila pink1 is rescued by parkin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(28):10793–10798.
- [Young et al. 1991] Young, P. E., Pesacreta, T. C., and Kiehart, D. P. (1991). Dynamic changes in the distribution of cytoplasmic myosin during drosophila embryogenesis. *Development*, 111(1):1–14.
- [Yu et al. 2009] Yu, W. M., Lee, H. K., Hariharan, S., Bu, W. Y., and Ahmed, S. (2009). Quantitative neurite outgrowth measurement based on image segmentation with topological dependence. *Cytometry*, 75(4):289–297.

- [Zhang et al. 1996] Zhang, C., Lee, M., Chen, A., Brown, S., and Hsieh, T. (1996). Isolation and characterization of a drosophila gene essential for early embryonic development and formation of cortical cleavage furrows. *The Journal of cell biology*, 134(4):923–934.