

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
CAMPUS DE RIO PARANAÍBA
SISTEMAS DE INFORMAÇÃO

RODRIGO JÚNIOR RODRIGUES DOS SANTOS

**UMA COMPARAÇÃO ENTRE DOIS MÉTODOS PARA
SEGMENTAÇÃO DE CROMOSSOMOS SOBREPOSTOS EM
IMAGENS DE MICROSCOPIA**

RIO PARANAÍBA

2018

RODRIGO JÚNIOR RODRIGUES DOS SANTOS

UMA COMPARAÇÃO ENTRE DOIS MÉTODOS PARA
SEGMENTAÇÃO DE CROMOSSOMOS SOBREPOSTOS EM
IMAGENS DE MICROSCOPIA

Monografia apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências para a aprovação na disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II

Orientador: Prof. Dr. João Fernando Mari

RIO PARANAÍBA

2018

SUMÁRIO

I	Introdução	4
II	Referencial Teórico	4
II-A	Morfologias Binárias	5
II-B	Erosão e Dilatação Binária	5
II-C	Abertura e Fechamento	5
II-D	Detecção de Bordas de <i>Canny</i>	5
II-E	<i>Hit-or-Miss</i>	6
II-F	Algoritmo de <i>Otsu</i>	6
II-G	Afinamento	6
III	Trabalhos Relacionados	6
IV	Material e Métodos	7
IV-A	Conjunto de dados	7
IV-B	Segmentação da imagem em fundo e cromossomos	7
IV-C	Separação de cromossomos sobrepostos utilizando o Esqueleto Morfológico . .	7
IV-C1	Detecção do ponto de intersecção no Esqueleto Morfológico	8
IV-C2	Detecção dos pontos de corte na borda dos cromossomos	8
IV-D	Separação de cromossomos sobrepostos utilizando a Triangulação de Delaunay .	8
IV-D1	Extração do contorno e Função de Curvatura	9
IV-D2	Triangulação de Delaunay Restrita e localização dos pontos de corte	9
IV-E	Validação	9
V	Resultados	10
VI	Conclusões	10
	Referências	11

A comparison between two approaches to segment overlapped chromosomes in microscopy images

Rodrigo Júnior Rodrigues, Welton Felipe Gonçalves, João Fernando Mari

Universidade Federal de Viçosa *Campus* Rio Paranaíba,

Instituto de Ciências Exatas e Tecnológicas,

Caixa Postal 22 – 38.810-000 – Rio Paranaíba – MG – Brazil

Email: {rodrigo.rodrigues, welton.goncalves, joaof.mari}@ufv.br

Resumo—The chromosome segmentation is the most important step in the automatic assembly of a karyotype. This work addresses methods for the problem of overlapping chromosome segmentation. Firstly, pixels belonging to chromosome regions are separated from the background. For the chromosome separation, we implemented two methods, one based on the Morphological Skeleton of the chromosome shapes and one based on the Restricted Delaunay Triangulation. The objective of both methods is to find adequate cut points, points on the contour of the shape used to separate the chromosomes. The main contribution of this work is the evaluation of these different approaches in a pragmatic way using a public available dataset with ground-truth provided. We applied the developed methods in 100 images of overlapping chromosomes. The results are evaluated considering the Hausdorff distance criteria and the method based on the Restricted Delaunay Triangulation presented better results but higher computational cost.

Keywords—Computational vision, karyotype, chromosomes, digital images, separation.

I INTRODUÇÃO

A cariotipagem cromossômica é uma tarefa essencial em citogenética, é útil em diversas atividades práticas e de pesquisa, para auxílio no diagnóstico de doenças genéticas, alguns tipos de câncer e pesquisas na área de citogenéticos [1]. Os cromossomos são compostos de DNA super-enrolado e associados. Uma anomalia cromossômica pode estar relacionada à um número atípico de cromossomos ou uma anormalidade estrutural em um ou mais cromossomos. A anomalia numérica é uma variação no número de cromossomos. A anomalia estrutural é a quebra e a perda de uma porção do braço cromátide ou uma reunião do braço em local diferente no mesmo cromossomo ou em um cromossomo diferente. Anomalias cromossômicas geralmente ocorrem quando há um erro na operação da divisão celular após meiose ou mitose [2].

Métodos descritos na literatura para a separação de sobreposições incluem vários métodos de segmentação como limiarização ou crescimento de regiões, pesquisas heurísticas de borda, métodos de ligação e métodos de decomposição de formas [3]. A imagem é primeiro convertida em imagem binária. A imagem binária ajuda a obter detalhes sobre a forma de qualquer objeto [4]. Cromossomos são estruturas celulares que contêm genética em formação. Quando cromossomos são imageados por microscopia podem fornecer muitas informações sobre a saúde de um indivíduo. Desde os anos 1980, os sistemas de detecção de cromossomos e classificação automática têm despertado grande interesse de pesquisa. Um

grande número de estudos tem sido realizado para desenvolver sistemas de detecção e classificação automática de cromossomos.

A montagem manual do cariótipo é uma tarefa repetitiva, desgastante, consome tempo e está sujeita a erros, pode ser realizada por meio de análise visual e requer a atenção de um profissional experiente e especializado. Em alguns casos a análise de muitas metáfases é necessária. A segmentação do cromossomo é o passo mais importante na análise automática de cromossomos [3]. Um sistema automático geralmente inclui as seguintes quatro etapas: (1) melhoria de imagem, (2) segmentação e alinhamento do cromossomo, (3) computação e seleção de características e (4) classificação cromossômica. Nestas fases, a segmentação do cromossomo é o mais importante pois os seus resultados podem afetar o desempenho de todo o sistema [5].

Deste modo, o presente trabalho busca estudar e comparar duas abordagens para a segmentação de cromossomos sobrepostos por meio da detecção de pontos de interesse na borda dos objetos. Esses pontos de interesse são usados para definir as linhas de corte nos cromossomos para separá-los adequadamente. As abordagens testadas e comparadas são baseadas em: a) identificação de pontos de intersecção no esqueleto morfológico do objeto; b) análise dos triângulos resultantes da Triangulação de Delaunay Restrita dos pontos no contorno dos objetos. Os métodos foram implantados e testados em um conjunto de imagens disponível publicamente com *ground-truth*. Foi realizada a análise e comparação quantitativa dos métodos implementados para a segmentação de cromossomos sobrepostos em imagens de microscopia.

Este artigo está organizado da seguinte maneira: esta seção apresenta a introdução sobre o assunto. A Seção II mostra o referencial teórico e a Seção III alguns trabalhos relacionados sobre segmentação de cromossomos sobrepostos. A Seção IV descreve os métodos que foram desenvolvidos e testados, assim como o conjunto de dados e os métodos de validação. A Seção V apresenta os resultados e a Seção VI as conclusões e trabalhos futuros.

II REFERENCIAL TEÓRICO

Este capítulo apresenta o estudo bibliográfico desta pesquisa, foi feito um levantamento dos principais autores e metodologias das áreas relacionadas.

II-A Morfologias Binárias

A imagem binária tem apenas dois níveis de cinza, 0 e 1, pixels com níveis de cinza 0 (pixels de fundo) e nível de cinza 1 (pixels interiores). Um conjunto de pixels interiores conectados forma uma imagem binária. Algum desses objetos corresponderá a estruturas físicas sobre a lâmina de microscopia. Outros podem ser devido a artefatos ou ruído. A segmentação de imagens é o processo de delinear as estruturas reais na imagem [6][7].

II-B Erosão e Dilatação Binária

A maioria das operações morfológicas é baseada na erosão de uma imagem por um elemento de estruturação. A erosão acontece digitalizando a imagem com o elemento estruturante. Quando o elemento estruturante se encaixa completamente dentro do objeto, a posição da sonda é marcada. O resultado da erosão consiste em todos os locais de digitalização onde o elemento estruturante se encaixa dentro do objeto. A imagem corroída é normalmente uma versão abreviada da imagem, e o efeito de encolhimento é controlado pelo tamanho e forma do elemento de estruturação [6][7][8]. A erosão do conjunto A por conjunto B é definida pela Equação (1):

$$A \ominus B = \{x : B_x \subset A\} \quad (1)$$

, onde \subset denota a relação subconjunto e $B_x = \{b+x : b \in B\}$ é a tradução do conjunto A por um ponto x [7].

A dilatação envolve a montagem de uma sonda para o complemento da imagem. Assim, ela representa uma filtragem no exterior do objeto, enquanto a erosão representa uma filtragem no interior do objeto. A dilatação do conjunto A por B é definida pela Equação (2):

$$A \oplus B = (A^c \ominus \check{B})^c \quad (2)$$

, onde A^c indica o complemento de A e $\check{B} = \{-b : b \in B\}$ é o reflexo de B , isto é, uma rotação de 180° sobre a origem de B [7].

A dilatação tem o efeito de expandir o objeto, o preenchimento de pequenos orifícios em intrusões, enquanto a erosão tem um efeito de encolhimento, ampliando buracos pequenos e eliminando intrusões [6][7][8].

II-C Abertura e Fechamento

Além das duas operações principais de erosão e dilatação, mais duas operações importantes desempenham papéis fundamentais em processamento de imagem morfológica: abertura e seu duplo fechamento. A abertura geralmente suaviza o contorno de um objeto, rompe os istmos e elimina as saliências finas. O fechamento preserva o fundo de acordo com a forma do elemento estruturante [4], tende a suavizar contornos, mas, ao contrário da abertura, geralmente funde as descontinuidades estreitas e alonga os golfos finos, elimina pequenos buracos e preenche lacunas se presente em uma imagem. A abertura do conjunto A pelo elemento estruturante B , indicado por $A \circ B$ é expressa pela Equação (3):

$$A \circ B = (A \ominus B) \oplus B \quad (3)$$

A operação de fechamento do conjunto A pelo elemento estruturante B é dada pela Equação (4):

$$A \bullet B = (A \oplus B) \ominus B \quad (4)$$

A abertura de A por B é a erosão de A por B , seguida de uma dilatação do resultado por B . Operação de fechamento de A por B é a dilatação de A por B , seguida pela erosão do resultado por B [4][6][7][8].

II-D Detecção de Bordas de Canny

O filtro *Canny* é um detector de bordas multi-estágio. É baseado na derivada de um Gaussiano para calcular a intensidade dos gradientes. A abordagem de *Canny* baseia-se em três objetivos específicos. Baixa taxa de erro, onde todos as bordas deverão ser encontradas e não deve haver respostas espúrias. Ou seja, as bordas detectadas devem ser o mais próximo das bordas verdadeiras. O segundo objetivo, os pontos de borda devem estar bem localizados, a distância entre um ponto marcado como borda pelo detector e o centro da borda verdadeira deve ser o mínimo. Por ultimo, a resposta de um único ponto de borda, o número de máximos locais em torno da borda verdadeira deve ser o mínimo. Isso significa que o detector não deve identificar múltiplos pixels de borda em que apenas um único ponto de borda existe [6] [9]. Encontrar um solução fechada que satisfaça esses três objetivos é uma tarefa difícil. Uma otimização numérica com bordas de grau 1-D levam conclusão de uma aproximação para o detector de borda é a primeira derivada de uma gaussiana como mostra a Equação (5) abaixo [6].

$$\frac{d}{dx} e^{-\frac{x^2}{2\sigma^2}} = -\frac{x}{\sigma^2} e^{-\frac{x^2}{2\sigma^2}} \quad (5)$$

Generalizar este resultado para uma imagem 2-D exigiria a aplicação do detector de borda 1-D e todas as direções possíveis. Essa tarefa pode ser feita suavizando primeiro a imagem com uma função gaussiana circular 2-D, calculando o gradiente do resultado e, em seguida, usar a magnitude do gradiente e a direção para estimar a intensidade da borda e a direção de cada ponto. Podemos observar a Equação (6), onde $f(x, y)$ denota a imagem de entrada e $g(x, y)$ denota a função gaussiana [6] (Equação (6)).

$$G(x, y) = e^{-\frac{x^2+y^2}{2\sigma^2}} \quad (6)$$

A Equação (7), mostra a imagem formada suavizada, $f(x, y)$, por convolução de $g(x, y)$ [6] (7).

$$f_s(x, y) = G(x, y) \star f(x, y) \quad (7)$$

Esta operação é seguida pelo cálculo da magnitude e da direção do gradiente, como podemos observar na Equação (8) e na Equação (9) [6].

$$M(x, y) = \sqrt{g_x^2 + g_y^2} \quad (8)$$

$$\alpha(x, y) = tg^{-1} \begin{bmatrix} g_y \\ g_x \end{bmatrix} \quad (9)$$

II-E Hit-or-Miss

Pode-se utilizar a transformada *hit-or-miss* para a detecção de formas e obter a localização de um determinado objeto em uma imagem. Em algumas aplicações podemos estar interessados na detecção de certos padrões de 1(s) e 0(s) dentro de um conjunto. É usado um elemento estruturante associados com os objetos e um elemento associado como fundo. Isso porque deve-se a definição de que dois ou mais objetos são distintos somente se formarem conjuntos disjuntos (não conectados). Isso é garantido exigindo que cada objeto tenha um fundo de pelo menos um pixel de espessura ao redor dele. A notação da transformada *hit-or-miss* é dada pela Equação (17):

$$A \circledast B = (A \ominus B_1) \cap (A^c \ominus B_2) \quad (10)$$

, onde o conjunto $A \circledast B$ contém todos os pontos (origem) em que, simultaneamente, B_1 encontrou um acerto (hit) em A , e B_2 encontrou um acerto em A^c [6].

II-F Algoritmo de Otsu

Um método de limiarização muito utilizado é o proposto por Otsu [10]. O método de Otsu é considerado ótimo no sentido de maximizar a variância entre as classes. Sua aplicação não necessita de parâmetros. Este limiar é aplicado sobre o histograma da imagem de modo que este se torna bimodal e assim a imagem passa a ter duas classes de pixels e dessa forma, ocorre a divisão dos pixels de objetos (foreground) e pixels de fundo (background) da imagem [10] [6].

Seja L o número de tons presentes em uma imagem, n_i o número de pixels de intensidade i , e N o número total de pixels da imagem, denota-se por p_i a probabilidade de ocorrência de um pixel i , como mostrado na Equação (11):

$$p_i = \frac{n_i}{N} \quad (11)$$

Além disso, utilizam-se os valores das somas das probabilidades até o limiar k , de acordo com a Equação (12):

$$w(k) = \sum_{i=1}^k p_i \quad (12)$$

A intensidade média até o limiar k , de acordo com a Equação (13):

$$\mu(k) = \sum_{i=1}^k ip_i \quad (13)$$

E a intensidade média global μ_T , de acordo com a Equação (14):

$$\mu_t = \sum_{i=1}^k ip_i \quad (14)$$

O limiar k divide os pixels em dois conjuntos $c1$ e $c2$ contendo os pixels menores ou iguais e maiores que k ,

respectivamente. O cálculo da variância entre classes é dado pela Equação (15):

$$\sigma_B^2(k) = \frac{[\mu_T w(k) - \mu(k)]^2}{w(k)[1 - w(k)]} \quad (15)$$

O limiar de Otsu k^* é definido pelo valor k para o qual a função $\sigma_B^2(k)$ gerar o maior valor [10] [6].

II-G Afinamento

Zhang e Suen propuseram um algoritmo paralelo de esqueletonização. O algoritmo de Zhang e Suen, consiste em sucessivas aplicações ao contorno da imagem de duas regras, sendo que os pontos do contorno são quaisquer pontos com valor 1 que tenham ao menos um dos seus oito vizinhos iguais a 0. As transformações são aplicadas à imagem ponto por ponto de acordo com os valores de um pequeno conjunto de pontos vizinhos. O algoritmo é paralelo, ou seja, os pixels são examinados para exclusão baseados apenas na iteração anterior. Assim, o algoritmo é composto por duas iterações: Na primeira, o pixel P1 será excluído se todas as quatro condições da Tabela I forem satisfeitas [11].

Tabela I: Condições da primeira iteração. Adaptado de Zhang e Suen [11]

c1	$2 \leq B(P1) \leq 6$
c2	$A(P1) = 1$
c3	$P2 \cdot P4 \cdot P6 = 0$
c4	$P4 \cdot P6 \cdot P8 = 0$

Na segunda iteração, as linhas c3 e c4 da tabela são substituídas por suas rotações de 180°, sendo assim, o pixel P1 será excluído se as condições da Tabela II forem satisfeitas [11].

Tabela II: Condições da segunda iteração. Adaptado de Zhang e Suen [11]

c1	$2 \leq B(P1) \leq 6$
c2	$A(P1) = 1$
c3	$P2 \cdot P4 \cdot P8 = 0$
c4	$P2 \cdot P6 \cdot P8 = 0$

III TRABALHOS RELACIONADOS

Munot *et al.* [12] desenvolveram um método para identificar os pontos de corte em imagens de cromossomos sobrepostos. O método é composto por etapas de pré-processamento, limiarização e detecção de bordas. Após obter um conjunto de pontos candidatos por meio de curvas com alto valor de inclinação, o algoritmo gera uma Triangulação de Delaunay para avaliar os pontos de corte. A Triangulação de Delaunay Restrita é utilizada para restringir o domínio da triangulação. Os vértices dos triângulos com área máxima gerados pela Triangulação de Delaunay Restrita são os pontos de corte considerados para a separação.

Somasundaram e Kumar [4] abordam o problema da separação de cromossomos sobrepostos e classificação de cromossomos pela posição do centrômero. O passo inicial deste trabalho é segmentar e separar as imagens de cromossomos sobrepostas. A imagem é primeiro convertida em imagem binária. Uma vez que as imagens binárias são obtidas, a forma exata e a região da zona sobreposta é identificada. Com a imagem binária obtida obtém-se o contorno da imagem. Depois de obter a imagem de contorno a função de curvatura é executada. A função de curvatura ajuda na obtenção dos pontos candidatos de corte na imagem. A partir dos pontos obtidos, obtém-se uma linha de corte adequada sobre a região sobreposta.

Madian *et. al.* [13] estudaram a segmentação de cromossomos em imagens de banda G. A segmentação foi realizada considerando informações sobre o contorno, limiarização de Otsu, operações morfológicas e preenchimento de buracos após a binarização. O método utiliza a detecção de bordas dos objetos e a função de curvatura para a detecção de pontos de corte. A função de curvatura é obtida após a suavização de bordas pelo filtro da mediana. Os Pontos detectados são côncavos e convexos. Os pontos côncavos ao logo das bordas do objeto são usados para detectar as zonas de sobreposições, os pontos convexos são opcionais. Neste trabalho foi possível detectar mais de uma sobreposição no cromossomos. O algoritmo é robusto e foi testado em mais de 350 imagens com vários graus de sobreposição. O método neste trabalho obteve uma precisão global de 96%.

Karvelis *et. al.* [14] apresentam um método para a segmentação de grupos de cromossomos que se tocam e cromossomos sobrepostos em imagens *M-FISH*. Inicialmente, a Transformada *Watershed* é aplicada e a imagem é decomposta em regiões. Em seguida, são calculados caminhos de gradiente a partir de pontos de concavidade elevada para cada região produzida. Esses caminhos dividem os grupos de cromossomos de pontos de alta concavidade e seguem pixels de grande magnitude de gradiente multicanal. Finalmente, as regiões adjacentes são fundidas produzindo as áreas cromossômicas finais. A computação do caminho de gradiente com base em valores de gradiente multicanal em vez da computação do caminho pálido, que se baseia em valores de baixa intensidade, se mostra mais robusta. Os caminhos de gradiente puderam lidar com casos sobrepostos de cromossomos, enquanto os caminhos pálidos só conseguiram lidar com grupos de cromossomos em contato. Para validar o método, foi utilizado um banco de dados de referência de 183 imagens *M-FISH*. O algoritmo proposto resultou em uma taxa de sucesso de 90,6% para os cromossomos que se tocam e de 80,4% para os grupos de cromossomos que estão sobrepostos.

Saiyod e Wayalum [15] desenvolveram uma abordagem para computar o esqueleto dos cromossomos, com o esqueleto do objeto é possível pesquisar o ponto de intersecção. O ponto de intersecção é usado para pesquisar os pontos candidatos de corte. Os pontos candidatos são pontos de curvatura encontrados após a detecção de bordas das imagens cromossômicas. Os pontos de corte são encontrados calculando a distancia euclidiana do ponto de intersecção aos pontos de curvatura. Os quatro pontos mais próximos são os pontos de interesse.

IV MATERIAL E MÉTODOS

IV-A Conjunto de dados

O conjunto de dados *Overlapping Chromosomes*¹ foi utilizado para realizar os experimentos com os métodos descritos [16]. O conjunto de dados esta disponível na plataforma *Kaggle* e é composto por cromossomos sobrepostos, conforme mostra a Figura 1. O conjunto contém 13.434 imagens em escala de cinzas contendo um par de cromossomos sobrepostos em destaque, corados com *DAPI* e marcados com telômeros mostrando as extremidades do objeto. Para cada imagem existe uma imagem de rótulos em que as partes relativas a cada um dos cromossomos e a intersecção entre eles foram segmentadas manualmente, gerando uma imagem com três rótulos.

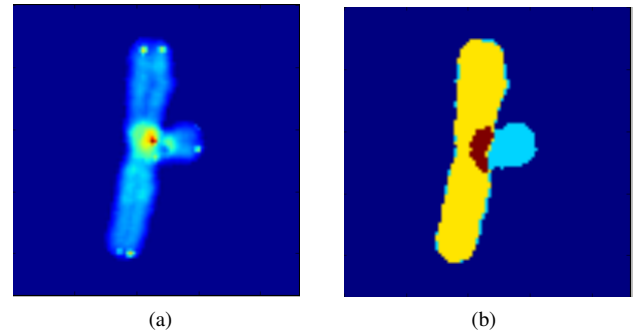


Figura 1: Imagens do conjunto de dados. (a) Imagem em escala de cinza para processar (b) Imagem de rótulos identificando os dois cromossomos e a região de intersecção entre eles.

IV-B Segmentação da imagem em fundo e cromossomos

Imagens cromossômicas geralmente são de baixa qualidade, apresentam ruído, baixo contraste e artefatos, por isso devem ser submetidas a uma etapa de pré-processamento [15]. Após converter as imagens para níveis de cinza, aplicou-se o filtro da mediana com máscara 9 x 9 [6]. Para segmentar a imagem, separando os pixels dos cromossomos dos pixels de fundo utilizou-se limiarização global de Otsu [10]. Algoritmos de morfologia matemática foram aplicados para melhorar a qualidade da imagem binária, dentre eles o preenchimento de buracos no interior dos objetos por reconstrução morfológica seguido da suavização das bordas por uma sequencia de operações de abertura e fechamento morfológicos utilizando elemento estruturante em forma de disco com raio 2 [6]. A Figura 2 ilustra a resultado do pré-processamento em imagens cromossômicas.

IV-C Separação de cromossomos sobrepostos utilizando o Esqueleto Morfológico

Baseado no método descrito em [15], foi desenvolvido um método que considera o esqueleto morfológico [7] do cromossomo para localizar os pontos de corte utilizados para separação dos cromossomos sobrepostos. O método consiste em computar o esqueleto morfológico dos cromossomos após a etapa de segmentação (Seção IV-B). O esqueleto morfológico é utilizado para localizar o ponto de intersecção entre os

¹Disponível em <https://www.kaggle.com/jeanpat/overlapping-chromosomes>

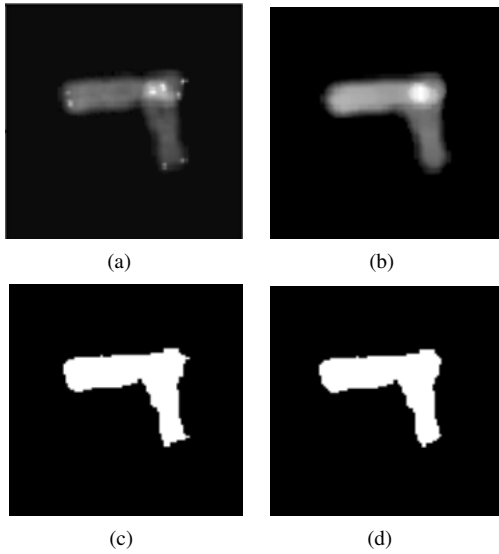


Figura 2: Pré-processamento e segmentação inicial das imagens. (a) Imagem em níveis de cinza. (b) Filtro da mediana 9x9. (c) Limiar global de Otsu. (d) Preenchimento de buracos e suavização do contorno por meio de abertura seguida de fechamento morfológicos.

cromossomos, conforme descrito na Seção IV-C1. O ponto de intersecção é usado para pesquisar os pontos candidatos de corte. Os pontos candidatos são pontos de curvatura localizados no contorno dos cromossomos segmentados. Os pontos de corte são encontrados calculando a distância Euclidiana entre o ponto de intersecção e os pontos de curvatura. Os quatro pontos de curvatura mais próximos do ponto de intersecção são considerados como pontos de corte [15].

IV-C1 Detecção do ponto de intersecção no Esqueleto Morfológico Após a segmentação inicial, descrita na Seção IV-B, computa-se o esqueleto morfológico [17][11] do objeto na imagem segmentada. O esqueleto morfológico é então processado a fim de localizar o ponto em que dois cromossomos sobrepostos se interceptam. Para que o algoritmo localize o ponto de intersecção adequadamente é necessário realizar a poda das ramificações irrelevantes do esqueleto morfológico. O processo de poda é realizado iterativamente: a cada iteração todos os extremos do esqueleto são identificados por meio da Transformada *Hit-or-Miss* e são eliminados, o nível da poda é determinado pelo número de iterações que é definido empiricamente. Neste trabalho utilizou-se 2 iterações de poda. Para localizar o ponto de intersecção no esqueleto já submetido à operação de poda utilizou-se o algoritmo *Hit-or-Miss*. Os elementos estruturantes foram formados com os possíveis formatos de ramificações do esqueleto. O esqueleto passa pelo processo de poda para evitar excesso de ramificações. A Figura 3 ilustra o processo de localização do ponto de intersecção entre os cromossomos no esqueleto morfológico.

IV-C2 Detecção dos pontos de corte na borda dos cromossomos Nesta etapa o objetivo é localizar quatro pontos de corte ao longo da borda do cromossomo. Primeiramente, a borda dos cromossomos é detectada usando o algoritmo de Canny [?]. O algoritmo de Canny suprime o efeito do ruído e

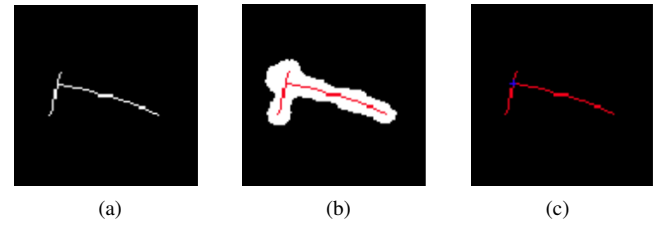


Figura 3: Ilustração do processo de detecção de ponto de intersecção. (a) Esqueleto morfológico; (b) Esqueleto morfológico sobre a imagem binária. (c) Ponto de intersecção detectado pela Transformada *Hit-or-Miss*.

assegura a continuidade, integridade e precisão das bordas localizadas [15]. Os cantos na borda do objeto foram detectados por meio algoritmo de detecção de cantos de Harris [18]. Os cantos detectados pelo algoritmo de Harris são considerados pontos candidatos para escolha dos pontos de corte. Os quatro cantos mais próximos, de acordo com a distância Euclidiana, do ponto de intersecção detectado no Esqueleto Morfológico (Seção IV-C1) são considerados como pontos de corte. que, por sua vez, são utilizados para traçar as linhas de corte que irão separar efetivamente os cromossomos. O processo de escolha dos pontos de corte é ilustrado na Figura 4.

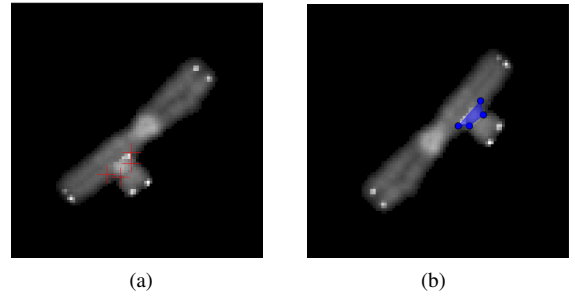


Figura 4: Seleção do pontos de corte. (a) Os pontos de corte são os quatro pontos de curvatura mais próximos do ponto de intersecção (b) Linhas de corte traçadas entre os pontos de corte e a área de sobreposição entre os cromossomos.

IV-D Separação de cromossomos sobrepostos utilizando a Triangulação de Delaunay

Assim como o método de separação de cromossomos sobrepostos baseado no Esqueleto Morfológico (Seção IV-C), o método baseado na Triangulação de Delaunay Restrita inicia a partir da imagem binária obtida pelo método de segmentação descrito na Seção IV-B. Conforme mencionado, cada imagem possui um objeto que consiste em um grupo de cromossomos sobrepostos. O método é baseado no trabalho de [3] e consiste nas etapas de: (a) extração do contorno dos cromossomos; (b) computação da função de curvatura discreta para eliminar pontos com curvatura igual zero; (c) computação da Triangulação de Delaunay Restrita; (d) Identificação dos pontos de corte a partir dos dois maiores triângulos; (e) Definição das linhas de corte e segmentação dos cromossomos.

Primeiramente, extrai-se o contorno deste objeto e, a partir do seu contorno computa-se uma função de curvatura cujo

objetivo é eliminar pontos da borda com curvatura igual a 0. A Triangulação de Delaunay é computada sobre o conjunto de pontos (x, y) obtidos a partir do contorno. Os triângulos obtidos a partir da Triangulação Restrita de Delaunay são utilizados para obter os pontos de corte, por meio da seleção dos vértices dos dois maiores triângulos.

IV-D1 Extração do contorno e Função de Curvatura A extração de contorno do objeto que representa o agrupamento de cromossomos é realizada por meio do algoritmo *Marching Squares* [19]. As coordenadas dos n pontos que compõem a borda do objeto são armazenadas em um arranjo com formato $(2, n)$, em que n é o número de pixels, a primeira linha armazena as coordenadas em x e a segunda linha armazena as coordenadas em y . As coordenadas são inseridas no arranjo percorrendo os pixels de borda no sentido anti-horário. A Figura 5 ilustra esse processo.

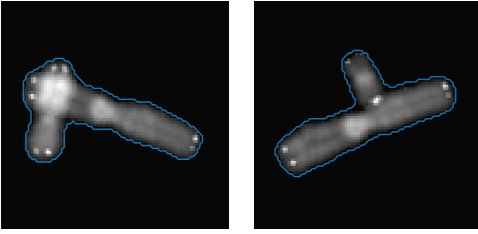


Figura 5: Contornos extraídos dos cromossomos sobrepostos nas imagens originais.

Uma Função de Curvatura Discreta é usada para identificar pontos no contorno com curvatura zeros e eliminá-los, reduzindo assim o custo computacional do algoritmo. A Função de Curvatura γ de uma curva $y(x)$ é definida como a taxa de mudança da inclinação da curva $\Psi(s)$ em relação ao seu comprimento s e é definida pela Equação 16:

$$\gamma \equiv \frac{d\Psi(s)}{ds} = \frac{1}{p} = \frac{\ddot{y}}{(1 + \dot{y}^2)^{\frac{3}{2}}} \quad (16)$$

em que \dot{y} é a primeira derivada de y , \ddot{y} é a segunda derivada de y e p é o raio da curvatura. A função de curvatura requer um cálculo exato de uma derivada secundária para curvas discretas [20]. A inclinação em um ponto de contorno é definida como a inclinação de uma linha que conecta este pixel com o seu vizinho direito. A curvatura em um pixel de contorno é definida como a diferença entre a inclinação de nesse pixel e a inclinação do seu vizinho esquerdo. Os pontos de interesse são detectados como pontos extremos da função de curvatura. A função de curvatura deve ser filtrada para destacar as características principais [12].

IV-D2 Triangulação de Delaunay Restrita e localização dos pontos de corte A Triangulação de Delaunay de um conjunto de pontos consiste em um conjunto de triângulos que conectam os pontos do conjunto, desde que a circunferência desses triângulos não possua nenhum outro ponto em seu interior [21]. A triangulação de Delaunay gera triângulos em todo o fecho-convexo do objeto, dessa forma, optou-se por utilizar a Triangulação de Delaunay Restrita para que os triângulos fossem gerados somente no limite dos cromossomos. Os triângulos resultantes da triangulação de Delaunay Restrita são

usados para obter os pontos de corte. As coordenadas dos vértices dos dois maiores triângulos vizinhos ou do maior é considerada os pontos de corte [12]. A Figura 6 mostra a Triangulação de Delaunay e a Triangulação de Delaunay Restrita aplicados sobre a forma de um cromossomo.

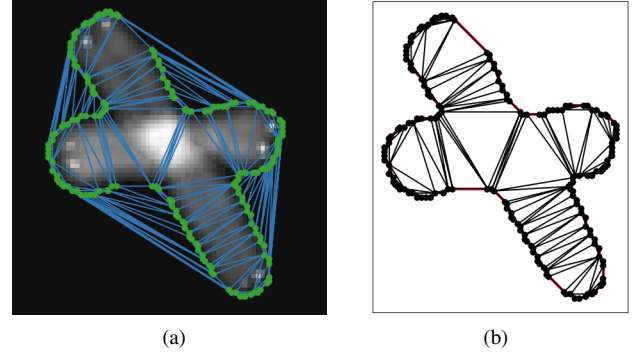


Figura 6: Resultado da Triangulação de Delaunay. (a) Triangulação de Delaunay. (b) Triangulação de Delaunay Restrita.

A Triangulação de Delaunay Restrita foi computada sobre os pontos de curvatura. Os pontos de corte foram obtidos calculando a área de cada triângulo e selecionando os dois maiores. Caso os dois maiores triângulos não compartilhem pelo menos dois vértices, apenas os três vértices do maior triângulo serão considerados pontos de corte (Figura 7). Quando os dois maiores triângulos compartilham dois vértices, os quatro vértices do par de triângulos são considerados pontos de corte.

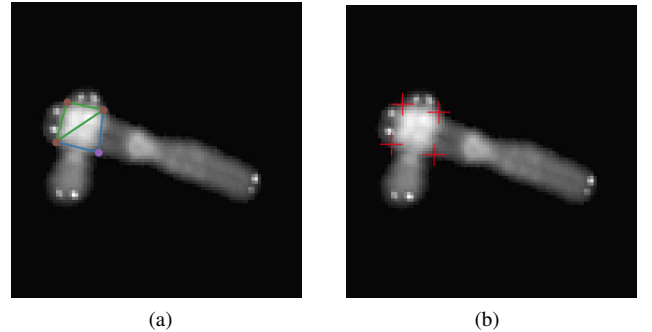


Figura 7: Localização dos pontos de corte. (a) Os dois maiores triângulos resultantes da Triangulação de Delaunay Restrita (b) Os quatro pontos de corte localizados.

IV-E Validação

Para verificar a eficiência e comparar os métodos descritos neste trabalho e compara-los utilizou-se a distância de Hausdorff. A distância de Hausdorff representa a maior distância mínima entre as bordas dos objetos da imagem segmentada I e da imagem de referência R conforme a Equação 17:

$$Hausdorff(I, R) = \max D(i) : S_i \neq R_i, \quad (17)$$

em que $D(i)$ é a distancia entre o pixel i do objeto segmentado até a borda do objeto de referencia. O valor 0 indica uma segmentação perfeita, porém, o índice não possui limite superior [22].

V RESULTADOS

Foram selecionadas as 100 primeiras imagens do conjunto de dados descrito na Seção IV-A para a realização dos experimentos. Todas as imagens foram segmentadas em pixels de cromossomo e pixels de fundo de acordo com o procedimento descrito na Seção IV-B. Em seguida, as imagens binárias foram submetidas aos algoritmos de separação de cromossomos: o algoritmo baseado no Esqueleto Morfológico (descrito na Seção IV-C) e o baseado na Triangulação de Delaunay Restrita (descrito na Seção IV-D). A Tabela III mostra a medida da distância de Hausdorff entre o resultado do método comparado com a imagem de referência (*ground-truth*) para os dois métodos. Na Tabela IV é possível observar a média e o desvio padrão dos valores mostrados na III, assim como o tempo médio de processamento de cada método em segundos. A partir das informações na Tabela IV pode-se notar que o método baseado na Triangulação de Delaunay Restrita apresenta um resultado melhor do que o método baseado no Esqueleto Morfológico, e se considerar também o desvio-padrão das distâncias de Hausdorff pode se afirmar que ele também apresenta maior regularidade. Entretanto, o método baseado na Triangulação de Delaunay possui custo computacional bem mais elevado do que o método baseado no Esqueleto Morfológico,

A Figura 8 mostra exemplos de resultados das segmentações usando os dois métodos. A primeira coluna mostra a imagem considerada como referência (*ground-truth*), a segunda coluna mostra o resultado do método baseado na Triangulação de Delaunay Restrita e a terceira coluna mostra o resultado do método baseado no Esqueleto Morfológico. As imagem na linha (a) foi segmentada corretamente por ambos os métodos, já a imagem na linha (b) não foi segmentada corretamente pelo método da Triangulação de Delaunay, mas foi segmentada corretamente pelo método do Esqueleto Morfológico. A imagem na linha (c) foi segmentada corretamente pelo método baseado na Triangulação de Delaunay porém não pelo método do Esqueleto Morfológico; e a imagem na linha (d) não foi segmentada corretamente por nenhum dos métodos.

VI CONCLUSÕES

Este artigo apresentou uma comparação de duas abordagens diferentes para a segmentação de cromossomos sobrepostos em imagens de microscopia.

Foram realizados experimentos utilizando 100 imagens contendo cromossomos sobrepostos. As imagens foram obtidas da partir de um repositório publico e cada imagem teve os seus cromossomos segmentados manualmente pelos seus desenvolvedores. Essas imagens permitem que o resultado dos experimentos possa ser validado de forma pragmática.

Os algoritmos foram testado e os resultados foram comparados e discutidos. Pode se verificar que o método baseado na Triangulação de Delaunay se mostrou superior ao método

Tabela III: Distância de Hausdorff computada sobre o resultado de ambos os métodos descritos, para cada uma das 100 imagens. A coluna 'Esqueleto' é o resultado para o método que utiliza o Esqueleto Morfológico e a coluna 'Triângulo' para o método baseado na Triangulação de Delaunay.

Imagem	Esqueleto	Triângulo	Imagem	Esqueleto	Triângulo
1	4.41	5.24	51	14.00	8.00
2	16.60	7.81	52	6.40	4.17
3	11.40	4.36	53	7.22	6.63
4	15.20	7.83	54	11.40	6.68
5	7.28	3.79	55	5.41	5.17
6	3.60	4.43	56	6.71	4.97
7	8.60	4.40	57	7.36	7.17
8	17.20	5.08	58	11.60	11.30
9	7.61	8.09	59	10.00	5.29
10	5.00	4.40	60	5.48	8.70
11	11.50	6.70	61	5.96	5.96
12	5.87	5.17	62	5.00	6.94
13	9.84	2.63	63	7.84	5.66
14	5.83	5.22	64	7.22	6.33
15	6.85	6.14	65	16.70	7.42
16	10.80	8.59	66	6.88	6.60
17	6.00	7.94	67	4.12	6.13
18	26.90	11.30	68	5.00	4.41
19	7.16	4.97	69	7.45	5.00
20	11.10	5.76	70	7.67	5.23
21	10.30	7.28	71	4.47	4.56
22	6.79	5.77	72	8.52	8.43
23	8.00	6.11	73	5.00	4.25
24	6.91	3.70	74	19.50	7.21
25	9.00	5.29	75	5.81	5.75
26	12.10	6.92	76	5.38	5.00
27	10.40	7.58	77	10.20	5.46
28	7.24	6.51	78	11.60	6.25
29	8.22	6.47	79	6.79	7.00
30	7.46	8.96	80	12.00	6.24
31	14.20	8.76	81	4.47	5.29
32	18.60	10.40	82	27.20	5.58
33	9.00	5.00	83	7.22	6.10
34	7.10	5.86	84	7.81	5.62
35	4.00	5.19	85	5.65	6.47
36	6.12	4.54	86	5.38	5.51
37	7.20	6.00	87	7.08	6.32
38	6.32	4.37	88	23.30	13.70
39	13.0	5.20	89	7.62	6.46
40	5.65	4.55	90	16.60	4.26
41	9.00	7.62	91	6.40	3.39
42	6.44	4.60	92	7.28	6.51
43	16.10	7.41	93	11.00	7.00
44	8.77	6.21	94	6.70	6.37
45	6.13	6.11	95	8.42	6.00
46	15.00	5.43	96	16.10	7.00
47	15.20	4.83	97	10.20	4.78
48	16.20	4.82	98	6.15	6.00
49	11.40	4.98	99	6.08	3.60
50	4.47	4.86	100	6.06	5.42

Tabela IV: Média e desvio padrão das distâncias de Hausdorff para todas as 100 imagens consideradas nos experimentos, juntamente com a média do tempo de execução dos algoritmos, em segundos.

	Esqueleto	Triângulo
Média:	9.32	6.11
Desvio padrão:	4.70	1.73
Tempo de execução (s):	5.70	11.70

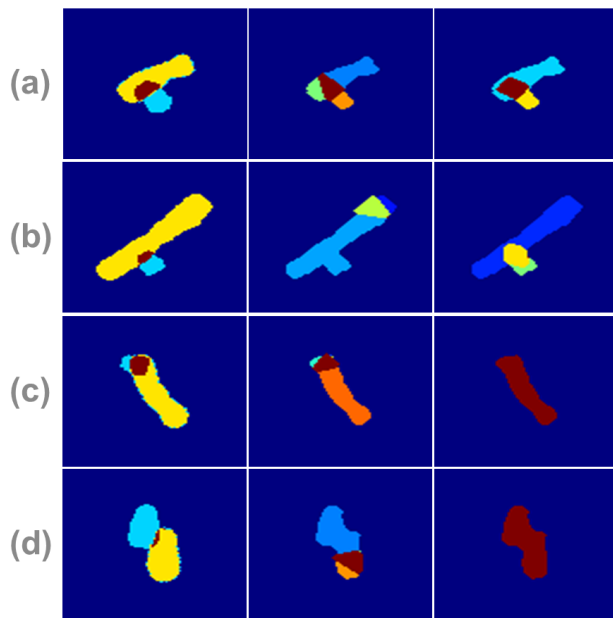


Figura 8: Resultados das segmentações utilizando os dois métodos descritos neste artigo. A primeira coluna mostra a imagem de referência (*ground-truth*), a segunda coluna mostra a imagem segmentada pelo método baseado no Esqueleto Morfológico e a terceira a imagem segmentada pelo método baseado na Triangulação de Delaunay. (a) A imagem foi segmentada corretamente por ambos os métodos; (b) A imagem segmentada corretamente pelo segundo método e não pelo primeiro; (c) Imagem segmentada corretamente pelo primeiro método e não pelo segundo; (d) Imagem segmentada de forma errada por ambos os métodos.

baseado no Esqueleto Morfológico, 6,11 contra 9,32 considerando as médias das distâncias de Hausdorff, respectivamente. Entretanto, o método baseado na Triangulação de Delaunay apresentou um custo computacional mais elevado, levando aproximadamente duas vezes mais tempo para processar as 100 imagens.

Como trabalhos futuros pode-se citar: (a) Implementar outras estratégias para segmentação dos cromossomos sobrepostos, como a transformada *Watershed*, detecção de pontos côncavos nas funções de curvatura dos contornos; (b) Desenvolver métodos híbridos que combinam as qualidades de métodos distintos; (c) Testar os métodos com um número maior de imagens e com métricas diferentes para avaliar a qualidade da segmentação.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos a Jean Patrick Prommier por disponibilizar o conjunto de dados utilizado nos experimentos. Agradecemos ao Instituto de Ciências Exatas e Tecnológicas da UFV - *campus* Rio Paranaíba e ao Prof. Lucas M. Guimarães pelo apoio financeiro. Os autores são gratos ao Laboratório de Genética Ecológica e Evolutiva da UFV - *campus* Rio Paranaíba e ao Prof. Dr. Rubens Pazza e Profa. Dra. Karine Frehner Kavalco. O autor Welton Felipe Gonçalves é bolsista

do programa PIBIC/CNPQ. Agradecemos também à Capes e à FAPEMIG.

REFERÊNCIAS

- [1] S. Minaee, M. Fotouhi, and B. H. Khalaj, "A Geometric Approach For Fully Automatic Chromosome Segmentation," pp. 1–8, 2011.
- [2] N. Madian and K. B. Jayanthi, "Overlapped chromosome segmentation and separation of touching chromosome for automated chromosome classification," *Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBS*, pp. 5392–5395, 2012.
- [3] M. V. Munot and N. Sharma, "Automated Detection of Cut-Points for Disentangling Overlapping Chromosomes," pp. 16–18, 2013.
- [4] D. Somasundaram and V. R. Vijay Kumar, "Separation of overlapped chromosomes and pairing of similar chromosomes for karyotyping analysis," *Measurement: Journal of the International Measurement Confederation*, vol. 48, no. 1, pp. 274–281, 2014.
- [5] W. Yan, "Segmentation Algorithms of Chromosome Images," pp. 1026–1029, 2013.
- [6] W. Gonzalez, *Processamento Digital De Imagens*, 3rd ed. 3663494, 2011, ISBN 9788576054016.
- [7] R. A. Lotufo, R. Audigier, A. Saúde, R. Machado, Q. Wu, F. Merchant, and K. Castleman, "Morphological image processing," *Microscope Image Processing. Burlington: Academic*, pp. 113–158, 2008.
- [8] H. Heijmans, *Mathematical morphology: basic principles*, 1995.
- [9] J. Canny, "A Computational Approach to Edge Detection," *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, vol. PAMI-8, no. 6, pp. 679–698, 1986.
- [10] Otsu, "A Threshold Selection Method from Gray-level Histograms," *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, vol. 9, no. 1, pp. 62–66, 1979.
- [11] Y. S. Chen and W. H. Hsu, "A modified fast parallel algorithm for thinning digital patterns," *Pattern Recognition Letters*, vol. 7, no. 2, pp. 99–106, 1988.
- [12] M. V. Munot, J. Mukherjee, and M. Joshi, "A novel approach for efficient extrication of overlapping chromosomes in automated karyotyping," *Medical and Biological Engineering and Computing*, vol. 51, no. 12, pp. 1325–1338, 2013.
- [13] N. Madian, M. Ieee, K. B. Jayanthi, S. M. Ieee, and S. Suresh, "Contour Based Segmentation of Chromosomes in G-Band Metaphase Images," pp. 943–947, 2015.
- [14] P. Karvelis, A. Likas, and D. I. Fotiadis, "Identifying touching and overlapping chromosomes using the watershed transform and gradient paths," *Pattern Recognition Letters*, vol. 31, no. 16, pp. 2474–2488, 2010.
- [15] W. Saiyod, "A Hybrid Technique for Overlapped Chromosome Segmentation of G-band Mataspread Images Automatic," pp. 400–404, 2014.
- [16] J. P. Pommier. (2016) Deepfish. [Online]. Available: <https://github.com/chromosome-seg/DeepFISH>
- [17] T. Y. Zhang and C. Y. Suen, "A fast parallel algorithm for thinning digital patterns," *Communications of the ACM*, vol. 27, no. 3, pp. 236–239, mar 1984.
- [18] C. Harris and M. Stephens, "A combined corner and edge detector," in *Alvey vision conference*, vol. 15, no. 50. Manchester, UK, 1988, pp. 10–5244.
- [19] W. E. Lorensen and H. E. Cline, "Marching cubes: A high resolution 3D surface construction algorithm," *ACM SIGGRAPH Computer Graphics*, vol. 21, no. 4, pp. 163–169, aug 1987.
- [20] W. Srisang, K. Jaroensutasinee, and M. Jaroensutasinee, "Segmentation of Overlapping Chromosome Images Using Computational Geometry," *Walailak J Sci & Tech*, vol. 3, no. 2, pp. 181–194, 2006.
- [21] H. Edelsbrunner and R. Seidel, "Voronoi diagrams and arrangements," *Discrete & Computational Geometry*, vol. 1, no. 1, pp. 25–44, dec 1986.
- [22] L. P. Coelho, A. Shariff, and R. F. Murphy, "Nuclear segmentation in microscope cell images: A hand-segmented dataset and comparison of algorithms," *Proceedings - 2009 IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro, ISBI 2009*, pp. 518–521, 2009.