

Método Automático para Morfometria de Membranas Neurais Utilizando Perceptron de Múltiplas Camadas e Código de Cadeia Diferencial

Luan F. R. Costa
e Marcelino M. Andrade
Laboratório de Instrumentação e
Processamento de Imagens e Sinais
(LIPIS/UnB)
luanfrc@gmail.com
andrade@unb.br

João C. Monteiro
Centro de Telecomunicações e Multimédia
(INESC/FEUP)
jcmonteiro89@gmail.com

Lourdes M. Brasil
Laboratório de Informática em Saúde
(LIS/UnB)
lmbrasil@gmail.com

Resumo—Neuropatias periféricas são alterações motoras e cognitivas em nervos que carecem de um diagnóstico rápido e eficiente para tratamento. Métodos de morfometria são normalmente utilizados para comparação de nervos saudáveis e patológicos, fazendo uso de análise de imagem para identificar, quantificar e extrair as características de comparação. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver uma técnica totalmente automatizada para extrair e medir as características de axônios (especialmente o parâmetro G -ratio) presentes em imagens de cortes transversais do nervo ciático. Dessa forma, foi apresentado o algoritmo ADA utilizando uma rede Perceptron de Múltiplas Camadas (PMC) para classificar os objetos segmentados da imagem ($N = 429$ axônios) e o Código de Cadeia Diferencial de Freeman para separar os axônios. Os resultados dos G -ratios obtidos foram similares quando comparado com morfometria semiautomática (*software Albeit*) mostrando um erro absoluto médio de 1,85% e erro absoluto máximo de 2,80% (menor valor na literatura). A *accuracy* do ADA situou-se entre 80-86%.

I. INTRODUÇÃO

No sistema nervoso periférico são as células de Schwann as responsáveis pela produção de mielina e, por isso, quando ocorre um dano num nervo periférico pode haver degeneração de axônios e em consequência desmielinização. Porém em algumas situações pode ocorrer remielinização. Ambos os processos levam à alteração da espessura da bainha de mielina (responsável pelo aumento da velocidade na condução dos impulsos nervosos), o que conduz muitas vezes a alterações na condução dos impulsos nervosos, que se traduzem em alterações motoras e cognitivas (neuropatia periférica) [1].

Os métodos morfométricos são ferramentas importantes e úteis no estudo deste tipo de patologias. A análise de imagens foca-se essencialmente na contagem de axônios, no seu perímetro, diâmetro e no G -ratio, considerado por muitos investigadores o parâmetro mais importante. O G -ratio define-se como a razão entre o diâmetro interior e o diâmetro exterior do axônio. O valor do G -ratio varia de axônio para axônio, envolvendo também a espessura da bainha de mielina, daí a sua importância para avaliar nervos saudáveis e patológicos [2].

A contagem e a morfometria dos axônios podem ser realizadas por softwares semiautomáticos ou automáticos. Nos semiautomáticos o especialista segmenta os axônios manualmente e o software extrai os parâmetros. Já no automático, a segmentação também ocorre via técnicas de processamento de imagens, o que acarreta menos tempo para diagnóstico [3]. Entretanto, imagens biológicas tendem a apresentar formas irregulares e variáveis. Esse fator denota um desafio maior na automatização de aplicações práticas no campo das ciências biológicas [4].

Existem diversas estratégias entre os processos automáticos encontrados na literatura, tais como: utilização de modelamento por *template*, detecção de bordas, *zonal graph*, *thresholding*, Redes Neurais Artificiais (RNA), crescimento de regiões, transformada Hough e sistemas fuzzy combinados com *multi-level gradient watershed* [5]. O trabalho em questão visa combinar RNA e detecção de bordas a fim de apresentar uma nova solução robusta de morfometria.

Portanto, é apresentado um Algoritmo de Detecção Automática (ADA), para interpretação de imagens do corte transversal de nervo ciático. Dessa forma, os objetos presentes nas imagens são classificados em axônios ou ruídos por uma RNA Perceptron de Múltiplas Camadas (PMC). Axônios agrupados são segmentados usando o código de cadeia diferencial. Em seguida é extraído diâmetro, área, perímetro de cada axônio e calculado o G -ratio equivalente para cada imagem. Os resultados do ADA foram comparados com os obtidos por especialista que utilizaram o software semiautomático *Albeit* atingindo valores de *accuracy* acima de 80%. O G -Ratio apresentou um erro absoluto médio de 1,85% e erro absoluto máximo de 2,80%. Além disso, o tempo de processamento do ADA foi 30 vezes menor que o obtido através do *Albeit*, indicando a viabilidade de aplicação do algoritmo proposto.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas quatro amostras de imagens retiradas de nervos ciáticos fornecidos

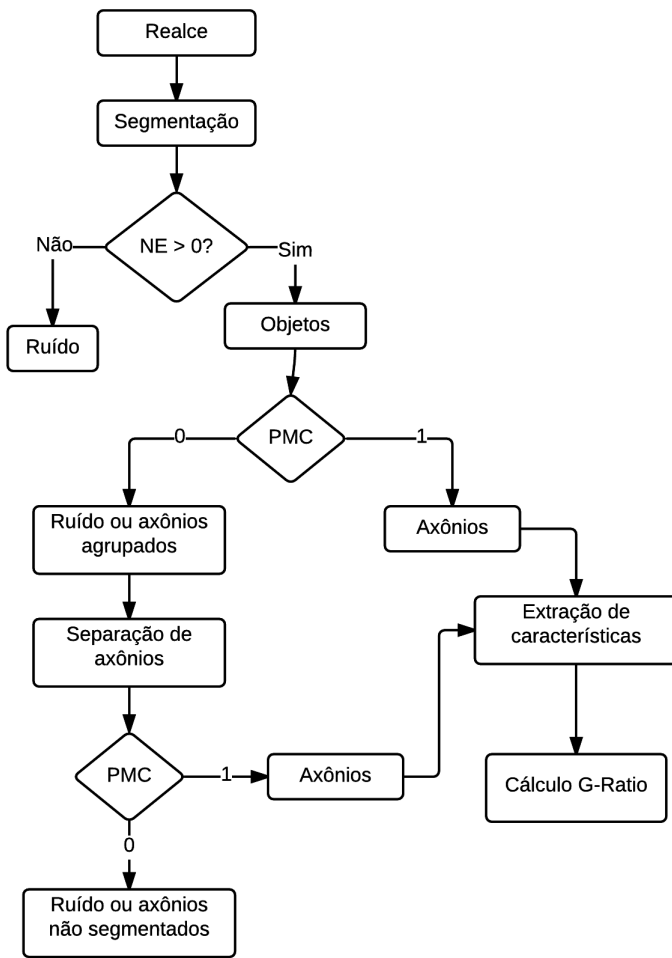


Figura 1. Fluxograma do ADA. NE: Número de Euler que corresponde ao número de objetos agrupados numa imagem menos o número de buracos nesses objetos. PMC: Perceptron de Múltiplas camadas, RNA utilizada para classificação de objetos.

pele Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC), por microscopia óptica. Pesquisadores do IBMC avaliaram cada amostra, classificando os axônios das mesmas e gerando quatro *ground truth*, auxiliados pelo programa semiautomático *Albeit* [3]. As quatro imagens em questão apresentaram um N de 429 axônios.

O fluxograma do algoritmo ADA desenvolvido é ilustrado na Figura 1. Observa-se que o objetivo final é o cálculo do G-ratio. Para melhor entendimento, a descrição do mesmo foi dividida em três partes: 1) Realce e segmentação, no qual é aplicado um pré-processamento e os objetos são segmentados da imagem original, 2) PMC, descrição da RNA utilizada para classificar objetos em axônios ou ruídos e 3) Separação de axônios, método utilizado para posterior classificação de axônios isolados.

A Figura 2 ilustra um exemplo das componentes RGB de uma imagem amostrada e seus respectivos histogramas. O contraste e distribuição homogênea de *pixels* da componente verde são evidentemente superiores às outras componentes. Dessa forma, essa componente em nível de cinza foi extraída

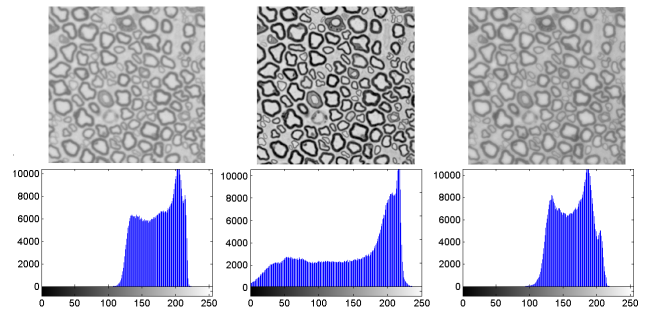


Figura 2. Componentes *Red*, *Green* e *Blue*, da imagem original amostrada e seus respectivos histogramas.

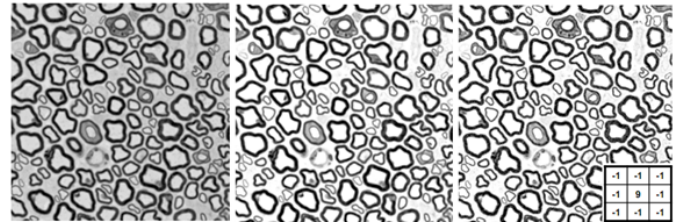


Figura 3. Imagem em nível de cinza, com aumento de contraste e com filtragem espacial de *sharpening*, respectivamente.

para processamento de realce e segmentação.

1) *Realce e Segmentação*: No realce foram aplicadas três operações: expansão linear do histograma, multiplicação da imagem por $e^{0,1}$ e uma filtragem espacial usando filtro *sharpening*. As duas primeiras operações aumentam o contraste da imagem em nível de cinza, saturando os *pixels* de alta intensidade (Figura 3). O valor de 0,1 indica a intensidade de saturação, que neste caso é baixa, visando preservar a integridade dos axônios. A terceira operação evidencia contornos e detalhes da imagem, a fim de evitar agrupamento de axônios. Tais operações apresentam baixo custo computacional [6], que é desejado para rapidez do exame.

A imagem resultante apresentou um histograma claramente bimodal. Esta característica levou a aplicação de uma segmentação por histograma, utilizando o método de Otsu [7] para definição do limiar de binarização. Tal método é amplamente utilizado em imagens bimodais que apresentam classes de objetos bem definidas [8]. A Figura 4 ilustra o resultado da binarização e as duas classes identificadas, fundo preto e axônios brancos.

A Figura 4 também ilustra o Número de Euler (NE) de alguns objetos. O NE corresponde ao número de objetos agrupados numa imagem menos o número de buracos nesses objetos [9]. Conforme o fluxograma apresentado, objetos com NE maior que zero foram classificados como ruído visto que não apresentam nenhum buraco e, portanto, não são axônios ou são axônios incompletos (Figura 4).

2) *Perceptron de Múltiplas Camadas (PMC)*: A RNA PMC foi escolhida para classificação dos objetos em axônios (1) ou não axônios (0) devido a sua capacidade de aprender por meio de exemplos. Além disso, sua eficácia e aplicabi-

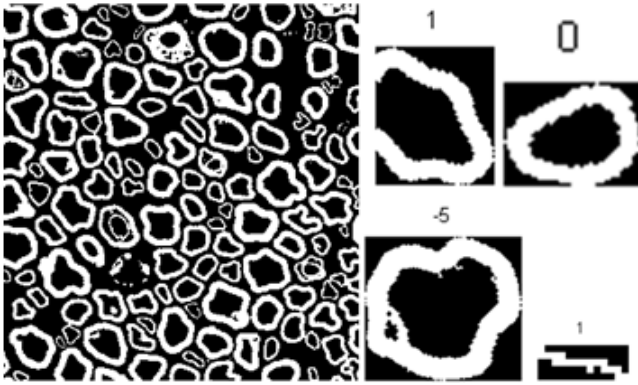


Figura 4. Imagem binarizada e o número de Euler de alguns objetos.

lidade são comprovadas pelos diversos casos de sucesso já apresentados [10]. Visto que a classificação dos objetos é conhecida previamente (dados do IBMC), o treinamento da RNA foi supervisionado. Para tanto, foi escolhido o algoritmo *backpropagation* com *momentum* (θ) e taxa de aprendizado (η) adaptativa [11].

Os parâmetros iniciais definidos para treinamento foram: η igual a 0,1 com taxa de incremento de 1,05 e decremento de 0,7, θ igual a 0,9 e valor mínimo de gradiente igual a 0,01. A função Tangente Hiperbólica (TH) foi escolhida como função de transferência da camada oculta e a degrau da camada de saída. A função TH foi escolhida por acelerar a convergência do algoritmo de treinamento da RNA e também por ser bastante utilizada em problemas de classificação [12]. Já a função degrau foi escolhida devido a classificação ser booleana, sendo a saída 1 correspondente a um axônio e 0 a um ruído. O valor de limiar utilizado nessa função foi de 0,7 (Figura 5).

As características extraídas dos objetos como parâmetro de entrada da PMC foram: área do objeto (A), NE, perímetro (p) e Razão de Circularidade (RC) (eq. 1) [4],

$$RC = \frac{4\pi A}{p^2} \quad (1)$$

Sendo assim, a camada de entrada da PMC consiste em 4 neurônios um para cada característica. Já a camada de saída apresentou apenas 1 neurônio representando a resposta booleana. Por fim, a camada oculta consistiu em 3 neurônios, obedecendo o critério descrito por Eberhart et al. [13]. A Figura 5 ilustra a PMC construída. Para o treinamento da rede foram selecionados de forma aleatória 228 objetos (50%) da amostra total.

3) *Separação de axônios*: A estratégia utilizada para separar grupos de axônios foi utilizar o código de cadeia diferencial para encontrar pontos de inflexão, agrupá-los e segmentar a imagem. Primeiramente foi calculado o código de cadeia (Fig. 6.a) e o código de cadeia diferencial (Figura 6.b) de Freeman [6], usando um deslocamento de dez posições. Em seguida foram identificados pontos de inflexão (2 ao 6) no código de cadeia diferencial (Figura 6.c).

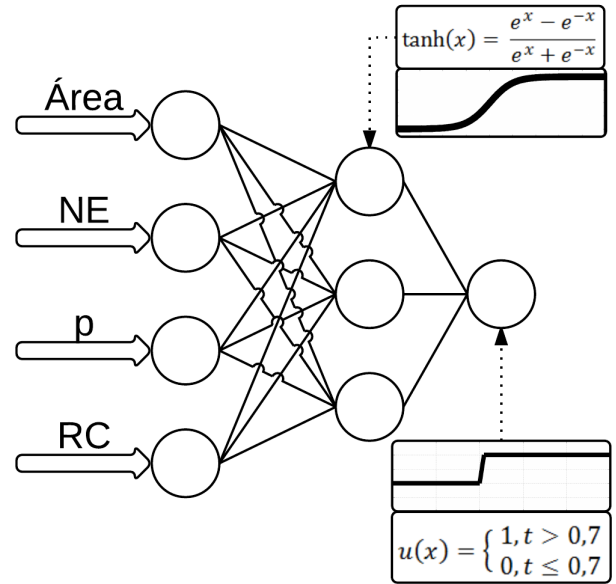


Figura 5. Arquitetura da RNA PMC adotada.

Diversos pontos de inflexão foram identificados na imagem. Então, o objetivo era identificar pares de pontos que, quando traçada uma reta entre eles, separassem os axônios. Para tanto, foi calculada a Distância Euclidiana (DE) e de a de Fronteira (DF) entre cada ponto e os demais. A DF corresponde à quantidade de *pixels* entre os dois pontos seguindo o contorno. Baixos valores de DF indicam que os pontos estão próximos com relação ao contorno e, portanto, não atingiram sequer o perímetro de um axônio.

Os pares de pontos foram considerados válidos caso $DE < 40$ e $DF > 100$. Dessa forma, apenas pontos próximos em distância e afastados ao longo da fronteira eram agrupados. Em casos com mais de um candidato para o par fosse encontrado, o com menor DE era selecionado.

4) *Extração de características*: Para cada axônio classificado foi computado uma máscara interna e uma externa. A máscara externa correspondeu à imagem binária do axônio preenchida (Figura 7.b) e a interna ao produto da máscara externa com o complemento da imagem do axônio (Figura 7.c).

O cálculo do *G-ratio* (GR) corresponde à média da razão entre o diâmetro interno D_{in} , obtido pela máscara interna, e o externo D_{ex} , pela máscara externa, de todos os axônios (eq. 2) [14].

$$GR = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{D_{in}(i)}{D_{ex}(i)}}{n} \quad (2)$$

Há diversas formas de se calcular o diâmetro de uma estrutura. Como os axônios nem sempre apresentam a forma circular, os diâmetros foram calculados em função do perímetro D_p e da área D_a , conforme mostra as equações 3 e 4, sendo o diâmetro final a média dos dois (eq. 5) [14].

$$D_p = \frac{p}{\pi} \quad (3)$$

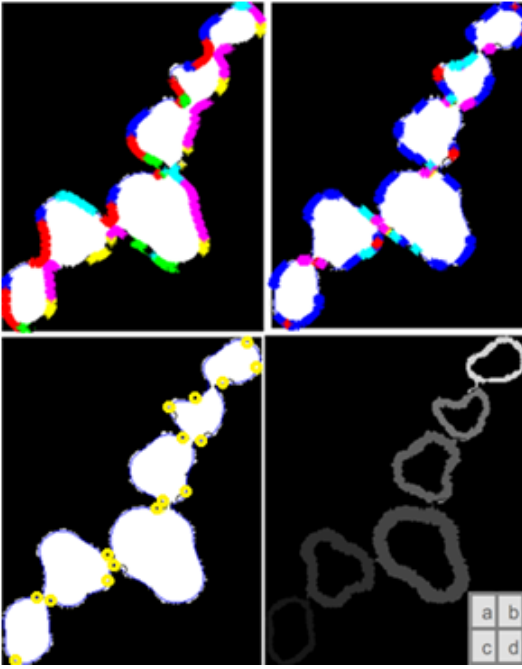


Figura 6. Agrupamento de axônios. a) Código de cadeia, b) Código de cadeia diferencial, c) Pontos de inflexão, d) 6 Axônios separados.



Figura 7. a) Axônio classificado, b) máscara externa, c) máscara interna

$$D_a = 2\sqrt{\frac{A}{\pi}} \quad (4)$$

$$D = \frac{D_a + D_p}{2} \quad (5)$$

III. RESULTADOS

As condições de parada atribuídas à PMC apresentada previamente foram o número máximo de épocas igual a 1000 e gradiente mínimo igual a 0,01. Na época 80 o gradiente mínimo foi alcançado e o treinamento apresentou uma taxa de acerto de 93%.

Para avaliar a segmentação e a classificação das estruturas calculadas pelo ADA, foi efetuada uma comparação entre as máscaras obtidas com seus respectivos *ground truth* (Figura 8). Dessa forma, foi possível calcular o número de: Verdadeiros Positivos (VP); Verdadeiros Negativos (VN); Falsos Positivos (FP); Falsos Negativos (FN). Os resultados dessa avaliação estão apresentados na Tabela I.

Na Tabela II estão apresentados os valores *G-ratio* para diferentes nervos do Sistema Nervoso Central (SNC) e do

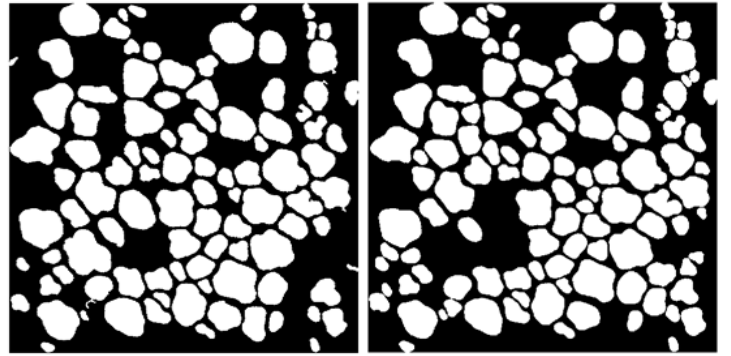


Figura 8. Exemplo de segmentação efectuada pelo ADA (esquerda) e o respectivo *ground truth* (direita).

Tabela I
DESEMPENHO DO ADA NAS RESPECTIVAS IMAGENS.

	Imagem 1	Imagem 2	Imagem 3	Imagem 4
VP	93	84	108	66
VN	40	50	40	50
FP	15	19	31	13
FN	6	7	6	9
<i>Accuracy</i>	0,86	0,84	0,80	0,84
<i>Sensitivity</i>	0,94	0,92	0,95	0,88
<i>Specificity</i>	0,73	0,72	0,56	0,79
<i>Precision</i>	0,86	0,82	0,78	0,84
<i>F-measure</i>	0,90	0,87	0,85	0,86

Sistema Nervoso Periférico (SNP). A faixa de valores do nervo ciático corresponde a 0,55 – 0,68, portanto, espera-se que os valores de *G-ratio* calculados estejam nessa faixa [2].

As medidas morfométricas da segmentação automática foram igualmente comparadas às medidas obtidas para o *ground truth*. Na Tabela III está exposta esta comparação, verificando-se um erro absoluto médio de 1,85% e um erro absoluto máximo de 2,80%. Tal medida de erro foi adotada a fim de comparar com os trabalhos [14] e [3] (Tabela IV). Além disso, a segmentação semiautomática apresentou um tempo médio de processamento de 20 minutos [3] enquanto que a segmentação efetuada pelo algoritmo proposto apresentou um tempo médio de processamento de 34 segundos.

IV. DISCUSSÃO

A estratégia apresentada no trabalho em questão, compondo o algoritmo ADA desenvolvido, baseou-se em técnicas conceituadas e consolidadas na literatura. Tais técnicas apresentam baixo custo computacional [6], o que permitiu um rápido processamento (Tabela III). Dessa forma, o ADA atingiu um tempo de processamento 30 vezes menor que o método semiautomático.

A RNA PMC escolhida atendeu bem os requisitos apresentados, convergindo após 80 épocas com taxa de acerto de 93%. Os altos valores de *accuracy* ($\geq 80\%$) apresentados na Tabela I mostram que a classificação foi satisfatória.

A Tabela IV compara os erros absolutos do ADA com os trabalhos [3] e [14]. Tais trabalhos foram escolhidos

Tabela II
VALORES ÓTIMOS DO *G-ratio* PARA DIFERENTES NERVOS DO SNC E SNP [2].

		<i>G-Ratio</i>
SNC	Corpus Callosum	0,75-0,81
	Spinal Cord	0,79
	Optic Nerve	0,81
	Superior Cerebellar Peduncle	0,76-0,81
	Anterior Commissure	0,72-0,79
	Internal Capsule	0,78
	Brainstem	0,81
	Sciatic	0,55-0,68
	Sural	0,47-0,6
	Saphenous	0,61
SNP	Hypoglossal	0,69
	Facial	0,69
	Splanchnic	0,78
	Vagal	0,73
	Glossopharyngeal	0,78
	Oculomotor	0,8
	Tibial	0,69-0,76
	Trochlear	0,71
	Phrenic	0,54-0,59

Tabela III
COMPARAÇÃO ENTRE VALORES DE *G-ratio* PARA O *ground truth* E A SEGMENTAÇÃO AUTOMÁTICA.

	Img. 1	Img. 2	Img. 3	Img. 4
Medida automática	0,659	0,638	0,670	0,677
Medida semiautomática	0,657	0,658	0,642	0,701
Erro absoluto (%)	0,20	2,00	2,80	2,40
Erro absoluto médio (desvio) (%)		1,85	(1,15)	
Tempo de Processamento	31 s	33 s	43 s	28 s

Tabela IV
COMPARAÇÃO ENTRE ERROS ABSOLUTOS DO ADA E DE TRABALHOS SEMELHANTES

	ADA	Rodrigues, et al. [14]	Dias [3]
Média erro absoluto (%)	1,85	1,80	1,9
Desvio erro absoluto (%)	1,15	1,31	1,08
Erro absoluto Máximo (%)	2,80	3,60	3,10

por apresentar comparação direta entre medida automática e semiautomática (ou manual) do *G-ratio*. Verificou-se que o ADA e os demais trabalhos tiveram valor de média e desvio-padrão do erro absoluto bastante próximos. Entretanto, o erro absoluto máximo do ADA foi o menor entre eles. Tal erro pode influenciar diretamente no diagnóstico do nervo analisado, devendo ser, portanto, evitado ao máximo.

As quatro características escolhidas como entradas atenderam adequadamente à problemática em questão. RNA com grande quantidade de neurônios na primeira camada tendem a sofrer o problema conhecido como “*curse of dimensionality*” [5]. Quanto maior o número de entradas mais disperso são os dados, dificultando na classificação.

Apesar das irregularidades observadas na morfologia dos axônios processados, o ADA apresentou resultados satisfatórios, quando comparado com medições realizadas por

especialistas. Os quatro *G-ratio* calculados encontram-se na faixa correspondente a classificação de nervo ciático conforme mostra a Tabela II.

As medidas de *accuracy* e erro absoluto são medidas padrões que possibilitam a comparação com outras técnicas automáticas. Tal comparação de *performance* deverá ser feita em progressos futuros, processando banco de dados equivalentes para comparações mais pontuais. Além disso, espera-se testar o algoritmo desenvolvidos com maior número de amostras.

V. CONCLUSÃO

O ADA desenvolvido apresentou valor de *accuracy* entre os 80% e 86% comparando com o *ground truth*. Além disso, o *G-ratio* calculado aproximou-se consideravelmente do obtido de forma semiautomática com erro absoluto médio de 1,85% e erro absoluto máximo de 2,80%. O tempo de processamento médio foi de 34 segundos para o ADA e 20 minutos para a segmentação semiautomática.

A combinação da classificação de axônios por meio de uma RNA PMC e da segmentação, utilizando o código de cadeia diferencial, mostrou-se satisfatória como solução alternativa da problemática em questão. O erro absoluto máximo obtido foi o menor entre os trabalhos comparados da literatura.

A base de dados usada neste trabalho apresenta um tamanho reduzido quando comparada a outras alternativas encontradas na literatura [5]. Entretanto, justifica-se como uma proposta inicial para avaliar o algoritmo implementado. Em trabalhos futuros, pretende-se compará-lo com as outras técnicas existentes e bases de dados mais extensas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC) pelo apoio e por disponibilizar as imagens e medidas semiautomáticas usadas como referência de comparação neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- [1] K. L. Moore, A. F. Dalley, and A. M. R. Agur, *Anatomia Orientada para a clínica*, 7th ed., G. K. S.A, Ed., 2014.
- [2] T. Chomiak and B. Hu, “What is the optimal value of the *g-ratio* for myelinated fibers in the rat CNS? a theoretical approach,” *PLoS ONE*, vol. 4, November 2009.
- [3] D. M. C. Dias, “Computational vision applied to segmentation and morphometric characterization of the sciatic nerve in microscopic images,” Master’s thesis, Faculdade de Engenharia da Universidade de Porto, Portugal, 2011.
- [4] C. A. Glasbey and G. W. Horgan, *Image analysis for the biological sciences*, J. Wiley and Sons, Eds., New York, 1995.
- [5] S. Bégin, O. D-Therrien, E. Bélanger, A. Daradich, S. Laffray, Y. D. Koninck, and D. C. Côté, “Automated method for the segmentation and morphometry of nerve fibers in large-scale cars images of spinal cord tissue,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 5, pp. 4145–4161, November 2014.
- [6] R. C. Gonzalez and R. Woods, *Digital Image Processing*, E. Prentice-Hall, Ed., Upper Saddle River, New Jersey, 2006.
- [7] N. Otsu, “A threshold selection method from gray-level histograms,” *IEEE Trans. Systems, Man, and Cybernetics*, vol. 9, pp. 62–66, 1994.
- [8] J. Zhang and J. Hu, “Image segmentation based on 2d otsu method with histogram analysis,” in *Proc. IEEE Computer Science and Software Engineering*, Wuhan, Hubei, Dec. 12–14, 2008, pp. 105–108.

- [9] A. Bishnu, B. B. Bhattacharya, M. K. Kundu, C. Murthy, and T. Acharya, "A pipeline architecture for computing the euler number of a binary image," *Journal of Systems Architecture*, vol. 51, pp. 470–487, August 2005.
- [10] S. Haykin, *Neural Networks: A Comprehensive Foundation*, 2nd ed., P. Hall, Ed., USA, 2009.
- [11] D. E. Rumelhart and J. L. McClelland, *Parallel distributed processing: explorations in the microstructure of cognition, v.1: foundations*, M. Press, Ed., Cambridge, MA, 1986.
- [12] A. M. Santos, J. M. Seixas, B. B. Pereira, and R. A. Medronho, "Usando redes neurais artificiais e regressão logística na predição da hepatite a," *Revista Brasileira de Epidemiologia*, vol. 8(2), pp. 117–26, August 2005.
- [13] R. C. Eberhart and R. W. Dobbins, *Neural Network PC Tools: A Practical Guide*, A. Press, Ed., 1990.
- [14] I. V. Rodrigues, P. M. Ferreira, A. R. Malheiro, P. Brites, E. M. Pereira, and H. P. Oliveira, "Morphometric analysis of sciatic nerve images: A directional gradient approach," in *Proc. IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine*, Belfast, Nov. 2–5, 2014, pp. 261–266.