

FABIANO CORDEIRO MOREIRA

**RECONHECIMENTO E CLASSIFICAÇÃO DE PADRÕES DE
IMAGENS DE NÚCLEOS DE LINFÓCITOS DO SANGUE
PERIFÉRICO HUMANO COM A UTILIZAÇÃO DE REDES
NEURAS ARTIFICIAIS**

**FLORIANÓPOLIS - SC
2002**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA
COMPUTAÇÃO**

Fabiano Cordeiro Moreira

**RECONHECIMENTO E CLASSIFICAÇÃO DE PADRÕES DE
IMAGENS DE NÚCLEOS DE LINFÓCITOS DO SANGUE
PERIFÉRICO HUMANO COM A UTILIZAÇÃO DE REDES
NEURAIS ARTIFICIAIS**

Dissertação submetida à Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciência da Computação

PROF. DR. MAURO ROISENBERG

Florianópolis, Fevereiro / 2002.

Reconhecimento e Classificação de Padrões de Imagens de Núcleos de Linfócitos do Sangue Periférico Humano com a Utilização de Redes Neurais Artificiais

Fabiano Cordeiro Moreira

Esta Dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciência da Computação Área de Concentração Sistemas de Conhecimentos aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência da Computação.

Prof. Dr. Fernando A. Ostuni Gauthier
Coordenador do Curso

Banca Examinadora

Prof. Dr. Mauro Roisenberg
Orientador

Prof. Dr. João Bosco da Mota Alves

Prof. Dr. Roberto Célio Limão de Oliveira

“Não sei de que modo o mundo me vê; mas a mim mesmo pareço ter sido apenas um menino brincando na praia, entretendo-me com encontrar de quando em quando um seixo mais liso ou uma concha mais bela do que o ordinário enquanto todo o vasto oceano da verdade jazia inexplorado diante de mim”.

ISAAC NEWTON

Dedico esse trabalho a Cláudio, meu pai,
Ethie, minha mãe e a meus dois irmãos,
Maxwell e Franklin, que são o alicerce dos
meus dias e o espelho da minha vida.

Fabiano.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me ter dado força para superar os momentos difíceis, permitindo a concretização deste trabalho.

Aos meus pais e irmãos, pelo amor, incentivo, paciência e compreensão dedicados a mim.

À Universidade Federal de Santa Catarina, seus professores e funcionários, que foram os alicerces para a realização deste.

Ao Centro de Ensino Superior do Pará, pois permitiu que esta oportunidade chegasse às minhas mãos.

A meu orientador, Prof. Dr. Mauro Roisenberg, por ter sido sempre o Norte, quando eu estava perdido e a luz, quando ficou escuro.

Ao Laboratório de Citogenética Humana e Genética Toxicológica do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Pará, em especial ao **Prof. Romeu**, e a **Eleonidas, Plínio e Patrícia**, sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado, e ao **Dr. Paulo Assumpção**, responsável pela abertura de meus olhos ao campo da citogenética.

Ao Prof. Gustavo Campos, por sua paciência, incentivo e pelas horas de conversa.

A meus amigos e todos aqueles que de alguma forma ajudaram a realização deste trabalho.

Muito obrigado,

Fabiano Cordeiro Moreira.

RESUMO

Neste trabalho foi implementada uma rede neural artificial para reconhecer, classificar e contar núcleos de linfócitos do sangue periférico humano. Foram utilizadas técnicas para o processamento da imagem digital, como segmentação e extração de características relevantes da imagem, assim como desenvolveu-se um conteúdo teórico a respeito de redes neurais diretas com múltiplas camadas e algoritmo de aprendizagem de retropropagação. Também foi desenvolvida, nesta pesquisa, uma solução utilizando Algoritmo Genético para evoluir o conjunto de treinamento da rede neural utilizada, na tentativa de aumentar o desempenho desta.

ABSTRACT

In this paper, an artificial neural network was implemented to recognize, classify and count nucleus of lymphocytes of human peripheral blood. Techniques to the digital image processing as segmentation and significant feature extraction were used, as well as contents about multi-layer feed-forward networks with backpropagation learn algorithm were developed. It was also developed, in this research, a solution using a genetic algorithm to evolve the training set of an artificial neural network, in a trial to increase its performance.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	11
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Objetivos do Trabalho	14
1.2 Organização do Trabalho	15
2 ÍNDICE MITÓTICO	17
2.1 Divisão Celular	17
2.2 Índice Mitótico	19
2.3 Aplicações do Índice Mitótico na Monitoração de Linfócitos do Sangue periférico Humano	20
3 PROCESSAMENTO DA IMAGEM DIGITAL	22
3.1 Imagem Digital	22
3.2 Aquisição da Imagem Digital	23
3.3 Histograma	23
3.4 Reconhecimento de Padrões	24
3.5 Segmentação da Imagem	27
3.5.1 Segmentação da Imagem por Limiar (Tresholding)	28
3.6 Extração de Características Relevantes da Imagem	29
3.6.1 Medições de Tamanho	30
3.6.2 Análises da Forma	30

4	TÉCNICAS DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL UTILIZADAS: REDES NEURAIS E ALGORITMOS GENÉTICOS	32
4.1	Redes Neurais Artificiais	32
4.1.1	Arquiteturas	34
4.1.2	Aprendizado	35
4.1.3	Redes Diretas de Múltiplas Camadas com Algoritmos de Aprendizado de Retropropagação (Backpropagation)	36
4.2	Algoritmos Genéticos	41
4.2.1	Elementos do Algoritmo Genético	42
5	PROCEDIMENTOS E MÉTODOS	46
5.1	Procedimentos para Cultura de Linfócitos de Sangue Periférico Humano para Determinação do Índice Mitótico	46
5.2	Processo de Segmentação da Imagem por Limiar	49
5.3	Extração de Características Relevantes da Imagem	52
5.4	Arquitetura e Treinamento da Rede Neural	54
5.5	Desenvolvimento do Algoritmo Genético	55
5.6	Erros de Segmentação e Classificação	58
6	RESULTADOS	61
7	CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS	65
7.1	Conclusões	65
7.2	Trabalhos Futuros	66
	BIBLIOGRAFIA	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Estágios da mitose em uma célula animal	10
Figura 2.2: Núcleos de linfócitos do sangue periférico humano	11
Figura 3.1: Representação numérica de uma imagem digital	14
Figura 3.2: Imagem de um cromossomo humano e seu histograma	16
Figura 3.3: As três fases do reconhecimento de padrões para imagens digitais	18
Figura 3.4: Gráficos que indicam a separação de classes.	18
Figura 3.5: Segmentação por limiar aplicada na imagem de um cromossomo Humano	21
Figura 4.1: Representação artificial de um neurônio natural.	24
Figura 4.2: Esquema de uma rede multi-camada direta com três camadas	25
Figura 4.3: Perceptron	29
Figura 4.4: Modelo do neurônio de uma rede MLP	30
Figura 4.5: Esquema de rede MLP com algoritmo de treinamento Backpropagation	31
Figura 4.6: Exemplo de roleta simples	36
Figura 4.7: Cruzamento de um par de cromossomos, gerando descendentes	36
Figura 4.8: Exemplo de mutação	37
Figura 5.1: Processo de centrifugação do material para preparação da lâmina	39
Figura 5.2: Remoção do sobrenadante, após a centrifugação.	39
Figura 5.3: Coração das lâminas com corante Giemsa	40
Figura 5.4: Dois exemplos de metáfases. Em (a) verifica-se uma situação indesejada, em (b) todos os cromossomos serão identificados como uma única imagem	40
Figura 5.5: Em (a) o histograma de uma imagem e em (b) seu respectivo vale	42
Figura 5.6: Imagem de linfócitos do sangue periférico humano, segmentada por limiar adaptativo	43
Figura 5.7: Matriz de posições formada após a segmentação da imagem	44
Figura 5.8: Núcleos de células em interfase (a) e metáfase (b) e seus respectivos contornos e valores de complexidade	45
Figura 5.9: População com 15 cromossomos	48
Figura 5.10: Imagens de células sobrepostas	51
Figura 5.11: O mesmo núcleo em interfase, antes da segmentação (a) e com falhas (b) devido a erros durante a segmentação	51
Figura 5.12: Célula em metáfase	52
Figura 6.1: Tabela com grupos de exemplo e treinamento	53
Figura 6.2: Resultados da simulação da rede treinada com o grupo de características FC	53
Figura 6.3: Resultados da simulação da rede treinada com o grupo de características HC	54
Figura 6.4: Resultados da simulação da rede treinada com o grupo de	54

características FHC	54
Figura 6.5: Resultados da simulação da rede treinada com o grupo de características FHCT	54
Figura 6.6: Gráfico comparativo com o desempenho das redes para cada grupo de exemplos	55
Figura 6.7: Tabela comparativa entre os resultados obtidos por vetor de atributos com os grupos de teste T1 e T2	55
Figura 6.8: Resultados do AG. Em (a) o gráfico da evolução do algoritmo e em (b) o gráfico da evolução da média da população	56
Figura 6.9: Tabela comparativa entre redes neurais com conjunto de treinamento otimizado por algoritmo genético, e sem otimização	56

1 INTRODUÇÃO

A citogenética é um campo no qual a análise de imagens microscópicas é de extrema importância, tornando-se um amplo alvo para a automatização do reconhecimento e classificação de padrões de imagens, porém são poucas as tentativas de automação em análises citogenéticas. O desenvolvimento de ferramentas para este fim minimizaria custos, popularizaria as técnicas e aumentaria a precisão dessas análises.

Os maiores estudos neste ramo são, geralmente, voltados para a contagem e classificação de cromossomos, que, apesar de ser uma ferramenta muito útil, é apenas uma pequena parte do trabalho desenvolvido pelos profissionais desta área. Além disso, boa parte dos trabalhos existentes para análises citogenéticas laboratoriais é baseada em imagens disponíveis em bancos de dados de domínio público já existentes, e que, geralmente, possuem imagens previamente selecionadas, de qualidade acima do padrão para a análise. Isso representa um sério problema, tendo em vista que, na maioria das vezes, não retrata a realidade das imagens encontradas em laboratório.

Neste trabalho, foi desenvolvido o primeiro passo em busca de uma solução, utilizando-se redes neurais, para reconhecer padrões em análises microscópicas. A tarefa proposta é a determinação do índice mitótico, de forma que os padrões a serem reconhecidos serão de células em fase de divisão celular. Assim, as células em metáfase e interfase de uma determinada amostra serão devidamente identificadas e contabilizadas. As imagens utilizadas para o desenvolvimento desta tarefa serão adquiridas em laboratório, de modo a retratar com fidelidade a realidade encontrada no ambiente do problema.

A determinação do índice mitótico é um trabalho muitas vezes árduo, tendo em vista que, para isto, é necessária uma contagem manual de dois mil núcleos de células. Geralmente este trabalho é efetuado por pessoal altamente qualificado, devido os procedimentos e o tipo de equipamento utilizado para este fim.

Esta pesquisa visa reconhecer, classificar e contar núcleos de linfócitos do sangue periférico humano, de modo a diminuir o custo operacional para a determinação do índice mitótico, assim como uma maior precisão e constância nesta aferição, observando-se que este método não sofrerá influências externas, como cansaço,

distração e outras dificuldades de natureza humana que podem, de algum modo, interferir na maior precisão na determinação deste índice.

Alguns trabalhos que podem ser citados e envolvem pesquisas na área de classificação de padrões em análises citogenéticas são verificados em CASTLEMAN (1996) e TODESCO (1995). Ambos trabalharam com contagem e classificação de cromossomos humanos, porém com abordagens diferentes. Em CASTLEMAN, observa-se uma abordagem estatística utilizando métodos bayesianos, já em TODESCO, encontra-se uma abordagem conexionista com a utilização de rede neural artificial direta com função de base radial (*Radial Basis function*).

No presente trabalho, também se optou por uma abordagem conexionista utilizando uma rede neural direta com múltiplas camadas, porém o algoritmo de aprendizagem selecionado foi o de retropropagação (*backpropagation*). Esta escolha foi feita devido às seguintes características presentes nas redes neurais: implementação de uma arquitetura de intenso paralelismo, dando a rede uma estrutura robusta e tolerante a ruídos, a possibilidade de aprendizado através de exemplos e a capacidade de solucionar problemas de classificação de padrões, mesmo quando a separação entre as classes a serem classificadas seja de extrema complexidade.

Na tentativa de minimizar o erro obtido durante os testes da rede neural, foi desenvolvido também, um algoritmo genético para evoluir a matriz de pesos da rede e selecionar o grupo de exemplos mais significativo dentre os exemplos existentes no grupo de treinamento da rede, de forma que o desempenho desta aumentasse. Os resultados obtidos com esta técnica serão avaliados e comparados com o resultado das redes neurais artificiais, determinando-se, assim, a aplicabilidade da técnica.

1.1 Objetivos do Trabalho

Este trabalho se propõe a atingir os seguintes objetivos:

- Definir uma técnica de segmentação de imagem e extrair as características mais significativas para posterior classificação de núcleos de linfócitos do sangue periférico humano.

- Projetar uma rede neural direta com algoritmo de aprendizagem de retropropagação para a classificação e contagem de núcleos de linfócitos do sangue periférico humano.
- Projetar um algoritmo genético para selecionar exemplos, na tentativa de melhorar o desempenho da rede neural.

Além dos objetivos acima vistos, ainda é proposto nesta pesquisa,

- Contribuir para a automação de técnicas citogenéticas no que diz respeito à precisão e rapidez nos testes de laboratório, para, possivelmente, torná-los mais acessíveis do ponto de vista econômico.
- Implementar computacionalmente tanto a rede neural quanto o algoritmo genético em estudo.

1.2 Organização do Trabalho

Este trabalho foi organizado em sete capítulos conforme descritos a seguir.

O Capítulo 1 introduz o tema descrevendo a relevância do trabalho, a descrição e a justificativa do problema, além dos objetivos e a organização deste.

No Capítulo 2 verifica-se uma breve explanação a respeito de conceitos básicos sobre a divisão celular e a importância na determinação do índice mitótico na citogenética.

O Capítulo 3 trata do processamento da imagem digital. Serão vistas neste capítulo as características da imagem, métodos de segmentação e conceito de reconhecimento de padrões de imagem digital.

No Capítulo 4 são descritas as duas técnicas de Inteligência Artificial utilizadas neste trabalho. Inicialmente conceitua-se as redes neurais e trata-se das arquiteturas e dos métodos de aprendizagem, seguido de uma explicação a respeito de redes diretas de múltiplas camadas com algoritmo de aprendizagem de retropropagação. Na segunda parte deste capítulo, os algoritmos genéticos são conceituados e suas principais características, além dos operadores genéticos, são descritas.

O Capítulo 5 descreve como foram implementados os métodos e técnicas tratadas nos capítulos 3 e 4. Será visto como foi feita a segmentação da imagem, quais características das imagens foram utilizadas para a classificação dos núcleos, a arquitetura da rede neural utilizada, além de como foi implementado o algoritmo genético. Também será visto neste capítulo, os procedimentos para cultura de linfócitos do sangue periférico humano, e, por fim, as principais fontes de erro durante o processo de segmentação e classificação da imagem.

O Capítulo 6 mostra os resultados obtidos e a taxa de acerto da rede neural, além de compará-los com os alcançados através do algoritmo genético.

Por fim, no Capítulo 7 apresentam-se as principais conclusões da pesquisa. Neste capítulo também são descritas recomendações e extensões para trabalhos futuros.

2 ÍNDICE MITÓTICO

2.1 Divisão Celular

O ciclo celular é o processo originado na formação da célula até a sua divisão em duas células-filhas, ele é dividido em duas etapas, que, por sua vez, são divididas em outras fases.

A *interfase* é a etapa do ciclo celular que não ocorrem muitas mudanças morfológicas nos núcleos das células, ela é dividida em três fases G1, S e G2. O fato mais significativo, para este trabalho, ocorrido na interfase, decorre na fase S, na qual o DNA da célula é duplicado.

A outra etapa do ciclo celular é a divisão celular, processo que dá origem a duas células descendentes, este processo é caracterizado pela divisão do núcleo, denominado *mitose*, e pela divisão do citoplasma, denominado de *citocinese*, sendo esta última divisão de pouca importância para o escopo deste trabalho.

A mitose é dividida nas seguintes fases *prófase*, *metáfase*, *anáfase* e *telófase* (COOPER, 2001). A seguir será feito um breve comentário das características mais importantes de cada uma destas fases.

O início da divisão celular ocorre com a *prófase*, fase cuja característica principal é a condensação gradual das *cromátides-irmãs*, formadas durante o processo de duplicação do DNA na fase S da interfase. As cromátides irmãs são mantidas juntas pelo centrômero, que é uma sequência de DNA que se liga às proteínas para formar o *cinetocoro*. Os centríolos do núcleo, que também foram duplicados na fase S, começam a migrar para os pólos da célula, unindo-se a microtúbulos, para começarem a formar o *fuso mitótico*.

A *pró-metáfase* é uma fase intermediária entre a *prófase* e a *metáfase*, o início desta fase é caracterizado pelo rompimento do envoltório nuclear, de forma que os microtúbulos conseguem ter acesso aos cinetocoros. Nesta etapa, os cromossomos já podem ser visíveis, de modo que núcleos nesta etapa, quando identificados, são contabilizados como *metáfases*.

A *metáfase* é a fase mais importante para este trabalho, tendo em vista que é nesta fase que os cromossomos encontram-se mais condensados, tornando-se mais visíveis. Os centríolos encontram-se nos pólos da célula e os microtúbulos, formando o fuso

mitótico, arrastaram para trás e para frente os cromossomos até estes ficarem alinhados formando uma placa na altura do equador da célula.

Na anáfase as ligações entre as cromátides-irmãs são quebradas e essas começam a se encaminhar cada uma para um pólo da célula.

A última fase da mitose é a telófase, nela os microtúbulos são desfeitos e o núcleo é reconstruído.

A citocinese inicia durante o final da anáfase e conclui-se logo após o final da telófase, formando, assim, as duas células-filhas. O esquema da mitose pode ser verificado na figura 2.1.

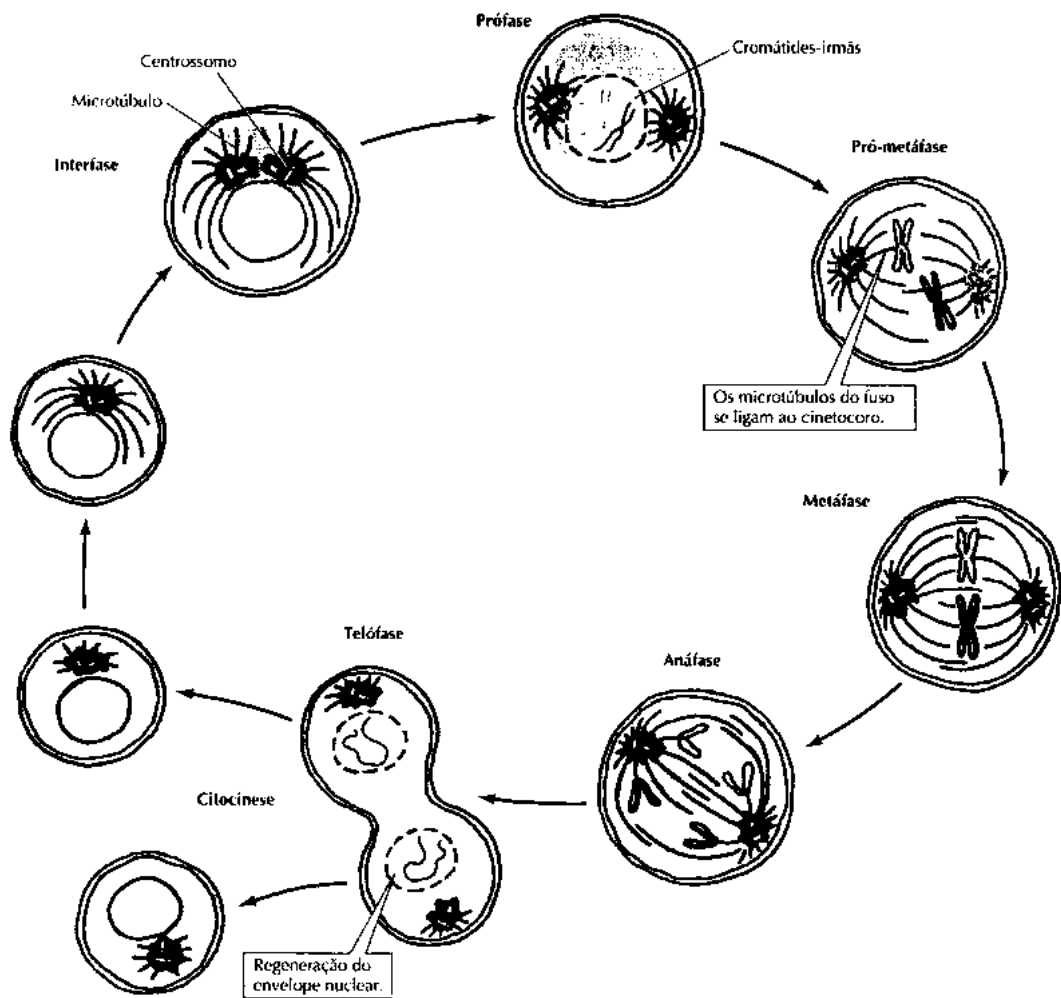


Figura 2.1: Estágios da mitose em uma célula animal (retirado de COOPER (2001)).

2.2 Índice Mitótico

O tempo de renovação de células em determinado tecido depende do tempo do ciclo celular dessas células. Existem tecidos de intensa proliferação, como a medula óssea, e outros onde a divisão celular raramente ocorre, como o músculo liso, ou não ocorrem em absoluto, como os neurônios (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1997).

O índice mitótico tem por finalidade mostrar a proliferação de células em um determinado tecido. Tendo em mente que a metáfase, como visto anteriormente, é a fase mais visível da divisão celular, por causa do modo condensado como se encontram seus cromossomos, defini-se índice mitótico como a proporção de núcleos em metáfase em relação a núcleos em outra fase do ciclo celular de uma amostra, excluindo-se da contagem células mortas durante o processo de cultura.

$$IM = \frac{\text{Núcleos em Metáfase} \times 100}{\text{Núcleos em Interfase}} \quad (2.1)$$

Para a determinação do Índice mitótico, serão contados dois mil núcleos celulares, os valores médios do índice irão variar de acordo com o tecido analisado.

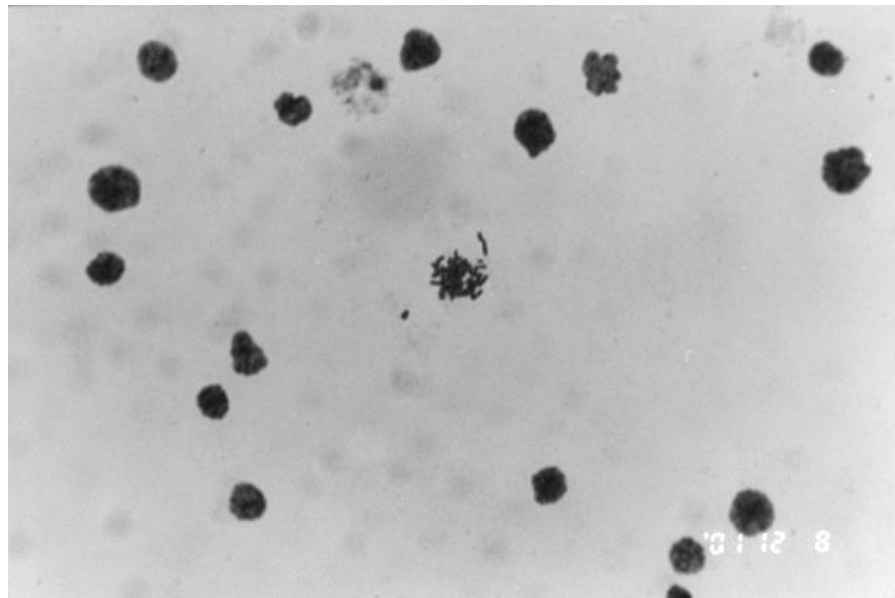


Figura 2.2: Núcleos de linfócitos do sangue periférico humano, fotografados em laboratório. Nota-se uma metáfase no centro da imagem.

2.3 Aplicações do Índice Mitótico na Monitoração de Linfócitos do Sangue periférico Humano

Uma boa parte das pesquisas envolvendo citogenética, necessita de aferições como o índice mitótico (IM), e sua aplicação dependerá do que se está analisando.

Como visto anteriormente, o índice mitótico visa determinar a proliferação de células em determinado tecido. Isto significa que quanto maior o índice mitótico da amostra, maior a proliferação de células neste tecido. A variação do IM é utilizada para monitorar a toxicidade celular induzida a qual determinada amostra está exposta.

“Esta informação (IM), em se tratando de citotoxicidade, é essencial para selecionar adequadamente a concentração e o período de cultivo de compostos, e é especialmente importante quando os resultados são usados em avaliações de risco de componentes aos quais humanos podem ser expostos” (AMORIM et al, 2000).

Assim, o IM é uma importante ferramenta para a monitoração de pacientes que estão sendo expostos a determinados compostos, de forma que se possa analisar a citotoxicidade deste composto.

Em KHAYAT (2001), foi feito um monitoramento, através da determinação do índice mitótico, do composto hidroxauréia (HU), em linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de anemia falciforme e verificou-se uma diferenciação e divisão celular anormal, tendo em vista que “os resultados obtidos demonstram um aumento significativo da citotoxicidade da HU em relação ao controle (amostras retiradas antes do começo do tratamento com HU), conforme as doses aumentavam de concentração”.

Outro exemplo de utilização do índice mitótico em linfócitos do sangue periférico está em AMORIM et al. (2000) que, analisando indivíduos com maiores e menores exposição a Metil-Mercúrio (MeHg), verificou que “o primeiro efeito biológico aparente, com o aumento do nível de (...) MeHg foi a prejudicação da proliferação de linfócitos, medida como índice mitótico.” Neste mesmo trabalho, observa-se que a provável implicação de mudanças no potencial proliferativo de linfócitos do sangue periférico está ligado ao sistema imunológico do indivíduo.

Estes são apenas alguns exemplos da aplicação do índice mitótico. Neste trabalho só foi possível, por indisponibilidade de material em laboratório, determinar o índice mitótico de linfócitos do sangue periférico humano, porém existem muitos outros tecidos nos quais a determinação do índice mitótico é de grande importância, e onde este trabalho se adequaria perfeitamente, sendo diferenciado somente o método de cultura das células.

3 PROCESSAMENTO DA IMAGEM DIGITAL

O processo de determinação do índice mitótico é visual, isto é, a contagem de células é baseada na observação da lâmina a ser examinada e na identificação visual das fases da divisão celular, que assumem padrões bem definidos.

O primeiro passo para automação da determinação do índice mitótico é a captura e digitalização da imagem para posterior processamento e reconhecimento.

3.1 Imagem Digital

Uma imagem é a representação de algo. Existem diversos tipos de imagens, uma pintura pode ser a representação visual da imaginação de seu autor, assim como uma fotografia de Einstein é a representação visual do físico alemão Albert Einstein.

Uma imagem digital é uma representação numérica e discreta de um objeto como mostrado na figura 3.1, ou mais especificamente,

“Imagem digital (...) é uma função quantificada e amostrada, de duas dimensões, gerada por meios ópticos, disposta em uma grade padrão, retangular e igualmente espaçada, quantificada em iguais intervalos de amplitude. Assim, uma imagem digital é (...) um vetor retangular bi-dimensional de amostras de valores quantificados” (CASTLEMAN, 1996).

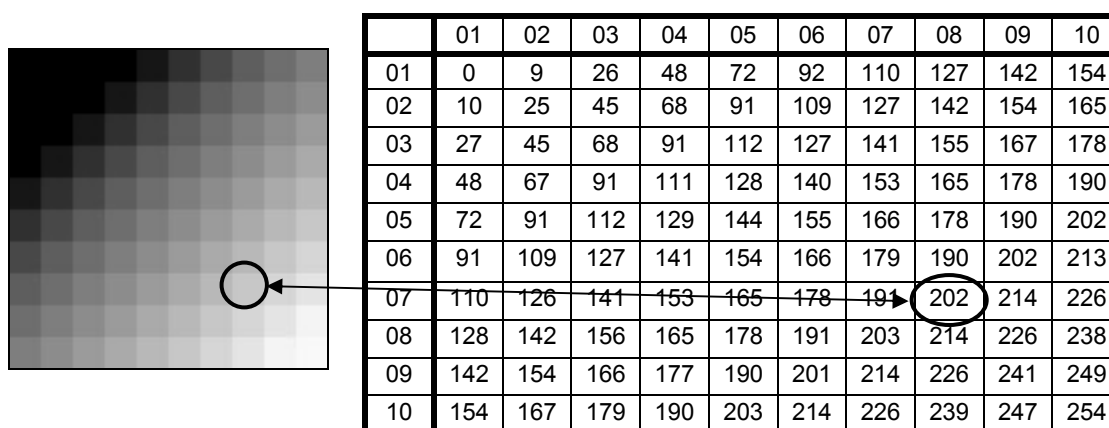


Figura 3.1: Representação numérica de uma imagem ampliada de 10x10 pixels com 256 tons de cinza.

A menor unidade de uma imagem digital é denominada *pixel* (abreviação de *picture element*). Um pixel é a representação numérica da luminosidade de uma pequena região da imagem, como se pode verificar na Figura 3.1.

3.2 Aquisição da Imagem Digital

O computador trabalha apenas com imagens digitais, assim, torna-se necessário a conversão da imagem de sua forma original analógica para uma forma digital, processo esse denominado digitalização.

Segundo CASTLEMAN (1996), esse processo é dividido em três partes: rastreamento, amostragem e quantização. No rastreamento é determinado o endereçamento de cada pixel da imagem. Na amostragem, um sensor mede a intensidade de luz de cada pixel na figura e produz uma voltagem proporcional medindo, assim, o nível de cinza do pixel. Na quantização, o nível de cinza é representado por um valor inteiro.

Desta forma, pode-se gerar uma matriz, na qual cada campo condiz com o nível de cinza de um determinado pixel da imagem.

3.3 Histograma

O histograma é uma função que mostra a quantidade de pixels de uma imagem para cada nível de cinza. O eixo da ordenada é responsável pela frequência que aparecem os pixels e o da abscissa o nível de cinza destes pixels. Sabendo-se que uma das maneiras mais fáceis e eficazes de se segmentar uma imagem é através do nível de cinza, a utilização do histograma torna-se fundamental neste trabalho.

Considerando uma imagem contínua que varia suavemente de tons de cinza mais escuros a tons mais claros, outra maneira de se definir histograma é (CASTLEMAN, 1996):

$$H(D) = \lim_{\Delta D \rightarrow 0} \frac{AD - A(D + \Delta D)}{\Delta D} = -\frac{d}{dD} A(D) \quad (3.1)$$

Onde $D_{(x,y)}$ é a função que define uma imagem contínua e AD é a área definida por todos os pontos que ligados formam uma linha de contorno de mesmo nível de cinza D. “Assim, o histograma de uma imagem contínua é o negativo da derivada de suas funções de área” (CASTLEMAN, 1996).

Imagem de Dxy

Como, para este estudo, as funções que utilizaremos serão discretas, podemos fazer $\Delta D=1$, assim a definição de histograma, para este caso em particular, utilizando $\Delta D=1$ em (3.1) seria:

$$H(D) = A(D) - A(D+1) \quad (3.2)$$

De modo que a função da área de uma imagem digital é a somatória de pixels de nível de cinza iguais ou maiores que D, e o histograma para D é a somatória de pixels de nível de cinza de valor D.

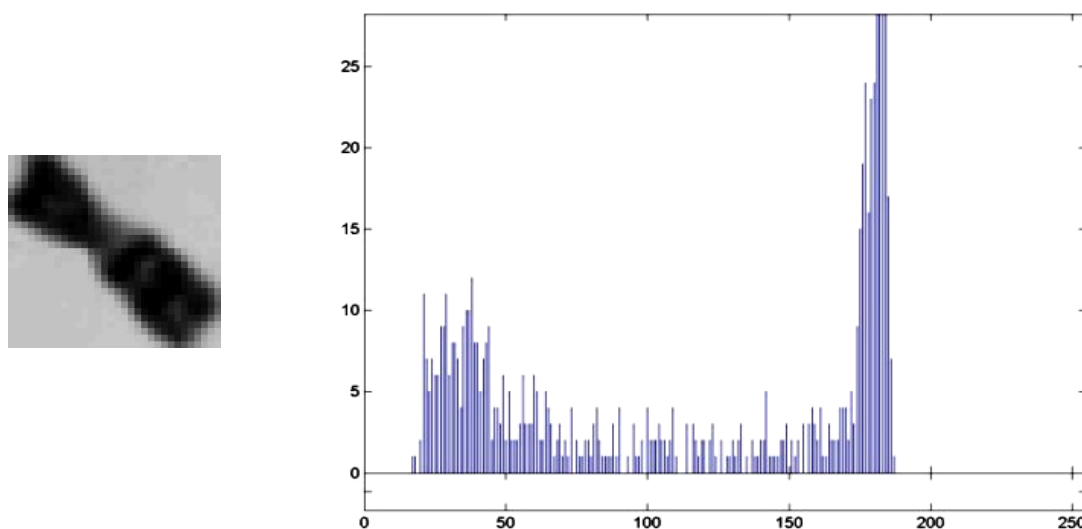


Figura 3.2: Imagem de 29 x 32 pixels, ampliada, de um cromossomo humano e seu respectivo histograma. Note o maior número de pixels de nível de cinza por volta de 180, o que determina a cor de fundo da imagem.

3.4 Reconhecimento de Padrões

Reconhecer padrões sempre foi uma das tarefas mais realizadas no campo da inteligência artificial, principalmente quando o assunto é redes neurais, tendo em vista a

afinidade que esta área da IA possui com tarefas cognitivas, verificando-se, portanto, características intrínsecas de excelente classificadora.

“Reconhecimento de padrões é o processo de identificar objetos, através da extração de suas características, a partir de dados sobre o objeto” (TOU & GONZÁLES, 1974 apud BARRETO, 1999). Vale ressaltar que o objeto em questão não precisa ser necessariamente algo concreto. Por exemplo, pode-se reconhecer padrões de comportamento, padrões sonoros, padrões numéricos, etc.

De acordo com BISHOP (1995), problemas de reconhecimento de padrões podem ser enquadrados em dois tipos: classificação e regressão.

Em problemas de classificação as classes ou categorias no qual a nova entrada será enquadrada já existem, e estão em número discreto. Em problemas de regressão, as saídas são representadas por valores de variáveis contínuas.

Neste trabalho será abordado um problema relacionado com a classificação de padrões de imagens, assim, as entradas serão classificadas em categorias previamente estabelecidas.

O trabalho de reconhecimento de padrões pode ser dividido em duas etapas: o pré-processamento e o reconhecimento propriamente dito (BISHOP, 1995). No pré-processamento são retiradas características do objeto a ser reconhecido, estas características serão utilizadas para facilitar o trabalho da classificação, eliminando informações que não sejam úteis e possam vir a atrapalhar o trabalho de reconhecimento.

Para imagens digitais, o pré-processamento também é dividido em duas fases distintas: a segmentação da imagem e a extração das características que serão analisadas. Na segmentação da imagem o objeto a ser reconhecido é isolado do resto da imagem. Na extração das características, serão selecionados atributos significativos da imagem, formando um vetor de atributos, de forma que este possa representar simplificada a imagem, diminuindo a quantidade de informação necessária para classificá-la, e, conseqüentemente, o tempo de processamento para executar a tarefa (CASTLEMAN, 1996).



Figura 3.3: As três fases do reconhecimento de padrões de imagens digitais (baseado em CASTLEMAN (1996)).

Neste trabalho será abordada a classificação dos objetos por intermédio de uma rede neural, assunto que será tratado em capítulos posteriores, porém vale ressaltar que um também eficiente método de classificação de padrões é o estatístico. Será feita uma breve explanação para futuras comparações com métodos conexionistas, caso necessário.

Uma abordagem estatística é baseada em experiências anteriores e no prévio conhecimento do que será classificado, usaremos um exemplo para ilustrar e ajudar na compreensão deste método. Será descrito um método hipotético estatístico que servirá para reconhecer e classificar os caracteres “a” e “b” (BISHOP, 1995).

Assim, têm-se duas classes de objetos, C_1 , que representa os caracteres “a” e C_2 , que representa “b”. Criar um banco de dados que possuísse todos os objetos das classes, seria uma tarefa árdua e que exigiria um poder computacional muito grande, porém, pode-se extrair características dos objetos, de forma que ajude a identificá-los. Um atributo válido é a razão entre a altura e a largura do objeto, o qual será denominado f_1 , assim, é fácil deduzir que os valores de f_1 para a classe C_2 serão maiores que os da classe C_1 .

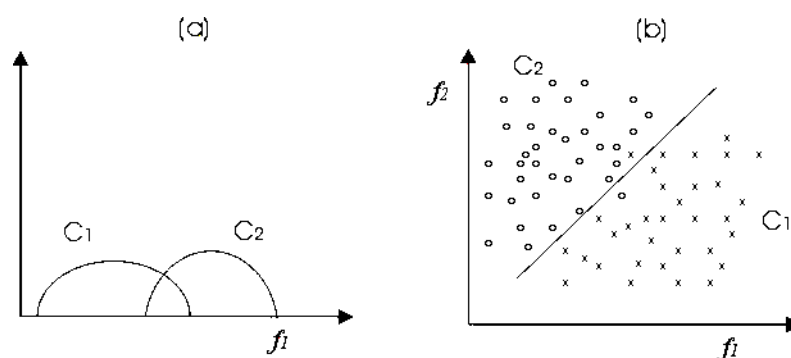


Figura 3.4: Em (a), classes C_1 e C_2 com apenas um atributo, nota-se a área sobreposta, tornando-se necessária à extração de mais um atributo do objeto para separar as classes através de uma linha de decisão (b) (baseado em BISHOP (1995)).

Se o atributo f_1 for suficiente para separar as duas classes, basta determinar um limiar, de forma que, valores acima do limiar pertencem à classe C_2 e abaixo do limiar, à C_1 , porém se existir uma grande quantidade de objetos de classes diferentes, mas que possuam valores de f_1 semelhantes, torna-se necessária a extração de mais um atributo (f_2) do objeto, de modo que possa ser efetuado uma melhor separação das classes, feita, agora, através de uma linha de decisão (figura 2.4b).

Este foi apenas um breve exemplo da abordagem estatística para o problema de reconhecimento de padrões, explicações mais detalhadas fogem do escopo desse trabalho e podem ser aprofundadas em bibliografias mais específicas, como CASTLEMAN (1996) e BISHOP (1995).

3.5 Segmentação da Imagem

A segmentação da imagem é a etapa mais delicada do processamento da imagem digital, tendo em vista que todo o trabalho posterior será baseado na imagem segmentada.

Existem inúmeras técnicas utilizadas na segmentação da imagem, e cada técnica é definida de acordo com o problema a ser resolvido, não existindo um modelo formal para o processo, que deverá se ajustar de acordo com o tipo de imagem estudada.

Segundo CASTLEMAN (1996), pode-se abordar a segmentação da imagem de três perspectivas filosóficas diferentes:

“No caso que denominamos *abordagem por região*, cada pixel é atribuído a um objeto ou região específica. Na *abordagem por limites* preocupa-se apenas com a localização dos limites que existem entre regiões. Na *abordagem por contornos* busca-se identificar pixels de contorno e então liga-los, para formar os limites requeridos”.

A imagem adquirida por microscópio possui um fundo bem definido, de tom relativamente constante, assim, para separar as células do fundo, para posterior classificação, a abordagem por região é bastante eficaz.

3.5.1 Segmentação da Imagem por Limiar (*Tresholding*)

Um tipo de abordagem por região é a segmentação da imagem por limiar (*tresholding*), esta técnica consiste em admitir um tom de cinza como um limiar, de forma que tons de cinza acima deste valor são considerados pertencentes ao objeto e tons abaixo, não pertencentes, isto é, fazem parte do fundo.

“O limiar é particularmente útil (...) para imagens que contêm objetos sólidos, em um fundo contrastante. É computacionalmente simples e nunca falha quando deve definir regiões disjuntas com contornos unidos e fechados” (CASTLEMAN, 1996).

As características citadas acima se enquadram perfeitamente neste trabalho, tendo em vista os contornos bem definidos das células e seu contraste acentuado com o fundo da imagem, que é relativamente constante.

A maior dificuldade desta técnica é identificar o valor do limiar e como ele vai atuar sobre a imagem. Caso tenha um tom de cinza constante e muito contrastante com todos os elementos da imagem, pode-se adotar um *limiar global*, que atuará em toda a imagem, esta é a maneira mais simples de implementar o limiar. Por outro lado, se o fundo da imagem possuir variações, pode-se utilizar um *limiar adaptativo*, o qual variará de acordo com a região da imagem.

Para imagens desse tipo, uma boa maneira de determinar o limiar é utilizar-se do histograma.

Como visto anteriormente, o histograma de uma imagem é a função que mostra a quantidade de pixels por nível de cinza. Como o fundo é contrastante com a imagem e relativamente constante, o histograma apresentará um pico com pixels de nível de cinza próximos entre si, que são referentes ao fundo, e um outro pico, geralmente menor, referente ao elemento, um valor de nível de cinza retirado do vale formado entre os dois picos poderá ser o limiar para a imagem.

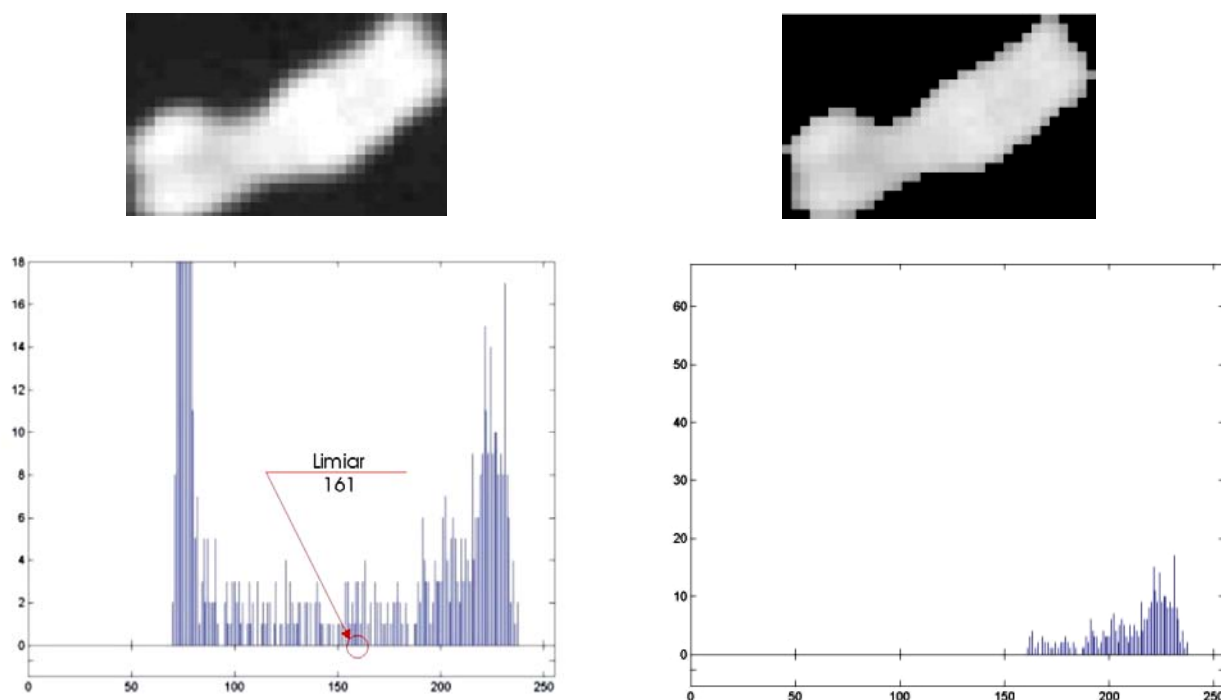


Figura 3.5: Segmentação por limiar aplicada na imagem de um cromossomo humano. Todos os pixels com nível de cinza inferiores a 161 forma substituídos por níveis de cinza 0 (zero). Nota-se uma diferença de escala devido a grande quantidade de pixels de nível de cinza zero.

Assim, eliminando-se os pixels de valores inferiores ao limiar, o que resta na imagem são os elementos que pretende-se segmentar, como visto na figura 3.5.

3.6 Extração de Características Relevantes da Imagem

Após a segmentação da imagem, o próximo passo para a classificação do padrão é extrair dessa imagem características relevantes de modo tal a formar um vetor de atributos que represente a imagem de forma satisfatória.

A importância dessa etapa advém da necessidade de minimizar a quantidade de informação e, conseqüentemente, diminuir a quantidade de poder computacional necessária durante o processo de classificação, removendo do objeto a ser classificado informações que não sejam necessárias para executar essa tarefa.

A escolha das características a serem utilizadas para classificação é dependente do tipo de objeto que se pretende representar, e varia bastante dependendo do problema, sendo algumas destas referentes apenas a problemas específicos. Nesta seção serão

vistas algumas características mais gerais utilizadas para formar um vetor de atributos de um elemento.

3.6.1 *Medições de Tamanho*

É importante lembrar que a menor unidade de uma imagem digital é o pixel, sendo assim, as informações a respeito de tamanho para imagens digitais serão todas em pixels, algumas das principais características referentes ao tamanho que se pode extrair de um elemento segmentado são:

- *Área e Perímetro* – A maneira mais simples de obter a área de um objeto é somar o número de pixels contidos dentro das bordas desse objeto, incluindo estas. O perímetro será representado pelo número de pixels necessários para fazer o contorno externo do objeto.
- *Densidade* – A densidade é dada pela soma de todos os níveis de cinza do objeto. A *Densidade Média* será obtida dividindo-se a densidade da imagem pela sua área.
- *Altura e Largura* – A altura e a largura são valores fáceis de serem extraídos da imagem, bastando utilizar os maiores e menores valores das linhas e colunas da imagem segmentada, porém, estes não serão, necessariamente, os valores reais de altura e largura do objeto, sendo, muitas vezes, necessária a localização do eixo da imagem. A maneira mais simples de encontrar este eixo é através da utilização do MER (*Minimum Enclosing Rectangler*), através dessa técnica, rotaciona-se poucos graus e enquadra-se a imagem em um retângulo até formar um ângulo de 90°, o menor dos retângulos formado, terá a altura e largura real do objeto.

3.6.2 *Análises da Forma*

Algumas vezes torna-se necessário analisar a forma de um objeto para classificá-lo corretamente, esta análise pode, ou não, ser feita em conjunto com as medições de tamanho descritas no item anterior. As análises de forma mais comuns são:

- *Retangularidade*: fator que mede quanto determinada forma é retangular. Pode ser obtido da seguinte forma:

$$R = \frac{A_o}{A_R}, \quad (3.3)$$

onde A_o é a área do objeto e A_R é a área de seu respectivo MER, assim, R irá representar o quanto o objeto se encaixa no seu MER, obtendo valor 1 (um) caso o objeto seja retangular.

- *Circularidade*: é um dos modos mais eficazes de se obter a forma de um objeto, irá medir a complexidade da borda do objeto, a maneira mais simples de se obter a complexidade de um objeto é:

$$C = \frac{P^2}{A}, \quad (3.4)$$

onde P é o perímetro do objeto e A , sua respectiva área.

4 TÉCNICAS DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL UTILIZADAS: REDES NEURAIS E ALGORITMOS GENÉTICOS

Durante o desenvolvimento deste trabalho, observou-se que uma boa ferramenta para o reconhecimento dos padrões de imagem envolvidos seria uma rede neural direta com algoritmo de treinamento de retropropagação, tendo em vista as características do problema. Nas próximas linhas será feita uma breve explanação da arquitetura e do funcionamento da rede neural escolhida para este trabalho.

Ainda neste capítulo serão vistas as principais características e fundamentos de outro ramo da inteligência artificial, mais especificamente da computação evolucionária, os algoritmos genéticos. Esta técnica foi introduzida para otimizar o grupo de treinamento e a própria rede neural, na tentativa de obter um rendimento melhorado no desempenho desta.

4.1 Redes Neurais Artificiais

Um dos ramos da inteligência artificial que mais se desenvolveu ultimamente é o de redes neurais, também conhecido como conexionista. Essas redes possuem inspiração biológica nas redes neuronais naturais, e, logicamente, em seus neurônios.

Assim como na natureza, um neurônio artificial é uma estrutura relativamente simples, que responde a estímulos de outros neurônios conectados a ele. Essa arquitetura dá as redes neurais características marcantes de intenso paralelismo e robustez.

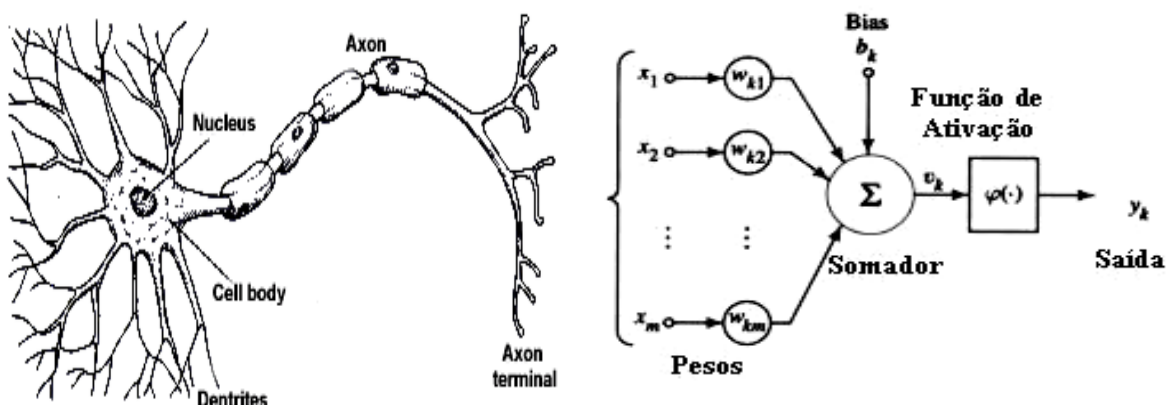


Figura 4.1: Representação artificial de um neurônio natural. As entradas $\{x_1, x_2, \dots, x_n\}$, representam os sinais vindos de outros n neurônios. Os pesos $\{w_{k1}, w_{k2}, \dots, w_{kn}\}$ representam os pesos sinápticos das conexões entre os neurônios da camada anterior e da camada k . O Bias (b_k) é o limiar para ativação do

neurônio. Nota-se que a representação é inspirada no natural não possuindo, evidentemente, todos os mecanismos e atributos do neurônio natural. (Figuras retiradas de LEVINE & SHEFNER (1991) e MOTA).

Uma definição de redes neurais é dada a seguir por HAYKIN (2001):

“Uma rede neural artificial é um processador maciçamente paralelamente distribuído constituído de unidades de processamento simples, que têm a propensão natural de armazenar conhecimento experimental e torná-lo disponível para o uso. Ela se assemelha ao cérebro em dois aspectos: 1.) O conhecimento é adquirido pela rede a partir de seu ambiente através de um processo de aprendizagem. 2.) Forças de conexão entre neurônios, conhecidas como pesos sinápticos, são utilizadas para armazenar o conhecimento adquirido”.

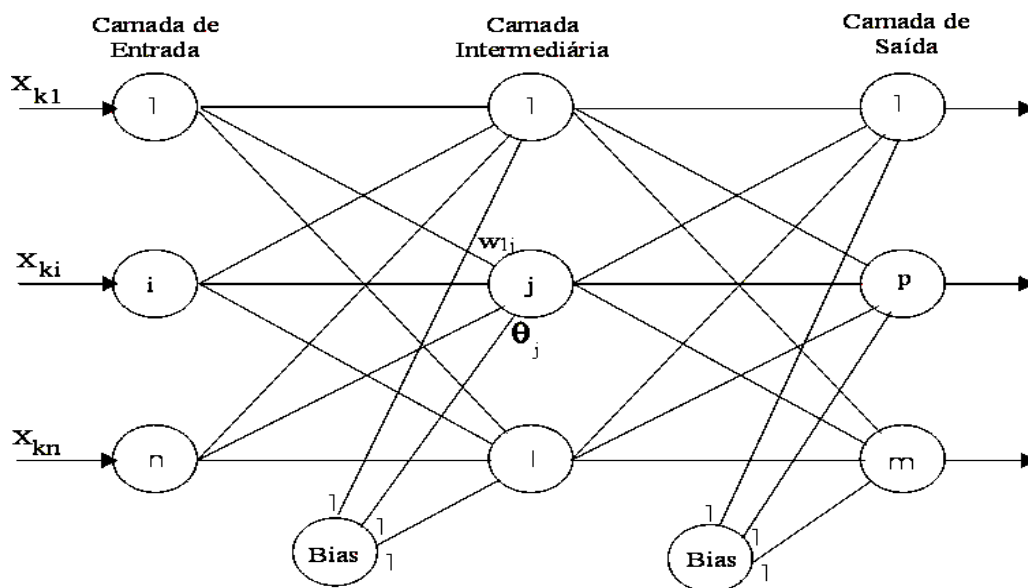


Figura 4.2: Esquema de uma rede neural multi-camada direta com três camadas, onde “x” é o vetor de entrada, “w” é a matriz que representa todos os pesos sinápticos das conexões e θ é a representação do bias (*threshold*).

4.1.1 Arquiteturas

A escolha da arquitetura da rede neural é de fundamental importância, pois irá restringir o tipo de problema que a rede será apta a trabalhar, tendo em vista que o algoritmo de aprendizagem para treinar a rede está ligado a sua arquitetura. Alguns parâmetros determinam a arquitetura de uma rede neural: o número de camadas, a topologia e a conectividade.

Quanto ao número de camadas as redes podem ser:

- *Redes de camada única:* Neste caso a rede possui apenas uma camada além da camada de entrada, esta não é contada por que nela não acontece nenhuma computação (HAYKIN, 2001).
- *Redes de múltiplas camadas:* São aquelas que possuem mais de uma camada além da de entrada, muitas vezes a(s) camada(s) intermediária(s) recebe(m) a denominação de escondida(s) (*hidden*).

Quanto à conectividade pode-se classificar em:

- *Totalmente conectada:* quando cada nó de uma camada está ligado a todos os nós da camada posterior.
- *Parcialmente conectada:* quando algumas conexões entre neurônios de camadas adjacentes estão faltando.

Quanto à topologia tem-se redes:

- *Diretas ou acíclicas:* são aquelas cujo grafo não tem ciclos (BARRETO, 1999), isto é, que se projetam da camada de entrada em direção a camada de saída, de forma que a saída da segunda camada torna-se a entrada da terceira e assim por diante. Se uma rede direta é de camada única, irá resolver apenas problemas linearmente separáveis (BRAGA et al, 2000), porém, com o acréscimo de camadas intermediárias, estas redes “são capazes de aproximar, com maior ou menor precisão, dependendo do

número de neurônios da rede, qualquer função não linear” (BARRETO, 1999).

- *Cíclicas (feedback)*: o grafo destas redes possui pelo menos um ciclo, isto é “a saída de algum neurônio na *i-ésima* camada da rede é usado como entrada de nodos (nós) em camadas de índice menor ou igual a *i*” (BRAGA et al, 2000), assim a rede pode possuir memória e guardar o momento anterior, o que faz com que ela não dependa somente dos sinais de entrada, como também do valor anterior de saída da rede. Se a rede possuir elementos com retardo (neurônios dinâmicos) será denominada *recorrente*. Caso todas as ligações da rede sejam cíclicas, a rede será *auto-associativa*.

4.1.2 Aprendizado

O conhecimento de uma rede neural está distribuído nos pesos sinápticos de seus neurônios, logo, pode-se dizer que uma rede neural aprende quando ela modifica seus pesos, interagindo com o ambiente em que está inserida, como se pode verificar na definição de aprendizagem para redes neurais, dada por HAYKIN (2001):

“Aprendizagem é um processo pelo qual os parâmetros livres de uma rede neural são adaptados através de um processo de estimulação pelo ambiente no qual a rede está inserida. O tipo de aprendizagem é determinado pela maneira pela qual a modificação dos parâmetros ocorre”.

Na definição acima, o que o autor denomina de parâmetros livres podem ser considerados os pesos da rede neural.

Existem várias maneiras de modificar os pesos de uma rede, essas modificações são feitas no processo de aprendizagem ou treinamento, através do algoritmo de aprendizagem. Esta aprendizagem poderá ser *supervisionada* ou *não-supervisionada*.

4.1.2.1 Aprendizado Supervisionado

O aprendizado supervisionado para redes neurais é o mais comumente utilizado. A rede neural que usa esse tipo de aprendizado necessita, durante o treinamento, da

presença de um professor para verificar se a saída obtida pela rede é satisfatória. Cria-se, então, um conjunto de treinamento entrada-saída, de forma que a rede altere seus pesos para chegar a um resultado satisfatório.

Assim, no processo de aprendizagem, a rede é submetida a um conjunto de treinamento o qual possui um vetor de entrada “X” e uma saída correspondente conhecida “d”, que será chamada de saída desejada. Quando a rede ainda não está treinada, ao ser submetida a “X” ela, provavelmente, irá ter como saída uma resposta “y” diferente de “d”. Assim, o método de aprendizagem tem por finalidade modificar os pesos da rede de forma que aproxime a saída “y” da resposta desejada “d”.

Estes tipos de algoritmos são de muita utilidade em problemas de classificação de padrões e aproximação de funções. Alguns exemplos de algoritmos de aprendizado supervisionado são a regra *delta* e a regra *delta generalizada* ou algoritmo de retropropagação (*backpropagation*).

4.1.2.2 Aprendizado Não-Supervisionado

Ao contrário do aprendizado supervisionado este não necessita de um professor. Neste tipo de aprendizado, os pesos sinápticos não são alterados de acordo com a resposta da rede, e sim, de forma que, para exemplos de entradas semelhantes, a rede responda de forma semelhante (BARRETO, 1999).

Esse tipo de aprendizagem pode ser utilizado em casos de reconhecimento de padrões onde não se conhecem as classes nas quais as entradas serão enquadradas, na verdade a rede irá se adaptar de forma que consiga separar as entradas em classes. Os algoritmos mais conhecidos, que utilizam aprendizado não-supervisionado são o hebbiano e o competitivo.

4.1.3 Redes Diretas de Múltiplas Camadas com Algoritmos de Aprendizado de Retropropagação (Backpropagation)

Também conhecidas como redes MLP, sigla para *Multi-Layer Perceptron*, por causa das camadas múltiplas e do *Perceptron*, tipo de neurônio que utiliza. Este tipo de rede é o mais difundido e largamente utilizado, principalmente para a classificação de padrões, tendo em vista o seu modo simples de aprendizado supervisionado.

4.1.3.1 Perceptron

O perceptron, desenvolvido por Rosenblatt em 1958, foi o primeiro modelo de redes neurais com aprendizado supervisionado (HAYKIN, 2001). O modelo de rede desenvolvido por Rosenblatt era de camada única e o neurônio possuía o formato da figura 3.3.

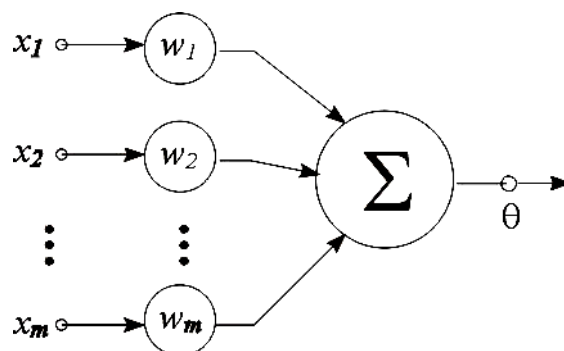


Figura 4.3: Perceptron. Modelo de neurônio desenvolvido por Rosenblatt em 1958.

Onde x_i são as entradas da rede w_i são os pesos sinápticos e θ é o limiar (*Threshold*). Assim, pode-se representar o perceptron da seguinte forma:

$$\sum_{k=1}^m w_k \cdot x_k = \theta \quad (4.1)$$

Rosenblatt provou, através do *teorema de convergência do perceptron*, que o perceptron era capaz de classificar qualquer padrão linearmente separável (HAYKIN, 2001).

4.1.3.2 Regra Delta

Desenvolvida por Widrow e Hoff, em 1960, também é conhecida como algoritmo do mínimo quadrado médio (LMS – *Least Mean Square*), foi implementado no modelo de neurônio denominado *Adaline (Adaptive Linear Neuron)*. No Adaline a saída $y \in [-1,1]$ e é obtida por:

$$y = \sum_{i=1}^m w_i \cdot x_i \quad (4.2)$$

O método de treinamento supervisionado utiliza um conjunto de vetores de entrada $\{X_1, X_2, \dots, X_L\}$ e suas respectivas saídas desejadas $\{d_1, d_2, \dots, d_L\}$ de forma que o erro obtido para o k -ésimo vetor de entrada é,

$$E_k = d_k - y_k \quad (4.3)$$

Como o objetivo é minimizar o erro entre a saída desejada e obtida, utiliza-se o método da descida mais íngreme, calculando-se o gradiente, de forma que se possa obter a direção da descida. Assim, a atualização do vetor de pesos é dada por,

$$W(t+1) = W(t) - \mu \nabla E_k^2(t) \quad (4.4)$$

Onde μ é a *taxa de aprendizado*, que representa a velocidade com que a rede irá convergir, geralmente um valor no intervalo $[0,1]$.

4.1.3.3 Algoritmo de Retropropagação (Backpropagation)

O algoritmo de aprendizagem de retropropagação (*backpropagation*), também conhecido como regra delta generalizada, é um dos principais algoritmos de aprendizagem para redes neurais. Foi o primeiro a conseguir treinar uma rede de múltiplas camadas e, por isso, é responsável pelo retorno de interesses no estudo de redes neurais, que obteve uma grave diminuição após a publicação, em 1969, do livro *Perceptrons*, de Minsky e Papert, que afirmava não ser possível classificar corretamente padrões *não linearmente separáveis* com Perceptrons.

O perceptron de uma rede MLP possui o seguinte formato:

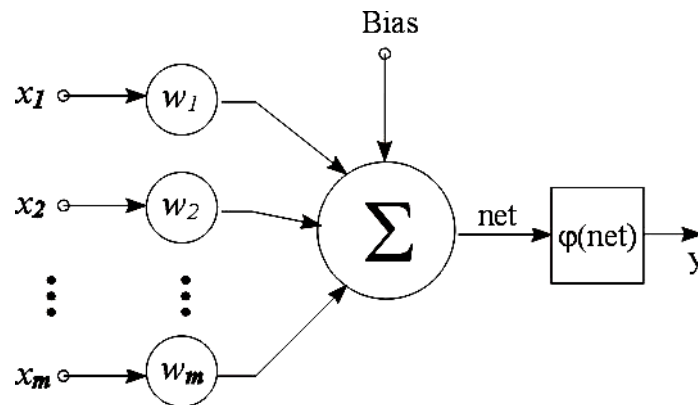


Figura 4.4: Modelo do neurônio de uma rede MLP

O bias é considerado parte do vetor de entrada, porém com valor constante igual a 1. A função de ativação, que geralmente era uma função degrau, pode ser substituída por uma linear, sigmoideal ou tangente hiperbólica.

$$y(x) = ax$$

Função Linear

$$y(x) = \frac{1}{1 + e^{-kx}}$$

Função Sigmoidal

$$y(x) = \tanh(kx) \frac{1 - e^{-kx}}{1 + e^{-kx}}$$

Função Tangente Hiperbólica

O algoritmo de retropropagação é dividido em duas etapas. Na primeira o vetor de treinamento é apresentado à rede e propagado por todos os nós até a camada de saída, compara-se o valor de saída com o valor desejado, calculando-se o erro médio quadrático, e posteriormente o valor de ΔW é calculado e os pesos da camada de saída são atualizados. A segunda etapa consiste na retropropagação, de forma que cada camada recalcula o valor de ΔW e atualiza seus pesos até a camada de entrada, onde o processo recomeça, cada etapa do processo recebe o nome de época, e este termina apenas quando um erro mínimo estipulado para a rede é alcançado, momento no qual ela converge.

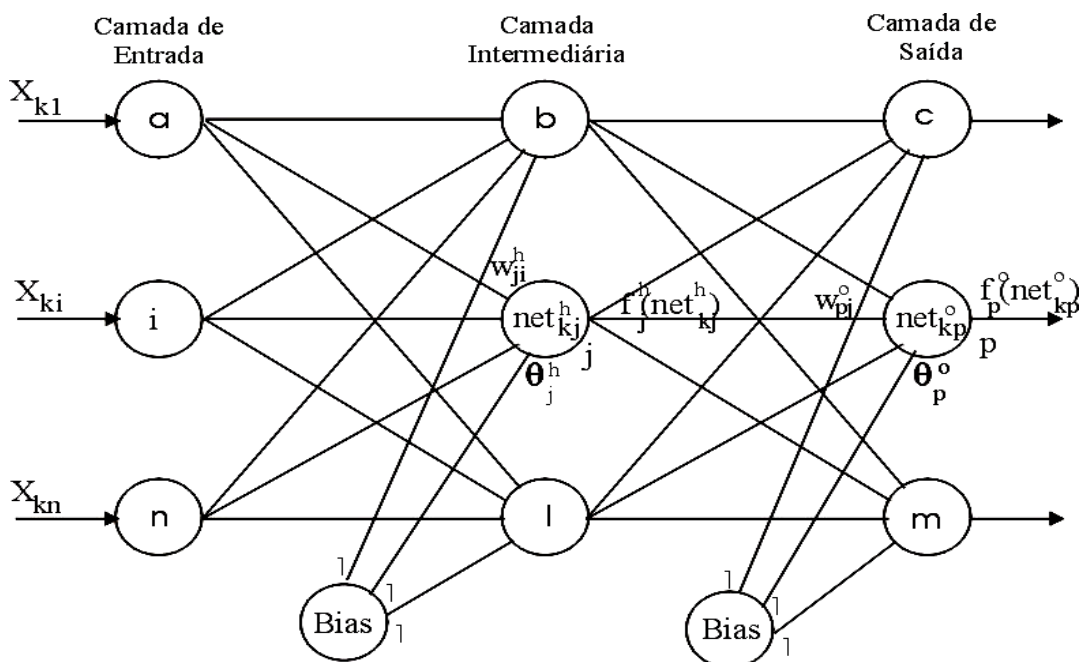


Figura 4.5: Esquema de rede MLP com algoritmo de treinamento Backpropagation

Assim, treina-se a rede da figura 4.5 da seguinte forma:

Aplica-se um vetor k de treinamento e calcula-se, para cada neurônio da camada escondida, o net e, posteriormente, a saída, através da função de ativação,

$$net_{kj}^h = \sum_{j=1}^n w_{ji}^h \cdot x_{ki} + \theta_j^h \quad (4.5) \quad i_{kj} = f_j^h(net_{kj}^h) \quad (4.6)$$

Nota-se que a saída do neurônio da camada escondida será a entrada do neurônio da camada de saída, assim calcula-se o net e a saída da rede,

$$net_{kp}^o = \sum_{j=1}^l w_{pj}^o \cdot i_{kj} + \theta_p^o \quad (4.7) \quad o_{kp} = f_p^o(net_{kp}^o) \quad (4.8)$$

Compara-se o valor da saída da rede com o valor desejado, através do cálculo do erro médio quadrado,

$$E_k = \frac{1}{2} \sum_{p=1}^m (d_{kp} - o_{kp})^2 \quad (4.9)$$

Os pesos dos neurônios da camada de saída são atualizados por: $w_{pj}^o(t+1) = w_{pj}^o(t) + \Delta_k w_{pj}^o(t)$, onde,

$$\Delta_k w_{pj}^o = \eta (d_{kp} - o_{kp}) \cdot f_p^{o'}(net_{kj}^o) i_{kj} \quad (4.10)$$

η é a taxa de aprendizado, e finalmente os valores dos pesos da camada anterior é atualizado por:

$$\Delta_k w_{ji}^h = \eta f_j^{h'}(net_{kj}^h) x_{ki} \sum_p (d_{kp} - o_{kp}) \cdot f_p^{o'}(net_{kp}^o) w_{pj}^o \quad (4.11)$$

4.1.3.4 Generalização x Overfitting

Quando o treinamento da rede é bem sucedido, isto é, ela converge para o erro mínimo estipulado, esta se torna capaz de classificar os padrões ensinados a ela. Entretanto, a rede possui ainda a capacidade de classificar corretamente padrões que não lhe foram ensinados, a essa capacidade damos o nome de generalização. Por outro lado, algumas vezes, a rede tende a reconhecer *somente* os padrões que lhe foram ensinados, a esta tendência denominamos *overfitting*.

Verificou-se, portanto, que a linha tênue entre o *overfitting* e a generalização exagerada da rede é extremamente difícil de ser encontrada e apesar da rede neural ser uma boa ferramenta para a solução do problema proposto neste trabalho, existe ainda muita heurística envolvida na aprendizagem desta.

Entre essas heurísticas podemos destacar algumas, como o número de camadas intermediárias, o número de neurônios em cada camada intermediária, caso haja mais de uma, o número de neurônios na camada de saída, o erro mínimo para o qual a rede

deverá convergir, a taxa de aprendizado que a rede deve utilizar, entre outras muitas variáveis.

4.2 Algoritmos Genéticos

A *Computação Evolucionária* é a área da Inteligência Artificial responsável pelo estudo de mecanismos baseados na teoria da evolução natural. A maioria desses mecanismos é inspirada, principalmente, na seleção natural.

Acredita-se que as técnicas de computação evolucionária possuem tendências naturais de evolução de acordo com BARRETO (1999):

“A motivação para tomar esta inspiração biológica vem da suposição que a Natureza com seus mecanismos buscou resolver um problema de otimização. Assim, poderia dizer-se que a Natureza resolveu um problema de complexidade: determinar a quantidade de ‘recursos’ para resolver um ‘problema’, a sobrevivência”.

O Algoritmo Genético é a técnica de computação evolucionária mais popular. Resumidamente, ela pode ser descrita da seguinte forma:

“Essencialmente, a técnica (1) reúne uma população de indivíduos denominados de ‘cromossomos’, (...), (2) propaga cópias desses indivíduos baseado em um critério de avaliação externo, e (3) gera novos indivíduos para cada próxima geração por mutação (...) e recombinação de elementos de diferentes membros da população” (FOGEL, 2000).

Assim como na teoria da evolução, os algoritmos genéticos utilizam-se de mecanismos tais como seleção do mais apto, mutação e reprodução. Estes mecanismos são utilizados para a otimização de sistemas, tendo em vista que na natureza, como visto, existe sempre a procura pelo ótimo, de forma que a espécie e, logicamente, seu código genético, sobreviva. Nota-se, porém que a proposta é apenas inspirada no

processo natural, isto é, o processo é, na verdade, uma simplificação da realidade, não possuindo, portanto, todas as etapas descritas na teoria da evolução.

Ao contrário de outros mecanismos de busca que geralmente utilizam apenas um ponto para varrer uma superfície, os algoritmos genéticos utilizam-se de uma população de indivíduos pontuais para fazer a varredura de uma determinada superfície, aumentando a possibilidade de encontrar uma solução satisfatória.

4.2.1 Elementos do Algoritmo Genético

Podemos simplificar o algoritmo de um AG da seguinte forma:

1. Inicialização da população;
2. Cada indivíduo da população é avaliado através de uma função de avaliação (*fitness*);
3. Os pais são selecionados para reprodução;
4. Realização do cruzamento (*crossover*) e da mutação (*mutation*);
5. Repetição dos passos 2-5 até uma condição ser atingida.

Em princípio é criada uma população de indivíduos de valores aleatoriamente selecionados de um universo de possibilidades previamente estabelecido, também conhecido como *alfabeto*. Cada indivíduo é chamado de *cromossomo*, e cada cromossomo é dividido em *genes*, os genes possuem lugares fixos no cromossomo denominados *locus*, e esses lugares são ocupados por valores denominados *alelos* que podem ser alterados por outros alelos do alfabeto (FOGEL, 2000). Uma pequena analogia pode ser feita para ajudar a entender o formato de um cromossomo. Visualize o cromossomo como uma rua, o gene como uma casa, o locus como o número da casa e o alelo como seu morador.

O número de indivíduos de uma população ainda é uma heurística, dependendo muito da experiência do usuário, porém quanto maior o número de indivíduos, maior será a probabilidade de se achar uma resposta satisfatória, haja vista a maior quantidade de pontos na superfície a ser pesquisada. Por outro lado, o tempo de processamento será aumentado.

4.2.1.1 Função de Avaliação (*Fitness*)

Determinar a Função de Avaliação ou *fitness* é a parte crítica do algoritmo genético, esta função será responsável pela avaliação da população e determinará quais indivíduos são mais aptos, isto é, quais cromossomos estão mais perto de uma solução satisfatória. Assim, uma função de avaliação determinada de forma incorreta, avaliará de forma errônea os cromossomos, comprometendo todo o processo.

Após a avaliação da população é realizado um *ranking* para a classificação dos melhores indivíduos, pois estes terão maior possibilidade de reprodução. Os indivíduos mal sucedidos serão cortados da população, para dar lugar a uma nova geração de indivíduos, de forma que o número de indivíduos existente na população seja constante. O corte da população é um passo muito importante, como pode ser verificado em BARRETO (1999):

“Sem morte (corte de indivíduos da população) não há evolução. Na natureza morte não é o fim do ser, mas tal como regra de produção, é a substituição de um elemento por seu descendente, mantendo vivo o elo da evolução genética”.

4.2.1.2 Cruzamento (*Crossover*)

O cruzamento para o algoritmo genético é a troca de alelos entre dois cromossomos. Esse cruzamento é o que garante a diversidade da população. Evidencia-se neste ponto a propriedade elitista do algoritmo genético, tendo em vista que a probabilidade do cruzamento será proporcional à avaliação do indivíduo. Podemos verificar a importância do cruzamento para o AG, guardando as devidas proporções, comparando-o com a importância da reprodução sexuada na evolução natural, conforme FOGEL (2000):

“A reprodução sexual oferece uma habilidade significativa de diversidade genética para uma espécie e, como consequência, diversidade fenotípica. A vantagem funcional evidente da recombinação sexual para uma determinada espécie é o significativo aumento da taxa de exploração do espaço do estado

genotípico/fenotípico (...). A recombinação se incumbirá de expor uma grande variedade de genótipos a várias condições ambientais”.

No algoritmo genético, a seleção de indivíduos para o cruzamento é feita atribuindo-se, como visto, uma probabilidade a cada indivíduo de ser escolhido. Uma boa ferramenta para essa tarefa é a roleta simples, na qual indivíduos de melhor colocação no ranking possuem uma fatia maior da roleta, e, conseqüentemente, maior probabilidade de serem escolhidos.

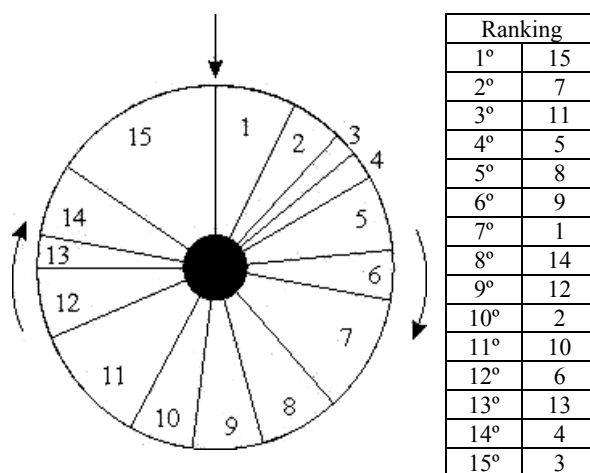


Figura 4.6: Exemplo de uma roleta simples. Distribuição dos cromossomos proporcionalmente à suas posições no Ranking

Após um par de cromossomos ser selecionado, será realizado o cruzamento entre eles da seguinte forma: um ponto de corte é escolhido aleatoriamente no cromossomo e os alelos dos genes que ficarem após este ponto serão trocados para dar origem aos descendentes.

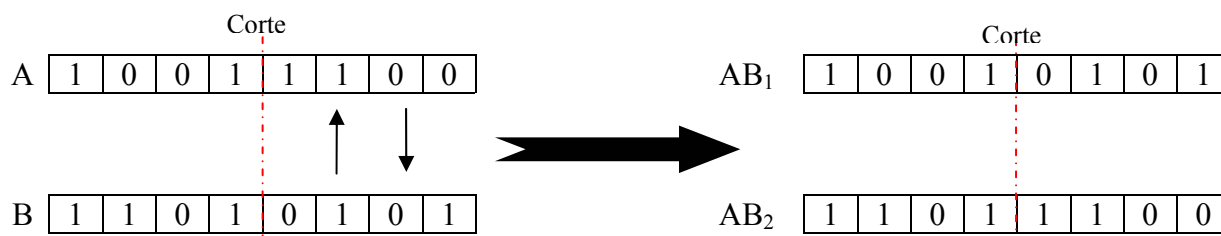


Figura 4.7: Cruzamento de um par de cromossomos A e B, gerando os descendentes AB₁ e AB₂.

4.2.1.3 Mutação

Para o algoritmo genético, mutação é a mudança aleatória de um cromossomo de uma geração em relação à outra. Neste caso, pouco importa se esta mudança ocorre somente com os filhos que são gerados, ou com um cromossomo aleatório da população, isso vai depender do usuário e da aplicação em que o algoritmo está sendo utilizado.

Apesar da diversidade que inicia o algoritmo genético, haja vista a aleatoriedade da escolha dos alelos para os cromossomos na inicialização da população, a mutação tem por finalidade colocar um pouco de acaso na evolução deste, já que existe a possibilidade de nem todos os alelos significativos para a solução do problema estarem representados na população, além de ajudar a manter a diversidade da população que pode ser perdida após várias gerações.

Assim, pode-se dizer que, para o algoritmo genético, a mutação consiste na escolha aleatória de um gene de um indivíduo, cujo alelo será trocado por outro escolhido aleatoriamente do alfabeto.

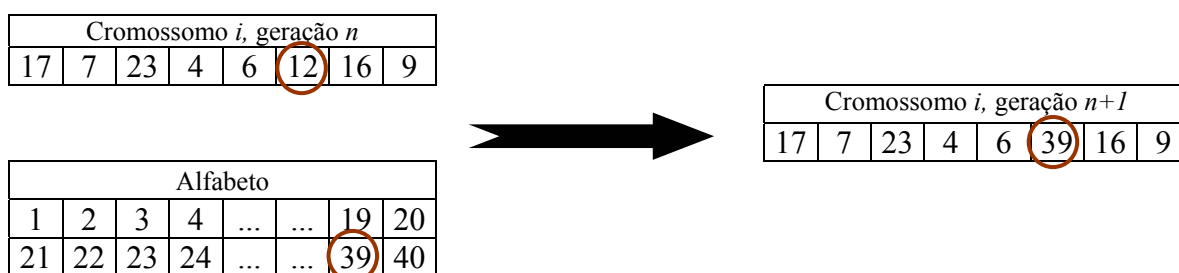


Figura 4.8: Exemplo de mutação ocorrida no cromossomo i no gene cujo alelo é o valor 12.

Algumas vezes é interessante preservar os cromossomos de melhor desempenho da população, de forma que eles não sofram mutação, assim evita-se a possibilidade desses cromossomos piorarem seu desempenho e atrapalhar o processo evolutivo.

5 PROCEDIMENTOS E MÉTODOS

5.1 Procedimentos para Cultura de Linfócitos de Sangue Periférico Humano para Determinação do Índice Mitótico

Para este trabalho as células foram cultivadas em meio completo contendo 80% de meio de cultura HAM-F10 (Sigma), suplementado com estreptomicina (100 mg/ml), penicilina (100 UI/ml), 20% de soro bovino fetal (Cultilab) e 0,2 ml de fitohemaglutinina (Gibco). As preparações citológicas para a análise do sangue periférico humano em metáfase foram obtidas pela técnica de MOORHEAD et al. (1960) apud KHAYAT (2001), com modificações utilizadas no Laboratório de Citogenética Humana e Genética Toxicológica do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Pará, conforme descrito a seguir:

1. Colheu-se 5 ml de sangue periférico humano por punção venosa utilizando agulhas e seringas descartáveis, previamente heparinizadas com Lique mine (Lab. Roche 5.000 UI/MI). Após a coleta, o sangue foi transferido para tubos de ensaio estéreis, que foram mantidos em repouso por algumas horas à temperatura ambiente, para a sedimentação das hemácias e leucócitos e separação do plasma.
2. Adicionou-se 1 ml de plasma com linfócitos ressuspensos, em frascos de cultura contendo um volume de 5 ml de meio de cultura completo. Mantiveram-se os frascos na estufa à 37°C por 72 horas.
3. A cada frasco de cultura foi adicionado 0,2 µl de colchicina¹ (0,0016% Sigma) 120 minutos antes da fixação.
4. Após o tempo de cultivo, procedeu-se a colheita agitando-se os frascos para a homogeneização. Então, o material foi transferido para tubos de centrífuga e centrifugado por oito minutos a 1000 rotações por minuto (RPM).

¹ A Colchicina é um alcalóide que desempenha o papel de *droga antimitótica*, e tem por finalidade interromper a divisão celular, pois causa o rápido desaparecimento do fuso mitótico. (ALBERTS et al., 1997).



Figura 5.1: Processo de centrifugação do material para preparação da lâmina.

5. Desprezou-se o sobrenadante e 5 ml de fixador Carnoy recém preparado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1) foram adicionados. Trocou-se o fixador mais duas vezes, centrifugando-se, como descrito no passo 4, e deixando-se apenas o material suficiente para a confecção das lâminas. Neste trabalho, em torno de 1 ml, de forma que se obtenha uma baixa concentração de células por lâmina.



Figura 5.2: Remoção do sobrenadante, após a centrifugação.

6. Usando-se lâminas bem limpas e mantidas em etanol gelado 50%, gotejou-se o material fixado, inclinando-se para espalhar melhor o material, passando em seguida na chama, com o cuidado para não aquecer demais.

7. A coloração foi processada com o corante Giemsa, diluído em uma solução tampão (Na_2HPO_4 0,06 M e KH_2PO_4 0,06 M – pH 6.8), na proporção de 1 ml do corante para 30 ml do tampão, por um período de 8 minutos.



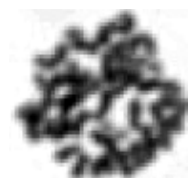
Figura 5.3: Coração das lâminas com corante Giemsa

É importante notar que os procedimentos descritos aqui foram modificados de forma que melhor se adaptassem aos objetivos deste trabalho. Assim, foi removida uma etapa dos procedimentos normalmente utilizada no Lab. de Citogenética Humana da Universidade Federal do Pará para cultura de linfócitos.

Esta etapa ficaria entre as etapas 4 e 5, e consiste na adição de uma solução hipotônica (KCl 0,075 M) ao material. Tendo em vista que tem por finalidade aumentar a distâncias entre os cromossomos da célula em metáfase, foi removida, pois esta não é uma situação desejada neste trabalho. Cromossomos distantes entre si podem levar a segmentação errônea ou eliminação da metáfase da contagem, pois, por serem muito pequenos, podem ser confundidos com sujeira ou núcleo de células mortas sendo, assim, eliminados da contagem.



(a)



(b)

Figura 5.4: Dois exemplos de metafases. Em (a) verifica-se uma situação indesejada. Percebe-se que durante a segmentação serão identificados vários objetos, quando, na verdade, é a mesma metáfase, por

outro lado, em (b) todos os cromossomos serão identificados como uma única imagem, o que permitirá sua correta classificação.

5.2 Processo de Segmentação da Imagem por Limiar

O processo de segmentação da imagem neste trabalho foi desenvolvido com a técnica de segmentação por limiar. Esta é uma das técnicas mais fáceis e eficazes, como visto no capítulo 3, para segmentar imagens cujo fundo é muito contrastante com os elementos. Utilizou-se o programa Matlab para desenvolver o método de segmentação.

As imagens utilizadas foram obtidas através de câmeras fotográficas acopladas a microscópios óticos em laboratório. A objetiva utilizada foi de 40X, que é a objetiva padrão utilizada na aferição do índice mitótico. Para fotografar, foram usados filmes fotográficos convencionais (ASA-100). Após a revelação, as imagens foram digitalizadas em scanner de mesa com resolução de 300 dpi. Essas imagens eram redimensionadas antes do processo de segmentação. O tamanho estipulado para a imagem foi de 350 x 500 pixels.

Foram utilizados dois tipos de segmentação por limiar: global e adaptativa. Na segmentação por limiar global, analisa-se toda a imagem, escolhe-se, no seu histograma, um ponto de corte, e segmenta-se a imagem, de forma que, valores acima deste ponto façam parte do objeto e valores abaixo dele façam parte do fundo.

Nota-se que, por convenção, tomamos o valor 0 (zero) para o nível mais escuro de cinza e o valor 255 para o nível mais claro, tendo em vista que esta convenção é a utilizada pelo Matlab, assim tivemos que adotar o negativo das imagens, de modo que o fundo ficasse mais escuro e os objetos mais claros.

A determinação do limiar global foi feita da seguinte forma:

- Verificou-se o histograma da imagem;
- Identificou-se qual o ponto mais alto do histograma, pois este pico representa o fundo da imagem, e foram eliminados níveis de cinza mais escuros que este;
- Varreu-se o gráfico do ponto mais alto até o final a procura de um novo pico;

- Ao encontrar um novo pico, foi verificado se ele possuía uma quantidade x de tons de cinza anteriores a ele, em quantidades menores que a dele. Neste trabalho o valor de x foi estipulado em 12;
- O maior desses novos picos foi selecionado, ele representa os objetos que se deseja separar do fundo. Todos os tons de cinza mais claros que ele foram descartados;
- O menor valor no vale formado entre esses dois picos foi selecionado como limiar global da imagem;

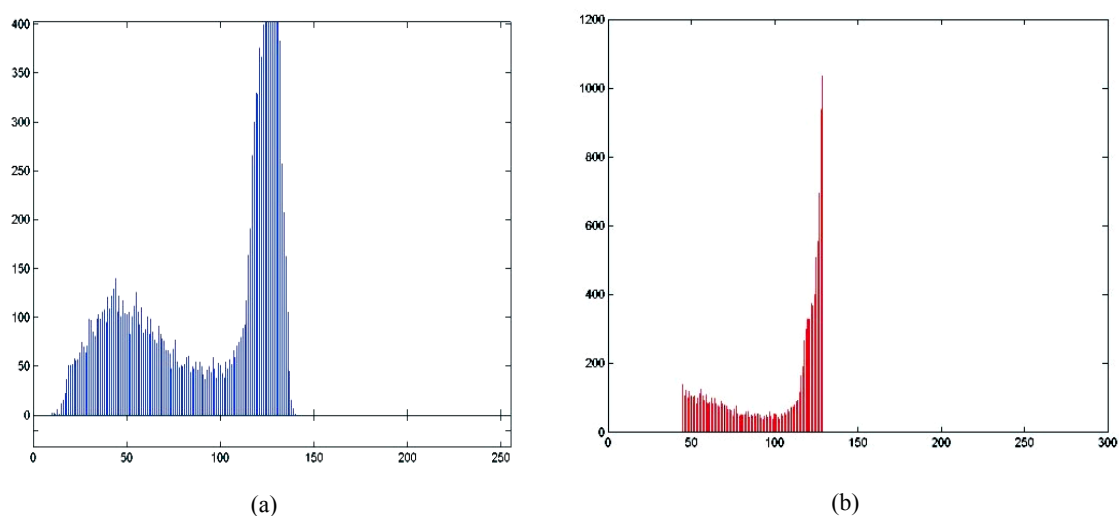


Figura 5.5: Em (a), o histograma de uma imagem e em (b) seu respectivo vale, o menor valor deste vale será adotado com limiar. Nota-se que esta imagem não teve seus tons de cinza invertidos, por isso o fundo (maior pico) possui tons de cinza maiores que a imagem (menor pico).

Quando o limiar global de uma imagem é determinado, parte-se do princípio que todos os objetos que fazem parte desta imagem, assim como o fundo, possuem níveis de cinza semelhantes, de modo que formam-se dois picos, um representando o fundo da imagem, com níveis de cinza escuros, e outros representando os elementos da imagem, de níveis de cinza claros. Porém, observou-se que, em análises microscópicas esses níveis de cinza podem variar, principalmente por causa do corante utilizado na lâmina, que não atua de forma uniforme. Assim, alguns elementos que, eventualmente, possuam níveis de cinza mais escuros, podem ser eliminados da seleção.

Para resolver este problema pode-se utilizar um limiar adaptativo, isto é, adquire-se um limiar diferente para cada parte da imagem. O limiar adaptativo foi implementado da seguinte forma:

- O limiar global da imagem foi determinado, conforme descrito anteriormente;
- A imagem foi dividida em $n \times n$ partes;
- Obteve-se o histograma de cada uma das partes divididas;
- Para partes que possuíssem dois picos em seu histograma, isto é, uma diferença clara entre elemento e fundo, obteve-se seu limiar conforme descrito na segmentação por limiar global, porém de acordo com o histograma desta parte, que foi determinado no passo anterior.
- Partes que possuíam apenas um pico em seu histograma, isto é, que eram totalmente compostas de pixels de níveis de cinza semelhantes, admitia-se o limiar global da imagem.

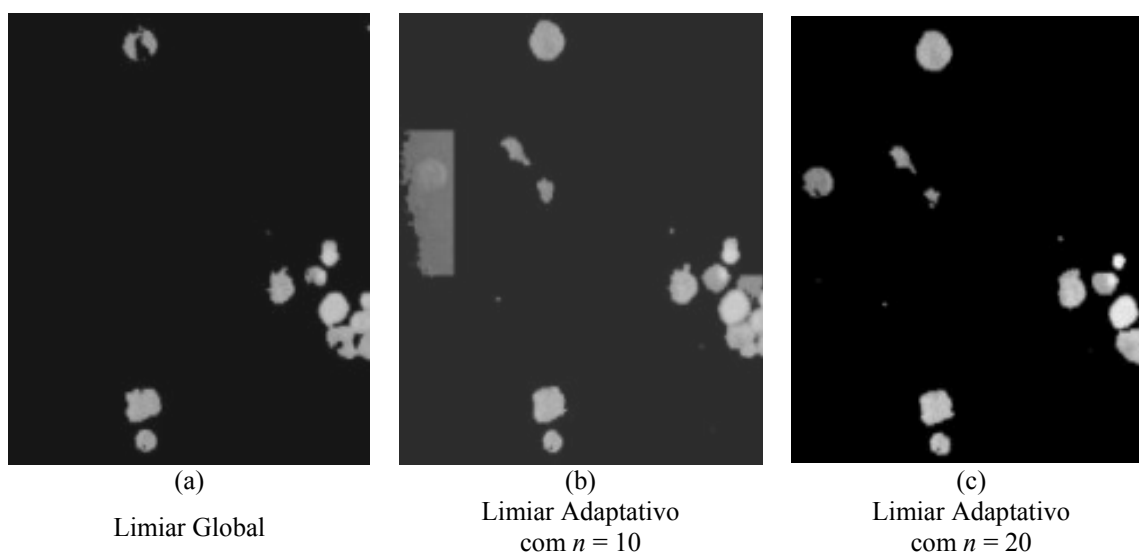


Figura 5.6: Imagem de linfócitos do sangue periférico humano, segmentada por limiar adaptativo. Os pixels do fundo receberam valor zero. Verificam-se novos elementos em (c) que em (a), com o limiar global, não podiam ser vistos, além da melhoria da qualidade da imagem dos elementos, aumentando-se o valor de n .

Após a determinação do limiar, todos os pixels de valor inferior ao limiar recebem o valor 0 (zero) e os elementos restantes são contados. Elementos muito pequenos

podem ser ruídos da imagem, sujeira da lâmina, ou até mesmo, no caso deste trabalho, células que morreram durante o processo de cultura, esses elementos não são interessantes e por isso são descartados. Os elementos significativos são discriminados em uma matriz que possui as coordenadas de cada elemento na matriz da imagem.

	1	2	3	4
1	360	369	27	36
2	60	79	109	129
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
15	194	259	366	435
16	1	20	373	398
17	1	19	399	443
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
29	356	365	580	592
30	180	192	607	620




Figura 5.7: Matriz de posições formada após a segmentação da imagem. As colunas representam as linhas e colunas inicial e final do elemento na matriz da imagem, de forma que o elemento de índice 16 tem sua altura da linha 1 à linha 20, e largura da coluna 373 à 398 da matriz da imagem, ou ainda do pixel (1,373) até o (20, 398).

5.3 Extração de Características Relevantes da Imagem

No capítulo 3 pode-se verificar que antes da classificação dos padrões de imagens são necessárias duas etapas: a segmentação e a extração de características relevantes das imagens, para formar o vetor de atributos. Foi visto, anteriormente, como a segmentação da imagem foi desenvolvida neste trabalho. Nesta seção serão mostradas quais características foram utilizadas para a formação do vetor de atributos utilizados para a classificação da imagem.

A princípio, tentou-se utilizar somente a forma da imagem como parâmetro, isto é, converteu-se a figura para um padrão preto e branco, descartando-se, assim, toda a informação a respeito de cores existente na imagem. Todos os valores acima de 0 (zero) foram transformados em 1 (um).

O tamanho dos núcleos de linfócitos foi redimensionado e fixado em um valor constante de 15 x 15 pixels. Apesar da rede ter convergido, o desempenho não foi

satisfatório, portanto, viu-se a necessidade de acrescentar mais padrões de entrada da rede.

O primeiro padrão escolhido foi o histograma da imagem, apesar de não ter sido notado nenhum padrão claro com relação a influência das cores, ou do formato do histograma, sobre a classificação do padrão, tendo em vista que existem tanto metáfases escuras como claras, assim como interfases.

De qualquer forma, os valores do histograma acima do nível de cinza 100 de cada imagem foram adicionados no conjunto de exemplos da rede, de modo que cada exemplo tivesse a forma e os níveis de cinza como padrões de entrada. O valor 100 foi escolhido tendo em vista que o limiar para a segmentação da imagem mostrou-se sempre um valor acima de 100, de forma que se tornaria irrelevante a utilização de valores do histograma abaixo desse nível, pois todos teriam o mesmo valor igual a zero.

A *complexidade da forma* é um terceiro padrão de entrada que foi acrescentado, também na tentativa de melhorar o desempenho da rede. Este padrão é baseado na análise da forma de imagens denominada circularidade (*circularity*) que permite contabilizar o quanto determinada forma é circular (CASTLEMAN, 1996), de acordo com a equação 3.4:

$$C = \frac{P^2}{A}$$

Onde P é o perímetro da imagem e A é sua respectiva área. A complexidade se diferencia da circularidade, pois não leva em consideração somente o perímetro, como também qualquer borda que tenha contato com o fundo, acrescentando também os espaços vazios no interior da imagem (figura 5.8). Esta se mostrou a característica mais importante na diferenciação das fases da divisão celular.

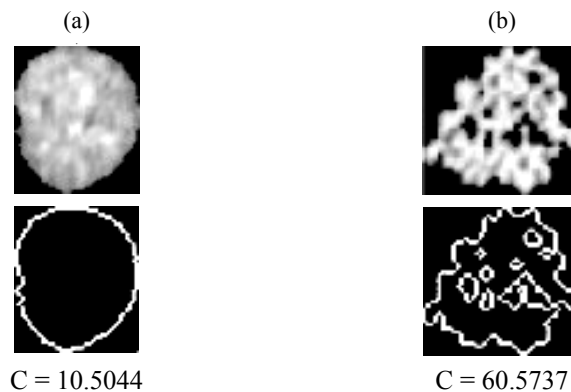


Figura 5.8: Núcleos de células em interfase (a) e metáfase (b) e seus respectivos contornos e valores de complexidade. Note que além do perímetro, contornos interiores também são identificados.

Por último foram adicionados mais dois campos no vetor de entrada referentes à largura e à altura do exemplo, pois foi verificada uma diferença de tamanho entre as células em metáfase e interfase. Esta diferença se dá devido às características da própria fase da divisão celular, como visto no capítulo 2. Quando a célula encontra-se em metáfase, a membrana do núcleo é rompida e os cromossomos espalham-se ao longo da placa equatorial da célula, diferente de quando estão em interfase, pois se mantêm contidas no envoltório nuclear, assim quando a divisão celular é interrompida, o tamanho das células em metáfase é, em geral, maior que o dos núcleos em interfase.

Assim, foram criados e simulados vetores de atributos baseados em diferentes características (vetor de atributos) das imagens de modo a determinar-se qual o melhor entre eles.

5.4 Arquitetura e Treinamento da Rede Neural

Para este trabalho foi escolhida uma arquitetura direta com múltiplas camadas, o algoritmo de aprendizado escolhido foi o de retropropagação. A rede foi treinada e simulada no programa Matlab.

Foram desenvolvidos quatro grupos de treinamentos diferentes, um para cada grupo de características extraídas da imagem e cujos desempenhos serão avaliados. Os grupos, de acordo com as características, são:

- Forma (15 x 15 pixels) + complexidade;
- Histograma + complexidade;
- Forma (15 x 15) + histograma + complexidade;
- Forma (15 x 15) + histograma + complexidade + tamanho.

Esses vetores de atributos terão influência sobre o número de neurônios da camada de entrada da rede neural, de forma que o primeiro terá 226 neurônios, o segundo 157, o terceiro 382 e o quarto 384.

A rede possui uma única camada intermediária que, por sua vez, possui cinco neurônios. A camada de saída possui apenas um neurônio. A função de ativação das

duas camadas é a tangente hiperbólica, assim, se a saída for maior que 0 (zero), a entrada é classificada como uma metáfase, caso seja menor que 0 (zero), a entrada é classificada como interfase.

Os parâmetros determinados para a rede neural foram os seguintes:

- Taxa de aprendizagem: 0,01;
- Erro médio quadrático mínimo: 0,001;
- Constante de momento: 0,5;
- Número máximo de épocas: 15.000.

5.5 Desenvolvimento do Algoritmo Genético

Nesta secção será visto como o algoritmo genético foi parametrizado, de forma que possa evoluir o grupo de treinamento e, indiretamente, os próprios pesos da rede neural, na tentativa de otimizar o desempenho desta. O objetivo é verificar se com a diminuição do grupo de exemplos, porém sendo estes selecionados de forma a melhor representar o conjunto, e com a evolução dos pesos da rede, seu desempenho possa ser melhorado.

A primeira tarefa é determinar o alfabeto. Neste ponto é importante notar que, neste trabalho, é levada em consideração a hipótese de que o alfabeto é diversificado o suficiente de modo que, se a rede consegue reconhecer todos os exemplos do alfabeto, ela irá reconhecer qualquer núcleo de linfócito do sangue periférico humano, com uma taxa de erro aceitável.

O alfabeto é composto pelos exemplos que queremos representar, cada exemplo representa um núcleo de linfócito e é uma coluna da tabela que forma o alfabeto. Será acrescentada, ainda, uma linha a mais em cada coluna do alfabeto, que representa a resposta desejada para cada exemplo, isto é, informam que fase da divisão celular este núcleo se encontra.

Para melhorar o entendimento do que está sendo proposto, basta visualizar da seguinte forma: todos os exemplos que seriam utilizados para treinar uma rede neural (grupo de treinamento X) farão parte do alfabeto, as respectivas respostas desejadas do grupo de treinamento da rede neural (vetor d') serão acrescentadas à última linha do referido alfabeto. O objetivo do Algoritmo Genético é selecionar quais elementos desse

grupo de exemplos (alfabeto) são mais relevantes, de modo a treinar uma rede neural utilizando *apenas* esses elementos e não todos os exemplos disponíveis para o treinamento, eliminando, assim, exemplos que não sejam bons representantes de suas classes, isto é, determinar a partir do grupo de treinamento X um grupo de treinamento X' menor que X , que represente de forma satisfatória este grupo.

Como visto anteriormente, uma população é formada de indivíduos ou cromossomos, onde cada indivíduo da população é formado por elementos ou alelos retirados do alfabeto. Assim, cada indivíduo, neste caso, será formado por um conjunto de exemplos, de modo que cada conjunto será utilizado para treinar uma rede neural, cujo desempenho será avaliado. Do mesmo modo, pode-se dizer que, cada cromossomo (indivíduo) representa um conjunto de treinamento para uma rede neural, logo, cada gene do cromossomo possui um alelo que representa um núcleo de linfócito (exemplo).

Porém, é bom notar que, na verdade, os alelos não são todas as linhas do vetor de atributos que representa a imagem do núcleo de linfócito, mas os índices do alfabeto que representam esses núcleos, eles só serão transformados em vetores na hora que a rede for treinada.

	1	2	3	4	...	19	20
1	23	7	56	132	...	87	5
2	45	62	7	123	...	78	99
3	105	109	32	65	...	3	12
.
.
.
15	77	56	36	146	...	67	18

Figura 5.9: População com 15 cromossomos, na qual cada cromossomo possui 20 alelos (exemplos).

Cada linha representa um conjunto de treinamento e cada campo um exemplo do alfabeto.

Na criação da população, os genes dos cromossomos são preenchidos por alelos escolhidos aleatoriamente do alfabeto, tomando-se o cuidado para não se colocar dois alelos iguais no mesmo cromossomo.

Após a criação da população, cada conjunto de treinamento será submetido a uma rede neural, cujos parâmetros foram determinados na secção anterior. Depois do treinamento, todos os elementos do alfabeto são simulados com a rede recém treinada, e a resposta obtida é comparada com a resposta desejada, que é a última linha do alfabeto. Conta-se, assim, o número de acertos e divide-se pela quantidade testada, que é o

número de elementos do alfabeto, essa razão é a taxa de acerto, e será utilizada como a função de avaliação do algoritmo genético.

$$fitness = \frac{\text{acerto da rede neural}}{\text{total de elementos do alfabeto}}$$

Após serem devidamente avaliados, os cromossomos são submetidos à roleta simples, na qual os melhores possuem maior probabilidade de se reproduzir. Os pais são selecionados e é feito o cruzamento, dando origem a descendentes, que substituirão os piores cromossomos, mantendo a população constante. A taxa de cruzamento foi estabelecida em dois por geração, logicamente a de corte foi estabelecida em quatro.

A mutação é efetuada logo em seguida. O melhor cromossomo da população é poupado, e não está sujeito a mutação, assim, não se corre o perigo de perder o cromossomo que possui a melhor chance de gerar os melhores filhos. A taxa de mutação foi estipulada em uma por geração, porém três genes do cromossomo selecionado são modificados. Esta escolha foi feita para melhorar o tempo de busca, tendo em vista que os cromossomos serão relativamente grandes e apenas um gene modificado altera bem pouco o fitness.

Algumas precauções foram tomadas, de forma que o algoritmo não fosse elitista demais e acabasse criando uma população de cromossomos iguais, pois assim dependeria somente da mutação, tornando-se uma busca aleatória. Tais precauções foram: a proibição de pais idênticos serem selecionados para o cruzamento e de filhos serem idênticos aos pais (MOREIRA, F. et al.).²

Outro cuidado foi não permitir, em nenhum momento, genes iguais em um mesmo cromossomo, isto pode ser notado durante a formação da população, na mutação e no cruzamento, esta atitude foi tomada para diminuir o tempo de processamento, tendo em vista que um conjunto de treinamento com genes com valores repetidos, provavelmente, não teria a mesma eficiência que um com todos os genes com valores diferentes.

Observou-se que, neste trabalho, duas redes com o mesmo grupo de treinamento e com o mesmo erro mínimo quadrático, podem generalizar de formas diferentes quando

² MOREIRA, Fabiano; SIMÕES, Aruanda; BAPTISTA, João; BORJES, Paulo. *Geogene – Desenvolvimento de Layouts para Observações Geofísicas*. (Artigo não-publicado).

possuem pesos diferentes. Assim, os pesos de cada rede treinada foram armazenados, juntamente com o cromossomo (grupo de treinamento).

Com esta atitude obteve-se não só uma melhora na resposta do algoritmo, tendo em vista que pesos que gerassem resultados insatisfatórios seriam cortados, como também um aumento no desempenho, haja vista que redes anteriormente treinadas, e cujos grupos de treinamento não sofreram corte ou mutação, não precisaram ser treinadas novamente na próxima geração.

Pode-se dizer, portanto, que o algoritmo genético, não só evolui o grupo de treinamento, como também evolui indiretamente os respectivos pesos da rede treinada por este grupo.

5.6 Erros de Segmentação e Classificação

O processo de segmentação da imagem é, como visto, de extrema importância para a classificação correta do padrão, tendo em vista que erros cometidos nesta etapa podem se propagar durante todo o processo de classificação, ocasionando uma interpretação errada do padrão.

Além da classificação, erros nesta etapa podem prejudicar também o processo de treinamento da rede neural, o que torna o erro ainda mais grave, pois poderá atrapalhar toda a aprendizagem da rede, levando esta a classificar erroneamente mesmo aqueles elementos que foram segmentados corretamente.

Pode-se citar duas situações em que a segmentação incorreta ocorre com maior frequência: núcleos sobrepostos e núcleos de tonalidades próximas ao fundo da imagem.

Os elementos sobrepostos são indesejáveis e devem ser evitados na determinação do índice mitótico. Geralmente, estes elementos possuem níveis de cinza muito próximos, e, algumas vezes, segmentá-los torna-se uma tarefa árdua mesmo utilizando-se de outras técnicas de segmentação, sendo possível somente com o conhecimento da forma, como o ser humano faz, porém isto é bastante difícil de ser implementado.



Figura 5.10: Imagens de células sobrepostas. Em (a) verifica-se um grupo de quatro células em interfase e em (b) um grupo de cinco células, estando quatro em interfase e uma em metáfase

Geralmente os elementos sobrepostos são elementos maiores que o normal, assim, será imposto um limite de tamanho, de modo que elementos muito grandes sejam descartados. Na maioria dos casos, um aglomerado de núcleos em interfase que não foi descartado é contabilizado como uma única interfase, devido, principalmente, ao seu baixo valor de complexidade em comparação a uma metáfase.

O volume da amostra durante o processo de preparação da lâmina, como visto na seção 5.1, também será aumentado, de modo que os núcleos fiquem mais espaçados, diminuindo, assim, a probabilidade de sobreposição.

Outro tipo de erro de segmentação é causado por núcleos de linfócitos que possuem um tom de cinza muito próximo ao tom de cinza do fundo da imagem, apesar da opção de implementar o limiar adaptativo, alguns núcleos ainda apresentam erros de segmentação.



Figura 5.11: O mesmo núcleo em interfase, antes da segmentação (a) e com falhas (b) devido a erros durante a segmentação.

Acredita-se que uma solução interessante seja a adoção de uma técnica híbrida, de forma que seja feita uma primeira segmentação por limiar global e uma segunda

segmentação dos elementos selecionados da primeira, adotando-se um novo valor de limiar, eliminando-se, assim, as falhas no interior da imagem (figura 5.10). No entanto, todas as tentativas desenvolvidas no decorrer deste trabalho não obtiveram resultados satisfatórios. Isso se deve a quantidade resumida de pixels que possui uma imagem segmentada, o que dificulta a escolha automática do novo limiar.

Além das dificuldades citadas acima, outra fonte de erro na classificação de células em divisão celular é ocasionada por metáfases cujos cromossomos estão muito próximos.

Como foi visto na seção 5.1, o método de cultura de linfócitos foi modificado de forma que os cromossomos fiquem próximos entre si, porém, a proximidade em excesso também não é desejada. Geralmente esse problema ocorre com células na pró-metáfase, haja vista que quando estão nesta fase da divisão celular já perderam o envoltório nuclear, porém seus cromossomos ainda não migraram para a placa equatorial, permanecendo ainda muito próximos.



Figura 5.12: Célula em metáfase. A situação desta metáfase não é desejada devido à proximidade dos cromossomos, assemelhando-se ao padrão de uma célula em interfase.

Assim, metáfases como a da figura 5.12 podem atrapalhar a segmentação da imagem, por serem muito semelhantes a um núcleo em interfase. Por outro lado, pode-se minimizar bastante este erro, treinando-se a rede de forma adequada.

6 RESULTADOS

Para a análise dos resultados foram utilizados três grupos de células. Cada um deles retirados de lâminas diferentes, confeccionadas a partir de diferentes culturas, porém utilizando sempre o mesmo método de cultura descrito no capítulo anterior.

O primeiro grupo, que será chamado de “Ex1”, foi usado como grupo de treinamento da rede e é composto de 246 núcleos de linfócitos, sendo 218 interfases e 28 metáfases. O segundo e o terceiro grupo são grupos teste. O grupo “T1” possui 253 núcleos, dos quais 188 estão em interfase e 65 estão em metáfase, e o grupo “T2” possui 261 núcleos, dentre estes, 198 em interfase e 63 em metáfase. Observe que o índice mitótico destas amostras, comparado com o índice normal encontrado no sangue periférico humano, está bastante elevado, tendo em vista que se tentou selecionar o maior número de metáfases possíveis de modo a melhor avaliar a rede.

Grupo	Ex1	T1	T2
Interfases	218	188	198
Metáfases	28	65	63
Total	246	253	261

Figura 6.1: Tabela com grupos de exemplo e treinamento.

A seguir serão vistos os valores obtidos e o gráfico de treinamento de acordo com cada vetor de atributos determinados no capítulo anterior.

- FC (Forma + Complexidade): nº de épocas: 6331

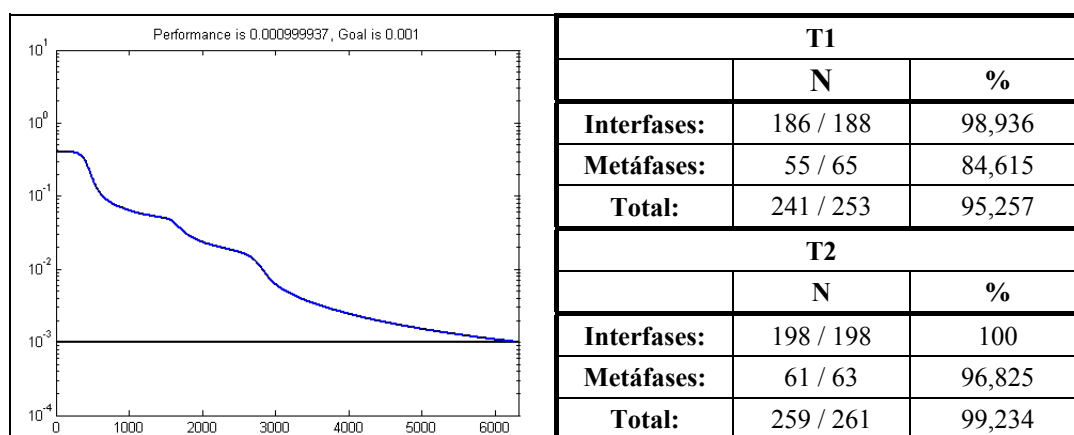


Figura 6.2: Resultados da simulação da rede treinada com o grupo de características FC.

- HC (histograma + complexidade): nº de épocas: 3472

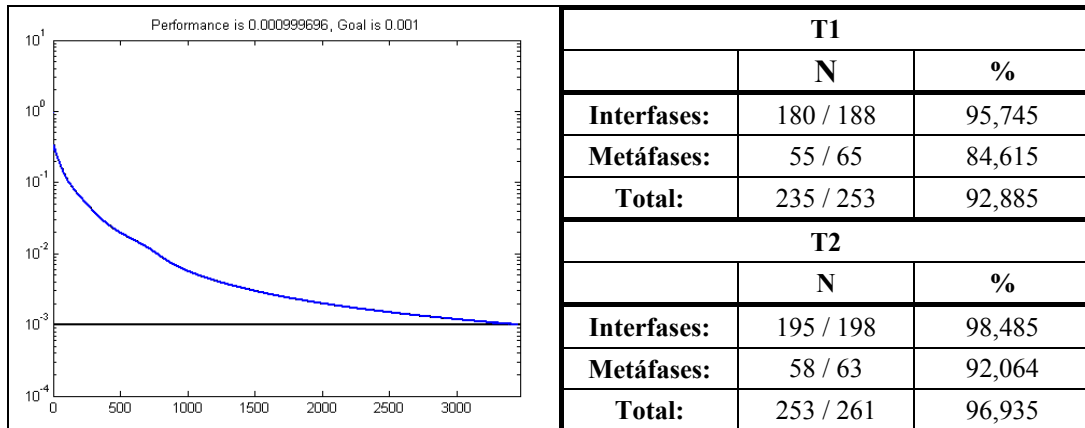


Figura 6.3: Resultados da simulação da rede treinada com o grupo de características HC.

- FHC (forma + histograma + complexidade): nº de épocas: 11861

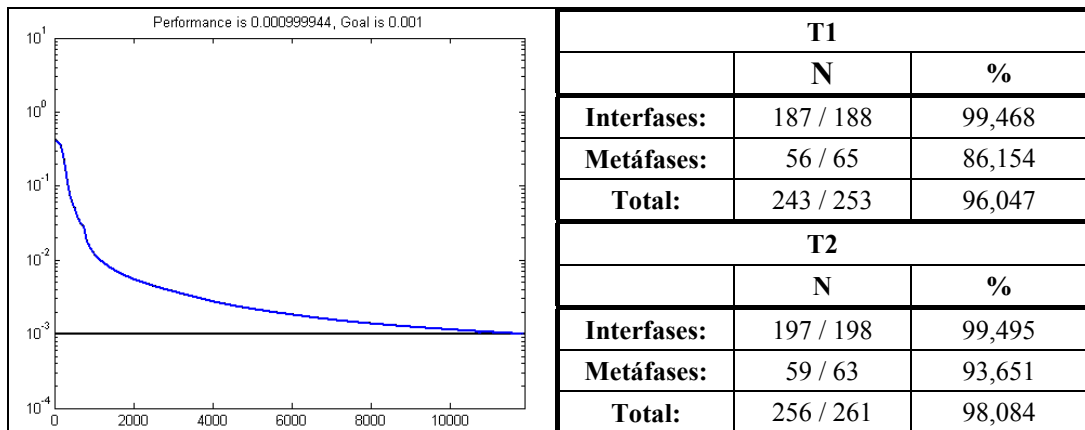


Figura 6.4: Resultados da simulação da rede treinada com o grupo de características FHC.

- FHCT (forma + histograma + complexidade + tamanho): nº de épocas: 7398

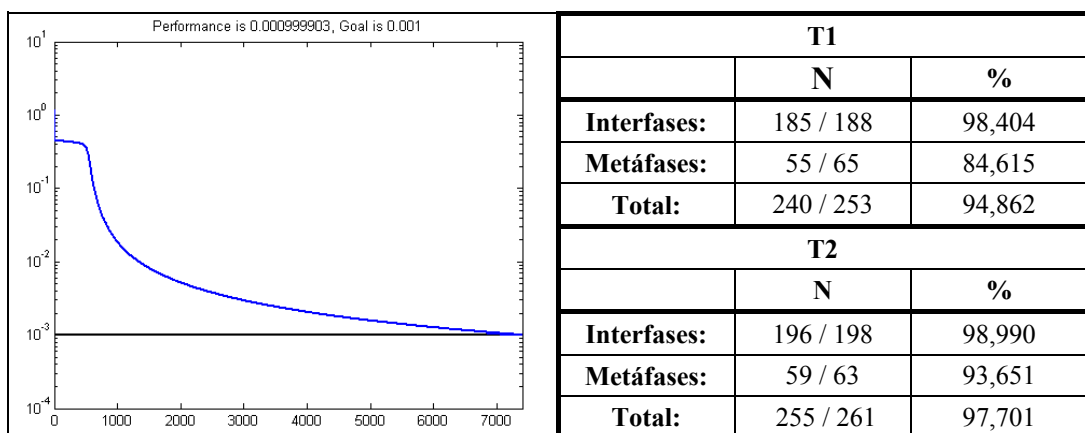


Figura 6.5: Resultados da simulação da rede treinada com o grupo de características FHCT.

Uma análise comparativa entre os resultados obtidos pode ser vista nas figuras 6.6 e 6.7.

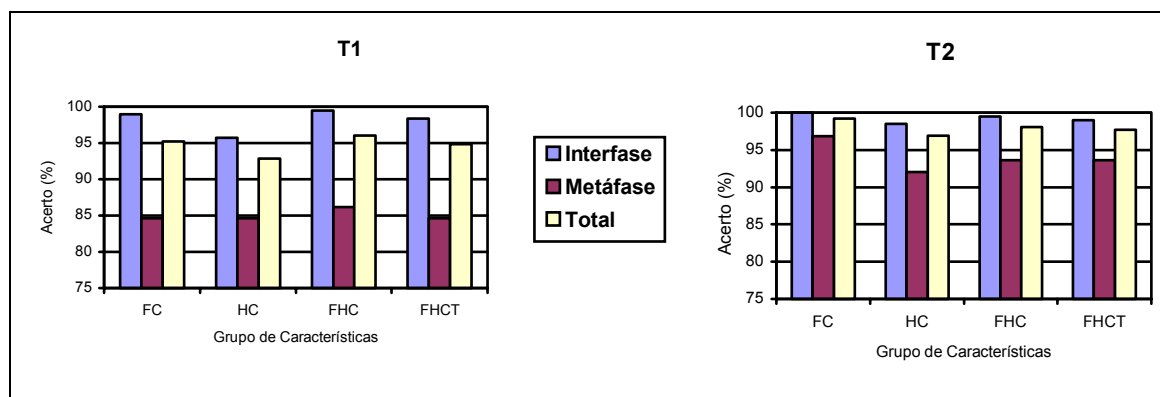


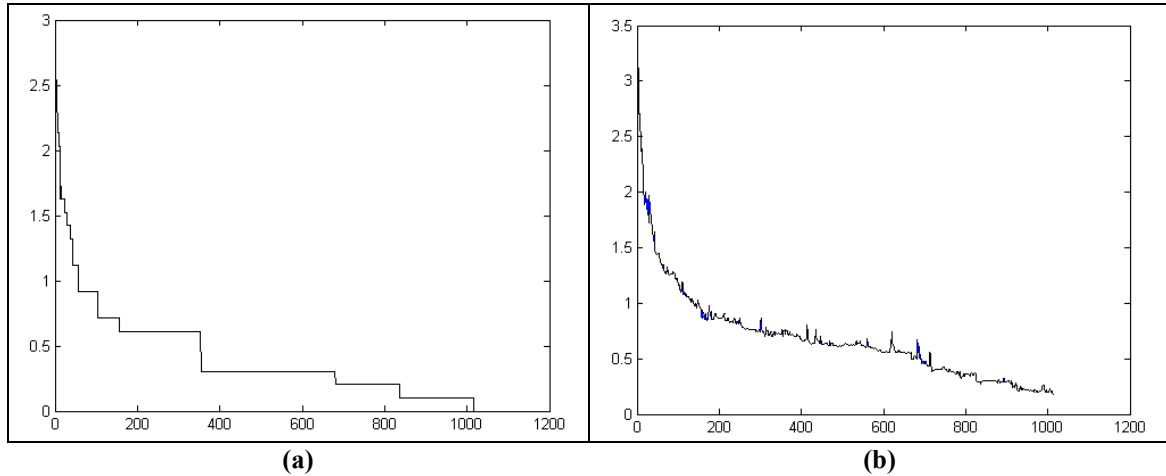
Figura 6.6: Gráfico comparativo com o desempenho das redes para cada grupo de exemplos.

T1	Vetor de Atributos	FC	HC	FHC	FHCT
	Interfases (188)	186	180	187	185
	Metáfases (65)	55	55	56	55
	Total (253)	95,3 %	92,9%	96,0 %	94,9%

T2	Vetor de Atributos	FC	HC	FHC	FHCT
	Interfases (198)	198	195	197	196
	Metáfases (63)	61	58	59	59
	Total (261)	99,2%	96,9%	98,1%	97,7%

Figura 6.7: Tabela comparativa entre os resultados obtidos por vetor de atributos com os grupos de teste T1 e T2.

Para a implementação do AG, foi utilizado apenas o vetor de atributos FHC (forma + histograma + complexidade). O alfabeto do grupo será representado pelo grupo Ex1, o mesmo grupo de treinamento da rede neural. Os parâmetros determinados para as redes que estarão envolvidas no processo evolutivo, são os mesmos determinados para as redes treinadas anteriormente e estão descritos na secção 5.4. O número de cromossomos foi estipulado em 15, com 50 genes por cromossomo, e o erro 0 (zero) foi alcançado com 1017 gerações. Os resultados obtidos são descritos na figura 6.8.



T1			T2		
	Nº	%		Nº	%
Interfases:	180 / 188	95,745	Interfases:	196 / 198	98,990
Metáfases:	57 / 65	87,692	Metáfases:	59 / 63	93,651
Total:	237 / 253	93,675	Total:	255 / 261	97,701

Figura 6.8: Em (a) o gráfico da evolução do Algoritmo Genético e em (b), o gráfico da evolução da média da população. A tabela mostra os resultados da rede neural cujo conjunto de treinamento foi otimizado pelo Algoritmo Genético, obtidos com os grupos T1 e T2.

	T1		T2	
	AG	RN	AG	RN
Interfases:	180 / 188	187 / 188	196 / 198	197 / 198
Metáfases:	57 / 65	56 / 65	59 / 63	59 / 63
Total:	93,7%	96,0 %	97,7%	98,1%

Figura 6.9: Tabela comparativa entre redes neurais com conjunto de treinamento otimizado por algoritmo genético (AG), e sem otimização (RN), para os grupos T1 e T2, utilizando apenas o vetor de atributos FHC.

7 CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

7.1 Conclusões

O desenvolvimento da solução para a determinação do índice mitótico em linfócitos do sangue periférico humano deve ser dividida em várias fases, tendo em vista a complexidade e a amplitude do problema.

Neste trabalho foi desenvolvida uma parte desta solução, a qual trata do reconhecimento e classificação dos padrões de imagens adquiridas, porém para a solução ficar completa existe ainda muito a desenvolver.

Analisando os resultados obtidos no capítulo anterior, tiram-se algumas conclusões com relação aos grupos de características, tais como a pouca influência que o tamanho do núcleo exerce no desempenho da rede, podendo até influir negativamente no resultado. A provável explicação para este fato deve-se a células em pró-metáfase, tendo em vista que apesar destas serem consideradas metáfases para a determinação do índice mitótico, ainda permanecem com o tamanho de interfases, como pode ser visto na secção 5.6, tornando o atributo tamanho desvantajoso para o processo de classificação.

Outra observação que pode ser feita é a respeito do grupo HC. Verifica-se que, apesar de não ter sido notado nenhum padrão claro com relação a influência das cores (níveis de cinza), ou forma do histograma, sobre a classificação do padrão de imagem aqui descrito, esta relação existe, tendo em vista que a rede convergiu e, além de seu desempenho ser aceitável para os padrões deste trabalho, ao tentar-se treinar a rede somente com a complexidade, esta não convergiu.

Também é interessante observar no grupo de características HC que, diferentemente dos outros grupos que tem como uma de suas características a forma, este grupo não depende de rotação, já que os valores da complexidade e do histograma serão os mesmos, independente do ângulo que a imagem for capturada.

A respeito dos resultados obtidos, é importante frisar que é mais interessante que a rede obtenha um erro percentual mais significativo na classificação de metáfases do que de interfases, tendo em vista que as últimas aparecem numa frequência bem maior no sangue periférico humano, diminuindo, assim, o erro na determinação do índice

mitótico, isto é, a diferença no erro percentual entre interfases e metáfases torna-se interessante de modo tal que o erro numérico permaneça equivalente.

Verificou-se, também, que o algoritmo genético, para este trabalho, não se caracteriza como uma solução satisfatória, tendo em vista que alcançou sempre resultados próximos, porém inferiores aos obtidos pelo treinamento convencional das redes neurais. Acredita-se, porém, que para um treinamento mais complexo, no qual a rede não convirja para um erro médio quadrático mínimo satisfatório, talvez seja uma solução interessante. Outro ponto a ser estudado é a evolução da matriz de pesos, tendo em vista que, redes iguais com grupos de treinamento iguais, podem possuir resultados diferentes, a evolução somente da matriz de pesos, de forma que a rede consiga um resultado otimizado, pode ser interessante.

Em se tratando da solução apresentada neste trabalho, apesar das respostas obtidas terem alcançado níveis satisfatórios, nota-se a necessidade de melhorias em algumas técnicas utilizadas, de forma a melhorar o desempenho da solução. Entre elas podemos citar a técnica de segmentação da imagem, de forma a diminuir os erros no processo de segmentação, como visto na seção 5.6, e a técnica utilizada na cultura de linfócitos do sangue periférico humano, pois esta foi desenvolvida a partir de uma solução já existente, podendo ainda ser aperfeiçoada.

Por outro lado, verifica-se que a tecnologia das redes neurais artificiais aplica-se com grande mérito nesta pesquisa e mostra-se extremamente promissora na área de classificação de padrões de imagens digitais. Também fica clara a importância do trabalho aqui desenvolvido, sendo o primeiro passo para uma solução completa no auxílio ao estudo e diagnose de problemas relacionados a Citogenética em geral.

7.2 Trabalhos Futuros

A pesquisa desenvolvida neste trabalho é o primeiro passo para o desenvolvimento de uma importante ferramenta de auxílio em análises citogenéticas em geral. Pode-se citar como possíveis passos futuros os seguintes trabalhos:

- Projetar e implementar soluções utilizando outros modelos de redes neurais, tais como *RBF*, *Kohonen* e *Counterpropagation*, de forma a obter uma melhor generalização e minimizar o valor do erro obtido.
- Melhoramento da técnica de cultivo de linfócitos do sangue periférico humano, direcionada a este trabalho, melhorando, assim, o reconhecimento e a classificação automática destes.
- Desenvolvimento de interface para acoplamento de câmera digital ao microscópio ótico, para digitalização automática da imagem.
- Automação do rastreamento da lâmina do microscópio ótico, de modo a excluir a interação humana no manuseio deste, e ainda estipular a exata localização das metáfases na lâmina para estudos futuros.
- Implementação de solução para reconhecer, contar e classificar cromossomos humanos, além da diagnose de anomalias e aberrações cromossômicas.

BIBLIOGRAFIA

ALBERTS, Bruce et al. **Biologia Molecular da Célula**. 3ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas. 1997.

AMORIM, Marúcia; MERGLER Donna; BAHIA, Marcelo et al. Cytogenetic Damage Related to Low Levels of Methyl Mercury Contamination in the Brazilian Amazon. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Dezembro, 2000. 72(4): 497-507. Disponível em: <http://www.facom.uqam.ca/facom/home/info/listamembros/amsul/brasil/marucia_amorim.html>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2002.

BARRETO, Jorge Muniz. **Inteligência Artificial no Limiar do Século XXI – Abordagem Híbrida**: Simbólica, Conexionista e Evolucionária. 2ª Edição. Florianópolis: pp3 edições. 1999.

BISHOP, Christopher. **Neural Networks for Pattern Recognition**. Birmingham: Oxford University Press. 1995.

BISHOP, Christopher. **Neural Networks: A Pattern Recognition Perspective**. Neural Computing Research Group: Aston University. 1996. Disponível em: <<http://www.ncrg.aston.uk>>. Acesso: 10 de fevereiro de 2002.

BRAGA, A. de P.; LUDERMIR, T. B.; CARVALHO, A. C. P. de L. F. **Redes Neurais Artificiais**: Teoria e Aplicações. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A.. 2000.

CASTLEMAN, Kenneth R. **Digital Image Processing**. Upper Saddle River: Prentice Hall, Inc. 1996.

COOPER, Geoffrey. **A Célula**: Uma Abordagem Molecular. 2ª Edição. São Paulo: ArtMed Editora. 2001.

EBERHART, R.; SIMPSON, P.; DOBBINS, R. **Computational Intelligence PC Tools**. London: Academic Press. 1996.

FOGEL, David. **Evolutionary Computation**: Toward a New Philosophy of Machine Intelligence. 2ª Edição. New York: IEEE Press. 2000.

HAYKIN, Simon. **Redes Neurais – Princípios e Práticas**. 2ª Edição. Tradução: Paulo Martins Engel. Porto Alegre: Bookman. 2001.

JUNQUEIRA, L.; C. CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 6ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 1997.

KASABOV, Nikola K. **Foundation of Neural Networks, Fuzzy Systems, and Knowledge Engineering**. Massachusetts: The MIT Press. 1996.

KHAYAT, André S. **Avaliação da Ação Mutagênica e Monitoramento Genotóxico em Pacientes Portadores de Anemia Falciforme Tratados com Hidroxiuréia**. 2001. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Curso de Pós-Graduação em Biologia, Universidade Federal do Pará, Belém.

KOVÁCS, Zsolt L. **Redes Neurais Artificiais: Fundamentos e Aplicações**. 2ª Edição. São Paulo: Collegium Cognitio. 1996.

LEVINE & SHENER. **Fundamentals of Sensation & Perception**. 2ª edição. Books/Cole Publishing. 1991. Disponível em: <<http://www.femanet.com.br/~andres/visao/monografia/visao.htm>>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2002.

MOTA, Guilherme. **Análise da Mesoestrutura de Bambu Utilizando Medidas de Saliência de Textura**. Disponível em: <<http://www.visgraf.impa.br/Courses/ip00/proj/texta>>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2002.

ORR, Mark. **Introduction to Radial Basis Function Networks**. Edinburgh: Center for Cognitive Science, University of Edinburgh. 1996. Disponível em: <<http://anc.ed.ac.uk/~mjo/rbf.html>>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2002.

PACIORNIK, Sidnei. **Introdução ao Processamento Digital de Imagens**. Rio de Janeiro: PUC. Disponível em: <<http://www.dcm.puc-rio.br/Cursos/IPDI/index.htm>>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2002.

ROISENBERG, Mauro. **Redes Neurais**. Setembro, 1999. Notas de Aula. Mimeografado.

RUMELHART, D.; WIDROW, B.; LEHR, M. **The Basic Ideas in Neural Networks**. Communications of the ACM. v37 n3. Pags.: 86-92. Março, 1994.

TODESCO, José Leomar. **Reconhecimento de Padrões Usando Redes Neurais Artificiais com uma Função de Base Radial: Uma Aplicação na Classificação de Cromossomos Humanos**. 1995. Tese (Doutorado em Engenharia de Produção) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. Disponível em: <<http://www.eps.ufsc.br/teses/todesco>>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2002.