

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA COMPUTAÇÃO**

**ANÁLISE QUANTITATIVA DE CULTURAS DE  
NEURÔNIOS EM MATRIZES DE MICROELETRODOS  
POR MEIO DO PROCESSAMENTO DE IMAGENS DE  
MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA**

**JOÃO FERNANDO MARI**

**ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ HIROKI SAITO**

São Carlos - SP

Março/2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA COMPUTAÇÃO

**ANÁLISE QUANTITATIVA DE CULTURAS DE  
NEURÔNIOS EM MATRIZES DE MICROELETRODOS  
POR MEIO DO PROCESSAMENTO DE IMAGENS DE  
MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA**

**JOÃO FERNANDO MARI**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência da Computação da Universidade Federal de  
São Carlos, como parte dos requisitos para a  
obtenção do título de Doutor em Ciência da  
Computação, área de concentração: Arquitetura e  
Processamento de Imagens e Sinais.

Orientador: Prof. Dr. José Hiroki Saito

São Carlos – SP

**MARÇO/2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

M332aq Mari, João Fernando.  
Análise quantitativa de culturas de neurônios em matrizes de microeletrodos por meio do processamento de imagens de microscopia confocal de fluorescência / João Fernando Mari. -- São Carlos : UFSCar, 2015.  
260 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Processamento de imagens. 2. Microeletrodos. 3. Microscopia confocal. 4. Neurônios. 5. Segmentação de imagem. 6. Análise quantitativa. I. Título.

CDD: 006.42 (20<sup>a</sup>)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Ciência da Computação

---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato João Fernando Mari, realizada em 09/03/2015:

---

Prof. Dr. José Hiroki Saito  
UFSCar

---

Prof. Dr. Alexandre Luis Magalhães Levada  
UFSCar

---

Prof. Dr. Emerson Carlos Pedrino  
UFSCar

---

Prof. Dr. Roberto Alencar Lotufo  
UNICAMP

---

Prof. Dr. João Batista Destro Filho  
UFU



*Aos meus pais,  
João Mari e Maria de Fátima Geraldo Mari.*



# AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida.

Aos meus pais, *João Mari e Maria de Fátima Geraldo Mari*, que nunca pouparam esforços para que eu pudesse alcançar os meus sonhos.

Ao meu orientador, *Prof. Dr. José Hiroki Saito*, pela competência durante a orientação deste trabalho, por estar presente nos momentos mais difíceis, pelos conselhos sempre oportunos, pela paciência, por tudo que aprendi e pela enorme humildade.

Ao *Prof. Dr. João Batista Destro-Filho* pelas valiosas contribuições, pelo entusiasmo contagiante e pela forma que consegue cativar e envolver as pessoas.

À *Profa. Dra. Celina Monteiro da Cruz Lotufo e Amanda Ferreira Neves e a Profa. Dra. Maria do Carmo Nicolleti* pelas contribuições para a realização deste trabalho.

À *Roberta Gomes Prado* pelo amor, pelo carinho e por todo o apoio durante a realização deste trabalho.

Aos membros da banca avaliadora pelas correções e importantes contribuições para este trabalho: *Prof. Dr. Roberto A. Lotufo, Prof. Dr. João Batista Destro-Filho, Prof. Dr. Emerson Carlos Pedrino, Prof. Dr. Alexandre Levada e ao Prof. Dr. Nelson Delfino d'Ávila Mascarenhas*.

Aos muitos amigos que convivi durante essa jornada: *Elaine Ribeiro de Faria e o José Gustavo, Marcelo Zorzan, Moacir Ponti Junior e a Paula Castro, Denis Salvadeo, 'Super' Rachel e o Clausius, Murilo e a Kemilly, Tácito Tiburtino, Maycon Leone, Flávia Grupioni, Érica Fidelis, Éder Teixeira Marques, Liziane e o Marcos Paulo, Adriana Martinhago e o Douglas, Íris Fabiana e Rodrigo Smarzaro*.

A todos os professores do curso de Sistema de Informação e do Instituto de Ciências Exatas e Tecnológicas da UFV Campus de Rio Paranaíba pelo apoio.

Ao amigo *Gustavo Poli* pela agradável companhia no DC-UFSCar. Aos colegas de doutorado *Eduardo Llapa Rodriguez e Francisco Fambrini*.

Aos amigos da república em São Carlos, *Cleocir Dalmaschio e Evandro César*.

Aos amigos de longa data que compartilhei momentos agradáveis: *Fernando Sampaio, Oscar Rosse, Thiago Barros, Karina Dáctilo, Wilian Lima, Alexandre Chiaramonte*, entre muitos outros.

A todos os meus familiares, em especial aos meus tios *Rubens Andrade* e *Odila Mari de Andrade*, a *Sonia Desiderato* e *Madalena Desiderato (in memoriam)* e ao *Luiz Carlos Fredi*.

À *Maria Aparecida F. Gomes* e o *Celso*, *Amanda G. Leal* e o *Carlinhos*, *Gabriela Gomes Prado*, e as pequenas *Maria Clara* e *Isabela* pelo carinho durante este período.

À *Elaine Bertinotti Gomes* e *Eliana Roseli Ferreira* por terem me ajudado a chegar até aqui.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência da Computação – PPG-CC – da UFSCar e a todos os professores do DC-UFSCar.

Ao *Prof. Sergio Martinoia*, da Universidade de Genova – Itália e a *Multichannel Systems Inc.* – Alemanha por gentilmente fornecer as Matrizes de Microeletrodos.

Ao Departamento de Histologia da UFU pela aquisição das imagens por microscopia confocal de fluorescência.

À UFV pela possibilidade de realização deste trabalho e pelo apoio financeiro.

À secretária da PPG da UFV, *Maria Suely Ricardo*, pela disponibilidade e presteza com que me ajudou nas questões burocráticas relacionadas à realização deste doutorado na condição de docente da UFV.

A todos que colaboraram de alguma forma, direta ou indiretamente, com o desenvolvimento deste trabalho.

O meu muito obrigado!

*“The human brain, then, is the most complicated organization of matter that we know.”*

*Isaac Asimov*



# RESUMO

Matrizes de Microeletrodos (MEAs) são dispositivos que permitem estimular quimicamente ou eletricamente e registrar a atividade elétrica extracelular de culturas de neurônios durante um longo período de tempo, da ordem de várias semanas. Modelos de MEAs com o substrato transparente permitem imagear a cultura por meio de microscopia óptica. As imagens são obtidas em dois canais: um de luz de fluorescência e outro de luz de transmissão. O primeiro permite visualizar os neurônios, enquanto o segundo os microeletrodos. O objetivo deste trabalho é desenvolver métodos que permitam realizar análises quantitativas de culturas dissociadas de neurônios de gânglio da raiz dorsal (*Dorsal Root Ganglion – DRG*) de ratos em MEAs por meio do processamento de imagens obtidas por microscopia confocal de fluorescência. Os seguintes métodos foram propostos e desenvolvidos para atingir este objetivo: (A) Identificação automática dos microeletrodos nas imagens do canal de luz de transmissão utilizando a transformada de Hough circular e correção de erros baseado na triangulação de Delaunay; (B) Registro de várias imagens tomadas de diferentes regiões da MEA para gerar uma única imagem em alta resolução que contemple a cultura toda; (C) Segmentação dos neurônios em imagens 2D obtidas a partir do canal de fluorescência, composto por etapas de pré-processamento, segmentação, filtragem morfológica, correção da oclusão de neurônios, transformada watershed e classificação de objetos; (D) Análise quantitativa 2D baseada nos microeletrodos identificados e nos neurônios segmentados; (E) Método para geração de modelos poligonais 3D dos neurônios a partir de imagens volumétricas, modelos os quais são utilizados para visualização da cultura na MEA por diferentes pontos de vista e níveis de *zoom*; e (F) Análise quantitativa 3D realizada por meio do processamento das superfícies poligonais juntamente com as informações sobre a posição dos microeletrodos. Os resultados mostram que os métodos são capazes de identificar com eficiência os neurônios e microeletrodos presentes nas imagens 2D. Nas imagens 3D, a etapa de pré-processamento utilizando informações resultantes do método de segmentação 2D se mostrou eficiente na geração dos modelos poligonais corretos. Enquanto a maioria das análises de imagens de culturas de neurônios em MEA consideram apenas análises quantitativas simples, os métodos aqui propostos permitem obter importantes medidas quantitativas relacionadas às culturas, tais como: a densidade e morfologia dos neurônios, assim como a distribuição espacial e topológica dos neurônios em relação aos microeletrodos. As informações sobre a morfologia são importantes, pois estão relacionadas com o comportamento desse tipo de neurônio. A distribuição espacial e topológica dos neurônios e microeletrodos permitem modelar a interface entre neurônios e microeletrodos e auxiliar nos estudos dos sinais eletrofisiológicos capturados pelos microeletrodos, assim como em simulações computacionais do comportamento dessas culturas.

**Palavras-chave:** matrizes de microeletrodos, microscopia confocal de fluorescência, culturas de neurônios DRG, segmentação, visualização 3D, análise quantitativa.



# ABSTRACT

Microelectrode arrays (MEA) are devices that allow chemical and electrical stimulation and recording of the extracellular electrical activity from entire neuronal cultures over long periods of time, such as several weeks. Some MEA models have transparent substrate, which enables the imaging of culture using optical microscopy. The images are taken from two channels: fluorescence light and transmitted light channels. In the first one, it is possible to visualize the neurons, while in the other one, it is possible to observe the microelectrodes. The objective of this work is to develop methods that enable performing quantitative analysis of the dissociated culture of rat dorsal root ganglion (DRG) neurons plated on MEA by means of the processing of the images, obtained from confocal fluorescence microscopy. We proposed and developed the following methods in order to achieve this objective: (A) A method to automatically identify the microelectrodes in the transmitted light channel using circular Hough Transform and error correction based on the Delaunay triangulation; (B) the registration of a number of images taken at different parts of the MEA in order to generate a unique and high-resolution representation of the whole culture; (C) the segmentation of the neuron in 2D images taken from the fluorescence channel, composed by the steps: preprocessing, thresholding, morphological filtering, neurons occlusion correction, watershed transform and object classification; (D) 2D quantitative analysis based on the identified microelectrodes and on the segmented neurons; (E) a method for generating 3D polygonal models of the neurons from the volumetric images, to be used for visualizing the culture on the MEA by different points of view and zoom levels; and (F) 3D quantitative analysis performed by the processing of the polygonal surfaces in conjunction with the information about the microelectrodes positioning. The results show that the methods are capable to identify the neurons and microelectrodes on the 2D images efficiently. In the 3D images, the preprocessing step which uses information from the 2D segmentation method, showed to be capable to generate correct polygonal models efficiently. Most of the studies involving the analysis of neuron cultures on MEAs consider only qualitative analysis or simple quantitative measures. However, the methods proposed in this thesis enables to obtain important measures related to the neuron culture, such as: the density and morphology of the neurons, and the spatial and topological distribution of the neurons and microelectrodes. The information about neuron morphology is important because they are related to the behavior of this kind of neuron. The spatial and topological distribution of neurons and microelectrodes are used for providing models of the interface between these elements, for supporting the analysis of the electrophysiological signal recorded by the microelectrodes, as well as in the computational simulations of the neuron culture behavior.

**Keywords:** microelectrode arrays, confocal fluorescence microscopy, cultured DRG neurons, segmentation, 3D visualization, quantitative analysis.



# LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1: Desenho de neurônios da retina de um mamífero feito por Ramon Y Cajal (CAJAL, 1889). .....46
- Figura 2.1: O gânglios da raiz dorsal e seus neurônios. (A) Parte da medula espinhal e os gânglios da raiz dorsal. Adaptado de (GRAY; LEWIS, 1918). (B) Neurônio do DRG em que é possível visualizar o envelope formado por células da glia. Figura adaptada de (HANANI, 2005). .....60
- Figura 2.2: Imagem por microscopia confocal de fluorescência da interface entre neurônio e microeletrodo. O neurônio em verde e o microeletrodo em preto. ....61
- Figura 2.3: Esquema geral de experimentação com culturas de neurônios plaqueadas em MEA. (A) Placa de uma Matriz de Microeletrodos. (B) Área de gravação da MEA. (C) Aparato para gravação de medidas e estimulação eletrofisiológica. (D) Aparato para imageamento óptico da cultura de neurônios. (E) Detalhe da interface entre neurônio e microeletrodo. ....63
- Figura 2.4: Sistema de malha fechada (*closed-loop*) baseado em um cultura de neurônios corticais em MEA imageado por microscopia 2-fótons, que funciona como o cérebro do sistema. Os estímulos do ambiente externo, virtual no caso do Animat e real no caso do Hybrot, estimulam a cultura em MEA. Os sinais eletrofisiológicos e alterações na morfologia dos neurônios decorrentes do estímulo são capturados pela MEA e pelo microscópio respectivamente, fechando o ciclo. Figura adaptada de (POTTER *et al.*, 2005). .....64
- Figura 2.5: Gravação extracelular da atividade de uma única célula por um microeletrodo planar de MEA. O circuito elétrico permite calcular a diferença de voltagem entre a região de contato do microeletrodo e o microeletrodo de referência. Figura adaptada de (FEJTL *et al.*, 2006). .....65
- Figura 2.6: Os experimentos com MEAs podem ser realizados utilizando fatias de tecido cerebral ou culturas de neurônios dissociados. (A) Fatia de hipocampo de rato depositada sobre MEA para estudos eletrofisiológicos. Imagem obtida por microscopia óptica convencional. Adaptado de (EGERT; HÄMMERLE, 2002). (B) Cultura dissociada de neurônios e glia após várias semanas em MEA. Adaptado de (POTTER *et al.*, 2005). .....66
- Figura 2.7: Esquema de uma interface homem-máquina. O implante neural é responsável por capturar os sinais do cérebro que são repassados a um controlador que movimenta a prótese. No sentido inverso, informações sensoriais gerados pela prótese são enviadas ao controlador que repassa a informação ao cérebro por meio do implante. Figura adaptada de (LEBEDEV; NICOLELIS, 2006). .....67

- Figura 2.8: MEA de alta densidade (*High-Density MEA*). (A) Visão do dispositivo. (B) Detalhe da região de gravação, onde é possível observar os 256 microeletrodos. Figura adaptada de (FEJTL *et al.*, 2006). .....69
- Figura 2.9: Processo de aquisição de imagens tridimensionais por seccionamento óptico. Adaptado de (MERCHANT, 2008). .....70
- Figura 2.10: Processo de imageamento de uma seção óptica por um microscópio confocal. A luz fluorescente emitida do plano focal (linha sólida) percorre o conjunto óptico e passa pelo *pinhole*, alcançando assim o fotomultiplicador. Já a luz fluorescente emitida de regiões distâtes do plano focal atravessa o conjunto óptico, mas não atingem o fotomultiplicador. Figura adaptada de (CONCHELLO; LICHTMAN, 2005). .....71
- Figura 2.11: Comprimentos de onda de excitação e emissão para três tipos de fluorocromos: *enhanced cyan protein* (ECFP), *yellow fluorescent protein* (EYFP) e *red fluorecence protein* (DsRed2). (A) Os comprimentos de onda absorvidos pelos fluorocromos são representados pelas linhas coloridas e os comprimentos de onda selecionados pelos filtros de excitação são representados pelas barras em cinza. (B) Quando excitados pelos comprimentos de onda adequados, os fluorocromos emitem radiação em comprimento de onda diferente, mostrados em (B) juntamente com os filtros de barreira utilizados para impedir que comprimentos de onda diferentes dos emitidos pelo fluorocromo utilizado sejam capturados. Figura adaptada de (DICKINSON; DAVIDSON, 2013). .....72
- Figura 2.12: Ilustração do processo de construção de uma imagem volumétrica (3D) a partir de uma série-z. (A) A série-z na forma de uma sequência de seções-planares empilhadas. (B) A construção dos voxels que ocorre pelo alongamento dos pixels das seções ópticas adjacentes. Figura adaptada de (TRUSK, 2011). .....73
- Figura 2.13: Representação de imagens digitais. (A) Imagem digital 2D. (B) Imagem digital 3D. ....74
- Figura 2.14: Máscaras de vizinhança consideradas para aplicação de filtros espaciais. No caso dos filtros passa-baixas, quanto maior a máscara, maior será a atenuação do ruído e conseqüentemente o borramento. (A) Máscara de tamanho 3x3. (B) Máscara de tamanho 5x5. (C) Máscara de tamanho 7x7. O elemento central da máscara está localizado sobre o pixel filtrado p. ....76
- Figura 2.15: Ilustração da filtragem pela média sobre uma imagem em níveis de cinza. (A) Imagem original antes da filtragem do pixel  $p = 10$ . Os pixels com bordas vermelhas representam a máscara 3x3 centralizada no pixel p. (B) Após a filtragem, o valor de p é substituído pela média dos pixels na vizinhança definida pela máscara. ....76
- Figura 2.16: Melhoria do contraste da imagem por normalização e equalização do histograma. A linha superior mostra a imagem e a linha inferior o respectivo histograma. A parte cinza do histograma está representada em escala logarítmica (A) Imagem original. (B) Resultado da normalização do histograma da imagem original. Note

- que toda a faixa de valores de intensidades está preenchida com pixels, diferente do que ocorre em (A). (C) Resultado da equalização do histograma da imagem original. Note que a distribuição dos pixels ao longo dos níveis de intensidade é mais constante do que em (A) e (B). Uma distribuição de pixels constante é difícil de alcançar em imagens discretas (TELEA, 2007). .....79
- Figura 2.17: Projeção das intensidades ao longo das seções ópticas de uma série-z. Na figura é possível observar uma projeção realizada ao longo do eixo-z (vermelho) e do eixo-x (verde). Figura adaptada de (TRUSK, 2011). ..... 81
- Figura 2.18: Processo de reamostragem por interpolação de uma imagem ao longo do eixo-z para restauração do aspecto cúbico dos voxels. As linhas em preto são as seções ópticas originais da imagem e as linhas azuis são geradas por interpolação. .... 83
- Figura 2.19: Correção da atenuação do sinal de fluorescência ao longo do eixo z realizado pelo método de Adiga e Chaudhuri. (A) Distribuição da média das intensidades dos pixels de objeto ao longo do eixo-z antes da correção. (B) Mostra a distribuição após a correção. Adaptado de (ADIGA; CHAUDHURI, 2001). ....86
- Figura 2.20: Ilustração das operações de erosão e dilatação morfológica. (A) Imagem original I. (B) Elemento estruturante em forma de cruz. (C) Resultado da erosão de A por B. Os pixels em vermelho foram removidos do objeto, pois o elemento estruturante não está contido em A quando o mesmo se posiciona sobre esses pixels. (D) Resultado da dilatação de A por B, Os pixels em verde são inseridos em A, pois quando B está sobre esses pixels a intersecção entre B e A não é vazia. .... 89
- Figura 2.21: Ilustração das operações de abertura e fechamento morfológico. (A) Imagem original I. (B) Elemento estruturante em forma de cruz. (C) Resultado da abertura de A por B. Os pixels em vermelho são removidos dos objetos. (D) Resultado do fechamento de A por B, Os pixels em verde são inseridos nos objetos. ....91
- Figura 2.22: Preenchimento de buracos no interior de objetos. (A) A imagem máscara A. (B) Imagem de marcadores M. (C) Em verde, objetos de A' que possuem intersecção M. O pixel em vermelho pertence a objetos que não possuem intersecção com M. (D) A reconstrução morfológica é composta pelo complemento da imagem formada pelos pixels verdes. A imagem binária resultante é igual à imagem original, exceto por não possuir nenhum buraco nos objetos. .... 93
- Figura 2.23: Ilustração da transformada da distância. (A) Mapa de distâncias gerado pela transformada da distância interna. (B) Mapa de distâncias gerado pela transformada a distância externa. Ambas as imagens consideram a distância Euclidiana. .... 94
- Figura 2.24: Ilustração do processamento de um sinal 1D pela transformada watershed clássica. (A) O sinal de entrada. (B) Início do processo de inundação. Pontos de inundação são criados em todos os mínimos regionais do sinal e a água começa a

emergir uniformemente a partir desses pontos. (C) Quando a água proveniente de dois mínimos regionais distintos estão prestes a se encontrar, cria-se uma barragem (*watershed lines*). (D) Ao final do processo de inundação, as barragens representam a segmentação dos objetos presentes na imagem. Adaptado de (LOTUFO *et al.*, 2008). .....96

Figura 2.25: Aplicação da transformada watershed com marcadores. (A) Pontos de inundação são criados apenas sobre os marcadores. (B) Quando a água que emana de um ponto de inundação (verde) encontra um mínimo regional sem marcador (branco) ela transborda para dentro deste. (C) Quando as águas de pontos de inundação distintos (azul e verde) estão prestes a se encontrar, uma barragem (*watershed line*) é criada. (D) O processo de inundação termina quando a superfície da água cobrir todos os máximos regionais. Figura adaptada de (LOTUFO *et al.*, 2008). .....97

Figura 2.26: Etapas de um sistema de classificação de formas: seleção das características a partir das formas dos objetos, normalização das características e a classificação. Figura adaptada de (COSTA; CESAR-JR., 2000). .....99

Figura 2.27: Ilustração do processo de treinamento de um classificador SVM, em que os padrões (objetos) do conjunto de treinamento pertencem a duas classes  $C_1$  (losangos, em que  $z_k = -1$ ) e  $C_2$  (círculos, em que  $z_k = 1$ ). (A) No espaço original de características os padrões não são linearmente separáveis. (B) Os padrões são transformados para um espaço de características de dimensão aumentada, em que os mesmos padrões são linearmente separáveis. (C) Nesta figura, o hiperplano  $g(y)$  não separa adequadamente as classes de padrões (objetos em vermelho). (D) O hiperplano separa adequadamente os padrões pertencentes às classes  $C_1$  e  $C_2$ , entretanto a margem de separação,  $b$ , não é a maior possível. Os vetores de suporte são mostrados em vermelho. (D) O algoritmo de treinamento do SVM busca maximizar a margem que separa os vetores de suporte (em vermelho) do hiperplano. ....102

Figura 2.28: Ilustração das construções triangulação e Delaunay e diagrama de Voronoi. (A) Uma imagem binária e sua transformada da distância Euclidiana externa. Os pixels brancos são os objetos na imagem, os pixels vermelhos representam as bordas das regiões de Voronoi e as demais cores são as regiões de Voronoi de cada objeto. Os valores nos pixels representam a distância em relação ao pixel de objeto mais próximos. (B) As linhas verdes são o diagrama de Voronoi e as linhas alaranjadas são os lados dos triângulos de Delaunay. As circunferências de cada triângulo são mostradas em azul. ....105

Figura 2.29: Construção do acumulador a partir do campo vetorial por meio de algoritmo de votação. (A) É possível definir um segmento de reta a partir da direção do vetor gradiente do pixel  $\nabla I(i, j)$ . (B) No acumulador, para cada pixel no caminho de algum segmento de reta definido por algum  $\nabla I(i, j)$  é atribuído o valor da magnitude do vetor gradiente  $\nabla I(i, j)$ . Ao contabilizar a contribuição de todos os

	vetores, os pixels com maior intensidade no acumulador representam o centro de um círculo na imagem original. Figura adaptada de (PENG <i>et al.</i> , 2007). .....	106
Figura 2.30:	As 14 possíveis formas de interceptar um cubo por uma iso-superfície (O'CONNOR <i>et al.</i> , 2004). .....	109
Figura 2.31:	As cinco maneiras possíveis que uma iso-superfície pode interceptar um tetraedro (O'CONNOR <i>et al.</i> , 2004). .....	109
Figura 3.1:	Ilustração geral das etapas dos métodos propostos e os relacionamento entre eles. Coluna da esquerda: Identificação dos microeletrodos. Coluna central: Segmentação dos neurônios 2D. Coluna da direita: Visualização 3D dos neurônios por meio de superfícies poligonais. ....	113
Figura 3.2:	Processo de extração dos gânglios da raiz dorsal de ratos Wistar, preparação das culturas de neurônios e deposição das mesmas nas MEAs. ....	114
Figura 3.3:	Modelos de MEA utilizados nos experimentos. (A) Visão geral de uma matriz de microeletrodos (MEA-60 da <i>Multichannel Systems</i> ). (B) Detalhe da área de gravação da MEA, onde é possível observar a disposição dos microeletrodos. ....	114
Figura 3.4:	Modelo do microscópio de varredura confocal de fluorescência utilizado para obter as imagens utilizadas nos experimentos (Zeiss LSM 510-Meta). ....	115
Figura 3.5:	O método proposto para a identificação dos microeletrodos. (A) Imagem original obtida a partir do canal de luz de transmissão (MinIP). (B) Pré-processamento. (C) Detecção de estruturas circulares pela transformada de Hough circular. (D-F) Remoção de falsos-positivos por meio da triangulação de Delaunay (D – triangulação inicial, E – critério #1 e F – critério #2). (G) Construção de uma grade, utilizando regressão linear, para correção de pequenos erros de posicionamento e inserção de falsos-negativos. (H) Detecção final dos microeletrodos, após a correção. ....	116
Figura 3.6:	Relacionamento do método de identificação de microeletrodos com os demais métodos propostos. ....	117
Figura 3.7:	Método para o registro das imagens. (A) O conjunto de imagens não registradas contendo os microeletrodos identificados nas imagens dos quadrantes de uma cultura de neurônios em MEA. (B) Construção da grade de acordo com as medidas relativas ao modelo de MEA utilizado. Na grade, os pontos de controle são as intersecções entre linhas e colunas. (C) As matrizes de transformação são computadas de acordo com os pontos de controle nas imagens de microeletrodos e na grade. (D) Resultado do registro das imagens com os microeletrodos. (E) Conjunto de imagens não registradas obtidas a partir do canal de fluorescência. (F) Resultado de registro das imagens do canal de fluorescência, considerando as mesmas matrizes de transformação obtidas para as imagens com os microeletrodos. ....	121
Figura 3.8:	Ilustração do método proposto para a segmentação dos neurônios. (A) Região de interesse da imagem original obtida a partir do canal de fluorescência. (B) Pré-	

processamento. (C) Segmentação por limiarização. (D) Filtragem morfológica, incluindo correção de oclusões. (E) Definição dos marcadores para a transformada watershed. (F) Resultado da transformada watershed. (G) Classificação de objetos. (H) Imagem com os neurônios segmentados. ....122

Figura 3.9: Ilustração de como o método de segmentação 2D se relaciona com os demais métodos. ....122

Figura 3.10: Ilustração da aplicação da etapa de filtragem morfológica. (A) Imagem binária com quatro componentes conectados. (B) Os componentes conectados com área inferior a um valor limiar são removidos pela operação de abertura por área. A reconstrução morfológica preenche eventuais buracos no interior dos componentes conectados. ....125

Figura 3.11: Detalhes do processo de correção da oclusão de neurônios pelos microeletrodos. (A) Imagem gabarito das trilhas e microeletrodos correspondente ao modelo de MEA utilizado. (B) Imagem resultando da detecção dos microeletrodos na cultura que esta sendo processada. (C) Imagem resultante da etapa de filtragem morfológica sobreposta pelo gabarito da MEA, após o registro. (D) Imagem após correção de oclusão sobreposta pela imagem gabarito do modelo de MEA. As imagens na linha inferior mostram detalhes das imagens C e D, respectivamente. ....125

Figura 3.12: O método de correção de oclusão de neurônios. (A) Imagem contendo dois neurônios que possuem partes ocluídas por um microeletrodo e sua trilha. (B) Os microeletrodos e trilha são dilatados. (C) Caso exista intersecção entre os neurônios e a parte dilatada dos microeletrodos e trilha considera-se que parte dos neurônios está localizada sobre o microeletrodos. (D-E) Computa-se o bounding-box da intersecção entre neurônios e microeletrodos e constrói-se um círculo com centro e diâmetro iguais à diagonal do bounding-box. (F) A parte do neurônio ocluída pelo microeletrodos é inferida como sendo a intersecção entre os círculos e os microeletrodos. ....126

Figura 3.13: O procedimento para separação de componentes conectados subsegmentados. (A) Imagem binária gerada por limiarização da imagem pré-processada. (B) Transformada da distância da imagem binária. (C) Marcadores para os objetos são extraídos do mapa de distâncias utilizando a transformada máxima estendida. Marcadores para o fundo da imagem são obtidos computando a transformada watershed da transformada da distância exterior da imagem binária. O gradiente morfológico é computado sobre a imagem binária e os marcadores de objetos e fundo são impostos como mínimos regionais sobre a mesma. (D) A superfície topográfica descrita em (C) mostrada em 3D, onde é possível visualizar os máximos regionais (fronteiras dos componentes conectados destacados pelo gradiente) e os mínimos regionais (impostos nos marcadores). (E) Resultado da segmentação watershed. As watershed lines são criadas para separar as águas provenientes de pontos de inundação distintos. Cada catchment basin é mostrada com uma cor diferente. (F) O resultado da

transformada watershed mostrada em 3D, onde é possível observar a *watershed line* criada para separar os componentes conectados subsegmentados. .... 127

Figura 3.14: Algumas das características utilizadas para classificar os objetos segmentados em neurônios DRG ou falso-positivos. (A) A área do objeto é aproximada pela soma da área dos pixels que o compõem. (B) O círculo na parte superior possui alta circularidade enquanto na parte inferior possui baixa circularidade. (C) A excentricidade mede o alongamento da forma por meio da razão entre o foco (seta dupla) e o maior eixo. .... 131

Figura 3.15: Esquemas de classificação de objetos. (A) Imagens não classificadas, resultantes da etapa de transformada watershed. (B) Aplicação do algoritmo k-means sobre cada uma das imagens, após a TNC. (C) Banco de dados contendo as características dos objetos e respectivos rótulos obtidos pelo algoritmo k-means. (D) O banco de dados em (C) é utilizado como conjunto de treinamento para a SVM. (E) 20% dos objetos nas imagens originais são manualmente classificados por um especialista. (F) Banco de dados com os resultados da classificação manual. (G) SVM treinada com o banco de dados em F. Características dos objetos: (A) área, (R) circularidade, (E) excentricidade, (I) intensidade média e (T) desvio padrão. .... 133

Figura 3.16: Medidas quantitativas 2D básicas da morfologia dos neurônios (A) e do relacionamento espacial entre os pares de neurônios (B) e entre neurônios e microeletrodos (interface neurônio-eletrodo) (C). Círculos pretos representam microeletrodos e círculos verdes representam células. .... 134

Figura 3.17: Ilustração das classificações dos neurônios de acordo com as suas medidas quantitativas morfológicas e topológicas. (A) Classificação morfológica dos neurônios de acordo com o diâmetro das somas: neurônios pequenos, médios e grandes. (B) Classificação dos neurônios de acordo com a distância em relação aos microeletrodos em: neurônios conectados (neurônio 1); neurônios na área de vizinhança (neurônio 2); neurônios distantes porém ainda na área de gravação de algum microeletrodo (neurônio 3) e neurônios fora da área de gravação de qualquer microeletrodo (neurônio 4). .... 137

Figura 3.18: Ilustração da análise quantitativa baseada no diagrama de Voronoi. (A) Diagrama de Voronoi considerando todos os neurônios e microeletrodos. Os polígonos amarelos representam a área de influência dos microeletrodos, os magentas representam a região de influência dos neurônios que fazem parte do 1-anel de algum microeletrodo e os azuis os demais neurônios. (B) A área de influência de um único microeletrodo, considerando a área do microeletrodo somado a área do seu 1-anel (amarelo + magenta). (C) Área do 1-anel de um único microeletrodo, desconsiderando a área de influência do microeletrodo. Nos resultados, esta medida é representada pela média dos polígonos. (D) A média das distâncias entre um microeletrodos e os neurônios localizados no seu 1-anel. .... 138

- Figura 3.19: Etapas do método proposto para a visualização tridimensional e análise quantitativa 3D. (A) Imagem volumétrica original. As imagens nos itens (B-D) ilustram as etapas anteriores ao processo de reamostragem. (B) Pré-filtragem pelo filtro da mediana. (C) Filtragem no domínio de Anscombe. (D) Interpolação. As imagens nos itens (E-J) ilustram as etapas de pré-processamento das imagens volumétricas antes da geração das superfícies poligonais. (E) Filtragem pela mediana 3D. (F) Preenchimento de buracos. (G) Supressão do fundo das imagens. (H) Correção da oclusão dos neurônios. (I) Evitar a formação de agrupamentos de neurônios utilizando o SKIZ. (J) Visualização das operações de supressão de fundo (cinza), e do SKIZ (vermelho). (K) Visualização 3D dos neurônios após reconstrução das superfícies. (L) Análise quantitativa computada a partir das superfícies poligonais.....140
- Figura 3.20: Ilustração do relacionamento do método de reconstrução de superfícies e visualização 3D com os demais métodos. ....141
- Figura 3.21: Ilustração do processo de registro de duas imagens volumétricas (séries-z) adjacentes quando estas possuem número diferentes de seções ópticas. A série-z da esquerda possui mais seções ópticas do que a da direita. As seções ópticas são registradas uma a uma, para isso é necessário criar novas seções ópticas na posição 1 e 7 da série-z à direita, centralizando a série-z menor em relação à maior. ....142
- Figura 3.22: Ilustração do processo de visualização 3D da cultura. O método permite visualizar a cultura de neurônios e os microeletrodos por diferentes pontos de vista e níveis de *zoom* (A) Visão frontal de uma cultura gerada artificialmente sobre uma MEA (B) Visão diagonal da mesma cultura. (C) *Zoom* em um pequeno grupo de neurônios reconstruídos. À esquerda visão dos polígonos (padrão) e à direita visão em *wireframe*. ....145
- Figura 4.1: Conjunto de imagens obtidas a partir das cultura MEA01 no DIV 1. A cultura foi imageada em dois canais, um de luz de transmissão (visualizada por MinIP) e um de fluorescência (visualizada por MIP), onde é possível visualizar microeletrodos e neurônios, respectivamente. Cada cultura foi dividida em quadrantes imageados separadamente. Cada quadrante foi nomeado de acordo com o número gravado em cada canto da MEA. Na figura, os quadrantes são mostrados de acordo com a organização original. ....150
- Figura 4.2: Conjunto de imagens obtidas a partir das cultura MEA02 no DIV 1. A cultura foi imageada em dois canais, um de luz de transmissão (visualizada por MinIP) e um de fluorescência (visualizada por MIP), onde é possível visualizar microeletrodos e neurônios, respectivamente. Cada cultura foi dividida em quadrantes imageados separadamente. Cada quadrante foi nomeado de acordo com o número gravado em cada canto da MEA. Na figura, os quadrantes são mostrados de acordo com a organização original. ....151

- Figura 4.3: Conjunto de imagens obtidas a partir das cultura MEA04 no DIV 1. A cultura foi imageada em dois canais, um de luz de transmissão (visualizada por MinIP) e um de fluorescência (visualizada por MIP), onde é possível visualizar microeletrodos e neurônios, respectivamente. Cada cultura foi dividida em quadrantes imageados separadamente. Cada quadrante foi nomeado de acordo com o número gravado em cada canto da MEA. Na figura, os quadrantes são mostrados de acordo com a organização original ..... 151
- Figura 4.4: Conjunto de imagens obtidas a partir das cultura MEA05 no DIV 1. A cultura foi imageada em dois canais, um de luz de transmissão (visualizada por MinIP) e um de fluorescência (visualizada por MIP), onde é possível visualizar microeletrodos e neurônios, respectivamente. Cada cultura foi dividida em quadrantes imageados separadamente. Cada quadrante foi nomeado de acordo com o número gravado em cada canto da MEA. Na figura, os quadrantes são mostrados de acordo com a organização original ..... 152
- Figura 4.5: Conjunto de imagens obtidas a partir das cultura MEA11 no DIV 1. A cultura foi imageada em dois canais, um de luz de transmissão (visualizada por MinIP) e um de fluorescência (visualizada por MIP), onde é possível visualizar microeletrodos e neurônios, respectivamente. Cada cultura foi dividida em quadrantes imageados separadamente. Cada quadrante foi nomeado de acordo com o número gravado em cada canto da MEA. Na figura, os quadrantes são mostrados de acordo com a organização original ..... 152
- Figura 4.6: Conjunto de imagens obtidas a partir das cultura MEA13 no DIV 1. A cultura foi imageada em dois canais, um de luz de transmissão (visualizada por MinIP) e um de fluorescência (visualizada por MIP), onde é possível visualizar microeletrodos e neurônios, respectivamente. Cada cultura foi dividida em quadrantes imageados separadamente. Cada quadrante foi nomeado de acordo com o número gravado em cada canto da MEA. Na figura, os quadrantes são mostrados de acordo com a organização original ..... 153
- Figura 4.7: Resultado das etapas de identificação automática de microeletrodos nas imagens do canal de luz de transmissão. Cada linha mostra os resultados para as imagens de cada um dos quadrantes da cultura MEA\_02. (A) Imagem original (MinIP). (B) Imagem pré-processada. (C) Microeletrodos identificados por meio da transformada de Hough circular. (D) Triangulação de Delaunay dos microeletrodos identificados para detecção automática de erros. (E) Após remover microeletrodos falso-positivos de acordo com o critério de perímetro (vermelho). (F) Após remover microeletrodos falso-positivos que não respeitam o critério de ângulo reto. (G) Grade construída por regressão linear para identificar microeletrodos falso negativos. (H) Resultado da correção automática. (I) Imagem final com os microeletrodos identificados. .... 156
- Figura 4.8: Imagens obtidas das culturas em MEA antes e após os registro das quatro imagens originais (não registradas). Cada linha mostra as imagens de uma das culturas de

neurônios em MEA. Coluna da esquerda: Imagem com os microeletrodos. Coluna da direita: Imagens do canal de fluorescência (visualizada por MIP). .159

Figura 4.9: Resultado das etapas do método proposto para segmentação 2D de neurônios considerando as imagens obtidas a partir da MEA\_02. (A) Imagem 2D obtida por MIP. (B) Imagem pré-processada; (C) Segmentação por limiarização local; (D) Filtragem Morfológica; (E) Correção da oclusão de neurônios; (F) Transformada watershed.....162

Figura 4.10: Resultado da etapa de classificação de objetos considerando as três estratégias propostas para a imagem MEA\_02. (A) Imagem a ser classificada, resultante da transformada watershed (B) Classificação pelo algoritmo k-means. (C) Classificação utilizando o algoritmo SVM treinado com o resultado das classificações por k-means (SVM + k-means). (D) Classificação utilizando o algoritmo SVM treinado com os resultados da classificação manual de 20% de cada uma das imagens do conjunto de dados (SVM + manual). .....163

Figura 4.11: Análise da sensibilidade dos parâmetros no método de segmentação de neurônios para todas as imagens. Cada coluna está relacionada a uma das imagens do conjunto de dados, e cada linha representa um parâmetro. Os quadrados são o  $dN_{MR}$ , losangos são  $dA_{MR}$  e os triângulos são a média entre os dois (MÉDIA\_3). (A) Cada parâmetro é variado contra valores fixados dos demais parâmetros. Para a rodada #1, KERNEL\_SIZE é fixado em 3, N e NUM\_TILES em 1. (B) Na segunda rodadas os parâmetros são variados novamente, porém dessa vez os valores fixados de cada parâmetro correspondem aos melhores resultados obtidos na rodada #1. (C) Computa-se o conjunto de valores dos parâmetros que sejam constantes para todas as imagens e que, ao mesmo tempo, apresentem a menor variação em relação aos seus melhores resultados. A primeira coluna representa as medidas de validação do conjunto de parâmetros definido (KERNEL\_SIZE=3, N=2 e NUM\_TILES=32) enquanto a segunda representa os índices resultantes dos melhores parâmetros para cada imagem .....169

Figura 4.12: Resultado da classificação morfológica da cultura MEA\_02. (A) Visualização da classificação morfológica. As linhas retas são o diagrama de Voronoi dos microeletrodos. (B) Histograma da distribuição dos neurônios de acordo com seus diâmetros, considerando cada microeletrodo individualmente. (C) Histograma da distribuição dos neurônios considerando toda a MEA. (D) Porcentagens de neurônios em cada classe, também considerando toda a MEA. ....172

Figura 4.13: A distribuição dos neurônios de acordo com os seus diâmetros considerando todos os neurônios da MEA. (A) Gráficos de barras, considerando o número absoluto de neurônios em cada classe. (B) Gráficos de pizza considerando a porcentagem de neurônios em cada uma das classes. PEQ são neurônios pequenos, MED são médios e GRD são grandes. ....173

- Figura 4.14: Resultado da classificação topológica para a cultura MEA\_02. (A) Visualização da classificação topológica. Os círculos concêntricos são os limites entre as classes de neurônios. (B) Histograma da distribuição dos neurônios de acordo com a distância em relação aos microeletrodos. (C) Histograma da distribuição dos neurônios considerando toda a MEA. (D) Porcentagens de neurônios em cada classe, também considerando toda a MEA. .... 174
- Figura 4.15: A distribuição dos neurônios de acordo com a distância em relação ao microeletrodo mais próximo para todos os neurônios da MEA. (A) Gráficos de barras, considerando o número absoluto de neurônios em cada classe. (B) Gráficos de pizza considerando a porcentagem de neurônios em cada uma das classes. CON são conectados, VIZ são vizinhos, DISTS são distantes e OUT são fora da área considerada para gravação. .... 175
- Figura 4.16: Visualização da classificação topológica baseada no diagrama de Voronoi aplicada sobre as imagens da cultura MEA\_02. (A) Classificação realizada considerando todos os microeletrodos. (B) Classificação considerando apenas o microeletrodo 26. (C) Classificação considerando apenas o microeletrodo 42. 177
- Figura 4.17: Tabela que resume e organiza as principais medidas quantitativas obtidas da cultura de neurônios na MEA. A tabela segue a distribuição espacial dos microeletrodos no modelo de MEA. Cada bloco delimitado por bordas escuras representam um microeletrodo numerado na primeira célula da primeira linha. O restante da primeira linha armazena as medidas morfológicas. A segunda linha armazena as medidas topológicas. A terceira e quarta linhas armazenam valores relacionados ao 1-anel do microeletrodo. .... 180
- Figura 4.18: Processo de construção da imagem sintética. (A) Imagem resultante da segmentação 2D da cultura MEA\_02. (B) Seção-óptica central (9) da imagem sintética. (C) Visão de várias seções-ópticas da imagem sintética a partir dos eixos X-Z. (D) Detalhe das imagens em (C). (E-G) Visão da imagem sintética reconstruída em 3D por diversos pontos de vista. .... 181
- Figura 4.19: Imagem sintética. (A) Imagem sintética original, sem a adição de ruído (Seção-óptica 9). (B) Imagem sintética após a inserção de ruído (Seção-óptica 9). Os quadros vermelhos mostram detalhes das imagens. .... 182
- Figura 4.20: Visualização dos resultados de diferentes estratégias de filtragem do ruído nas imagens. Na linha superior (A-D) são mostrados os resultados da aplicação simples dos métodos de filtragem: (A) Filtragem pela mediana; (B) Filtragem pela média; (C) Suavização Gaussiana; (D) Filtro de médias não locais. Na linha central (E-H) são mostrados os mesmos filtros aplicados no domínio de Anscombe. Na linha inferior (I-L) os métodos de filtragem no domínio de Anscombe são precedidos por pré-filtragem pela mediana. .... 184
- Figura 4.21: Teste realizado sobre uma imagem artificial, subamostrada ao longo do eixo Z, com o objetivo de definir o melhor algoritmo de interpolação a ser utilizado pelo método proposto. (A) Visão dos eixos X-Y. (B) Visão dos eixos Y-Z. (C) Visão

- dos eixos X-Z. (D) Reconstrução das superfícies. (E) Sistema de coordenadas. ....186
- Figura 4.22: Relação entre o processo de aquisição das imagens volumétricas pelo microscópio confocal invertido e o sistema de coordenadas das imagens obtidas. (A) Visão lateral do processo de imageamento, em que se observam as coordenadas do eixo-Z. (B) Visão diagonal em que pode se observar as relações entre as coordenadas X, Y e Z. ....187
- Figura 4.23: Resultado do processo de filtragem do ruído no domínio de Anscombe seguido da reamostragem da imagem por interpolação tri-cúbica aplicados sobre a imagem volumétrica da cultura MEA\_02. (A) Imagem volumétrica original. (B) Resultado da filtragem do ruído utilizando o filtro de médias não locais, no domínio de Anscombe, com pré-filtragem pelo filtro da mediana. (C) Imagem reamostrada utilizando interpolação tri-cúbica. A imagem foi subamostrada por um fator de 4 nos eixos X e Y, e super-amostrada no eixo-Z para apresentar aspecto isotrópico. A coluna da esquerda mostra a visão dos eixos X-Y da seção óptica central (4 para A e B e 8 para C). A coluna da direita mostra seções transversais (X-Z) em diferentes valores de Y. Os quadros em vermelho mostram detalhes de cada imagem. ....188
- Figura 4.24: Sequencia de operações da etapa de pré-processamento das imagens da cultura MEA\_02. A coluna da esquerda mostra a visão da seção óptica central (8) visto a partir de X-Y. A coluna da direita mostra 15 seções obtidas ao longo do eixo Y a partir de X-Z. (A) Imagem original, resultante do processo de interpolação. (B) resultado da filtragem pela mediana 3D e do preenchimento de buracos. (C) Correção da oclusão dos neurônios pelos microeletrodos e trilhas, seguida pela supressão do fundo. (D) Ilustração do processo de supressão do fundo e separação de agrupamentos de neurônios. As regiões em cinza são o fundo da imagem resultante do método de segmentação 2D e as regiões em branco são o SKIZ. (E) Resultado da subtração do fundo e do SKIZ da imagem segmentada. Esta imagem será submetida à reconstrução das superfícies tridimensionais. ...189
- Figura 4.25: Visualização da cultura MEA\_02, após reconstrução das superfícies poligonais. (A) Visão frontal das culturas. (B) Visão das culturas por um ponto de vista diagonal. (C) Visão por um ponto de vista diagonal da cultura com a câmera posicionada próxima ao canto inferior esquerdo da MEA. Isovalor = 46. ....190
- Figura 4.26: Neurônios ordenados pela área da superfície. (A) Imagem MEA\_01; (B) Imagem MEA\_02. (C) MEA\_04. (D) MEA\_05. (E) MEA\_11. (F) MEA\_13. ....191
- Figura 4.27: A distribuição dos neurônios de acordo com a área da superfície dos corpos celulares. (A) Gráficos de barras, considerando o número absoluto de neurônios em cada classe. (B) Gráficos de pizza considerando a porcentagem de neurônios em cada uma das classes. PEQ são neurônios pequenos, MED são médios e GRD são grandes. ....192

- Figura 4.28: A distribuição dos neurônios de acordo com a distância em relação aos microeletrodos. (A) Gráficos de barras, considerando o número absoluto de neurônios em cada classe. (B) Gráficos de pizza considerando a porcentagem de neurônios em cada uma das classes. .... 193
- Figura 4.29: Visualização das classificações morfológica e topológica dos neurônios para a MEA\_02. Em (A), (B) e (C) são mostradas a classificação morfológica por visualização frontal, diagonal e diagonal a partir da parte inferior da MEA, respectivamente. Em (D), (E) e (F) é mostrada a classificação topológica por visualização frontal, diagonal e diagonal a partir da parte inferior da MEA, respectivamente. .... 194
- Figura A.1: Resultado das etapas de identificação automática de microeletrodos nas imagens do canal de luz de transmissão. Cada linha mostra os resultados para as imagens de cada um dos quadrantes da cultura MEA\_01. (A) Imagem original (MinIP). (B) Imagem pré-processada. (C) Microeletrodos identificados por meio da transformada de Hough circular. (D) Triangulação de Delaunay dos microeletrodos identificados para detecção automática de erros. (E) Após remover microeletrodos falso-positivos de acordo com o critério de perímetro (vermelho). (F) Após remover microeletrodos falso-positivos que não respeitam o critério de ângulo reto. (G) Grade construída por regressão linear para identificar microeletrodos falso negativos. (H) Resultado da correção automática. (I) Imagem final com os microeletrodos identificados. .... 213
- Figura A.2: Resultado das etapas de identificação automática de microeletrodos nas imagens do canal de luz de transmissão. Cada linha mostra os resultados para as imagens de cada um dos quadrantes da cultura MEA\_04. (A) Imagem original (MinIP). (B) Imagem pré-processada. (C) Microeletrodos identificados por meio da transformada de Hough circular. (D) Triangulação de Delaunay dos microeletrodos identificados para detecção automática de erros. (E) Após remover microeletrodos falso-positivos de acordo com o critério de perímetro (vermelho). (F) Após remover microeletrodos falso-positivos que não respeitam o critério de ângulo reto. (G) Grade construída por regressão linear para identificar microeletrodos falso negativos. (H) Resultado da correção automática. (I) Imagem final com os microeletrodos identificados. .... 214
- Figura A.3: Resultado das etapas de identificação automática de microeletrodos nas imagens do canal de luz de transmissão. Cada linha mostra os resultados para as imagens de cada um dos quadrantes da cultura MEA\_05. (A) Imagem original (MinIP). (B) Imagem pré-processada. (C) Microeletrodos identificados por meio da transformada de Hough circular. (D) Triangulação de Delaunay dos microeletrodos identificados para detecção automática de erros. (E) Após remover microeletrodos falso-positivos de acordo com o critério de perímetro (vermelho). (F) Após remover microeletrodos falso-positivos que não respeitam o critério de ângulo reto. (G) Grade construída por regressão linear para

identificar microeletrodos falso negativos. (H) Resultado da correção automática. (I) Imagem final com os microeletrodos identificados. ....214

Figura A.4: Resultado das etapas de identificação automática de microeletrodos nas imagens do canal de luz de transmissão. Cada linha mostra os resultados para as imagens de cada um dos quadrantes da cultura MEA\_11. (A) Imagem original (MinIP). (B) Imagem pré-processada. (C) Microeletrodos identificados por meio da transformada de Hough circular. (D) Triangulação de Delaunay dos microeletrodos identificados para detecção automática de erros. (E) Após remover microeletrodos falso-positivos de acordo com o critério de perímetro (vermelho). (F) Após remover microeletrodos falso-positivos que não respeitam o critério de ângulo reto. (G) Grade construída por regressão linear para identificar microeletrodos falso negativos. (H) Resultado da correção automática. (I) Imagem final com os microeletrodos identificados. ....215

Figura A.5: Resultado das etapas de identificação automática de microeletrodos nas imagens do canal de luz de transmissão. Cada linha mostra os resultados para as imagens de cada um dos quadrantes da cultura MEA\_13. (A) Imagem original (MinIP). (B) Imagem pré-processada. (C) Microeletrodos identificados por meio da transformada de Hough circular. (D) Triangulação de Delaunay dos microeletrodos identificados para detecção automática de erros. (E) Após remover microeletrodos falso-positivos de acordo com o critério de perímetro (vermelho). (F) Após remover microeletrodos falso-positivos que não respeitam o critério de ângulo reto. (G) Grade construída por regressão linear para identificar microeletrodos falso negativos. (H) Resultado da correção automática. (I) Imagem final com os microeletrodos identificados. ....215

Figura A.6: Resultado das etapas do método proposto para segmentação 2D de neurônios considerando as imagens obtidas a partir da MEA\_01. (A) Imagem 2D obtida por MIP. (B) Imagem pré-processada; (C) Segmentação por limiarização local; (D) Filtragem Morfológica; (E) Correção da oclusão de neurônios; (F) Transformada watershed. ....216

Figura A.7: Resultado das etapas do método proposto para segmentação 2D de neurônios considerando as imagens obtidas a partir da MEA\_04. (A) Imagem 2D obtida por MIP. (B) Imagem pré-processada; (C) Segmentação por limiarização local; (D) Filtragem Morfológica; (E) Correção da oclusão de neurônios; (F) Transformada watershed. ....217

Figura A.8: Resultado das etapas do método proposto para segmentação 2D de neurônios considerando as imagens obtidas a partir da MEA\_05. (A) Imagem 2D obtida por MIP. (B) Imagem pré-processada; (C) Segmentação por limiarização local; (D) Filtragem Morfológica; (E) Correção da oclusão de neurônios; (F) Transformada watershed. ....218

Figura A.9: Resultado das etapas do método proposto para segmentação 2D de neurônios considerando as imagens obtidas a partir da MEA\_11. (A) Imagem 2D obtida

por MIP. (B) Imagem pré-processada; (C) Segmentação por limiarização local; (D) Filtragem Morfológica; (E) Correção da oclusão de neurônios; (F) Transformada watershed. ....219

Figura A.10: Resultado das etapas do método proposto para segmentação 2D de neurônios considerando as imagens obtidas a partir da MEA\_13. (A) Imagem 2D obtida por MIP. (B) Imagem pré-processada; (C) Segmentação por limiarização local; (D) Filtragem Morfológica; (E) Correção da oclusão de neurônios; (F) Transformada watershed. ....220

Figura A.11: Resultado da etapa de classificação de objetos considerando as três estratégias propostas para a imagem MEA\_01. (A) Imagem a ser classificada, resultante da transformada watershed (B) Classificação pelo algoritmo k-means. (C) Classificação utilizando o algoritmo SVM treinado com o resultado das classificações por k-means (SVM + k-means). (D) Classificação utilizando o algoritmo SVM treinado com os resultados da classificação manual de 20% de cada uma das imagens do conjunto de dados (SVM + manual). ....221

Figura A.12: Resultado da etapa de classificação de objetos considerando as três estratégias propostas para a imagem MEA\_04. (A) Imagem a ser classificada, resultante da transformada watershed (B) Classificação pelo algoritmo k-means. (C) Classificação utilizando o algoritmo SVM treinado com o resultado das classificações por k-means (SVM + k-means). (D) Classificação utilizando o algoritmo SVM treinado com os resultados da classificação manual de 20% de cada uma das imagens do conjunto de dados (SVM + manual). ....222

Figura A.13: Resultado da etapa de classificação de objetos considerando as três estratégias propostas para a imagem MEA\_05. (A) Imagem a ser classificada, resultante da transformada watershed (B) Classificação pelo algoritmo k-means. (C) Classificação utilizando o algoritmo SVM treinado com o resultado das classificações por k-means (SVM + k-means). (D) Classificação utilizando o algoritmo SVM treinado com os resultados da classificação manual de 20% de cada uma das imagens do conjunto de dados (SVM + manual). ....223

Figura A.14: Resultado da etapa de classificação de objetos considerando as três estratégias propostas para a imagem MEA\_11. (A) Imagem a ser classificada, resultante da transformada watershed (B) Classificação pelo algoritmo k-means. (C) Classificação utilizando o algoritmo SVM treinado com o resultado das classificações por k-means (SVM + k-means). (D) Classificação utilizando o algoritmo SVM treinado com os resultados da classificação manual de 20% de cada uma das imagens do conjunto de dados (SVM + manual). ....224

Figura A.15: Resultado da etapa de classificação de objetos considerando as três estratégias propostas para a imagem MEA\_13. (A) Imagem a ser classificada, resultante da transformada watershed (B) Classificação pelo algoritmo k-means. (C) Classificação utilizando o algoritmo SVM treinado com o resultado das classificações por k-means (SVM + k-means). (D) Classificação utilizando o

algoritmo SVM treinado com os resultados da classificação manual de 20% de cada uma das imagens do conjunto de dados (SVM + manual).....225

Figura A.16: Resultado da classificação morfológica da cultura MEA\_01. (A) Visualização da classificação morfológica. As linhas retas são o diagrama de Voronoi dos microeletrodos. (B) Histograma da distribuição dos neurônios de acordo com seus diâmetros, considerando cada microeletrodo individualmente. (C) Histograma da distribuição dos neurônios considerando toda a MEA. (D) Porcentagens de neurônios em cada classe, também considerando toda a MEA. ....226

Figura A.17: Resultado da classificação morfológica da cultura MEA\_04. (A) Visualização da classificação morfológica. As linhas retas são o diagrama de Voronoi dos microeletrodos. (B) Histograma da distribuição dos neurônios de acordo com seus diâmetros, considerando cada microeletrodo individualmente. (C) Histograma da distribuição dos neurônios considerando toda a MEA. (D) Porcentagens de neurônios em cada classe, considerando toda a MEA. ....227

Figura A.18: Resultado da classificação morfológica da cultura MEA\_05. (A) Visualização da classificação morfológica. As linhas retas são o diagrama de Voronoi dos microeletrodos. (B) Histograma da distribuição dos neurônios de acordo com seus diâmetros, considerando cada microeletrodo individualmente. (C) Histograma da distribuição dos neurônios considerando toda a MEA. (D) Porcentagens de neurônios em cada classe, considerando toda a MEA. ....227

Figura A.19: Resultado da classificação morfológica da cultura MEA\_11. (A) Visualização da classificação morfológica. As linhas retas são o diagrama de Voronoi dos microeletrodos. (B) Histograma da distribuição dos neurônios de acordo com seus diâmetros, considerando cada microeletrodo individualmente. (C) Histograma da distribuição dos neurônios considerando toda a MEA. (D) Porcentagens de neurônios em cada classe, considerando toda a MEA. ....228

Figura A.20: Resultado da classificação morfológica da cultura MEA\_13. (A) Visualização da classificação morfológica. As linhas retas são o diagrama de Voronoi dos microeletrodos. (B) Histograma da distribuição dos neurônios de acordo com seus diâmetros, considerando cada microeletrodo individualmente. (C) Histograma da distribuição dos neurônios considerando toda a MEA. (D) Porcentagens de neurônios em cada classe, considerando toda a MEA. ....228

Figura A.21: Resultado da classificação topológica para a cultura MEA\_01. (A) Visualização da classificação topológica. Os círculos concêntricos são os limites entre as classes de neurônios. (B) Histograma da distribuição dos neurônios de acordo com a distância em relação ao microeletrodo. (C) Histograma da distribuição dos neurônios considerando toda a MEA. (D) Porcentagens de neurônios em cada classe, também considerando toda a MEA. ....229

Figura A.22: Resultado da classificação topológica para a cultura MEA\_04. (A) Visualização da classificação topológica. Os círculos concêntricos são os limites entre as

classes de neurônios. (B) Histograma da distribuição dos neurônios de acordo com a distância em relação ao microeletrodo. (C) Histograma da distribuição dos neurônios considerando toda a MEA. (D) Porcentagens de neurônios em cada classe, também considerando toda a MEA. ....230

Figura A.23: Resultado da classificação topológica para a cultura MEA\_05. (A) Visualização da classificação topológica. Os círculos concêntricos são os limites entre as classes de neurônios. (B) Histograma da distribuição dos neurônios de acordo com a distância em relação ao microeletrodo. (C) Histograma da distribuição dos neurônios considerando toda a MEA. (D) Porcentagens de neurônios em cada classe, também considerando toda a MEA. ....230

Figura A.24: Resultado da classificação topológica para a cultura MEA\_11. (A) Visualização da classificação topológica. Os círculos concêntricos são os limites entre as classes de neurônios. (B) Histograma da distribuição dos neurônios de acordo com a distância em relação ao microeletrodo. (C) Histograma da distribuição dos neurônios considerando toda a MEA. (D) Porcentagens de neurônios em cada classe, também considerando toda a MEA. ....231

Figura A.25: Resultado da classificação topológica para a cultura MEA\_13. (A) Visualização da classificação topológica. Os círculos concêntricos são os limites entre as classes de neurônios. (B) Histograma da distribuição dos neurônios de acordo com a distância em relação ao microeletrodo. (C) Histograma da distribuição dos neurônios considerando toda a MEA. (D) Porcentagens de neurônios em cada classe, também considerando toda a MEA. ....231

Figura A.26: Visualização da classificação topológica baseada no diagrama de Voronoi aplicada sobre as imagens da cultura MEA\_01. (A) Classificação realizada considerando todos os microeletrodos. (B) Classificação considerando apenas o microeletrodo 22. (C) Classificação considerando apenas o microeletrodo 31. 232

Figura A.27: Visualização da classificação topológica baseada no diagrama de Voronoi aplicada sobre as imagens da cultura MEA\_04. (A) Classificação realizada considerando todos os microeletrodos. (B) Classificação considerando apenas o microeletrodo 16. (C) Classificação considerando apenas o microeletrodo 42. 233

Figura A.28: Visualização da classificação topológica baseada no diagrama de Voronoi aplicada sobre as imagens da cultura MEA\_05. (A) Classificação realizada considerando todos os microeletrodos. (B) Classificação considerando apenas o microeletrodo 17. (C) Classificação considerando apenas o microeletrodo 36. 233

Figura A.29: Visualização da classificação topológica baseada no diagrama de Voronoi aplicada sobre as imagens da cultura MEA\_11. (A) Classificação realizada considerando todos os microeletrodos. (B) Classificação considerando apenas o microeletrodo 32. (C) Classificação considerando apenas o microeletrodo 36. 234

Figura A.30: Visualização da classificação topológica baseada no diagrama de Voronoi aplicada sobre as imagens da cultura MEA\_13. (A) Classificação realizada

considerando todos os microeletrodos. (B) Classificação considerando apenas o microeletrodo 26. (C) Classificação considerando apenas o microeletrodo 42. 234

- Figura A.31: Tabela que resume e organiza as principais medidas quantitativas obtidas da cultura de neurônios na MEA\_01. A tabela segue a distribuição espacial dos microeletrodos no modelo de MEA. Cada bloco delimitado por bordas escuras representam um microeletrodo numerado na primeira célula da primeira linha. O restante da primeira linha armazena as medidas morfológicas. A segunda linha armazena as medidas topológicas. A terceira e quarta linhas armazenam valores relacionados ao 1-anel do microeletrodo. ....235
- Figura A.32: Tabela que resume e organiza as principais medidas quantitativas obtidas da cultura de neurônios na MEA\_04. A tabela segue a distribuição espacial dos microeletrodos no modelo de MEA. Cada bloco delimitado por bordas escuras representam um microeletrodo numerado na primeira célula da primeira linha. O restante da primeira linha armazena as medidas morfológicas. A segunda linha armazena as medidas topológicas. A terceira e quarta linhas armazenam valores relacionados ao 1-anel do microeletrodo. ....236
- Figura A.33: Tabela que resume e organiza as principais medidas quantitativas obtidas da cultura de neurônios na MEA\_05. A tabela segue a distribuição espacial dos microeletrodos no modelo de MEA. Cada bloco delimitado por bordas escuras representam um microeletrodo numerado na primeira célula da primeira linha. O restante da primeira linha armazena as medidas morfológicas. A segunda linha armazena as medidas topológicas. A terceira e quarta linhas armazenam valores relacionados ao 1-anel do microeletrodo. ....236
- Figura A.34: Tabela que resume e organiza as principais medidas quantitativas obtidas da cultura de neurônios na MEA\_11. A tabela segue a distribuição espacial dos microeletrodos no modelo de MEA. Cada bloco delimitado por bordas escuras representam um microeletrodo numerado na primeira célula da primeira linha. O restante da primeira linha armazena as medidas morfológicas. A segunda linha armazena as medidas topológicas. A terceira e quarta linhas armazenam valores relacionados ao 1-anel do microeletrodo. ....237
- Figura A.35: Tabela que resume e organiza as principais medidas quantitativas obtidas da cultura de neurônios na MEA\_13. A tabela segue a distribuição espacial dos microeletrodos no modelo de MEA. Cada bloco delimitado por bordas escuras representam um microeletrodo numerado na primeira célula da primeira linha. O restante da primeira linha armazena as medidas morfológicas. A segunda linha armazena as medidas topológicas. A terceira e quarta linhas armazenam valores relacionados ao 1-anel do microeletrodo. ....237
- Figura A.36: Resultado do processo de filtragem do ruído no domínio de Anscombe seguido da reamostragem da imagem por interpolação tri-cúbica aplicados sobre a imagem volumétrica da cultura MEA\_01. (A) Imagem volumétrica original. (B) Resultado da filtragem do ruído utilizando o filtro de médias não locais, no

domínio de Anscombe, com pré-filtragem pelo filtro da mediana. (C) Imagem reamostrada utilizando interpolação tri-cúbica. A imagem foi subamostrada por um fator de 4 nos eixos X e Y, e super amostrada no eixo-Z para apresentar aspecto isotrópico. A coluna da esquerda mostra a visão dos eixos X-Y da seção óptica central (4 para A e B e 8 para C). A coluna da direita mostra seções transversais (X-Z) em diferentes valores de Y. Os quadros em vermelho mostram detalhes de cada imagem. ....238

Figura A.37: Resultado do processo de filtragem do ruído no domínio de Anscombe seguido da reamostragem da imagem por interpolação tri-cúbica aplicados sobre a imagem volumétrica da cultura MEA\_04. (A) Imagem volumétrica original. (B) Resultado da filtragem do ruído utilizando o filtro de médias não locais, no domínio de Anscombe, com pré-filtragem pelo filtro da mediana. (C) Imagem reamostrada utilizando interpolação tri-cúbica. A imagem foi subamostrada por um fator de 4 nos eixos X e Y, e super-amostrada no eixo-Z para apresentar aspecto isotrópico. A coluna da esquerda mostra a visão dos eixos X-Y da seção óptica central (4 para A e B e 8 para C). A coluna da direita mostra seções transversais (X-Z) em diferentes valores de Y. Os quadros em vermelho mostram detalhes de cada imagem. ....239

Figura A.38: Resultado do processo de filtragem do ruído no domínio de Anscombe seguido da reamostragem da imagem por interpolação tri-cúbica aplicados sobre a imagem volumétrica da cultura MEA\_05. (A) Imagem volumétrica original. (B) Resultado da filtragem do ruído utilizando o filtro de médias não locais, no domínio de Anscombe, com pré-filtragem pelo filtro da mediana. (C) Imagem reamostrada utilizando interpolação tri-cúbica. A imagem foi subamostrada por um fator de 4 nos eixos X e Y, e super-amostrada no eixo-Z para apresentar aspecto isotrópico. A coluna da esquerda mostra a visão dos eixos X-Y da seção óptica central (4 para A e B e 8 para C). A coluna da direita mostra seções transversais (X-Z) em diferentes valores de Y. Os quadros em vermelho mostram detalhes de cada imagem. ....240

Figura A.39: Resultado do processo de filtragem do ruído no domínio de Anscombe seguido da reamostragem da imagem por interpolação tri-cúbica aplicados sobre a imagem volumétrica da cultura MEA\_11. (A) Imagem volumétrica original. (B) Resultado da filtragem do ruído utilizando o filtro de médias não locais, no domínio de Anscombe, com pré-filtragem pelo filtro da mediana. (C) Imagem reamostrada utilizando interpolação tri-cúbica. A imagem foi subamostrada por um fator de 4 nos eixos X e Y, e super-amostrada no eixo-Z para apresentar aspecto isotrópico. A coluna da esquerda mostra a visão dos eixos X-Y da seção óptica central (4 para A e B e 8 para C). A coluna da direita mostra seções transversais (X-Z) em diferentes valores de Y. Os quadros em vermelho mostram detalhes de cada imagem. ....241

Figura A.40: Resultado do processo de filtragem do ruído no domínio de Anscombe seguido da reamostragem da imagem por interpolação tri-cúbica aplicados sobre a

imagem volumétrica da cultura MEA\_13. (A) Imagem volumétrica original. (B) Resultado da filtragem do ruído utilizando o filtro de médias não locais, no domínio de Anscombe, com pré-filtragem pelo filtro da mediana. (C) Imagem reamostrada utilizando interpolação tri-cúbica. A imagem foi subamostrada por um fator de 4 nos eixos X e Y, e super-amostrada no eixo-Z para apresentar aspecto isotrópico. A coluna da esquerda mostra a visão dos eixos X-Y da seção óptica central (4 para A e B e 8 para C). A coluna da direita mostra seções transversais (X-Z) em diferentes valores de Y. Os quadros em vermelho mostram detalhes de cada imagem. ....242

Figura A.41: Sequencia de operações da etapa de pré-processamento das imagens da cultura MEA\_01. A coluna da esquerda mostra a visão frontal da seção óptica central (8). A coluna da direita mostra 15 seções obtidas ao longo do eixo Y a partir de X-Z. (A) Imagem original, resultante do processo de interpolação. (B) Resultado da filtragem pela mediana 3D e do preenchimento de buracos. (C) Correção da oclusão dos neurônios. (D) Ilustração do processo de supressão do fundo e separação de agrupamentos de neurônios. (E) Resultado da subtração do fundo e do SKIZ da imagem segmentada. ....243

Figura A.42: Sequencia de operações da etapa de pré-processamento das imagens da cultura MEA\_04. A coluna da esquerda mostra a visão frontal da seção óptica central (8). A coluna da direita mostra 15 seções obtidas ao longo do eixo Y a partir de X-Z. (A) Imagem original, resultante do processo de interpolação. (B) Resultado da filtragem pela mediana 3D e do preenchimento de buracos. (C) Correção da oclusão dos neurônios. (D) Ilustração do processo de supressão do fundo e separação de agrupamentos de neurônios. (E) Resultado da subtração do fundo e do SKIZ da imagem segmentada. ....244

Figura A.43: Sequencia de operações da etapa de pré-processamento das imagens da cultura MEA\_05. A coluna da esquerda mostra a visão frontal da seção óptica central (8). A coluna da direita mostra 15 seções obtidas ao longo do eixo Y a partir de X-Z. (A) Imagem original, resultante do processo de interpolação. (B) Resultado da filtragem pela mediana 3D e do preenchimento de buracos. (C) Correção da oclusão dos neurônios. (D) Ilustração do processo de supressão do fundo e separação de agrupamentos de neurônios. (E) Resultado da subtração do fundo e do SKIZ da imagem segmentada. ....245

Figura A.44: Sequencia de operações da etapa de pré-processamento das imagens da cultura MEA\_11. A coluna da esquerda mostra a visão frontal da seção óptica central (8). A coluna da direita mostra 15 seções obtidas ao longo do eixo Y a partir de X-Z. (A) Imagem original, resultante do processo de interpolação. (B) Resultado da filtragem pela mediana 3D e do preenchimento de buracos. (C) Correção da oclusão dos neurônios. (D) Ilustração do processo de supressão do fundo e separação de agrupamentos de neurônios. (E) Resultado da subtração do fundo e do SKIZ da imagem segmentada. ....246

- Figura A.45: Sequencia de operações da etapa de pré-processamento das imagens da cultura MEA\_13. A coluna da esquerda mostra a visão frontal da seção óptica central (8). A coluna da direita mostra 15 seções obtidas ao longo do eixo Y a partir de X-Z. (A) Imagem original, resultante do processo de interpolação. (B) Resultado da filtragem pela mediana 3D e do preenchimento de buracos. (C) Correção da oclusão dos neurônios. (D) Ilustração do processo de supressão do fundo e separação de agrupamentos de neurônios. (E) Resultado da subtração do fundo e do SKIZ da imagem segmentada. ....247
- Figura A.46: Visualização da cultura MEA\_01, após reconstrução das superfícies poligonais. (A) Visão frontal das culturas. (B) Visão das culturas por um ponto de vista diagonal. (C) Visão por um ponto de vista diagonal da cultura com a câmera posicionada próxima ao canto inferior esquerdo da MEA. Isovalor = 54. ....248
- Figura A.47: Visualização da cultura MEA\_04, após reconstrução das superfícies poligonais. (A) Visão frontal das culturas. (B) Visão das culturas por um ponto de vista diagonal. (C) Visão por um ponto de vista diagonal da cultura com a câmera posicionada próxima ao canto inferior esquerdo da MEA. Isovalor = 28. ....249
- Figura A.48: Visualização da cultura MEA\_05, após reconstrução das superfícies poligonais. (A) Visão frontal das culturas. (B) Visão das culturas por um ponto de vista diagonal. (C) Visão por um ponto de vista diagonal da cultura com a câmera posicionada próxima ao canto inferior esquerdo da MEA. Isovalor = 34. ....249
- Figura A.49: Visualização da cultura MEA\_11, após reconstrução das superfícies poligonais. (A) Visão frontal das culturas. (B) Visão das culturas por um ponto de vista diagonal. (C) Visão por um ponto de vista diagonal da cultura com a câmera posicionada próxima ao canto inferior esquerdo da MEA. Isovalor = 40. ....250
- Figura A.50: Visualização da cultura MEA\_13, após reconstrução das superfícies poligonais. (A) Visão frontal das culturas. (B) Visão das culturas por um ponto de vista diagonal. (C) Visão por um ponto de vista diagonal da cultura com a câmera posicionada próxima ao canto inferior esquerdo da MEA. Isovalor = 29. ....250
- Figura A.51: Visualização das classificações morfológica e topológica dos neurônios para a MEA\_01. Em (A), (B) e (C) são mostradas a classificação morfológica por visualização frontal, diagonal e diagonal a partir da parte inferior da MEA, respectivamente. Em (D), (E) e (F) é mostrada a classificação topológica por visualização frontal, diagonal e diagonal a partir da parte inferior da MEA, respectivamente. ....251
- Figura A.52: Visualização das classificações morfológica e topológica dos neurônios para a MEA\_04. Em (A), (B) e (C) são mostradas a classificação morfológica por visualização frontal, diagonal e diagonal a partir da parte inferior da MEA, respectivamente. Em (D), (E) e (F) é mostrada a classificação topológica por visualização frontal, diagonal e diagonal a partir da parte inferior da MEA, respectivamente. ....252

Figura A.53: Visualização das classificações morfológica e topológica dos neurônios para a MEA_05. Em (A), (B) e (C) são mostradas a classificação morfológica por visualização frontal, diagonal e diagonal a partir da parte inferior da MEA, respectivamente. Em (D), (E) e (F) é mostrada a classificação topológica por visualização frontal, diagonal e diagonal a partir da parte inferior da MEA, respectivamente. ....	252
Figura A.54: Visualização das classificações morfológica e topológica dos neurônios para a MEA_11. Em (A), (B) e (C) são mostradas a classificação morfológica por visualização frontal, diagonal e diagonal a partir da parte inferior da MEA, respectivamente. Em (D), (E) e (F) é mostrada a classificação topológica por visualização frontal, diagonal e diagonal a partir da parte inferior da MEA, respectivamente. ....	253
Figura A.55: Visualização das classificações morfológica e topológica dos neurônios para a MEA_13. Em (A), (B) e (C) são mostradas a classificação morfológica por visualização frontal, diagonal e diagonal a partir da parte inferior da MEA, respectivamente. Em (D), (E) e (F) é mostrada a classificação topológica por visualização frontal, diagonal e diagonal a partir da parte inferior da MEA, respectivamente. ....	253
Figura B.1: Interface gráfica do método de identificação automática de microeletrodos. ....	255
Figura B.2: Interface gráfica do método de registro de imagens. ....	256
Figura B.3: Interface gráfica do método de segmentação de neurônios em imagens 2D. ....	256
Figura B.4: Interface gráfica do método de análise quantitativa 2D. ....	257
Figura B.5: Interface gráfica do método de pré-processamento das imagens volumétricas 3D. ....	257
Figura B.6: Interface gráfica do método reconstrução de superfícies 3D e análise quantitativa 3D. ....	258

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Tabela comparativa dos <i>softwares</i> considerados nesta seção. ....	55
Tabela 4.1: Informações e detalhes sobre as imagens utilizadas nos experimentos. ....	154
Tabela 4.2: Valores dos parâmetros e efetividade dos passos do método utilizado para a identificação dos microeletrodos para cada quadrante (QUAD) das culturas imageadas. REF é o número real de microeletrodos em cada quadrante. CORR é o número de microeletrodos identificados corretamente, FP é o número de falso-positivos e FN é o número de falso-negativos. ....	157
Tabela 4.3: Índices de validação ao longo das etapas do método, exceto pela etapa de classificação que são mostradas na Tabela 4.4. SEG é a etapa da segmentação; MORF de filtragem morfológica, incluindo a correção de oclusão e WAT é a transformada watershed. ....	166
Tabela 4.4: Valores dos índices de validação considerando todas as estratégias de classificação: k-means, SVM+k-means e SVM+Manual. O resultado da transformada watershed (WAT) é mostrado para comparação. ....	167
Tabela 4.5: Medidas quantitativas computadas após correção dos erros de segmentação remanescentes. ....	170
Tabela 4.6: Informações relacionadas à distribuição topológica dos neurônios vizinhos de cada microeletrodo. Cada linha representa um microeletrodo. S é o número de neurônios que compõem o 1-anel do microeletrodo. A é a área total do 1-anel do microeletrodo, incluindo sua própria área (em $\mu\text{m}^2$ ). A' é a área média do 1-anel, não considerando a área do microeletrodo (em $\mu\text{m}^2$ ). D' é a média das distâncias entre os microeletrodos e os neurônios no seu 1-anel. ....	178
Tabela 4.7: Índices de qualidade das computada sobre as imagens ruidosas, antes e depois do processo de filtragem. ....	183
Tabela 4.8: A média e o desvio padrão de todas as medidas quantitativas computadas sobre as superfícies poligonais. ....	194



# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AvgIP** – *Average Intensity Projection* (Projeção de Intensidade Média)
- BMI** – *Brain Machine Interface* (Interface Homem-Máquina)
- CoM** – *Center of Mass* (Centro de Massa)
- DBS** – *Deep Brain Stimulation* (Estimulação Cerebral Profunda)
- DIV** - *Dias In Vitro*
- DRG** – *Dorsal Root Ganglion* (Gânglio da Raiz Dorsal)
- EEG** - Eléetroencefalograma
- FCM** – *Fuzzy C-Means*
- fMRI** – *funcional Magnetic Resonance Imaging* (Ressonância Magnética Funcional)
- GUI** – *Graphical User Interface* (Interface Gráfica do Usuário)
- GVF** – *Gradient Vector Field* (Campo do Vetor Gradiente)
- ITO** – *Indium-tin Oxide* (Óxido de Índio-Estanho)
- LoG** – *Laplacian of Gaussian* (Laplaciano da Gaussiana)
- MEA** – *Multielectrode Array ou Microelectrode Array* (Matriz de Microeletrodos)
- MSE** – *Mean Squared Error* (Erro Quadrático Médio)
- MinIP** – *Minimum Intensity Projection* (Projeção de Intensidade Mínima)
- MIP** – *Maximum Intensity Projection* (Projeção de Intensidade Máxima)
- NA** – *Numerical Apperture* (Abertura Numérica)
- PSF** – Função de Espalhamento Pontual (*Point-Spread Function*)
- PSNR** – *Peak Signal-to-Noise Ratio* (Relação Sinal-Ruído de Pico)
- SGC** – *Sattelite Glial Cells* (Células Satélites da Glia)
- SKIZ** – *Skeleton by Influence Zone* (Esqueleto por Zona de Influência)
- SNC** – Sistema Nervoso Central
- TNC** – Transformada Normal de Características



# SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO .....</b>	<b>45</b>
1.1 Motivação e Objetivos .....	48
1.2 <i>Softwares</i> de Processamento de Imagens de Microscopia.....	51
1.3 Principais Contribuições Originais .....	56
1.3.1 Por que essas contribuições são importantes? .....	56
1.4 Organização do Trabalho.....	58
<b>CAPÍTULO 2 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>59</b>
2.1 Considerações Iniciais .....	59
2.2 Culturas de Neurônios .....	59
2.3 Matrizes de Microeletrodos (MEAs) .....	62
2.3.1 Microscopia Confocal de Fluorescência.....	69
2.3.2 Processamento de imagens 3D .....	72
2.4 Processamento e Análise de Imagens de Microscopia .....	74
2.4.1 Pré-processamento e Correção de Imagens .....	75
2.4.1.1 Filtragem espacial .....	75
2.4.1.2 Melhoria do Contraste .....	78
2.4.1.3 Filtragem no Domínio de Anscombe.....	79
2.4.1.4 Projeção de Intensidades (Fusão de imagens) .....	80
2.4.1.5 Interpolação de Imagens .....	82
2.4.1.6 Correção de Atenuação do Sinal de Fluorescência.....	85
2.4.2 Segmentação de Imagens.....	86
2.4.2.1 O método de Otsu .....	87
2.4.3 Filtragem Morfológica .....	88
2.4.3.1 Dilatação e Erosão .....	88
2.4.3.2 Abertura e Fechamento .....	90
2.4.3.3 Transformada Top-Hat .....	91
2.4.3.4 Reconstrução Morfológica.....	92
2.4.4 Transformada da Distância .....	92
2.4.5 Transformada Watershed .....	95

2.4.5.1 Transformada Watershed com Marcadores .....	96
2.4.5.2 Transformada Watershed sobre o Gradiente da Imagem.....	97
2.4.6 Análise de Formas e Classificação de Objetos .....	98
2.4.6.1 Características de Formas para Classificação de Neurônios.....	99
2.4.6.2 Normalização das características .....	100
2.4.6.3 Máquinas de Vetor de Suporte (SVM – <i>Support Vector Machines</i> ) .....	101
2.4.6.4 K-means .....	104
2.4.7 Triangulação de Delaunay e Diagramas de Voronoi .....	104
2.4.8 Detecção de Círculos em Imagens .....	105
2.4.9 Registro de Imagens.....	107
2.4.10 Superfícies Poligonais - Visualização Tridimensional .....	108
2.5 Considerações Finais .....	110
<b>CAPÍTULO 3 - MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>111</b>
3.1 Considerações Iniciais.....	111
3.2 Cultura de Células e Aquisição das Imagens .....	112
3.3 Identificação Automatizada de Microeletrodos em Imagens 2D.....	115
3.3.1 Pré-processamento das Imagens do Canal de Luz de Transmissão .....	116
3.3.2 Detecção de Estruturas Circulares – Transformada de Hough Circular .....	117
3.3.3 Correção Automática dos Microeletrodos por Triangulação de Delaunay.....	118
3.3.4 Registro de Imagens para Construir uma Imagem da MEA Completa .....	119
3.4 Segmentação de Neurônios 2D .....	120
3.4.1 Pré-processamento .....	123
3.4.2 Segmentação da Imagem em Fundo e Objetos .....	124
3.4.3 Filtragem Morfológica e Correção das Oclusões de Neurônios .....	124
3.4.4 Transformada Watershed .....	127
3.4.4.1 Transformada Watershed com Marcadores .....	128
3.4.5 Classificação dos Objetos .....	130
3.5 Análise Quantitativa 2D.....	132
3.5.1 Análise Morfológica e Topológica .....	134
3.5.2 Classificação Morfológica e Topológica .....	136
3.5.3 Análise Topológica baseada no Diagrama de Voronoi.....	137
3.6 Reconstrução Poligonal e Visualização de Neurônios 3D.....	139
3.6.1 Registro e Alinhamento das Imagens Volumétricas .....	141

3.6.2 Filtragem do Ruído e Interpolação das Imagens .....	142
3.6.3 Pré-processamento das Imagens Volumétricas .....	143
3.6.4 Geração das Superfícies Poligonais .....	144
3.6.5 Visualização 3D .....	145
3.7 Análise Quantitativa 3D .....	146
3.8 Considerações Finais .....	148
<b>CAPÍTULO 4 - RESULTADOS .....</b>	<b>149</b>
4.1 Considerações Iniciais .....	149
4.2 Imagens Utilizadas nos Experimentos .....	149
4.3 Identificação Automatizada de Microeletrodos .....	154
4.4 Registro das Imagens .....	158
4.5 Segmentação de Neurônios a partir de Imagens 2D .....	160
4.5.1 Validação da Segmentação .....	164
4.5.2 Sensibilidade dos Parâmetros .....	168
4.6 Análise Quantitativa 2D .....	170
4.6.1 Classificação Morfológica e Topológica de Neurônios .....	171
4.6.2 Análise Topológica baseada no Diagrama de Voronoi .....	176
4.7 Reconstrução Poligonal e Visualização 3D .....	180
4.7.1 Filtragem do Ruído nas Imagens .....	180
4.7.2 Interpolação das Imagens .....	185
4.7.3 Pré-processamento das Imagens Volumétricas .....	188
4.7.4 Geração das Superfícies Poligonais – Visualização 3D .....	190
4.8 Análise Quantitativa 3D .....	191
4.9 Considerações Finais .....	195
<b>CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES .....</b>	<b>197</b>
5.1 Trabalhos Futuros .....	198
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>201</b>
<b>APÊNDICE A – RESULTADOS – FIGURAS .....</b>	<b>213</b>
<b>APÊNDICE B – INTERFACES GRÁFICAS .....</b>	<b>255</b>
<b>APÊNDICE C – LISTA DE PUBLICAÇÕES .....</b>	<b>259</b>



# Capítulo 1

## INTRODUÇÃO

---

Ao longo dos séculos a humanidade tenta desvendar a natureza da mente humana. Embora referências ao órgão ‘cérebro’ já tenham sido encontradas em um documento egípcio conhecido como "Papiro Cirúrgico de Edwin Smith", datado de cerca de 1700 anos a.C., diferentes culturas da antiguidade relacionavam a mente, assim como as funções mentais, com o coração (CASTRO; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012). O primeiro pensador a relacionar o cérebro às funções da mente foi o médico grego Alcmeon de Crotona (500 a 450 a.C.). A discussão estendeu-se por séculos, passando pelos filósofos Platão e Aristóteles, o primeiro acreditava que o cérebro comandava as funções da mente e o segundo atribuía ao coração tais funções. Os trabalhos do médico romano Cláudio Galeno (129 a 217) e do pensador Rene Descartes no início do século XVIII foram decisivos para estabelecer o cérebro como o órgão que governa nossos pensamentos, ações e sentimentos (CASTRO; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).

O estudo do cérebro humano em nível celular retoma ao trabalho de Santiago Ramón y Cajal (1852 a 1934), que desenhou e catalogou diversos tipos de neurônios e chegou a importantes conclusões sobre a relação entre as diferentes morfologias dos neurônios e suas funções (CAJAL, 1889). A Figura 1.1 mostra um desenho de neurônios da retina de um mamífero feito por Cajal.

Nas últimas décadas, uma série de desenvolvimentos tecnológicos possibilitou entender melhor o funcionamento do cérebro em nível macroscópico (considerando o órgão como um todo) seja por meio de medidas eletrofisiológicas utilizando, por exemplo, a Eletroencefalografia (EEG) (NUNEZ; SRINIVASAN, 2006) ou pelo imageamento funcional do cérebro por Ressonância Magnética Funcional (fMRI) (LAUREYS *et al.*, 2009). Por meio desses dispositivos, aliado ao conhecimento adquirido ao longo do tempo pela observação, por parte de médicos, de pacientes com injúrias no crânio e cérebro foi possível compreender

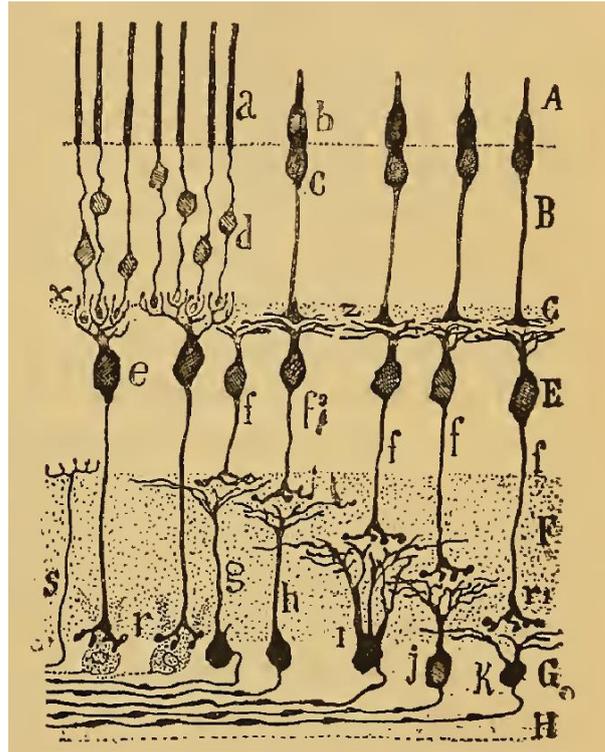


Figura 1.1: Desenho de neurônios da retina de um mamífero feito por Ramon Y Cajal (CAJAL, 1889).

melhor a anatomia do cérebro assim como as funções desempenhadas por suas regiões (LENT, 2001). Entretanto, são as redes neuronais (conexões estabelecidas entre os neurônios e grupos de neurônios) que constituem a base dos mecanismos que possibilitam o armazenamento e o processamento das informações no cérebro humano e o seu estudo é um dos grandes desafios da ciência nas próximas décadas (POTTER, 2001; MAROM; SHAHAF, 2002; MORIN *et al.*, 2005; STEGENGA *et al.*, 2008).

Os microscópios ópticos constituem uma importante ferramenta para o estudo das redes neurais em nível microscópico. Por meio das diversas tecnologias de microscopia óptica, como os microscópios fluorescentes, confocais, eletrônicos, de força atômica, entre outros, muito se aprendeu sobre a morfologia, estruturas internas e organização dos neurônios (EILS; ATHALE, 2003). Porém, exceto por algumas técnicas de imageamento funcional, como fluxo de cálcio (KIM *et al.*, 2012), pouca informação pode ser obtida quanto à dinâmica do comportamento dos neurônios e das redes formadas por eles. A tecnologia de *patch-clamp* (HAMILL *et al.*, 1981) permite observar e estudar a atividade eletrofisiológica intracelular, entretanto essa tecnologia é restrita a uma única célula por vez e durante períodos de tempo muito curtos (HALES *et al.*, 2010).

Na década de 1970, o desenvolvimento das matrizes de microeletrodos, também chamadas de matrizes de múltiplos eletrodos (MEAs – *microelectrode arrays* ou *multielectrode arrays*) (THOMAS-JR. *et al.*, 1972; GROSS *et al.*, 1977) permitiu estudar o comportamento das redes neuronais biológicas formadas por vários neurônios e não apenas de neurônios individuais. As MEAs são dispositivos semelhantes a placas de Petri com microeletrodos incorporados ao substrato da cultura e conectados a um sistema de gravação/estimulação. As MEAs permitem monitorar, de forma não invasiva e por longos períodos de tempo, a atividade eletrofisiológica extracelular de populações de neurônios em fatias bidimensionais de tecido cerebral ou em culturas de tecido cerebral dissociado, composto por neurônios e células da glia (MORIN *et al.*, 2005).

A utilização de fatias inteiras do córtex em MEAs possui a vantagem de manter a conectividade existente entre os neurônios quando vivos, porém as culturas dissociadas são capazes de recompor a sua conectividade básica, e como permitem melhor acesso a nutrientes é possível mantê-las vivas por longos períodos de tempo, possibilitando observações impossíveis em fatias de tecidos (COLICOS; SYED, 2006). Neurônios de mamíferos podem ser mecanicamente ou enzimaticamente dissociados do tecido cerebral e serem cultivados durante meses, observando com a devida atenção a manutenção da esterilidade, temperatura, pH, osmolaridade, oxigenação e o fornecimento de fatores de crescimento (POTTER, 2001; POTTER; DEMARSE, 2001). Existem muitas vantagens em utilizar culturas de neurônios dissociados em aplicações com MEAs. Após algumas semanas plaqueadas na MEA, as culturas de neurônios formam redes completas, com axônios, dendritos e centenas de conexões sinápticas. Redes de neurônios dissociados proveem um modelo mais simples para estudar a dinâmica do funcionamento do cérebro, quando comparado com abordagens que consideram um cérebro intacto ou regiões específicas (HALES *et al.*, 2010).

O processamento de informações no sistema nervoso é realizado principalmente pelas conexões sinápticas entre os neurônios, isso permite que os mesmos atuem em conjunto para executar as complexas tarefas sensoriais e motores, assim como as de aprendizagem e memória (COLICOS; SYED, 2006). A conectividade sináptica entre pares de neurônios não é fixa, ao contrário, exibe um alto grau de plasticidade, no qual constituem as bases dos mecanismos de processamento de informação no sistema nervoso central (COLICOS; SYED, 2006). As alterações na conectividade entre os neurônios levam as redes neuronais a apresentarem as características como aprendizagem, memória, emoções, e sensações (FEBER, LE *et al.*, 2007).

A utilização das MEAs para monitorar a atividade gerada em uma rede composta por milhares de neurônios, de maneira simultânea e não invasiva, desempenha um papel crucial para o entendimento das funções que ela desempenha (COLICOS; SYED, 2006). A conectividade funcional (AERTSEN; GERSTEIN, 1985) permite modelar a rede neuronal em uma MEA por meio da medida de conexão estabelecida entre os microeletrodos por intermédio dos neurônios (FEBER, LE *et al.*, 2007). A conectividade funcional pode ser computada entre pares de microeletrodos da MEAs por meio de métodos como correlação cruzada (EICHLER *et al.*, 2003; IDE *et al.*, 2007) e Probabilidade de Disparo Condicional (FEBER, LE *et al.*, 2007).

É possível combinar o uso de MEAs com outras técnicas para estudar populações de neurônios, sendo esse tipo de combinação simultânea cada vez mais adotado para contornar problemas como a baixa resolução espacial na eletrofisiologia *in vitro* (GIUGLIANO; MARTINOIA, 2006) e para obter informações sobre eventos ocorrendo em regiões distantes dos microeletrodos (KIM *et al.*, 2012).

Técnicas modernas de imageamento óptico, como microscopia de fluorescência e confocal de fluorescência, podem ser utilizadas simultaneamente com a aquisição de sinais eletrofisiológicos pelas MEAs. As técnicas de imageamento podem ser aplicadas em conjunto com corantes e marcadores específicos, como os sensíveis a cálcio e sensíveis a voltagem (GIUGLIANO; MARTINOIA, 2006). Além disso, culturas de neurônios dissociados em MEAs crescem em uma camada única facilitando o seu monitoramento por técnicas de imageamento (HALES *et al.*, 2010).

## 1.1 Motivação e Objetivos

O objetivo principal deste projeto de Doutorado foi pesquisar e desenvolver métodos e ferramentas baseados em processamento de imagens obtidas por microscopia confocal a partir de culturas de neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG – *Dorsal Root Ganglion*) em MEAs e realizar análises quantitativas sobre a cultura. Espera-se que os métodos e ferramentas resultantes deste estudo sejam eficientes para auxiliar pesquisadores a responder importantes questões relacionadas ao funcionamento e ao comportamento de neurônios DRG, quando culturas desse tipo são estudadas por meio de MEAs.

Os métodos desenvolvidos são capazes de realizar, de maneira eficiente e robusta, as seguintes tarefas sobre as imagens: (A) identificar automaticamente a forma e posicionamento dos microeletrodos das MEAs; (B) segmentar e identificar os neurônios presentes nas imagens; (C) visualizar tridimensionalmente as populações de neurônios; (D) obter medidas quantitativas 2D e 3D relacionadas à morfologia dos neurônios e à distribuição espacial dos mesmos, assim como, sobre o relacionamento espacial e topológico entre neurônios e microeletrodos. Os métodos desenvolvidos são eficientes no sentido de exigir o mínimo de interação humana possível e apresentar os resultados de forma rápida e objetiva, uma vez que a demora em se obter informações relevantes a partir de imagens por meio de procedimentos manuais ou semiautomáticos pode desfavorecer estudos de imageamento em conjunto com experimentações de eletrofisiologia.

Os métodos propostos foram desenvolvidos para processar imagens de microscopia confocal obtidas, especificamente, a partir de culturas de neurônios DRG extraído de ratos Wistar. Os gânglios da raiz dorsal estão localizados próximos à medula espinhal e são compostos por neurônios aferentes primários. Os neurônios do DRG são responsáveis por transmitir informação sensorial das partes periféricas do corpo para o sistema nervoso central (SNC) (HANANI, 2005). A atividade elétrica anormal dos neurônios DRG contribui para a dor crônica, por isso esse tipo de neurônio é muito estudado, principalmente no que diz respeito à avaliação de drogas que interferem na sua excitabilidade e podem servir como analgésicos (DEVOR, 1999; HANANI, 2005).

Estudos sugerem que mudanças na morfologia de neurônios DRG influenciam na velocidade de propagação dos impulsos nervosos (HARPER; LAWSON, 1985), entretanto, pouco se conhece sobre as características eletrofisiológicas da excitabilidade desses neurônios (CUNHA *et al.*, 2010). Neurônios DRG podem ser facilmente dissociados e cultivados em um ambiente controlado e demonstram muita resistência, característica adequada para estudos envolvendo experimentações com MEAs. Além disso, neurônios DRG são esféricos e grandes, medem entre 20 e 150  $\mu\text{m}$  em humanos e 15 e 50  $\mu\text{m}$  em ratos, aproximadamente (DEVOR, 1999; MARTÍNEZ-GUTIÉRREZ; CASTELLANOS, 2007). Essas características morfológicas os fazem mais adequados à adesão e estabelecimento da interface neurônio-microeletrodo na MEA do que outros tipos de neurônios menores, como corticais e do hipocampo, uma vez que é desejável que uma parte substancial do microeletrodo esteja em contato com o neurônio (PELT, VAN *et al.*, 2004).

O estudo desse tipo de neurônio é relevante no entendimento de como inflamações e outras condições são capazes de sensibilizar neurônios nociceptores primários, em um

processo denominado hiperalgesia ou hipernocicepção, em que alterações no limiar de excitação dos neurônios resultam em amplificação da sensação de dor (VERRI *et al.*, 2006). Dessa forma, os métodos e ferramentas desenvolvidos neste projeto pretendem, em longo prazo, contribuir para estudos do comportamento de culturas desse tipo de neurônios em MEAs, ao proporcionar uma forma rápida e fácil de acessar medidas quantitativas a partir de imagens de microscopia tomadas das culturas. Acredita-se que, em conjunto com a atividade eletrofisiológica gravada pela MEA, as informações quantitativas relacionadas da morfologia e distribuição espacial dos neurônios ao longo da MEA obtidas a partir do processamento das imagens de microscopia poderão contribuir para a investigação de novas drogas analgésicas, no contexto de farmacologia aplicada.

O número de trabalhos na literatura que discute o processamento de imagens tomadas de culturas de neurônios em MEA é muito pequeno. A maioria dos procedimentos experimentais envolvendo aquisição de imagens de microscopia resulta em imagem de baixa resolução e inadequadas para estudos quantitativos, uma vez que são utilizadas apenas para verificar se a cultura está viva ou se aderiu à MEA (RUTTEN, 2002; EYTAN; MAROM, 2006). No que diz respeito ao processamento de imagens de culturas em MEA obtidas por microscopia 3D o número de estudos é ainda menor (ROSS, 2008).

Existe atualmente, um grande número de *softwares* disponíveis para auxiliar em pesquisas que fazem uso de imagens de microscopia. Pesquisas que atuam em áreas como nefrologia, citologia/citometria, neurociências, entre outras, utilizam microscópios para auxiliar em diversos processos, alguns deles cruciais. Dependendo das necessidades de cada aplicação, diferentes tipos de microscópios demonstram ser mais adequados. Microscópios ópticos convencionais 2D, microscópios de fluorescência, microscópios widefield 3D (deconvolução) e microscópios confocal de varredura a laser são os modelos mais utilizados. Os objetivos da utilização desses microscópios incluem a visualização eficiente das estruturas imageadas, seja em 2D ou 3D, as vezes também associadas ao comportamento dessas estruturas, sejam elas biológicas ou não. Outro objetivo bastante comum é a análise dessas imagens, o que pode incluir a realização de medidas quantitativas.

## 1.2 Softwares de Processamento de Imagens de Microscopia

Nesta seção é realizada uma revisão de alguns *softwares* comerciais e gratuitos disponíveis para o processamento, visualização e análise de imagens de microscopia, especialmente os mais adequados a imagens relacionadas à pesquisa em neurociência. A maioria dos pacotes de *softwares* comerciais oferece um ambiente que integra diversas funcionalidades, que em conjunto com uma interface gráfica de usuário (GUI – *graphical user interface*) amigável permite que profissionais das mais diversas áreas possam extrair o máximo das ferramentas sem a necessidade de conhecimentos mais profundos de processamento de imagens ou programação. Alguns *softwares* gratuitos também apresentam alto nível de integração e GUI amigáveis, porém em sua maioria, eles apresentam baixo nível de integração com os dados gerados por outros aplicativos, não possuem GUIs (acesso as funcionalidade por meio de linha de comando) ou GUIs pouco amigáveis.

O **ImageJ** (RASBAND; ABRÀMOFF et al., 2004) é um *software* gratuito e de código aberto destinado a tarefas em processamento de imagens. Desenvolvido pela *National Institute of Health* (NIH) utilizando a linguagem Java, pode funcionar em diversos Sistemas Operacionais, incluindo Windows, Linux, e Mac. A principal característica do ImageJ, é a possibilidade de incluir novas ferramentas e algoritmos, por meio de *plug-ins* externos. Um grande número de *plug-ins* destinados a diferentes tarefas envolvendo processamento de imagens tem sido desenvolvido por pesquisadores das mais diferentes áreas.

Um esforço na direção de tornar o ImageJ mais adequado ao processamento e manipulação de imagens de microscopia é o **MBF ImageJ for Microscopy** (COLLINS, 2007). O MBF ImageJ for Microscopy é uma coleção de diversos *plug-ins* para ImageJ relacionados com processamento de imagens de microscopia e organizados pela McMaster Biophotonics Facility (MBF). Os *plug-ins* são organizados em diversas categorias: (A) importação e exportação de diferentes formatos de arquivos; (B) operações sobre a intensidade da imagem, como manipulação de histograma, correção de fundo, ajuste de brilho e contraste, correção de gama, *flat-field correction*; (C) algoritmos de deconvolução e para geração de funções de espalhamento pontuais (PSF – *point-spread function*) teórica, porém não é capaz de gerar PSF para microscópios confocais; (D) *plug-ins* para visualização de volumes e superfícies - VolumeJ (ABRÀMOFF; VIERGEVER, 2002), manipulação e edição de seções planares. O MBF ImageJ for Microscopy foi descontinuado em 2012, entretanto é

possível obter o Fiji (SCHINDELIN et al., 2012) *Cookbook* (<http://fiji.sc/Cookbook>), que é baseado no MBF ImageJ.

Entre os *plug-ins* disponíveis para o ImageJ, destaca-se o **ImageJ 3D Viewer** (SCHMID et al., 2010), um *plug-in* destinado a visualização de imagens 3D. O *plug-in* implementa visualização de volumes baseado em texturas, reconstrução de superfícies por meio do algoritmo *marching cubes* (LORENSEN; CLINE, 1987), edição de volumes e criação de vídeos a partir dos volumes visualizados. Apesar da interface pouco amigável é um dos melhores *plug-ins* para visualização 3D de vários tipos (microscopia 3D, CT, MRI, etc.).

O **ImagePro** (Media Cybernetics) é um pacote de *software* comercial desenvolvido pela MediaCybernetics. O ImagePro reúne um grande número de ferramentas destinadas à análise de imagens para uma ampla variedade de aplicações, incluindo microscopia de fluorescência, microscopia confocal, traçado de neurônios, entre outras. O **ImagePro** oferece ferramentas para auxiliar na aquisição, no processamento e realce das imagens, na visualização 3D, ferramentas para extração de medidas em imagens 2D e 3D, análise 4D (3D no tempo). Uma importante característica do ImagePro é a presença de ferramentas específicas para a visualização, contagem e traçado de neurônios.

O **AutoQuant X** (Media Cybernetics) (BIGGS, 2004) é um pacote de *software* comercial destinado a restauração de imagens de microscopia 3D de fluorescência *wide-field* e confocal. Assim como o ImagePro é desenvolvido pela MediaCybernetics e inclui os algoritmos de *deblurring: no-neighbors* e *nearest-neighbors*, os algoritmos de deconvolução: filtro inverso, filtro de Wiener, e estimação por máxima verossimilhança. O principal diferencial do AutoQuant X é o algoritmo de deconvolução cega que permite estimar a PSFs do microscópio ao mesmo tempo que a imagem é restaurada, evitando uma das etapas mais difíceis e trabalhosas do processo de deconvolução, a definição da PSF, seja ela teórica ou experimental. O algoritmo de deconvolução cega em conjunto com uma GUI amigável fazem do AutoQuant X uma ferramenta de fácil manipulação.

O **Imaris** (Bitplane) é outro pacote de *software* comercial para processamento de imagens de microscopia. Possui diversos módulos para visualização, segmentação e análise de dados de microscopia em 3D e 4D (3D + tempo). Uma atenção especial deve ser dada aos módulos **AutoDeblur**, **MeasurementPro** e **FilamentTracer**. O AutoDeblur possui um eficiente algoritmo de deconvolução cega, semelhante ao do AutoQuant X. E o **MeasurementPro** que adiciona capacidade de extração de parâmetros estatísticos relacionados a forma, tamanho e intensidades dos objetos visualização, tudo de forma

interativa. O **FilamentTracer** é o módulo de Imaris para detecção automática de neurônios, neuritos e *spines* em 2D e 3D.

O **Huygens Software** (SVI) refere-se a um conjunto de pacotes de *software* para processamento de imagens obtidas por microscopia de fluorescência. Ele é dividido, basicamente, em três módulos, o **Huygens Essential**, provê uma interface gráfica amigável para acessar as funcionalidades de restauração, visualização e análise, enquanto os módulos **Huygens Professional** e **Huygens Scripting** oferecem recursos para usuários mais avançados.

Uma série de técnicas interativas de visualização está presentes no Huygens, entre elas Projeção de Intensidades Máximas (*Maximum Intensity Projection* - MIP), o *Simulated Fluorescence Process* (SFP), um algoritmo de visualização volumétrica com alto nível de detalhamento, visualização de superfícies contínuas por *Fast Ray Casting*. O *software* permite ainda a geração de vídeos com alta qualidade. Dois módulos são responsáveis pela análise e aquisição de medidas quantitativas a partir das imagens, o **Colocalization Analyzer** e o **Object Analyzer**. O **Object Analyzer** permite obter medidas estatísticas dos objetos.

O **ImageSurfer** (FENG et al., 2007) é um *software* gratuito para visualização e análise de imagens 3D, projetado especificamente para imagens de microscopia. Possui uma interface amigável e um bom conjunto de funções. As ferramentas que o ImageSurfer oferece incluem algoritmos de pré-processamento, entre eles filtro de borramento gaussiano, filtro da mediana, operações morfológicas de erosão e dilatação, e difusão anisotrópica e algoritmos de deconvolução das imagens. Porém, não possui uma ferramenta para geração de PSF teórica, ou seja, para restaurar a imagem o usuário precisa lançar mão de outro *software*, ou obter uma PSF experimental. As ferramentas de visualização 3D do ImageSurfer são o ponto forte do *software*, possui um eficiente algoritmo de visualização de volumes interativo, extração e visualização de isosuperfícies. As ferramentas de análise quantitativa permitem obter medidas de regiões da imagem de forma semiautomática.

O **COSMOS** (*Computational Optical Sectioning Microscopy Open Source*) (COSMOS, 2015) é um pacote de *software* desenvolvido pelo *Computational Imaging Research Laboratory* (CIRL) liderado pela Dra. Chrysanthe Preza. Todas as funcionalidades do COSMOS são acessadas por meio de interfaces gráficas, possui módulos para geração de PSFs teóricas para microscópios 3D confocais, 3D *widefield* (convencionais) e 3D 2-fótons, e possui algoritmos de restauração, visualização de imagens e análise de desempenho. O *software* está disponível para os sistemas operacionais Windows, Linux e Mac. Inclui um visualizador 3D simples para as imagens e as PSFs, e um algoritmo de convolução para gerar

imagens sintéticas, importantes para testar os algoritmos PSF. O COSMOS veio substituir o pacote de *software* XCOSM desenvolvido na década de 1990 (COSMOS, 2015).

O **V3D** (PENG et al., 2010) é uma ferramenta gratuita para uso em pesquisas sem fins comerciais, disponível em versões para múltiplas plataformas (Mac, Linux, e Windows) desenvolvidas pelo *Howard Hughes Medical Institute* para visualização de imagens 3D, possui módulos para segmentação de células, traçado de neurônios, extração de medidas quantitativas. O V3D é adequado para visualização e processamento de dados em larga escala.

Existe uma tendência em neurociências no desenvolvimento de algoritmos e *softwares* específicos destinados ao processamento, segmentação, visualização e análise das arborizações de neuritos. A análise dessas imagens é difícil devido a vários fatores: (A) os neuritos são estruturas muito finas, de difícil detecção durante processo de imageamento; (B) algumas arborizações de neuritos são muito densas, dificultando a identificação de neuritos individuais. Alguns dos *softwares* comerciais citados acima possuem módulos desenvolvidos especificamente para processamento de neuritos, como o ImageSurfer e o ImagePro. Uma ótima revisão sobre traçados de neuritos e respectivos *softwares* pode ser visto em (MEIJERING, 2010).

O **NeuronJ** (MEIJERING et al., 2004) é um *plug-in* de código livre para o ImageJ bastante difundido que permite o traçado e a quantificação de neuritos em imagens bidimensionais.

O **NeuroLucida** (MBF Bioscience) é um dos mais antigos e consolidados *softwares* comerciais para imagens de microscopia, específico para neurociência. Produzido pela MBF Bioscience, permite a reconstrução 3D de neurônios e neuritos de maneira automática, módulos de visualização 3D. Uma das características mais marcantes do NeuroLucida é o módulo **AutoNeuron** que permite processar neuritos e somas em imagens 3D de maneira automática e eficiente. Edições e correções podem ser realizadas interativamente durante o processamento, e os resultados podem ser visualizados e analisados diretamente pelo NeuroLucida. O NeuroLucida é um *software* de referência em reconstrução, visualização e análise de imagens de neurociência.

O *software* **NeuriteIQ** (XIONG et al., 2006; ZHANG et al., 2007) prove métodos automáticos para classificação, análise e extração de medidas de neuritos a partir de imagens de microscopia de fluorescência. Funções de processamento em lote também estão incluídas. Algumas medidas realizadas pelo *software* incluem a contagem do número de células, número de neurônios, intensidade total, intensidade média, comprimento total dos neuritos, comprimento médio dos neuritos. O NeuriteIQ requer o ambiente Matlab para execução.

Os *softwares* comerciais possuem a vantagem de possuírem interfaces mais amigáveis, e integram várias funções. Alguns *softwares* comerciais não são projetados especificamente para trabalhar com imagens de microscopia. Os *softwares* gratuitos, muitas vezes também de código livre possuem baixo nível de integração entre eles, sendo possível encontrar *softwares* para funções bastante específicas, relacionadas, por exemplo, com imagens de microscopia associadas à neurociência, porém requerem maior conhecimento técnico sobre os algoritmos e técnicas utilizados.

A Tabela 1.1 resume as informações sobre os *softwares* considerados nesta seção. As colunas (P) Pré-processamento; (D) Restauração; (S) Segmentação; (V) Visualização; (Q) Análise Quantitativa, correspondem aos itens presentes em cada *software*. Cada coluna é preenchida com um dos seguintes valores: (nenhum ●): não possui ferramentas para essa tarefa; (●): possui uma ferramenta simples; (●●): possui a ferramenta de nível médio; (●●●): possui uma ferramenta avançada. Os *softwares* que funcionam sobre as plataformas ImageJ ou Matlab rodam nos sistemas operacionais que possuem versões das mesmas instaladas (Windows, Mac e Linux para ambas). *Softwares* com licença “Gratuita” não disponibilizam o código fonte. Para *softwares* de código aberto (*open source*) o código está disponível. Alguns *softwares* comerciais possuem módulos gratuitos e de versões de teste por períodos limitados.

**Tabela 1.1: Tabela comparativa dos *softwares* considerados nesta seção.**

<i>Software</i>	P	D	S	V	Q	Plataforma	Licença	URL
ImageSurfer	●●	●●	●●	●●●	●●	Win	Gratuito	<a href="http://imagesurfer.cs.unc.edu/">imagesurfer.cs.unc.edu/</a>
COSMOS		●●●		●		Win/Lin/Mac	Cód. Aberto	<a href="http://cir1.memphis.edu/cosmos/">cir1.memphis.edu/cosmos/</a>
V3D			●●	●●●	●●●	Win/Lin/Mac	Gratuito	<a href="http://penglab.janelia.org/proj/v3d/V3D/About_V3D.html">penglab.janelia.org/proj/v3d/V3D/About_V3D.html</a>
ImageJ 3D Viewer				●●●		ImageJ	Cód. Aberto	<a href="http://132.187.25.13/home/?category=Download&amp;page=Viewer3D">132.187.25.13/home/?category=Download&amp;page=Viewer3D</a>
MBF ImageJ for Microscopia	●●●	●	●●●	●●●	●●	ImageJ	Cód. Aberto	<a href="http://www.macbiophotonics.ca/imagej/">www.macbiophotonics.ca/imagej/</a>
NeuriteIQ			●●●	●●		Matlab	Cód. Aberto	<a href="http://www.cbi-tmhs.org/neuriteiq.html">www.cbi-tmhs.org/neuriteiq.html</a>
ImagePro	●●●		●●	●●●	●●●	Win	Comercial	<a href="http://www.mediacy.com/index.aspx?page=IPP">www.mediacy.com/index.aspx?page=IPP</a>
AutoQuant X		●●●				Win	Comercial	<a href="http://www.mediacy.com/index.aspx?page=AutoQuant">www.mediacy.com/index.aspx?page=AutoQuant</a>
Huygens Software	●●	●●●	●	●●●	●●●	Win/Lin/Mac	Comercial	<a href="http://www.svi.nl/HuygensSoftware">www.svi.nl/HuygensSoftware</a>
Imaris	●●●	●●●	●●●	●●●	●●	Win/Mac	Comercial	<a href="http://www.bitplane.com/go/products/imaris">www.bitplane.com/go/products/imaris</a>
NeuronJ			●●●	●		ImageJ	Gratuito	<a href="http://www.imagescience.org/meijering/software/neuronj/">www.imagescience.org/meijering/software/neuronj/</a>
NeuroLucida			●●●	●●	●●●	Win	Comercial	<a href="http://www.mfbioscience.com/neuroLucida">www.mfbioscience.com/neuroLucida</a>

## 1.3 Principais Contribuições Originais

Como contribuições originais deste trabalho podem-se citar:

(A) O desenvolvimento de métodos eficientes para identificação automatizada dos microeletrodos da MEA nas imagens.

Pode-se destacar a proposta e o desenvolvimento do método para correção de microeletrodos identificados erroneamente baseado na triangulação de Delaunay (descrito na Seção 3.3.3);

(B) O estabelecimento de uma sequência de métodos e ferramentas adequados para segmentar, de forma mais automática, neurônios em imagens obtidas por microscopia de fluorescência no contexto de culturas em MEA.

Destaca-se o método proposto e desenvolvido para correção dos neurônios ocluídos pelos microeletrodos (descrito na Seção 3.4.3);

(C) A definição de um conjunto de ferramentas para visualização 3D eficiente das culturas de células em conjunto com os microeletrodos da MEA;

(D) Estabelecimento de análises quantitativas, um contexto 2D e 3D, que contemplam características morfológicas nos neurônios, da distribuição espacial e topológica dos neurônios e dos microeletrodos. Tais medidas quantitativas são descritas neste documento e são obtidas automaticamente a partir dos resultados das contribuições descritas nos itens (A), (B), e (C). A importância das medidas aqui definidas está ligada com os estudos relacionados com estudos relacionados à eletrofisiologia das culturas em MEA.

Dentre as medidas quantitativas, deve-se frisar o método de análise topológica baseada no diagrama de Voronoi juntamente com o conceito de 1-anel (descritos na Seção 3.5.3) que foram propostos e desenvolvidos durante o presente trabalho.

### 1.3.1 Por que essas contribuições são importantes?

A maioria dos estudos relacionados à análise de imagens de microscopia de culturas de neurônios em MEA consideram apenas análises qualitativas como, por exemplo, verificar se a cultura está viva e se aderiu aos microeletrodos (RUTTEN, 2002; EYTAN; MAROM, 2006), e nos casos mais complexos para mapear a resposta à estimulação (ROSS, 2008). Vale ainda ressaltar que nos trabalhos que envolvem o processamento de imagens tomadas de culturas de neurônios em MEA, não se tem conhecimento de nenhum estudo criterioso,

teórico ou experimental, com o objetivo de definir um conjunto de ferramentas e métodos bem estabelecidos, eficientes e precisos que possam ser considerados padrão para segmentar e identificar neurônios e microeletrodos para fins de análises quantitativas. Da mesma forma, não se tem notícia de estudos quantitativos completos de culturas de neurônios em MEA que consideram medidas morfológicas e topológicas relevantes para os estudos eletrofisiológicos.

A maior parte dos estudos relacionados à análise quantitativa de neurônios e outros tipos de células por meio de processamento de imagens de microscopia considera imagens 2D em placas de cultura convencionais (NILSSON; HEYDEN, 2005; CHENG; RAJAPAKSE, 2009; AL-KOFAHI *et al.*, 2010; JUNG; KIM, 2010). Apenas alguns estudos abordam esse problema em um contexto 3D, mesmo assim em placas de cultura convencionais (ADIGA; CHAUDHURI, 2001; LIN *et al.*, 2003; HODNELAND *et al.*, 2009).

Os métodos propostos e implementados nesta tese constituem um sistema de processamento de imagens capaz de preencher uma lacuna no conjunto de equipamentos para experimentações em eletrofisiologia, principalmente em experimentos envolvendo MEAs e neurônios DRG. A maior parte dos sistemas de processamento de imagens aplicados em imagens biomédicas de culturas celulares exige alto nível de interação com o usuário (CHENG; RAJAPAKSE, 2009), aumentando o tempo para a geração dos resultados, além de necessitarem de imagens capturadas com alta qualidade, que exigem protocolos de aquisição complexos e de alto custo para as células. Diferente do que ocorre nesses sistemas, os métodos aqui propostos, buscam atingir um alto nível de automatização com o objetivo de reduzir o tempo entre a aquisição das imagens e a apresentação dos resultados da análise quantitativa.

Os sistemas de imageamento e de processamento de imagens construídos para lidar com culturas de células convencionais solucionam problemas diferentes daqueles encontrados na manipulação de imagens de culturas em MEAs que, por sua vez, apresentam outras dificuldades e desafios. As culturas de neurônios devem permanecer nas MEAs, ou seja, não podem ser transportadas para dispositivos mais adequados à manipulação por microscópio, o que pode prejudicar a qualidade da imagem adquirida. Por exemplo, a espessura da base das MEAs convencionais é grande (~1 mm) o que diminui a distância de trabalho nos microscópios (ver Seção 2.3 para mais detalhes). As culturas de neurônios em MEA devem permanecer vivas e saudáveis o máximo de tempo possível para que novas medidas eletrofisiológicas possam ser tomadas. Portanto, a não ser que o imageamento seja realizado no final dos experimentos, deve-se buscar reduzir o tempo de exposição do espécime ao laser, o que acaba resultando em imagens com alto nível de ruído, e baixa resolução, principalmente

no eixo-z. Os sistemas desenvolvidos para o processamento desse tipo de imagem devem ser capazes de lidar com imagens adquiridas em condições não ideais, principalmente no que diz respeito ao tempo de aquisição, uma vez que se deve buscar preservar as condições da cultura para que novos estudos sejam realizados posteriormente.

Vale ainda destacar a presença dos microeletrodos e das trilhas que os conectam com o restante do sistema. O imageamento e a identificação desses elementos são importantes para a análise quantitativa do relacionamento entre neurônios e microeletrodos. Entretanto, da mesma forma que os microeletrodos são importantes para a análise quantitativa, eles impedem o imageamento por completo das células localizadas sobre eles, aumentando a dificuldade do processamento dessas imagens. Os métodos propostos nesta tese contemplam este problema tanto no ambiente 2D quanto 3D.

## **1.4 Organização do Trabalho**

O presente documento é organizado da seguinte forma. O Capítulo 1 apresenta a introdução ao tema, motivação, justificativa e os objetivos do trabalho. O Capítulo 2 descreve a tecnologia de MEA, culturas de neurônios, microscopia confocal, assim como os algoritmos e técnicas de processamento de imagens digitais utilizados na construção dos métodos propostos. O Capítulo 3 descreve os métodos propostos e implementados. O Capítulo 4 apresenta e discute os resultados obtidos com os experimentos. As referências bibliográficas são apresentadas na sequência. O Apêndice A mostra as figuras com os resultados que foram omitidos no Capítulo 4. O Apêndice B mostra as interfaces gráficas dos aplicativos que implementam os métodos propostos. O Apêndice C lista as publicações decorrentes deste trabalho de forma direta ou indireta.

# Capítulo 2

## FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

---

---

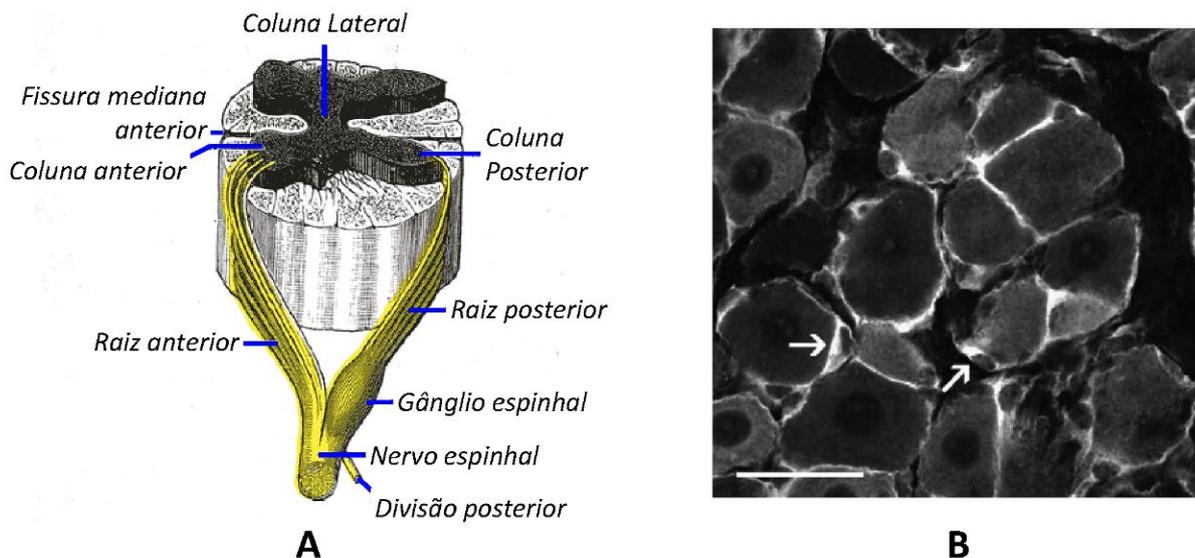
### 2.1 Considerações Iniciais

Neste capítulo são apresentadas: a tecnologia de matrizes de microeletrodos, pesquisas envolvendo culturas de neurônios em MEAs e o imageamento das culturas em MEA por microscopia confocal de fluorescência. É realizada também, uma revisão das principais técnicas e algoritmos de processamento e visualização de imagens utilizadas nos métodos desenvolvidos nesta tese.

### 2.2 Culturas de Neurônios

Os gânglios da raiz dorsal (DRG – *dorsal root ganglia*) estão localizados próximos à medula, portanto não fazem parte do Sistema Nervoso Central (SNC) (Figura 2.1(A)). Os gânglios da raiz dorsal são compostos por neurônios aferentes primários. Os neurônios do DRG são responsáveis por receber sinais sensoriais táteis, térmicos e nociceptivos (dor) provenientes das extremidades do corpo, realizar a transdução desses sinais e transmiti-los para a medula espinhal (HANANI, 2005). Os neurônios DRG são grandes e esféricos, medem entre ~20 e 150  $\mu\text{m}$  em humanos e entre ~15 e 50  $\mu\text{m}$  em ratos, são de fácil cultivo e são relativamente mais resistentes do que outros tipos de neurônios (DEVOR, 1999). O limiar de excitação desses neurônios é variável de acordo com a sensibilização. Morfologicamente, os neurônios DRG podem ser classificados em dois grandes grupos baseado no seu diâmetro e na

densidade dos neurofilamentos citoplasmáticos, denominados neurônios A (*large-light*) e neurônios B (*small-dark*) (DEVOR, 1999). As medidas de diâmetro desses dois tipos de neurônios segue uma distribuição normal e existe uma sobreposição entre elas, dessa forma, neurônios de ambos os grupos podem apresentar diâmetro semelhante, e as características morfológicas estão relacionadas com a velocidade de condução dos sinais eletrofisiológicos (HARPER; LAWSON, 1985).

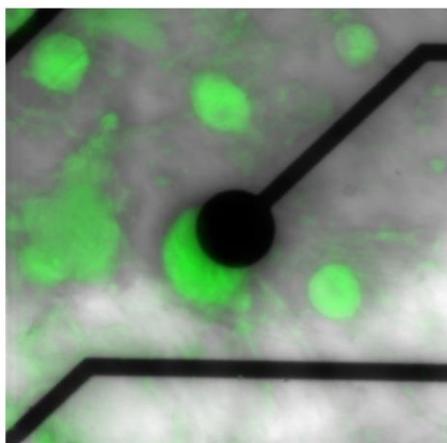


**Figura 2.1:** O gânglios da raiz dorsal e seus neurônios. (A) Parte da medula espinhal e os gânglios da raiz dorsal. Adaptado de (GRAY; LEWIS, 1918). (B) Neurônio do DRG em que é possível visualizar o envelope formado por células da glia. Figura adaptada de (HANANI, 2005).

Nos gânglios, essas células são envolvidas por uma camada de células da glia, em torno de ~20 nm (Figura 2.1(B)). As células da glia são responsáveis por dar suporte estrutural aos neurônios, assim como fornecer nutrição e defesa. E são importantes para o desenvolvimento e o crescimento neuronal, entretanto, em culturas, podem crescer rapidamente e prejudicar a adesão dos neurônios aos microeletrodos (PELT, VAN *et al.*, 2004). As células da glia que envolvem os neurônios DRG são denominadas células satélites da glia (SGC – *sattelite glial cells*) e são muito diferentes das células da glia do sistema nervoso central (SNC) (astrócitos e micróglia). O envelope formado pelas SGC ao redor dos neurônios DRG permite a difusão de moléculas, mas também constitui uma barreira física que diminui o acesso a elementos químicos. Pouco se conhece sobre a interação entre as células SGC e os neurônios DRG, porém estudos sugerem que a interação entre neurônio e glia participa do processo de dor crônica (HANANI, 2005; DUBLIN; HANANI, 2007). Estudos

envolvendo neurônios sensoriais em MEA são úteis na avaliação de drogas que interferem na excitabilidade, e podem servir como analgésicos.

Embora já descrito anteriormente, é importante destacar que os neurônios DRG de ratos possuem diâmetro entre 15 e 50  $\mu\text{m}$ , que são semelhantes aos dos microeletrodos das MEAs (MARTÍNEZ-GUTIÉRREZ; CASTELLANOS, 2007). De acordo com (PELT, VAN *et al.*, 2004), para que o sinal eletrofisiológico das células seja gravado com qualidade, uma porção superficial da soma do neurônio deve estar em contato com a superfície do microeletrodo. Dessa forma, neurônios DRG são adequados para cobrir os microeletrodos da MEA (RUTTEN *et al.*, 2001) e, conseqüentemente, neurônios DRG e MEAs constituem um sistema ideal para o monitoramento e estudo da interface neurônio–microeletrodo (Figura 2.2).



**Figura 2.2: Imagem por microscopia confocal de fluorescência da interface entre neurônio e microeletrodo. O neurônio em verde e o microeletrodo em preto.**

A pesquisa atual envolvendo atividade neuronal baseada em MEA utiliza principalmente culturas de neurônios corticais (POTTER; DEMARSE, 2001; MARTINOIA *et al.*, 2005; BERDONDINI *et al.*, 2009). Existem na literatura, alguns estudos que utilizam MEAs para estudar neurônios sensoriais DRG por meio de gravações *in vivo* (AOYAGI *et al.*, 2003; STEIN *et al.*, 2004; WEBER *et al.*, 2007) e apenas alguns estudos publicados recentemente consideram a investigação de culturas de neurônios DRG *in vitro* (GREVE *et al.*, 2007; ZHAO *et al.*, 2009).

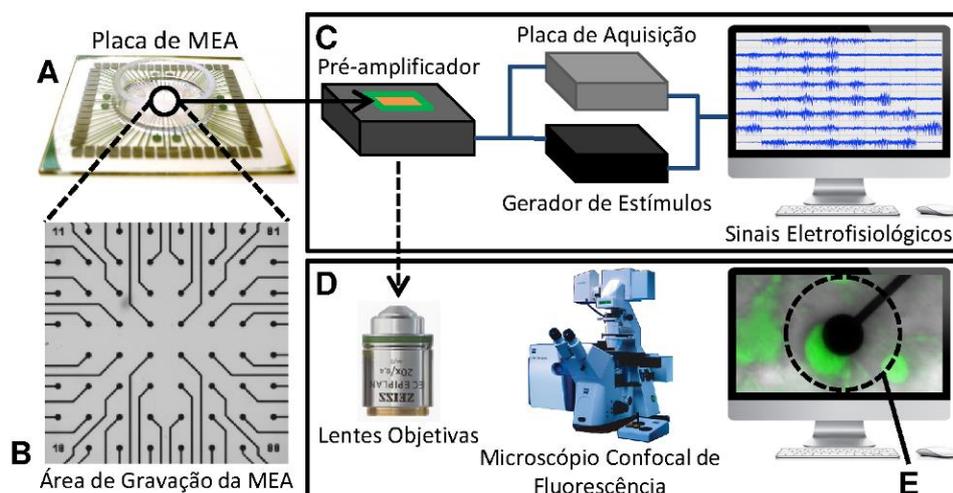
Existe um grande número de trabalhos envolvendo o imageamento por microscopia de culturas de neurônios em placas de Petri comuns, sem a presença de microeletrodos, sendo que apenas uma parcela desses estudos utiliza imagens tridimensionais das culturas para o

estudo de modificações morfológicas nas células (WEARNE *et al.*, 2005; BJORNSSON *et al.*, 2008).

### 2.3 Matrizes de Microeletrodos (MEAs)

A tecnologia de Matrizes de Microeletrodos (MEAs) (THOMAS-JR. *et al.*, 1972; GROSS *et al.*, 1977), desenvolvida no início da década de 1970, tem sido amplamente aplicada em pesquisas sobre neurociências, como em estudos sobre a neurodinâmica do processamento de informações no cérebro (aprendizagem e memória) (POTTER, 2001; MAROM; SHAHAF, 2002; MORIN *et al.*, 2005; STEGENGA *et al.*, 2008); doenças como a epilepsia (BOIDO *et al.*, 2010) e resposta à manipulação farmacológica (EGERT; HÄMMERLE, 2002; STETT *et al.*, 2003).

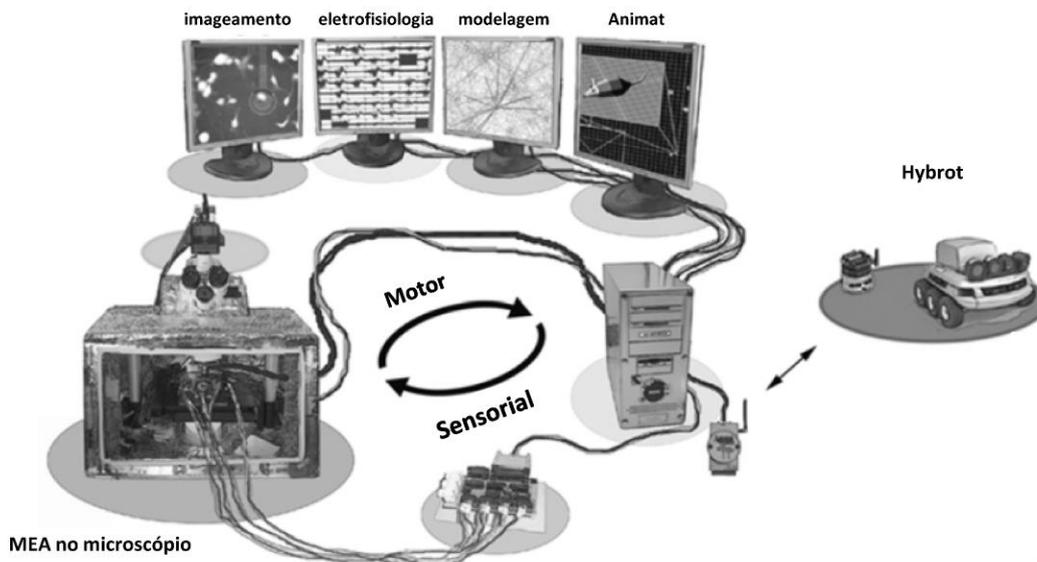
As MEAs são dispositivos semelhantes a placas de Petri com microeletrodos embutidos no substrato da cultura e conectados a um sistema de gravação e estimulação (POTTER, 2001; MORIN *et al.*, 2005). Os microeletrodos permitem monitorar, de forma não invasiva, a atividade eletrofisiológica simultânea de culturas inteiras de neurônios, durante longos períodos de tempo (de alguns meses até um ano) (POTTER, 2001; POTTER; DEMARSE, 2001; MORIN *et al.*, 2005). Esses mesmos microeletrodos podem ser utilizados para estimular eletricamente os neurônios, criando, dessa forma, uma conexão de duas vias entre a rede neural cultivada e o sistema de computação (POTTER, 2001). A Figura 2.3 ilustra uma configuração experimental de um sistema MEA padrão. (A) A placa de MEA. (B) Detalhe do centro da MEA, onde se pode observar a área de gravação da MEA composta pelo arranjo de microeletrodos. (C) A sequência de etapas para experimentação eletrofisiológica. Os sinais captados pela MEA são enviados ao pré-amplificador, que por sua vez está conectado com uma placa de aquisição de sinais conectado a um sistema computacional. O sistema computacional é responsável por armazenar e processar os sinais eletrofisiológicos. É possível observar também um gerador de estímulos utilizado para estimular eletricamente as culturas as de neurônios. (D) A parte do sistema responsável por adquirir imagens de microscopia da cultura de neurônios. As imagens são gravadas em um sistema computacional que possibilita o processamento da mesma. Os métodos propostos e desenvolvidos nesta tese de Doutorado localizam-se no item D desta imagem. (E) Detalhe de um neurônio em contato (sobre) um dos microeletrodos da MEA.



**Figura 2.3:** Esquema geral de experimentação com culturas de neurônios plaqueadas em MEA. (A) Placa de uma Matriz de Microeletrodos. (B) Área de gravação da MEA. (C) Aparato para gravação de medidas e estimulação eletrofisiológica. (D) Aparato para imageamento óptico da cultura de neurônios. (E) Detalhe da interface entre neurônio e microeletrodo.

Em um experimento realizado por Potter *et al.* (POTTER *et al.*, 2005), foi desenvolvido um conjunto de ferramentas para possibilitar o estudo da dinâmica morfológica de uma rede de neurônios vivos ao longo do processo de aprendizagem, ao mesmo tempo que a atividade elétrica é monitorada. Ao combinar a tecnologia MEA para estimular e gravar a atividade eletrofisiológica com microscopia *time-lapse* de 2-fótons é possível acompanhar a relação entre a atividade eletrofisiológica e as modificações morfológicas em centenas de neurônios ao longo de semanas ou meses. Porém, uma vez não mais inseridas em um corpo, as culturas *in vitro* são incapazes de apresentar algum tipo de comportamento (POTTER *et al.*, 2005). Dessa forma, para estudar o processamento de informações nessas culturas, mecanismos capazes de simular um corpo hospedeiro para a cultura foram desenvolvidos. Esses mecanismos possibilitam que a cultura receba estímulos de um ambiente externo, real ou simulado. A atividade eletrofisiológica gerada pela rede após os estímulos é transmitida por meio do sistema MEA para o ambiente externo, fazendo com que a atividade da cultura realize tarefas como, por exemplo, controlar um animal simulado (Animat) em um ambiente virtual (Figura 2.4) (POTTER *et al.*, 2005), ou até mesmo movimentar robôs (Hybrot) (NOVELLINO *et al.*, 2007) e fazer com que um robô pinte quadros (BAKKUM *et al.*, 2007).

O conjunto básico de equipamentos para experimentação com MEA inclui, além das próprias MEAs, circuitos eletrônicos para amplificação do sinal, um computador para os *softwares* de processamento de sinais e armazenamento dos dados e, finalmente, um conjunto de dispositivos de suporte à vida para manter as células vivas e saudáveis durante todo o período do experimento (MORIN *et al.*, 2005). Um sistema que gera sinais para estimulação



**Figura 2.4:** Sistema de malha fechada (*closed-loop*) baseado em um cultura de neurônios corticais em MEA imageado por microscopia 2-fótons, que funciona como o cérebro do sistema. Os estímulos do ambiente externo, virtual no caso do Animat e real no caso do Hybrot, estimulam a cultura em MEA. Os sinais eletrofisiológicos e alterações na morfologia dos neurônios decorrentes do estímulo são capturados pela MEA e pelo microscópio respectivamente, fechando o ciclo. Figura adaptada de (POTTER *et al.*, 2005).

das culturas pode fazer parte do conjunto de equipamentos. Da mesma forma, muitas vezes um microscópio óptico invertido (convencional (*wide-field*), de fluorescência, confocal de fluorescência, ou 2-fótons) faz parte do conjunto de equipamentos e está acoplado a uma câmera, geralmente baseada em sensores CCD ou fotomultiplicadores (GROSS, 1995; CHIAPPALONE *et al.*, 2003, 2006).

Os dispositivos MEAs consistem de um número de microeletrodos, com tamanho aproximado de uma célula (entre 10 e 100  $\mu\text{m}$ ), arranjados ao longo de uma placa de cultura (POTTER, 2001). O substrato é geralmente feito de vidro, e as trilhas feitas de ouro ou material transparente semicondutor ITO (óxido de índio-estanho – em inglês *indium-tin oxide*), que transmitem os sinais dos microeletrodos para o sistema de gravação/estimulação e vice-versa (POTTER, 2001).

Os microeletrodos da MEA precisam ser biocompatíveis, duráveis, e possuir uma impedância razoavelmente baixa (menor do que 500 k $\Omega$  em 1 kHz) para que seja possível detectar sinais extracelulares pequenos (de 10 até 100 microvolts) (POTTER, 2001). A superfície da placa de cultura da MEA, incluindo as trilhas dos microeletrodos, deve ser recoberta com material isolante biocompatível (geralmente poliamida, nitrito de silício ou óxido de silício) que previne curtos circuitos com o meio e permite a adesão das células (POTTER, 2001).

A captura dos sinais eletrofisiológicos dos neurônios cultivados na MEA se dá quando o corpo celular do neurônio cobre parcialmente a região de contato do microeletrodo e a região do microeletrodo não coberta está conectada com a solução salina e com o aterramento (referência), conforme esquema na Figura 2.5. O amplificador conectado às trilhas captura a soma dos potenciais na superfície do microeletrodo, tanto na área coberta pela membrana da célula quanto na área livre. Desconsiderando a baixa resistência,  $R_b$ , da solução acima da área livre do microeletrodo, a relação entre a voltagem  $V_{pad}$  na região de contato e  $V_J$  no espaço entre a membrana e microeletrodo, é dada pela relação independente de frequência na Equação 2.1.

$$\frac{V_{pad}}{V_J} = \frac{C_{JE}}{C_E + C_{sh}} \approx \frac{a_{JE}}{a_E} \quad (2.1)$$

em que  $C_{JE}$  é a capacitância de uma região coberta do microeletrodo com área  $a_{JE}$ ,  $C_E$  é a capacitância de toda a área do microeletrodo  $a_E$ , e  $C_{sh}$  é a capacitância *shunt* da trilha de conexão. Dado que  $C_{sh} \ll C_E$ , a amplitude do sinal adquirido depende linearmente da razão entre a área do microeletrodo coberta e a sua área total (FEJTL *et al.*, 2006).

As propriedades elétricas do contato entre membrana e microeletrodo foram modeladas utilizando elementos finitos por Buitenweg *et al.* (BUITENWEG *et al.*, 2002, 2003).

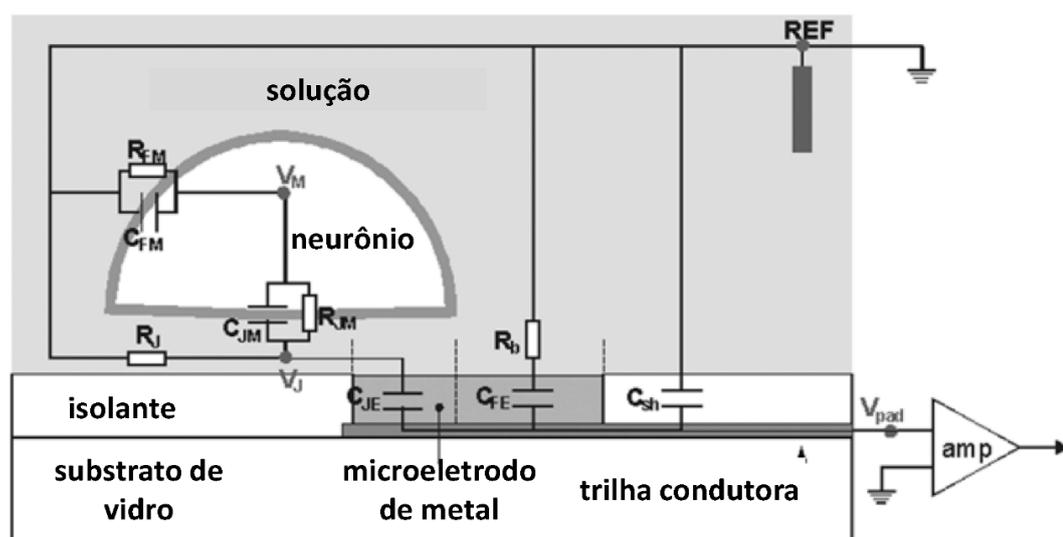
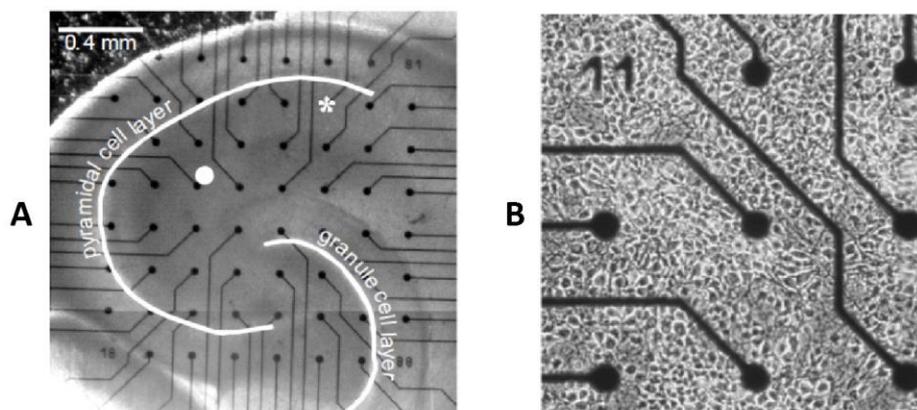


Figura 2.5: Gravação extracelular da atividade de uma única célula por um microeletrodo planar de MEA. O circuito elétrico permite calcular a diferença de voltagem entre a região de contato do microeletrodo e o microeletrodo de referência. Figura adaptada de (FEJTL *et al.*, 2006).

As MEAs permitem estudar os padrões distribuídos de atividade elétrica em fatias bidimensionais do córtex (Figura 2.6(A)), assim como em culturas dissociadas (Figura 2.6(B)) de tecido cerebral composto por neurônios e células da glia (POTTER; DEMARSE, 2001; POTTER *et al.*, 2005). Fatias de tecido cerebral fornecem modelos mais realísticos para estudos, uma vez que mantêm as características estruturais quase intactas, porém, mesmo mantidas em condições favoráveis possuem tempo de vida limitado. Já culturas de neurônios dissociados podem sobreviver por longos períodos de tempo, fazendo delas um modelo ideal para estudos de longo prazo em MEAs (HALES *et al.*, 2010). Nas redes neuronais formadas em culturas dissociadas, o impacto da estimulação elétrica é limitado às áreas observáveis (elétrica ou visualmente) o que permite maior controle sobre os experimentos, ao contrário do que ocorre com fatias de tecido cerebral (HALES *et al.*, 2010).



**Figura 2.6:** Os experimentos com MEAs podem ser realizados utilizando fatias de tecido cerebral ou culturas de neurônios dissociados. (A) Fatia de hipocampo de rato depositada sobre MEA para estudos eletrofisiológicos. Imagem obtida por microscopia óptica convencional. Adaptado de (EGERT; HÄMMERLE, 2002). (B) Cultura dissociada de neurônios e glia após várias semanas em MEA. Adaptado de (POTTER *et al.*, 2005).

O estudo do sistema nervoso utilizando modelos *in vitro* oferece algumas vantagens em relação às abordagens *in vivo*. Culturas de neurônios dissociados são capazes de desenvolver conexões sinápticas organotípicas, ou seja, as sinapses continuam a se desenvolver como se as células ainda pertencessem a um corpo, e exibem uma rica variedade de padrões de atividade elétrica distribuída. Além disso, sistemas *in vitro* são muito mais acessíveis ao imageamento por microscopia óptica e manipulação farmacológica do que sistemas *in vivo* (POTTER, 2001; POTTER *et al.*, 2005; HALES *et al.*, 2010).

Existem vários projetos de MEAs, cada um desenvolvido para um conjunto específico de aplicações (LITT *et al.*, 2003). Alguns modelos de MEA são utilizados para aplicações *in*

*vivo*, como por exemplo, na forma de implantes neurais possibilitando reestabelecer o controle das funções de algum tecido danificado do sistema nervoso (MAHER *et al.*, 1999). Implantes neurais disponíveis para uso clínico incluem dispositivos para restauração e aprimoramento da memória (BERGER *et al.*, 2011), assim como dispositivos de estimulação profunda do cérebro (DBS – *deep brain stimulation*) para tratamento de doenças como Parkinson (BREIT *et al.*, 2004) e epilepsia. Implantes neurais constituem parte fundamental de interfaces homem-máquina (BMI – *brain-machine interfaces*). BMIs podem ser utilizados na restauração do controle motor em pacientes impossibilitados de movimentar os membros devido a injúrias na espinha dorsal ou problemas congênitos. Os implantes neuronais são responsáveis por adquirir os sinais eletrofisiológicos do cérebro. Os sinais, por sua vez, são processados em tempo real por algoritmos executados em um dispositivo computacional e utilizados para controlar uma prótese. Estímulos para realimentação sensorial são gerados pela prótese e, após processados pelo sistema computacional, são levados até o cérebro por meio do próprio implante (WARWICK *et al.*, 2003; SCHWARTZ, 2004; LEBEDEV; NICOLELIS, 2006). A Figura 2.7 ilustra o esquema de uma BMI.

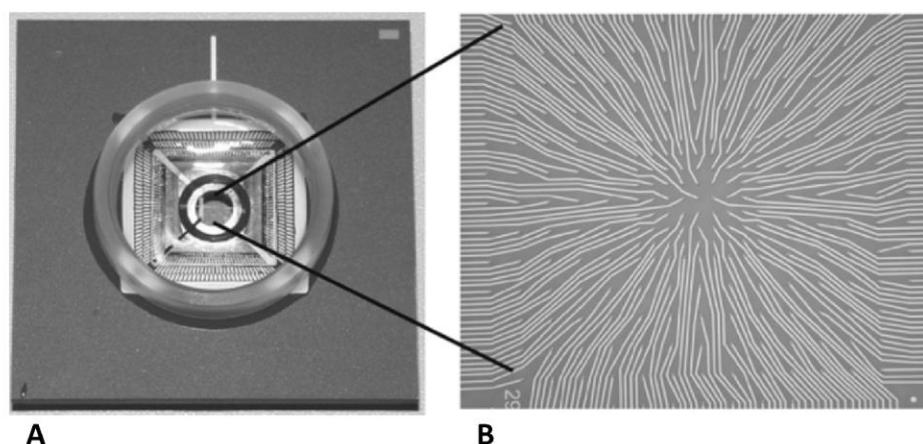


**Figura 2.7: Esquema de uma interface homem-máquina. O implante neural é responsável por capturar os sinais do cérebro que são repassados a um controlador que movimenta a prótese. No sentido inverso, informações sensoriais geradas pela prótese são enviadas ao controlador que repassa a informação ao cérebro por meio do implante. Figura adaptada de (LEBEDEV; NICOLELIS, 2006).**

Os diversos modelos de MEA para aplicações *in vitro* existentes permitem monitorar atividade eletrofisiológica, assim como o desenvolvimento das redes neuronais formadas pelas culturas de neurônios. Modelos de MEAs planares, com o substrato transparente permitem imagear a cultura por meio de um microscópio óptico invertido. Nos modelos *ThinMEA* o substrato, além de transparente, possui apenas 180  $\mu\text{m}$  de espessura, muito menos do que 1 mm da MEA padrão. Essa característica permite que as MEAs sejam imageadas utilizando lentes objetivas com alta abertura numérica, NA, que necessitam de distâncias de trabalho muito pequenas (da ordem de algumas centenas de micrômetros) (FEJTL *et al.*, 2006).

Modelos de MEA padrão com 60 microeletrodos possuem boa resolução espacial, apresentando distâncias entre os microeletrodos variando de 100 a 200  $\mu\text{m}$ , entretanto a área de gravação pode ser pequena para determinados tipos de experimentos como, por exemplo, estudos relacionados à velocidade de propagação dos sinais eletrofisiológicos por longas distâncias (FEJTL *et al.*, 2006). Para aumentar a área de gravação da MEA e ao mesmo tempo manter a resolução espacial, foi proposto um modelo de MEA de alta densidade (*High-Density MEA*). O projeto da MEA de alta densidade é composto por 256 microeletrodos organizados em uma matriz quadrada. Os microeletrodos na região central possuem um espaçamento de 100 $\mu\text{m}$ , enquanto os microeletrodos na periferia estão distantes 200  $\mu\text{m}$  uns dos outros (FEJTL *et al.*, 2006). A Figura 2.8 mostra uma MEA de alta densidade. Em (A) é mostrada uma visão geral do dispositivo, que por sua vez possui um conector compatível com soquetes utilizados em chips de circuitos integrados comuns, facilitando a montagem do *setup* experimental. A Figura 2.8(B) mostra em detalhes a área de gravação da MEA, onde é possível observar os 256 microeletrodos.

Por meio do imageamento óptico é possível acessar informações complementares à atividade eletrofisiológica das células da cultura, como medidas da morfologia de cada célula e distribuição espacial e topológica das células na MEA. As informações morfológicas dos neurônios, como o diâmetro e área da superfície, permitem investigar a relação entre a forma dos neurônios e os sinais por eles produzidos, sinais esses relacionados ao comportamento e função desempenhada pelos neurônios. O imageamento óptico permite acessar também a densidade de neurônios em uma determinada região da cultura. A densidade de neurônios está ligada à probabilidade dos mesmos estarem localizados sobre ou próximos aos microeletrodos, uma das condições críticas para a aquisição dos sinais eletrofisiológicos com qualidade pelos microeletrodos (PELT, VAN *et al.*, 2004). Imagens periódicas tomadas das



**Figura 2.8:** MEA de alta densidade (*High-Density MEA*). (A) Visão do dispositivo. (B) Detalhe da região de gravação, onde é possível observar os 256 microeletrodos. Figura adaptada de (FEJTL *et al.*, 2006).

culturas permitem descrever a relação entre neurônios e microeletrodos ao longo do tempo (POTTER, 2000; FROMHERZ, 2003; POTTER *et al.*, 2004).

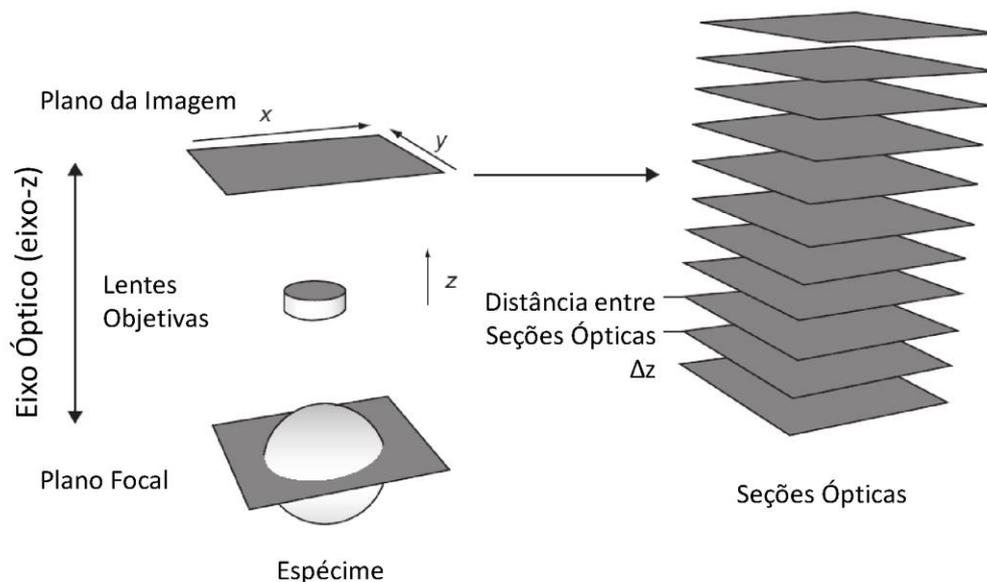
Pontos negativos que dizem respeito ao imageamento de culturas em MEA surgem quando o estudo necessita de medidas com alta resolução temporal. Técnicas baseadas em imageamento óptico não se mostram adequadas, por serem muito mais lentas do que a gravação da atividade eletrofisiológica. Abordagens baseadas em imageamento óptico sofrem ainda com o fenômeno da fototoxicidade, que pode causar danos às culturas em longos períodos de imageamento (GIUGLIANO; MARTINOIA, 2006). Esses fatores apenas corroboram com a necessidade de desenvolver novos métodos capazes de acelerar a aquisição de informações relevantes a partir das imagens. Sistemas de processamento de imagens capazes de obter, de forma rápida e com pouca intervenção humana, informações precisas sobre a morfologia e topologia de populações de neurônios em MEA representam um passo importante para estabelecer as tecnologias de imageamento como ferramentas úteis junto aos estudos dos sinais eletrofisiológicos capturados pela MEA. Outro ponto importante é que algoritmos mais eficientes podem ser aplicados ainda com sucesso sobre imagens com menor qualidade, uma vez que a aquisição de imagens com alta qualidade necessita de maior tempo de exposição do espécime ao laser o que pode prejudicar a integridade da cultura.

### 2.3.1 Microscopia Confocal de Fluorescência

Células e tecidos são entidades tridimensionais, assim como a distribuição espacial das células na maioria das culturas de laboratório. Portanto, técnicas de microscopia que

permitted to collect 3D information of the specimens studied are of great importance for various areas of science (MERCHANT, 2008).

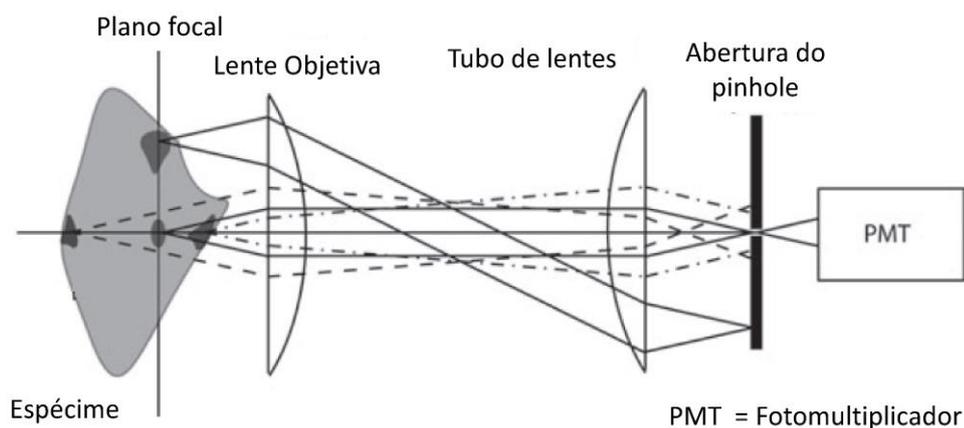
Techniques of three-dimensional microscopy allow the collection of three-dimensional information of the specimens imaged by means of a process called optical sectioning. Microscopes *wide-field* (conventional), confocal and multiphoton are the most common techniques capable of generating three-dimensional images. Optical sectioning microscopes function by acquiring a sequence of optical sections in different focal planes along the z-axis of the specimen, forming a z-series. The optical sections of a z-series are obtained in fixed intervals along the z-axis of the imaged specimen. Each optical section can be represented as a 2D image (MERCHANT, 2008; TRUSK, 2011). Figure 2.9 illustrates the process of acquisition of a z-series by means of some 3D microscopy technique.



**Figura 2.9: Processo de aquisição de imagens tridimensionais por seccionamento óptico. Adaptado de (MERCHANT, 2008).**

Different from a conventional 2D image, which has an infinitely small depth along the z-axis, an optical section has depth. The depth of the optical section is defined by the optical system of the microscope and primarily by the diameter of the aperture of the *pinhole* in confocal microscopes (TRUSK, 2011). As the diameter of the aperture of the *pinhole* increases, a larger amount of light from regions above and below the focal plane will be captured by each pixel (TRUSK, 2011). Conventional optical sectioning microscopes (*wide-field*) have disadvantages compared to confocal microscopes, one of which is that light emitted by objects above and below the focal plane is captured

indiscriminadamente e entra na composição de cada seção óptica, reduzindo a resolução lateral e a discriminação da profundidade. Microscópios confocais são capazes de reduzir a quantidade de luz fora de foco que atinge o fotomultiplicador, por meio de um *pinhole*, aumentando, dessa forma, a resolução lateral e a discriminação de profundidade, como ilustrado na Figura 2.10 (CONCHELLO; LICHTMAN, 2005; MERCHANT, 2008).



**Figura 2.10: Processo de imageamento de uma seção óptica por um microscópio confocal. A luz fluorescente emitida do plano focal (linha sólida) percorre o conjunto óptico e passa pelo *pinhole*, alcançando assim o fotomultiplicador. Já a luz fluorescente emitida de regiões distâtes do plano focal atravessa o conjunto óptico, mas não atinge o fotomultiplicador. Figura adaptada de (CONCHELLO; LICHTMAN, 2005).**

Algoritmos de deconvolução computacional podem ser utilizados para remover a informação fora de foco de imagem 2D nos microscópios *wide-field*. Quando utilizado para coletar dados 3D o microscópio *wide-field* é denominado microscopia de deconvolução ou microscopia de seccionamento óptico computacional (MERCHANT, 2008). No caso dos microscópios confocais é possível utilizar técnicas de deconvolução, porém não é necessário.

Técnicas de microscopia óptica convencionais iluminam o espécime como um todo, porém, em algumas aplicações é necessário observar apenas uma região específica do espécime. Pode-se ter interesse, por exemplo, em imagear exclusivamente um tipo específico de célula, o núcleo de uma célula, um gene, ou apenas a arborização de dendritos. O desenvolvimento de técnicas de fluorescência permite utilizar a propriedade que algumas moléculas possuem de, quando excitadas por uma fonte de luz de um determinado comprimento de onda, emitir luz em um comprimento de onda diferente. Essas moléculas, denominadas fluorocromos, funcionam como corantes fluorescentes e se ligam a estruturas celulares específicas permitindo imagear exclusivamente as estruturas de interesse (MERCHANT; PERIASAMY, 2008). A Figura 2.11 mostra as faixas dos comprimentos de

onda de absorção de alguns fluorocromos, as faixas de comprimento de onda das luzes emitidas, assim como as faixas dos filtros de excitação e de barreira utilizados pelo microscópio para imagear os fluorocromos.

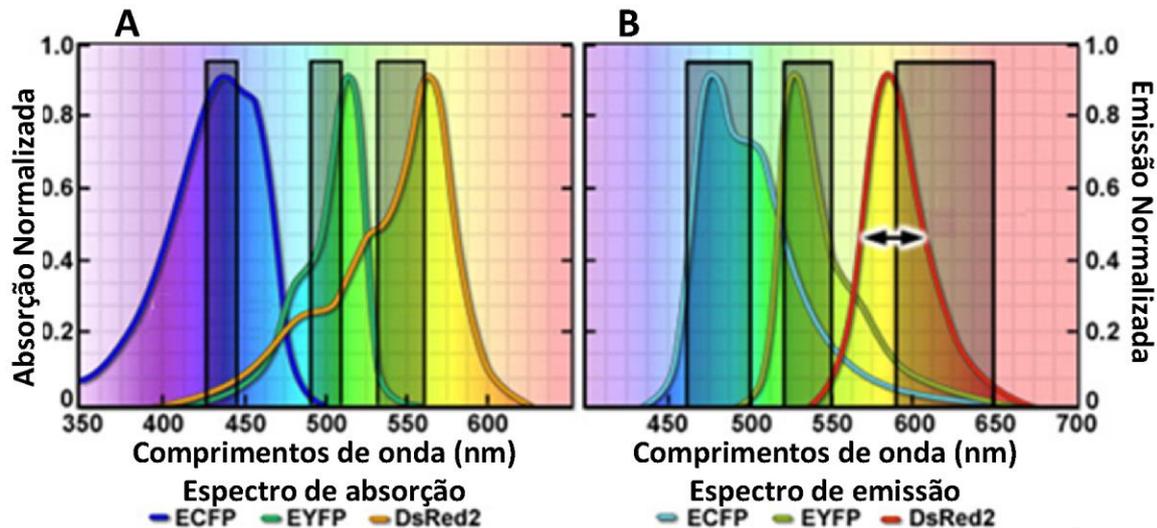


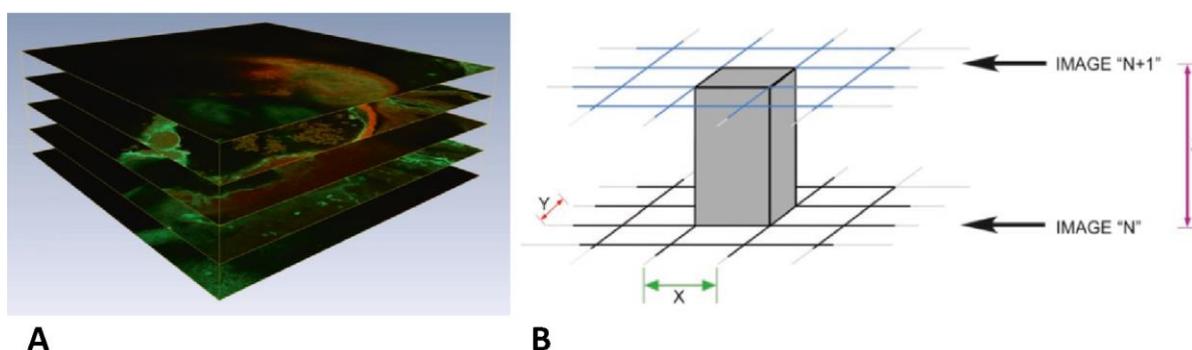
Figura 2.11: Comprimentos de onda de excitação e emissão para três tipos de fluorocromos: *enhanced cyan protein* (ECFP), *yellow fluorescent protein* (EYFP) e *red fluorescence protein* (DsRed2). (A) Os comprimentos de onda absorvidos pelos fluorocromos são representados pelas linhas coloridas e os comprimentos de onda selecionados pelos filtros de excitação são representados pelas barras em cinza. (B) Quando excitados pelos comprimentos de onda adequados, os fluorocromos emitem radiação em comprimento de onda diferente, mostrados em (B) juntamente com os filtros de barreira utilizados para impedir que comprimentos de onda diferentes dos emitidos pelo fluorocromo utilizado sejam capturados. Figura adaptada de (DICKINSON; DAVIDSON, 2013).

Na Figura 2.11, ainda é possível observar o efeito de *crosstalk*, quando os comprimentos de onda de emissão de dois fluorocromos se sobrepõem, tornando mais difícil ou até mesmo impossível separar os canais específicos em estudos envolvendo múltiplos fluorocromos (DICKINSON; DAVIDSON, 2013).

### 2.3.2 Processamento de imagens 3D

Para o processamento dos dados 3D na forma de uma pilha de seções ópticas, obtidos por meio de microscopia, duas abordagens são consideradas. A primeira consiste em processar cada seção óptica, na forma de uma imagem 2D, individualmente. A segunda consiste em reconstruir tridimensionalmente a série-z alongando-se os pixels das seções ópticas na direção do eixo-z, preenchendo os espaços entre elas. Dessa forma, expande-se o conceito 2D de pixel para o conceito 3D de voxel (elemento de volume – em inglês *volume*

element), gerando uma imagem 3D, também denominada imagem volumétrica (TRUSK, 2011), como ilustrado na Figura 2.12. O processamento e análise são realizados sobre a imagem digital 3D, representada como um arranjo tridimensional de voxels, em que cada voxel possui tamanho físico  $\eta_x$ ,  $\eta_y$  e  $\eta_z$ . As dimensões  $\eta_x$  e  $\eta_y$  representam o tamanho do voxel ao longo dos eixos x e y, respectivamente, e equivalem às dimensões dos pixels na seção óptica. Já a dimensão  $\eta_z$  corresponde ao tamanho do voxel ao longo do eixo z, é equivalente à distância entre seções ópticas adjacentes e é definida no momento da aquisição das imagens. Entretanto, em microscopia 3D a dimensão ao longo do eixo z,  $\eta_z$ , costuma ser maior do que  $\eta_x$  e  $\eta_y$  (MERCHANT, 2008; TRUSK, 2011).



**Figura 2.12:** Ilustração do processo de construção de uma imagem volumétrica (3D) a partir de uma série-z. (A) A série-z na forma de uma sequência de seções-planares empilhadas. (B) A construção dos voxels que ocorre pelo alongamento dos pixels das seções ópticas adjacentes. Figura adaptada de (TRUSK, 2011).

Wearne *et al.* (WEARNE *et al.*, 2005) investigou a morfologia da estrutura de dendritos (padrões de bifurcação e geometria dos *spines*), em que a degradação fisiológica pode refletir em algumas doenças nervosas. Para realizar esse trabalho, os autores desenvolveram técnicas tridimensionais capazes de analisar variações nas estruturas globais e locais da rede de neurônios; assim como reconstruir a morfologia dos neurônios a partir de imagens volumétricas obtidas por microscopia confocal de varredura a laser. As técnicas e métodos foram aplicados a culturas de neurônios piramidais CA3 do hipocampo de camundongos.

Bjornsson *et al.* (BJORNSSON *et al.*, 2008) descrevem um método para delinear e classificar estruturas chave em imagens volumétricas de tecido extraído do cérebro de ratos e imageados por microscopia confocal. A ferramenta desenvolvida permite a visualização das superfícies e análise quantitativa, considerando medidas intrínsecas (posição espacial, tamanho, morfologia das células, comprimento e padrões de bifurcação dos neuritos, diâmetro

dos vasos sanguíneos, área da superfície das membranas, etc.), entretanto o foco do estudo foi em fatias de tecido cerebral e não em culturas. Os parâmetros foram aplicados para classificar astrócitos, micróglia, células do endotélio, assim como o relacionamento entre elas.

## 2.4 Processamento e Análise de Imagens de Microscopia

Nesta seção são apresentadas algumas das principais técnicas e algoritmos de processamento de imagens utilizados pelos métodos propostos nesta tese e descritos no Capítulo 3. A maior parte dos algoritmos podem ser aplicados tanto para imagens 2D quanto para imagens 3D.

Em termos da representação computacional de imagens digitais, uma imagem é uma matriz bidimensional regular, em que cada elemento recebe a denominação de pixel (elemento da imagem – em inglês *picture element*). Nas imagens monocromáticas, ou em níveis de cinza, cada pixel contém um atributo escalar que define a sua intensidade, ou luminescência. Em imagens coloridas todos os pixels armazenam uma tripla de atributos escalares que definem a cor do pixel de acordo com algum esquema de codificação, como RGB ou HSV (TELEA, 2007). A representação das imagens 2D pode ser facilmente expandida para armazenar imagens 3D. A Figura 2.13 mostra a representação digital de uma imagem 2D e de uma imagem 3D.

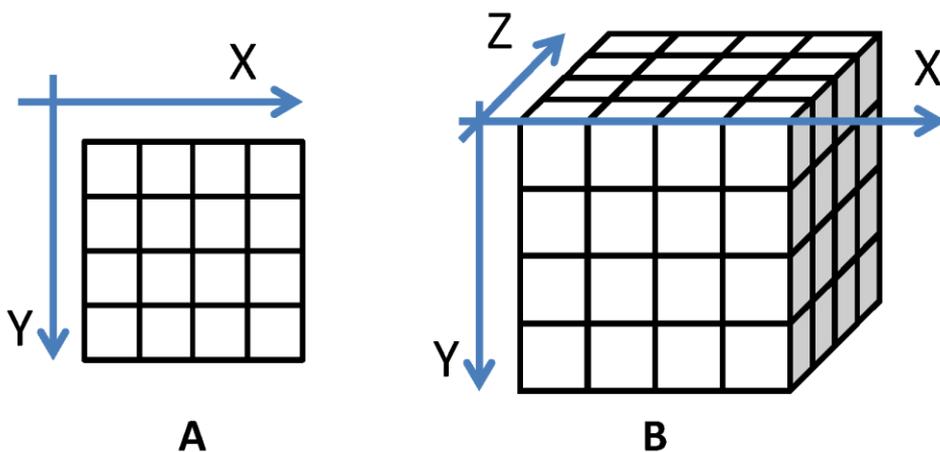


Figura 2.13: Representação de imagens digitais. (A) Imagem digital 2D. (B) Imagem digital 3D.

## 2.4.1 Pré-processamento e Correção de Imagens

Pode ser necessário aplicar uma etapa de pré-processamento sobre as imagens de microscopia a fim de reduzir o ruído e corrigir imperfeições que eventualmente possam dificultar, ou até mesmo impedir, o processamento das imagens, assim como, levar a resultados imprecisos. O próprio processo de imageamento pode inserir ruído nas imagens, e a resolução espacial pode não ser a mais adequada, principalmente ao longo do eixo-z. A aquisição de imagens de alta qualidade por meio de microscopia confocal de fluorescência exige que a cultura seja exposta a laser com alta intensidade e aquisições com alta resolução aumentam o tempo da exposição. Nesse caso, a cultura pode vir a sofrer danos pela fototoxicidade ao ser exposta ao laser por longo período. Existe também o problema do *photobleaching*, em que a capacidade de emitir luz fluorescente em resposta à excitação dos fluorocromos se perde ao longo da aquisição. Nesta seção são descritos alguns métodos de pré-processamento das imagens, utilizados com o objetivo de reduzir o ruído e corrigir informações indesejadas nas imagens decorrentes das escolhas realizadas durante a aquisição.

### 2.4.1.1 Filtragem espacial

Filtros espaciais consideram o uso de uma máscara espacial para processar imagens e realçar características de interesse (GONZALEZ; WOODS, 2007). Os filtros denominados passa-altas atenuam os componentes de baixa frequência e aguçam bordas e outros detalhes finos. Os filtros denominados passa-baixas atenuam os elementos de alta frequência, como bordas e detalhes finos na imagem e, por esse motivo são frequentemente utilizados para redução do ruído. Já os filtros passa-faixas combinam características dos filtros passa-altas e passa-baixas selecionando regiões de frequências específicas da imagem. A seguir são apresentados três filtros passa-baixas utilizados para reduzir o ruído em imagens. O tamanho da máscara é determinante no nível de suavização e borramento imposto sobre a imagem processada. A maioria dos filtros espaciais pode ser facilmente estendida para imagens volumétricas 3D. A Figura 2.14 mostra a relação entre máscaras com tamanhos: 3x3, 5x5, e 7x7 em uma imagem 2D.

**Filtragem pela média.** A filtragem pela média consiste em somar os valores dos pixels localizados dentro da máscara e dividir o resultado pela quantidade de pixels englobados pela máscara. Consequentemente, o novo valor atribuído ao pixel central corresponde à média dos pixels dentro da máscara (GONZALEZ; WOODS, 2007). A Figura 2.15 mostra uma imagem e o resultado da filtragem pela média utilizando uma máscara 3x3.

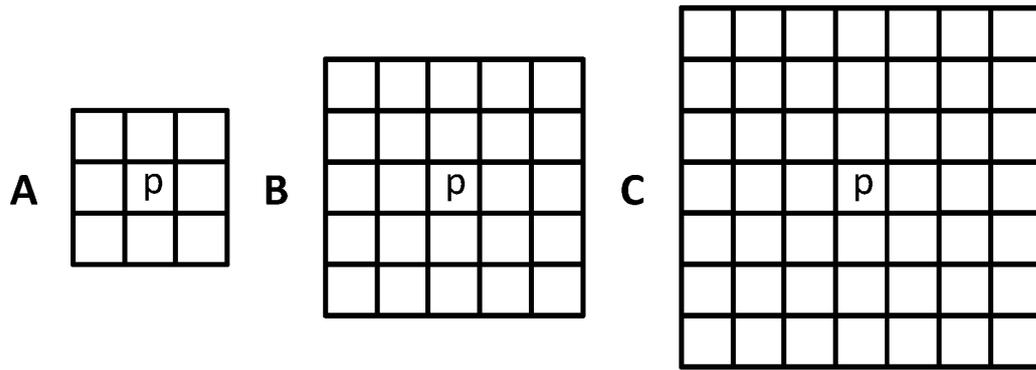


Figura 2.14: Máscaras de vizinhança consideradas para aplicação de filtros espaciais. No caso dos filtros passa-baixas, quanto maior a máscara, maior será a atenuação do ruído e consequentemente o borramento. (A) Máscara de tamanho 3x3. (B) Máscara de tamanho 5x5. (C) Máscara de tamanho 7x7. O elemento central da máscara está localizado sobre o pixel filtrado  $p$ .

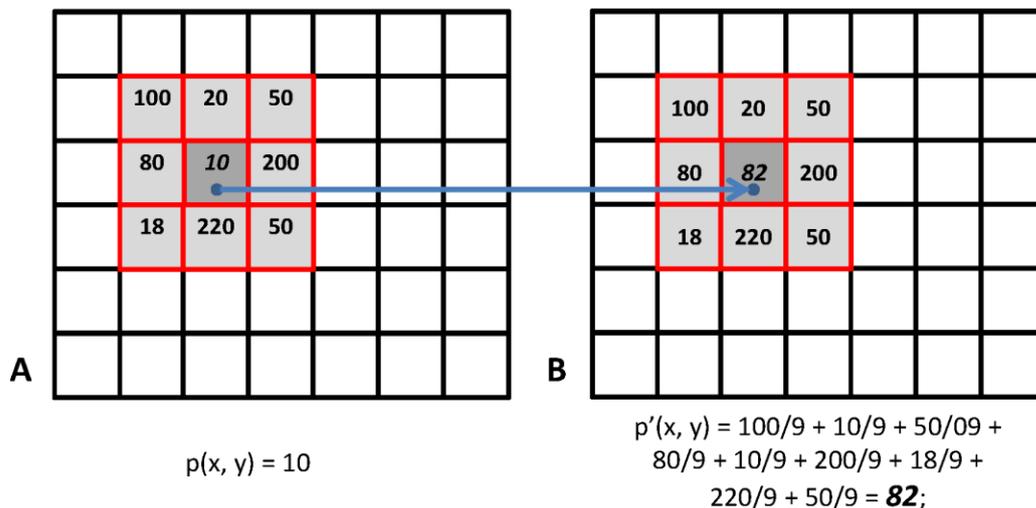


Figura 2.15: Ilustração da filtragem pela média sobre uma imagem em níveis de cinza. (A) Imagem original antes da filtragem do pixel  $p = 10$ . Os pixels com bordas vermelhas representam a máscara 3x3 centralizada no pixel  $p$ . (B) Após a filtragem, o valor de  $p$  é substituído pela média dos pixels na vizinhança definida pela máscara.

**Suavização Gaussiana.** A filtragem por Suavização Gaussiana remove o ruído de alta-frequência por meio da convolução da imagem original com uma função Gaussiana,  $G(i, j)$ , definida pela Equação (2.2) (COSTA; CESAR-JR., 2000),

$$G(i, j) = \exp\left(-\frac{i^2 + j^2}{2a^2}\right) \quad (2.2)$$

em que  $a$  é o parâmetro de espalhamento, ou escala, da Gaussiana. Conforme o parâmetro de escala aumenta, a Gaussiana se torna maior no espaço aumentando, dessa forma, o efeito de borramento e suavização na imagem (COSTA; CESAR-JR., 2000).

**Filtragem pela mediana.** As filtrações pela média e por suavização gaussiana reduzem o ruído, entretanto podem borrar detalhes da imagem, como bordas por exemplo. A filtragem pela mediana é capaz de reduzir o ruído e ao mesmo tempo preservar a forma original dos objetos (GONZALEZ; WOODS, 2007). Uma máscara é definida com centro no pixel  $p$ . A mediana dos valores dos pixels contidos nessa máscara é calculada e o resultado é atribuído àquele pixel. O cálculo da mediana envolve a ordenação dos valores dos pixels dentro da máscara e toma-se o elemento central da lista ordenada.

**Filtro de Médias Não Locais.** O algoritmo de médias não locais consiste em estimar o valor de cada pixel,  $i$ , de uma imagem ruidosa,  $I$ , baseado na média ponderada de todos os pixels,  $j$ , da imagem (BUADES *et al.*, 2005), conforme a Equação 2.3.

$$NL[v](i) = \sum_{j \in I} w(i, j)v(j) \quad (2.3)$$

em que os pesos  $\{w(i, j)\}_j$  dependem da similaridade entre os pixels  $i$  e  $j$ . A similaridade entre os pixels  $i$  e  $j$  é medida de acordo com a distância Euclidiana ponderada considerando as vizinhanças quadradas com centros nos pixels  $i$  e  $j$ , denotadas por  $N_i$  e  $N_j$ , respectivamente.

Os pesos são definidos pela Equação 2.4. Quanto maior a semelhança entre as vizinhanças dos pixels  $i$  e  $j$  ( $I(N_i)$  e  $I(N_j)$  respectivamente) maior serão os pesos (BUADES *et al.*, 2005).

$$w(i, j) = \frac{1}{Z(i)} e^{-\left(\|I(N_i) - I(N_j)\|_{2,a}^2\right)/h^2}, \quad (2.4)$$

em que  $a > 0$  é o desvio padrão do kernel Gaussiano,  $h$  é um parâmetro de filtragem e  $Z(i)$  é uma constante de normalização definida pela Equação 2.5.

$$Z(i) = \sum_j e^{-\left(\|I(N_i) - I(N_j)\|_{2,a}^2\right)/h^2}, \quad (2.5)$$

Basicamente o filtro de médias não locais, não considera apenas a vizinhança direta do pixel que está sendo processado, mas também considera a média de todos os pixels da

imagem cujas vizinhanças gaussianas mais se assemelham à vizinhança do próprio pixel (BUADES *et al.*, 2005).

#### 2.4.1.2 Melhoria do Contraste

O histograma de uma imagem em níveis de cinza pode ser computado como uma função,  $p(r_k)$ , definida pela Equação (2.6),

$$p(r_k) = \frac{n_k}{n} \quad (2.6)$$

em que  $n_k$  é o número de ocorrências de pixel com nível de cinza  $r_k$  e  $n$  é o número total de pixels na imagem. O histograma de uma imagem reflete a probabilidade da ocorrência de um determinado nível de cinza nos pixels de uma imagem e fornece informações sobre o contraste da imagem (GONZALEZ; WOODS, 2007).

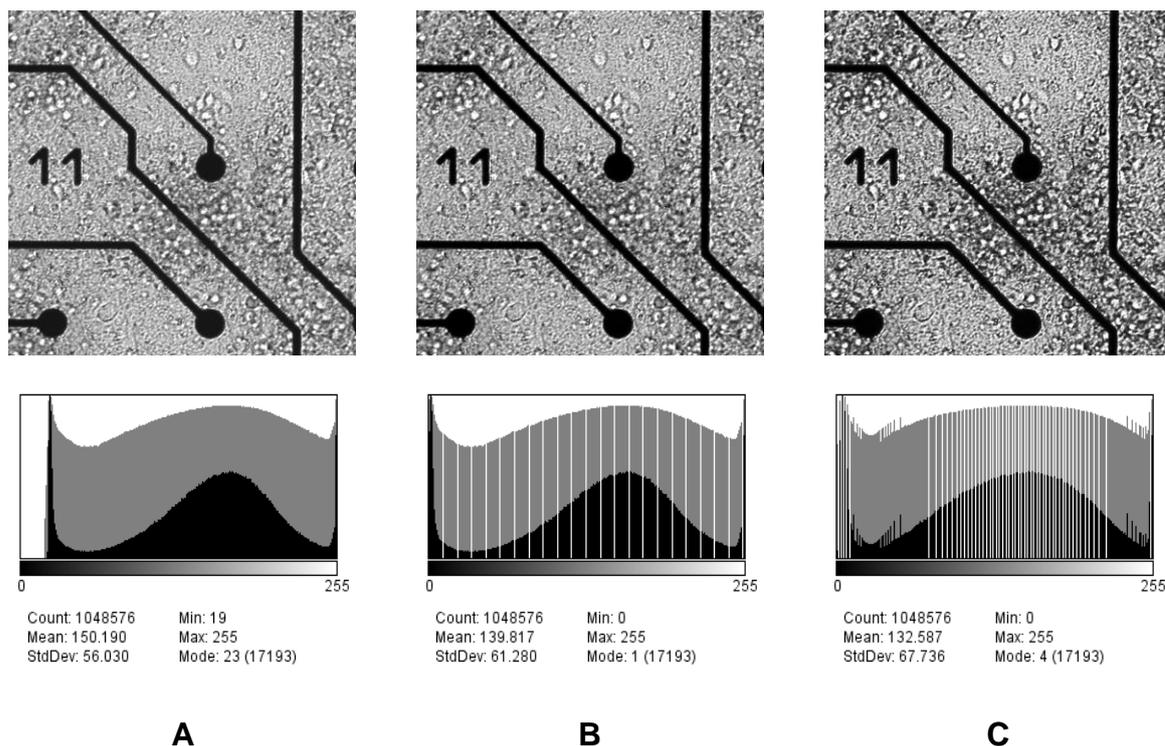
**Normalização de Histograma.** A forma mais simples de melhorar o contraste em uma imagem é por meio da normalização do seu histograma. A normalização do histograma faz com que a informação de intensidade dos pixels seja distribuída ao longo de toda a faixa de valores válida para aquela imagem. Por exemplo, [0, 255] em imagens de 8 bits (TELEA, 2007). Isso é realizado por meio da Equação (2.7),

$$I'(x) = \frac{x - I_{\min}}{I_{\max} - I_{\min}} \quad (2.7)$$

em que  $I_{\min}$  é a menor intensidade da imagem original e  $I_{\max}$  é a maior.

**Equalização de Histograma.** A equalização do histograma melhora o contraste das imagens por meio da transformação de uma imagem original  $I$  em uma imagem  $I'$  em que os valores de intensidade possuem aproximadamente o mesmo número de pixels (TELEA, 2007).

A Figura 2.16 mostra uma imagem original, processada por normalização e por equalização do histograma, todas acompanhadas dos respectivos histogramas. Utilizou-se o *software* ImageJ (ABRÀMOFF, 2004) para gerar as imagens.



**Figura 2.16:** Melhoria do contraste da imagem por normalização e equalização do histograma. A linha superior mostra a imagem e a linha inferior o respectivo histograma. A parte cinza do histograma está representada em escala logarítmica (A) Imagem original. (B) Resultado da normalização do histograma da imagem original. Note que toda a faixa de valores de intensidades está preenchida com pixels, diferente do que ocorre em (A). (C) Resultado da equalização do histograma da imagem original. Note que a distribuição dos pixels ao longo dos níveis de intensidade é mais constante do que em (A) e (B). Uma distribuição de pixels constante é difícil de alcançar em imagens discretas (TELEA, 2007).

### 2.4.1.3 Filtragem no Domínio de Anscombe

O ruído presente nas imagens obtidas por meio de microscopia confocal pode ser modelado por meio de uma combinação de ruído Poisson e ruído Gaussiano (COUPÉ *et al.*, 2012). O ruído Poisson é decorrente da baixa contagem de fótons que atingem o detector, enquanto que o ruído Gaussiano decorre do ruído eletrônico do detector (COUPÉ *et al.*, 2012).

A transformada de Anscombe (ANSCOMBE, 1948) possibilita transformar o ruído dependente do sinal em ruído Gaussiano independente do sinal. A transformada de Anscombe de uma imagem,  $I$ , é definida pela Equação (2.8).

$$I' = 2\sqrt{I + \frac{3}{8}} \quad (2.8)$$

em que  $I'$  é a imagem no domínio de Anscombe.

Após a aplicação de algum algoritmo para filtragem de ruído independente do sinal (como algum dos mostrados na Seção 2.4.1.1) sobre a imagem  $I'$ , denotada aqui por  $F(I')$ , deve-se aplicar a transformada inversa de Anscombe, definida pela Equação (2.9), para que se obtenha a estimativa da imagem original sem o ruído.

$$I_{inv} = \left( \frac{F(I')}{2} \right)^2 - \frac{3}{8} \quad (2.9)$$

Em que  $I_{inv}$  é a imagem resultante da filtragem do ruído no domínio de Anscombe. Ambas as transformadas, adiante e inversa, de Anscombe são simples e independente de parâmetros. (COUPÉ *et al.*, 2012).

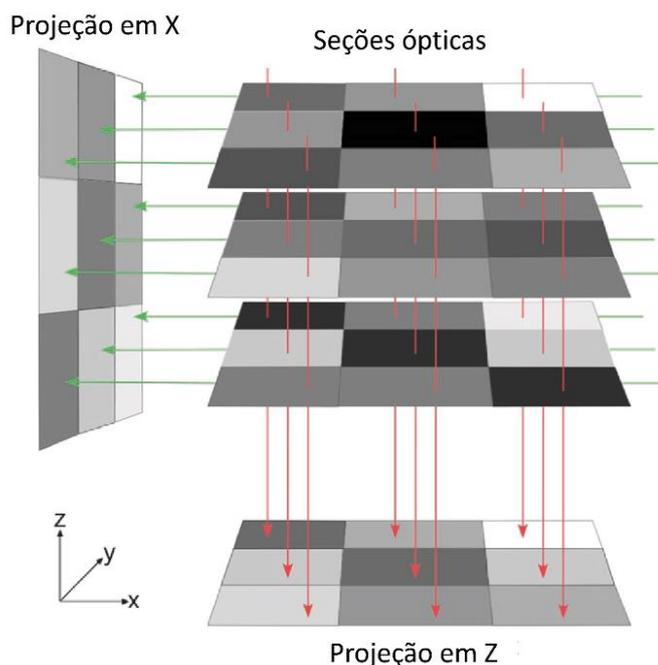
#### 2.4.1.4 Projeção de Intensidades (Fusão de imagens)

A fusão de imagens por projeção de intensidades, no contexto de microscopia tridimensional, é uma forma de reconstruir uma imagem 2D a partir de uma imagem 3D. Os métodos mais simples de realizar esse tipo de reconstrução consistem em projetar as intensidades dos voxels ao longo de algum dos eixos, geralmente o eixo z, seguindo algum critério para seleção das intensidades, como ilustrado na Figura 2.17 (FORSTER *et al.*, 2004; TRUSK, 2011). Outros métodos, mais complexos, buscam identificar os voxels em foco ao longo do eixo z e projetar esse valor na imagem 2D. Esses métodos podem ser baseados na vizinhança 2D dos voxels (YEO *et al.*, 1993) ou análise de multiresolução usando Wavelets (FORSTER *et al.*, 2004).

**Fusão pontual de imagens.** A fusão pontual de imagens, ou simplesmente projeção de intensidades, consiste em gerar uma representação 2D de uma imagem volumétrica (ou série-z) a partir da projeção das intensidades ao longo do eixo-z. A projeção deve seguir algum critério para determinar quais intensidades serão projetadas, os mais comuns são:

(A) Projeção de Intensidades Máximas (MIP – *Maximum Intensity Projection*). Em que, para cada posição  $(x, y)$ , projeta-se a maior intensidade ao longo do eixo z (Equação (2.10)).

$$MIP(x, y) = \max_i I(x, y, z_i) \quad (2.10)$$



**Figura 2.17: Projeção das intensidades ao longo das seções ópticas de uma série-z. Na figura é possível observar uma projeção realizada ao longo do eixo-z (vermelho) e do eixo-x (verde).  
Figura adaptada de (TRUSK, 2011).**

(B) Projeção de Intensidades Mínimas (MinIP – *Minimum Intensity Projection*). Semelhante ao método MIP, entretanto seleciona-se a menor intensidade ao longo de z para ser projetada (Equação (2.11)).

$$\text{MinIP}(x, y) = \min_i (x, y, z_i) \quad (2.11)$$

(C) Projeção de intensidades médias (AvgIP – *Average Intensity Projection*). Calcula-se a média aritmética de todos os voxels na mesma posição (x, y) ao longo do eixo-z (Equação (2.12)).

$$\text{AvgIP}(x, y) = \frac{1}{Z} \sum_{i=1}^z I(x, y, z_i) \quad (2.12)$$

(D) Projeção de intensidades médias considerando apenas valores diferentes de zero. Funciona como o AvgIP, porém desconsidera os voxels com valor igual a zero no cálculo da média.

O MIP é mais adequado quando os objetos de interesse são representados pelos pixels com maior intensidade, já o MinIP é mais adequado quando os objetos de interesse possuem menor intensidade (próximos do preto). Tanto o MIP quanto MinP podem aguçá-lo o ruído presente nas imagens, por esse motivo devem ser utilizados em conjunto com algum método para redução do ruído. O AvgIP é menos afetado pelo ruído, entretanto, para certas aplicações o método não é suficiente para visualizar todos os objetos na imagem.

**Fusão de imagens baseada na vizinhança mais próxima.** Esse método consiste em projetar os pixels  $(x, y)$  selecionados a partir da seção óptica em foco. Uma forma de determinar, para cada posição  $(x, y)$ , qual é a seção óptica que possui melhor foco é por meio do cálculo da variância. O método da variância pressupõe que as informações mais importantes sobre o espécime estão nas seções em foco, dessa forma a variância sobre uma máscara de tamanho  $3 \times 3$  é calculada sobre todas as posições  $(x, y)$  ao longo das  $z$  seções ópticas. O pixel com a maior variância é projetado e passa a fazer parte da imagem 2D reconstruída.

#### 2.4.1.5 Interpolação de Imagens

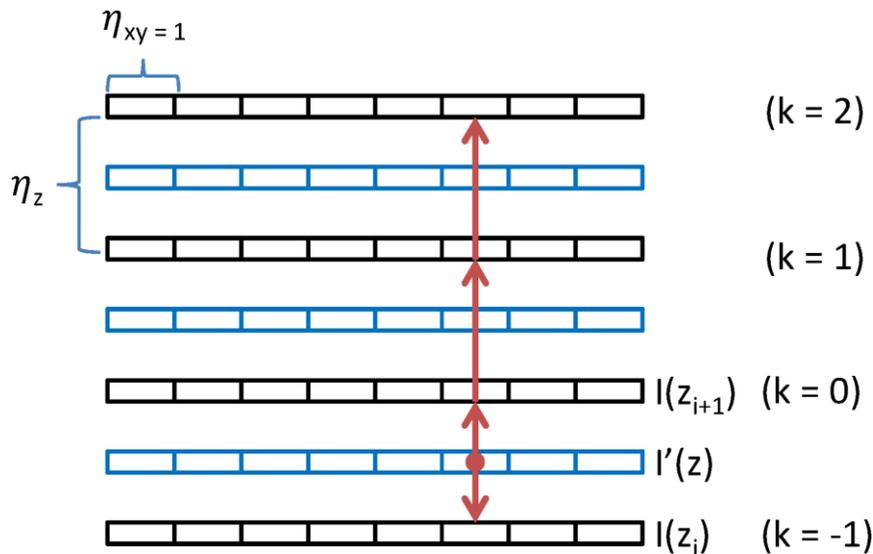
As imagens geradas por microscopia confocal apresentam, geralmente, resolução menor ao longo do eixo- $z$  do que ao longo dos eixos  $x$  e  $y$ , conforme discutido na Seção 0. Isso ocorre devido à própria assimetria da função de espalhamento pontual do microscópio, como também pelo imageamento utilizando *fast-z scanning*, ou seja, quando a varredura do espécime é realizada em intervalos maiores ao longo do eixo  $z$  para, dessa forma, evitar danos à cultura e o efeito de *photobleaching*. Em muitas aplicações, a série- $z$  adquirida, assim como a imagem volumétrica correspondente, precisa ser corrigida computacionalmente antes de aplicar rotinas de processamento, visualização e análise quantitativa (INDHUMATHI *et al.*, 2009).

As técnicas de interpolação buscam restaurar o aspecto cúbico dos voxels e podem ser classificadas em duas categorias: interpolação baseada em formas (GREVERA; UDUPA, 1996) e interpolação baseada em intensidades (THÉVENAZ *et al.*, 2000; PAN *et al.*, 2012). Na primeira categoria, interpolam-se informações diretamente relacionadas com os objetos presentes nas imagens, já nas técnicas baseadas em intensidades a interpolação é resultado direto dos valores de intensidades dos próprios voxels. Técnicas de interpolação baseadas em intensidades incluem: interpolação por vizinhos mais próximos, interpolação tri-linear, tri-cúbica, Splines, entre outras (INDHUMATHI *et al.*, 2012).

A interpolação de imagens volumétricas considera como entrada uma série-z,  $I$ , com tamanho  $N \times N \times M$ , em que  $I(x_i, y_j, z_k)$  representa a intensidade do pixel na posição  $(x_i, y_j)$  localizado na seção óptica  $z_k$ . A dimensão lateral dos pixels (tamanho ao longo dos eixos X e Y) é definida como  $\eta_x$  e  $\eta_y$  e a distância entre seções ópticas adjacentes é  $\eta_z$ . Em séries-z adquiridas por microscopia confocal,  $\eta_z$ , costuma ser maior do que  $\eta_x$  e  $\eta_y$ , gerando um efeito anisotrópico na imagem. O objetivo dos métodos de interpolação é obter uma imagem  $I'$  com as mesmas dimensões da imagem original,  $I$ , porém com  $\eta_x = \eta_y = \eta_z$ . Considerando  $\eta$  a razão de amostragem de  $I$  e definida pela Equação (2.13),

$$\eta = \frac{\eta_z}{\eta_{xy}} \tag{2.13}$$

em que  $\eta_{xy}$  representa as dimensões laterais  $\eta_x$  ou  $\eta_y$ , uma vez que os dois valores são iguais. Observa-se que é necessário gerar  $(\eta - 1)$  seções ópticas entre cada par de seções ópticas adjacentes na imagem original,  $I$ . A Figura 2.18 ilustra, de forma simplificada, o processo de geração do voxel  $I'(z)$  por meio da interpolação dos pixels nas seções adjacentes.



Para  $L = 2, k = (-1, 0, 1, 2)$

**Figura 2.18:** Processo de reamostragem por interpolação de uma imagem ao longo do eixo-z para restauração do aspecto cúbico dos voxels. As linhas em preto são as seções ópticas originais da imagem e as linhas azuis são geradas por interpolação.

**Vizinhos mais próximos:** A interpolação por vizinhos mais próximos consiste em definir o valor dos novos pixels (voxels) pelo valor do pixel mais próximo (GETREUER, 2011). A função de interpolação por vizinhos mais próximos é dada pela Equação (2.14).

$$\varphi(z) = \begin{cases} 1, & 0 \leq |z| < 0,5 \\ 0, & \text{caso contrário} \end{cases} \quad (2.14)$$

**Tri-Linear:** Consiste em combinar os 8 vizinhos mais próximos do voxel a ser inserido (vizinhança  $2 \times 2 \times 2$ ) (GETREUER, 2011). A função de interpolação é dada pela Equação (2.15):

$$\varphi(z) = \begin{cases} 1 - |z|, & 0 \leq |z| < 1 \\ 0, & \text{caso contrário} \end{cases} \quad (2.15)$$

**Tri-Cúbica:** É uma extensão da interpolação cúbica para o espaço 3D (GETREUER, 2011). Consiste em combinar as informações dos 64 voxels mais próximos (vizinhança  $4 \times 4 \times 4$ ) para obter o valor dos que serão inseridos. A função de interpolação é dada pela Equação (2.16).

$$\varphi(z) = \begin{cases} (a+2)|z|^3 - (a+3)|z|^2 + 1, & |z| \leq 1 \\ a|z|^3 - 5a|z|^2 + 8a|z| - 4a, & 1 < |z| < 2 \\ 0, & \text{caso contrário} \end{cases} \quad (2.16)$$

**Splines:** A interpolação por B-Spline (UNSER *et al.*, 1991; INDHUMATHI *et al.*, 2012) realiza a convolução da imagem I com uma máscara de interpolação  $\varphi$ , em que  $\varphi$  é a função B-Spline definida pela Equação (2.17).

$$\varphi(z) = \begin{cases} \frac{1}{2}|z^3| - |z^2| + \frac{2}{3}, & \text{para } 0 \leq |z| < 1 \\ -\frac{1}{6}|z^3| + |z^2| - 2|z| + \frac{4}{3}, & \text{para } 1 \leq |z| < 2 \\ 0, & \text{caso contrário} \end{cases} \quad (2.17)$$

Indhumathi *et al.* (INDHUMATHI *et al.*, 2012) propuseram um algoritmo baseado no B-Spline cúbico que proporciona maior precisão quando interpola regiões de alta frequência nas imagens, assim como diminui o custo computacional do algoritmo utilizando *lookup tables* (LUT).

#### 2.4.1.6 Correção de Atenuação do Sinal de Fluorescência

Um dos problemas com imagens de microscopia confocal é a variação da luz ao longo do eixo z do espécime (ADIGA; CHAUDHURI, 2001). A atenuação do sinal ao longo do eixo z ocorre devido à dispersão e absorção sofrida pela luz no trajeto entre a fonte de luz e o detector, passando pela região do espécime que está sendo imageada (GUAN *et al.*, 2008). Outro fenômeno que afeta a variação do sinal é o efeito de *photobleaching*, que corresponde à perda da capacidade do fluorocromo de emitir luz em resposta à excitação (ADIGA; CHAUDHURI, 2001).

Adiga e Chaudhuri (ADIGA; CHAUDHURI, 2001) propuseram um método simples para corrigir computacionalmente o decaimento do sinal de fluorescência com base na seção óptica que apresenta a maior intensidade média. O método computa a intensidade média,  $I' = \{I'_1, I'_2, I'_3, \dots, I'_n\}$  para todas as n seções ópticas da série-z.

Considera-se como imagem de referência a seção óptica com a maior intensidade média,  $I'_i$ , ou seja,  $I'_i \geq I'_j$ , para  $j = 1, \dots, n$ . É necessário considerar também que a intensidade média é computada apenas sobre os pixels de objetos, dessa forma, é necessário aplicar algum método de segmentação ou classificação para definir quais os pixels, em cada seção óptica, pertencem ao fundo da imagem e quais pertencem aos objetos. A diferença entre a intensidade da seção óptica de referência,  $I'_i$ , e a intensidade média de todas as seções ópticas  $I'_j$  é calculada de acordo com a Equação (2.18).

$$\beta_k = |I'_i - I'_k|, \quad \text{para } k = 1, \dots, n \quad (2.18)$$

Dessa forma, todos os pixels de objetos  $I(x, y, z)$  nas seções ópticas tem seus níveis de cinza atualizados de acordo com o parâmetro  $\beta_k$ , pela Equação (2.19),

$$I'(x, y, z) = I(x, y, z) + c\beta_k \quad (2.19)$$

em que  $c$  é uma constante definida experimentalmente, sendo que o valor utilizado pelo autor é 1. O autor aponta que uma das desvantagens do método é a perda de sensibilidade dos pixels, principalmente no que diz respeito ao detalhamento de estruturas internas. Entretanto, assim como no trabalho dos autores (ADIGA; CHAUDHURI, 2001), o presente trabalho também busca identificar características relacionadas com a morfologia das células. A Figura 2.19 (gráfico à esquerda) mostra a distribuição da fluorescência nos pixels de objeto ao longo do eixo-z das imagens antes da correção, e na Figura 2.19 (gráfico à direita) na imagem após a correção.

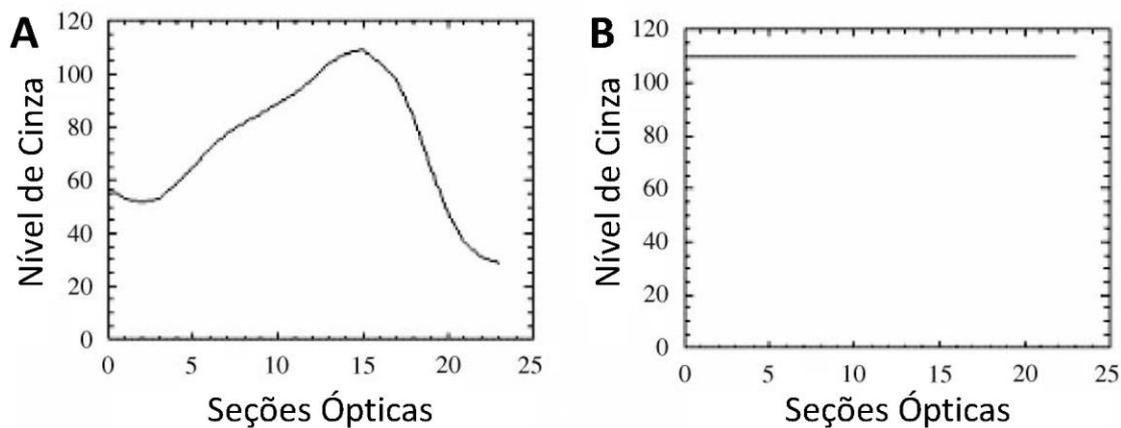


Figura 2.19: Correção da atenuação do sinal de fluorescência ao longo do eixo z realizado pelo método de Adiga e Chaudhuri. (A) Distribuição da média das intensidades dos pixels de objeto ao longo do eixo-z antes da correção. (B) Mostra a distribuição após a correção. Adaptado de (ADIGA; CHAUDHURI, 2001).

## 2.4.2 Segmentação de Imagens

O processo de segmentação de imagens consiste em dividir os pixels de uma imagem em pixels de objetos (*foreground*) e pixels de fundo (*background*). Grupos conectados de pixels pertencentes a um mesmo objeto são denominados componentes conectados (GONZALEZ; WOODS, 2007; TELEA, 2007).

A segmentação por limiarização separa os pixels de objeto dos pixels de fundo em uma imagem de intensidades,  $I$ , por meio da definição de um limiar  $T$ , de forma que os pixels com intensidade menor ou igual a  $T$  sejam rotulados com 0 e os maiores rotulados com 1, como mostra a Equação (2.20),

$$B(x, y) = \begin{cases} 1, & , se I(x, y) > T \\ 0, & , se I(x, y) \leq T \end{cases} \quad (2.20)$$

em que  $B$  é a imagem binária resultante. Quando o valor de  $T$  é o mesmo para todos os pixels da imagem a abordagem é denominada limiar global, já quando  $T$  varia de acordo com alguma propriedade do pixel  $p$  que está sendo processado tem-se o limiar dinâmico (GONZALEZ; WOODS, 2007; GONZALEZ *et al.*, 2009).

Métodos baseados em agrupamento (*clustering*) são utilizados para segmentação de imagens por meio da classificação não supervisionada dos vetores de características que representam cada um dos pixels das imagens (JAIN *et al.*, 1999). Os algoritmos k-means (DUDA *et al.*, 2000) e fuzzy C-means (BEZDEK, 1981) são dois algoritmos de agrupamento muito utilizados para essa tarefa.

#### 2.4.2.1 O método de Otsu

O método de Otsu (OTSU, 1979) baseia-se no histograma da imagem para definir um limiar  $k$  que maximiza a variância entre as classes de pixels (GONZALEZ; WOODS, 2007). Primeiro, o método calcula o histograma normalizado da imagem. Seja  $L$  o número total de valores que os pixels podem assumir, o algoritmo de Otsu define um limiar  $k$  que define dois grupos, sendo  $C_0$  o conjunto de pixels que possuem níveis de cinza  $[0, 1, \dots, k-1]$ , e  $C_1$  é o conjunto de pixels com níveis de cinza  $[k, k+1, \dots, L-1]$ . A escolha de  $k$  é realizada de forma a maximizar a variância entre as classes,  $\sigma_B^2$ , por meio da Equação (2.21),

$$\sigma_B^2 = \omega_0(\mu_0 - \mu_T)^2 + \omega_1(\mu_1 - \mu_T)^2$$

em que:

$$\begin{aligned} \omega_0 &= \sum_{q=0}^{k-1} p_q(r_q) \\ \omega_1 &= \sum_{q=k}^{L-1} p_q(r_q) \\ \mu_0 &= \sum_{q=0}^{k-1} qp_q(r_q) / \omega_0 \\ \mu_1 &= \sum_{q=k}^{L-1} qp_q(r_q) / \omega_1 \\ \mu_T &= \sum_{q=0}^{L-1} qp_q(r_q) \end{aligned} \tag{2.21}$$

em que  $p_q(r_q)$  é o histograma normalizado da imagem considerando os pixels com intensidade  $r_q$ ;  $\omega_0$  é a probabilidade de um pixel ser atribuído à classe  $C_0$  e  $\omega_1$  é a probabilidade de um pixel pertencer à classe  $C_1$ ;  $\mu_0$  é o valor médio da intensidade dos pixels atribuídos à classe  $C_0$  e similarmente,  $\mu_1$  é o valor médio dos pixels da classe  $C_1$ ; e  $\mu_T$  é o valor médio global dos pixels de toda a imagem.

### 2.4.3 Filtragem Morfológica

A morfologia matemática fornece um conjunto de operações úteis em muitas aplicações de processamento de imagens, como filtragem, segmentação e extração de características (GONZALEZ; WOODS, 2007). De maneira geral, as operações da morfologia matemática processam os objetos contidos em uma imagem de acordo com alguma comparação entre estes e um elemento estruturante (LOTUFO *et al.*, 2008). As operações de abertura por área e reconstrução morfológica (Seção 3.4.3), a transformada top-hat (Seção 3.4.1), transformada da distância, transformada h-máxima, transformada máxima estendida (*extended maxima transform*) e a transformada watershed (Seção 3.4.4) pertencem ao campo da morfologia matemática (SERRA, 1984).

#### 2.4.3.1 Dilatação e Erosão

A dilatação e a erosão morfológica constituem as operações básicas da morfologia matemática e são a base para a maioria das demais operações (GONZALEZ; WOODS, 2007). A erosão de uma imagem binária,  $A$ , por um elemento estruturante  $B$  resulta em uma imagem composta pelos pixels em  $A$  em que, quando o centro de  $B$  é posicionado sobre ele,  $B$  está contido em  $A$  (Equação (2.22)). A erosão de uma imagem resulta, geralmente, em versões reduzidas dos objetos representados na imagem,

$$A \ominus B = \{x \mid B_x \subset A\} \quad (2.22)$$

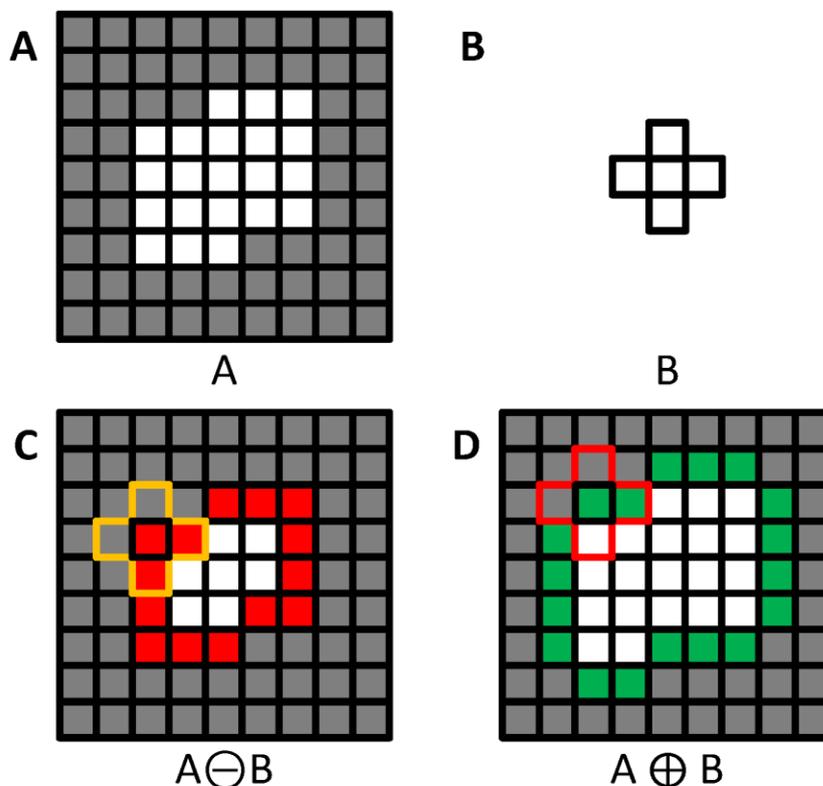
em que  $B_x$  é o resultado da translação de  $B$  pelos pixels  $x$ .

A dilatação de uma imagem binária  $A$  por um elemento estruturante  $B$  é o conjunto de todos os pixels que pertencem à intersecção entre  $A$  e  $\tilde{B}$  quando estes se sobrepõem em, pelo menos um elemento (Equação (2.23)),

$$A \oplus B = \{x \mid (\tilde{B}_x \cap A) \subset A\} \quad (2.23)$$

em que  $\tilde{B}$  é  $B$  rotacionado 180° em relação à origem. A Figura 2.20 ilustra o funcionamento das operações de erosão e dilatação em uma imagem binária: (A) Imagem binária original  $A$ , em que os pixels brancos representam os objetos; (B) O elemento estruturante  $B$ ; (C) Erosão da imagem  $A$  pelo elemento estruturante  $B$ , em que os pixels em vermelho são removidos dos

objetos em A; (D) Dilatação da imagem A por B, em que os pixels em verde passam a fazer parte dos objetos em A.



**Figura 2.20:** Ilustração das operações de erosão e dilatação morfológica. (A) Imagem original I. (B) Elemento estruturante em forma de cruz. (C) Resultado da erosão de A por B. Os pixels em vermelho foram removidos do objeto, pois o elemento estruturante não está contido em A quando o mesmo se posiciona sobre esses pixels. (D) Resultado da dilatação de A por B. Os pixels em verde são inseridos em A, pois quando B está sobre esses pixels a intersecção entre B e A não é vazia.

Muitas operações morfológicas para imagens binárias podem ser estendidas para imagens em níveis de cinza por meio do conceito de decomposição por limiar (LOTUFO *et al.*, 2008). A decomposição por limiar de uma imagem de intensidades I gera uma série de imagens binárias,  $B_t$ . Cada imagem binária,  $B_t$ , é resultado da segmentação de I utilizando um limiar  $t$  e recebe o nome de conjunto de limiar (*threshold set*). Os componentes conectados localizados em algum conjunto de limiar são chamados de “componentes de nível”. A decomposição por limiar,  $B_t(I)$ , de uma imagem de intensidades, I, é representada pela Equação (2.24).

$$B_t(I) = \{z \mid I(z) \geq t\} \quad (2.24)$$

Uma imagem pode ser caracterizada unicamente pela sua decomposição por limiar, assim como pode ser reconstruída por uma operação de reconstrução de pilha (Equação (2.25)).

$$I(x) = \max \{t \mid x \in Bt(I)\} \quad (2.25)$$

As operações de erosão e dilatação morfológica, assim como as operações descritas a seguir (abertura, fechamento, reconstrução e filtragem top-hat) podem ser aplicadas sobre imagens em níveis de cinza seguindo o procedimento a seguir: primeiramente realiza-se a decomposição por limiar dessa imagem, aplica-se a operação morfológica escolhida sobre cada conjunto de limiar individualmente, e em seguida, os conjuntos de limiar são reconstruídos por uma operação de reconstrução da pilha.

#### 2.4.3.2 Abertura e Fechamento

A abertura morfológica de uma imagem binária  $A$  por um elemento estruturante  $B$  consiste em uma erosão seguida de uma dilatação, de acordo com a Equação (2.26).

$$A \circ B = (A \ominus B) \oplus B \quad (2.26)$$

A abertura morfológica remove pontes finas entre objetos e suaviza as bordas dos objetos eliminando pequenas extrusões.

O fechamento morfológico de uma imagem binária  $A$  por um elemento estruturante  $B$  é definido como uma operação de dilatação seguida de uma erosão (Equação (2.27)).

$$A \bullet B = (A \oplus B) \ominus B \quad (2.27)$$

O fechamento morfológico preenche fendas em contornos e suaviza as bordas dos objetos preenchendo pequenas intrusões. Pode ser utilizado para preencher pequenos buracos no interior dos objetos. A Figura 2.21 ilustra as operações de abertura e fechamento morfológicos sobre uma imagem binária.

**Abertura por Área.** A operação de abertura por área remove todos os componentes conectados com área inferior a um valor predefinido  $\alpha$  (LOTUFO *et al.*, 2008). A Equação (2.28) descreve a operação de abertura de área de uma imagem  $A$ , considerando um limiar  $\alpha$ ,

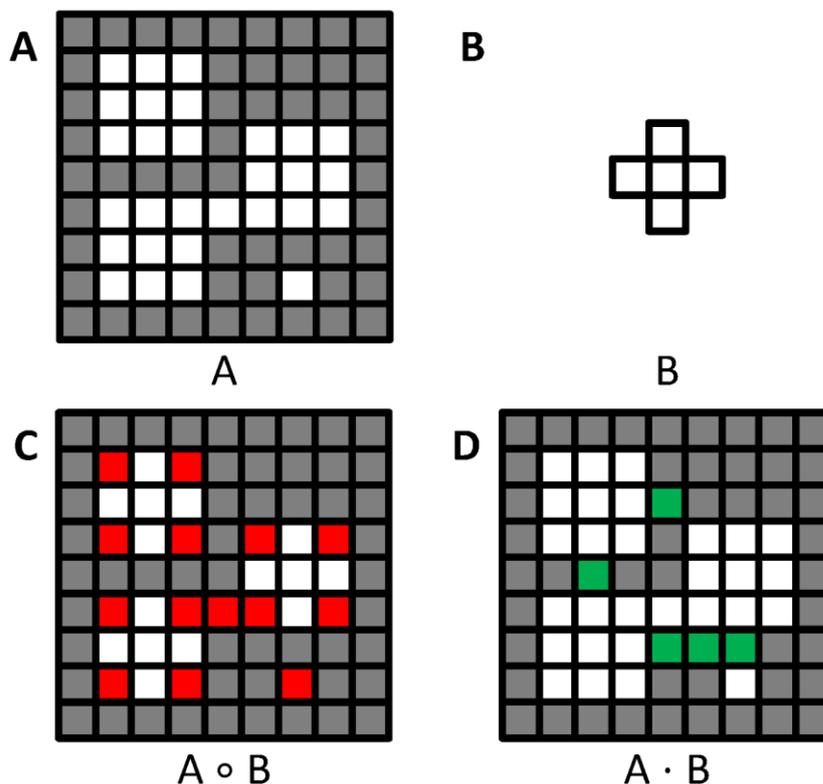


Figura 2.21: Ilustração das operações de abertura e fechamento morfológico. (A) Imagem original I. (B) Elemento estruturante em forma de cruz. (C) Resultado da abertura de A por B. Os pixels em vermelho são removidos dos objetos. (D) Resultado do fechamento de A por B, Os pixels em verde são inseridos nos objetos.

$$A \circ \alpha_E = \bigcup \{C_i \mid \text{Área}(C_i) \geq \alpha\} \tag{2.28}$$

em que E define a conectividade. Diferente do que ocorre com a operação de abertura morfológica, em que, apenas os objetos da imagem que casam com o elemento estruturante são removidos, todos os objetos com área inferior ao limiar  $\alpha$  são removidos e os demais objetos são mantidos inalterados.

### 2.4.3.3 Transformada Top-Hat

A transformada top-hat de uma imagem binária A por um elemento estruturante B consiste em subtrair a abertura morfológica da imagem A da própria imagem (Equação (2.29)).

$$A \hat{\circ} B = A - (A \circ B) \tag{2.29}$$

A transformada top-hat pode ser utilizada para corrigir a iluminação não uniforme realçando os objetos que casam com o elemento estruturante B, ao mesmo tempo, suprimindo objetos que não casam B (LOTUFO *et al.*, 2008).

#### 2.4.3.4 Reconstrução Morfológica

A operação de reconstrução morfológica é uma operação que envolve o processamento de uma imagem máscara, A, uma imagem de marcadores, M, e um elemento estruturante que define a conectividade, E. A reconstrução da imagem máscara a partir da imagem de marcadores é definida pela união dos componentes conectados da imagem máscara que possuem intersecção com a imagem de marcadores (Equação (2.30)),

$$A \Delta_E M = \bigcup \{C_k | C_k \cap M \neq \emptyset\} \quad (2.30)$$

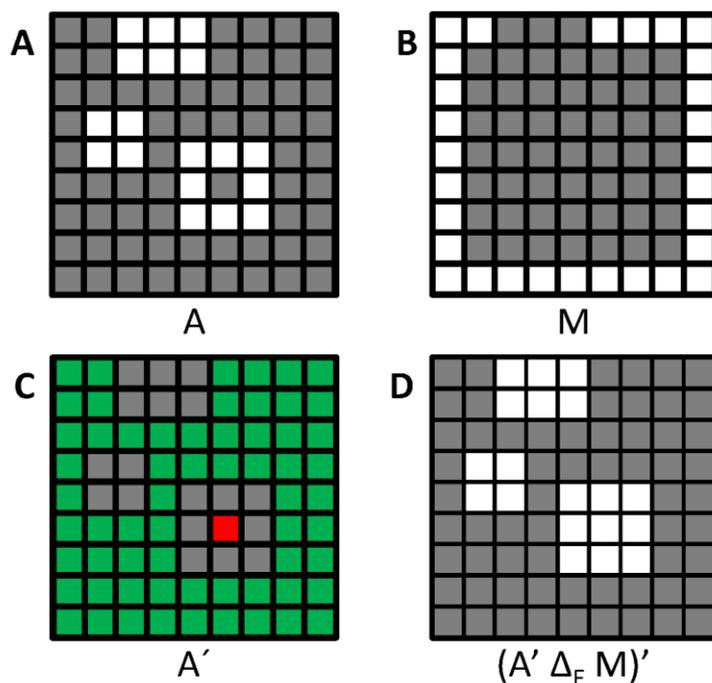
em que A é a imagem máscara, M é a imagem de marcadores,  $\Delta$  é o operador de reconstrução e E define a conectividade.

A operação de reconstrução morfológica possui uma ampla gama de aplicações práticas, dependendo da forma que a imagem de marcadores é definida. É possível eliminar os buracos no interior dos objetos utilizando uma imagem de marcadores M, construída da seguinte forma: os pixels das bordas são definidos como o complemento daquele pixel na imagem original e todos os demais pixels recebem o valor 0. O complemento, A', da imagem original A é reconstruído pela imagem de marcadores M e o complemento da imagem resultante será idêntico à imagem original, porém sem a presença de nenhum buraco no interior dos objetos (LOTUFO *et al.*, 2008; GONZALEZ *et al.*, 2009). A Figura 2.22 ilustra esse processo.

#### 2.4.4 Transformada da Distância

A transformada da distância (BORGEFORS, 1984, 1986; FABBRI *et al.*, 2008) de uma imagem binária I gera uma imagem em níveis de cinza, DT, em que, o valor de todos os pixels  $p \in I$  é definido de acordo com a menor distância entre p e o fundo da imagem, F(I), isso no caso da transformada da distância interna (Equação (2.31)).

$$DT(p) = \min_{q \in F(I)} \|p - q\| \quad (2.31)$$



**Figura 2.22: Preenchimento de buracos no interior de objetos. (A) A imagem máscara A. (B) Imagem de marcadores M. (C) Em verde, objetos de A' que possuem intersecção M. O pixel em vermelho pertence a objetos que não possuem intersecção com M. (D) A reconstrução morfológica é composta pelo complemento da imagem formada pelos pixels verdes. A imagem binária resultante é igual à imagem original, exceto por não possuir nenhum buraco nos objetos.**

A imagem gerada DT corresponde a um mapa de distâncias, em que os pixels de fundo possuem valor 0, e a intensidade dos pixels de objeto aumenta conforme estes se afastam da borda e se aproximam dos centros dos componentes conectados (Figura 2.23). Quando os valores de todos os pixels  $p \in I$  são substituídos, em DT, pela menor distância entre ele e o pixel de objeto mais próximo temos a transformada da distância externa (Equação (2.32)).

$$DT(p) = \min_{q \in O(i)} \|p - q\| \quad (2.32)$$

Nesse caso, os pixels de objeto possuem valor 0 e o valor dos pixels de fundo aumenta conforme se afastam das bordas dos objetos (Figura 2.23). A distância entre os pixels pode ser computada considerando diferentes métricas, entre elas a distância Euclidiana. A Figura 2.23(A) ilustra a transformada da distância interna e a Figura 2.23(B) a externa aplicada sobre uma imagem binária considerando a métrica Euclidiana. Os pixels brancos representam os objetos (*foreground*) e os cinza o fundo da imagem (*background*).

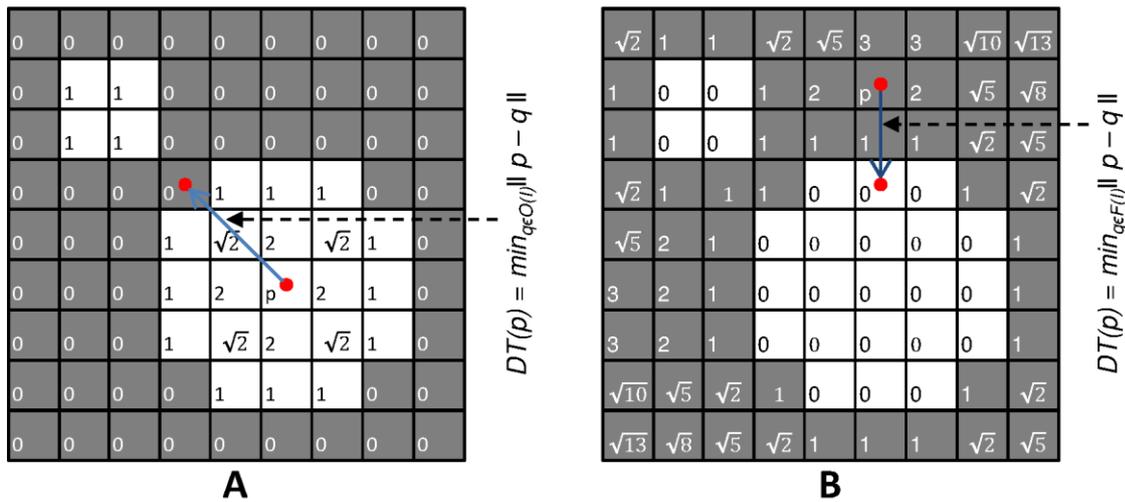


Figura 2.23: Ilustração da transformada da distância. (A) Mapa de distâncias gerado pela transformada da distância interna. (B) Mapa de distâncias gerado pela transformada a distância externa. Ambas as imagens consideram a distância Euclidiana.

Existem diferentes classes de algoritmos para calcular a transformada da distância. A implementação por força bruta consiste em computar, para cada pixel de objeto, o pixel de fundo adjacente às bordas do objeto mais próximo dele. O método é ineficiente, necessita de  $O(N \times B)$  passos, em que  $N$  é o número de pixels de objeto e  $B$  o número de pixels de fundo localizados nas adjacências da borda dos objetos (TELEA, 2007).

A transformada da distância considerando as métricas *cityblock*, *chessboard* e quasi-Euclidiana são implementadas no MATLAB utilizando o algoritmo proposto por Rosenfeld e Pfaltz (ROSENFELD; PFALTZ, 1966). O algoritmo funciona por meio de duas operações locais de varredura aplicadas sequencialmente em duas passadas. As operações locais,  $f_1$  e  $f_2$ , são descritas na Equação (2.33) e na Equação (2.34),

$$f_1(I(i, j)) = \begin{cases} 0 & , \text{ se } I(i, j) = 0 \\ \min(I(i-1, j) + 1, I(i, j-1) + 1) & , \text{ se } I(i, j) = 1 \text{ e } (i, j) \neq (1, 1) \\ m + n & , \text{ se } I(i, j) = 1 \text{ e } (i, j) = (1, 1) \end{cases} \quad (2.33)$$

$$f_2(I(i, j)) = \min(I(i, j), I(i+1, j) + 1, I(i, j+1) + 1) \quad (2.34)$$

em que  $m$  e  $n$  são as dimensões da imagem. As diferentes métricas são computadas modificando os pesos nas funções.

A transformada da distância, DT, é obtida após varrer a imagem I adiante aplicando a função  $f_1$ . A varredura adiante inicia no primeiro pixel da imagem (1, 1) e termina no último (m, n). Na sequência a imagem é varrida no sentido reverso (iniciando em (m, n) e finalizando no pixel (1, 1)) aplicando a função  $f_2$ .

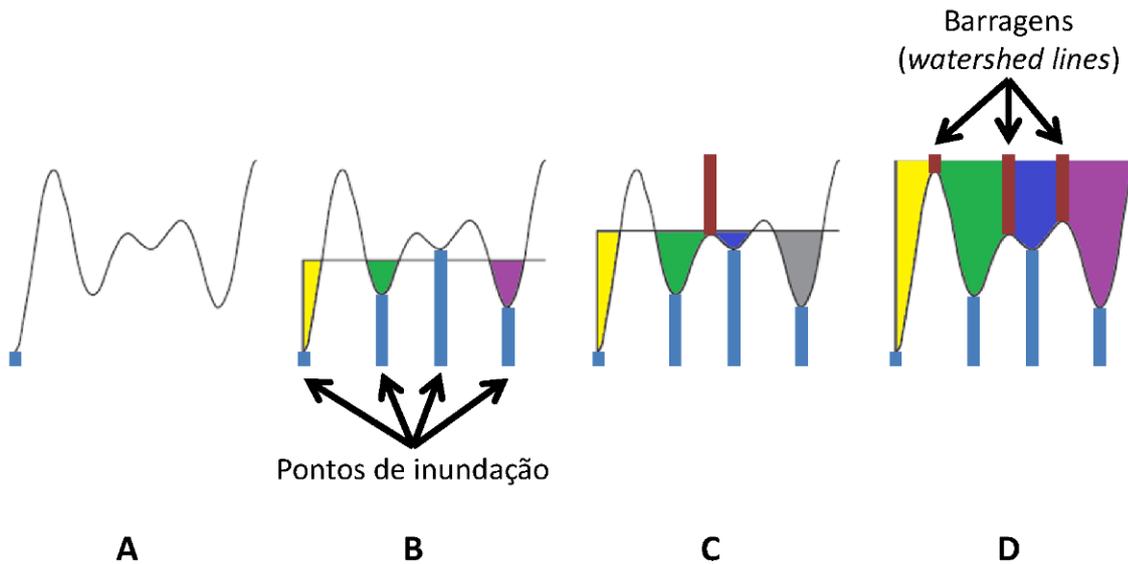
A implementação da transformada da distância Euclidiana presente no MATLAB é baseada no algoritmo sequencial proposto por Maurer *et al.* (MAURER; RAGHAVAN, 2003). O algoritmo funciona em dimensões arbitrárias, executa em tempo linear sobre o número de elementos (pixels/voxels) e utiliza Diagramas de Voronoi parciais.

Outros algoritmos para computação de transformadas da distância são o método *fast marching* (SETHIAN, 1999), descrito com detalhes em (TELEA, 2007) e o método *graph-based search*, que considera o grafo de vizinhança entre os pixels (LOTUFO *et al.*, 2000).

#### 2.4.5 Transformada Watershed

A transformada watershed (VINCENT; SOILLE, 1991; BEUCHER; MEYER, 1992; BELAID; MOUROU, 2009) considera a imagem de entrada como uma superfície topográfica e simula a inundação dessa superfície a partir de cada um dos seus mínimos regionais. Barragens, ou *watershed lines*, são construídas para impedir que as águas provenientes de mínimos regionais distintos se encontrem. As superfícies dos lagos formadas pelas *watershed lines* recebem o nome de *catchment basins* e representam as regiões segmentadas na imagem. O processo de inundação termina quando toda a superfície topográfica estiver submersa, e apenas as *catchment basins* e as *watershed lines* estiverem visíveis (Figura 2.24) (ADIGA; CHAUDHURI, 2001; LOTUFO *et al.*, 2008).

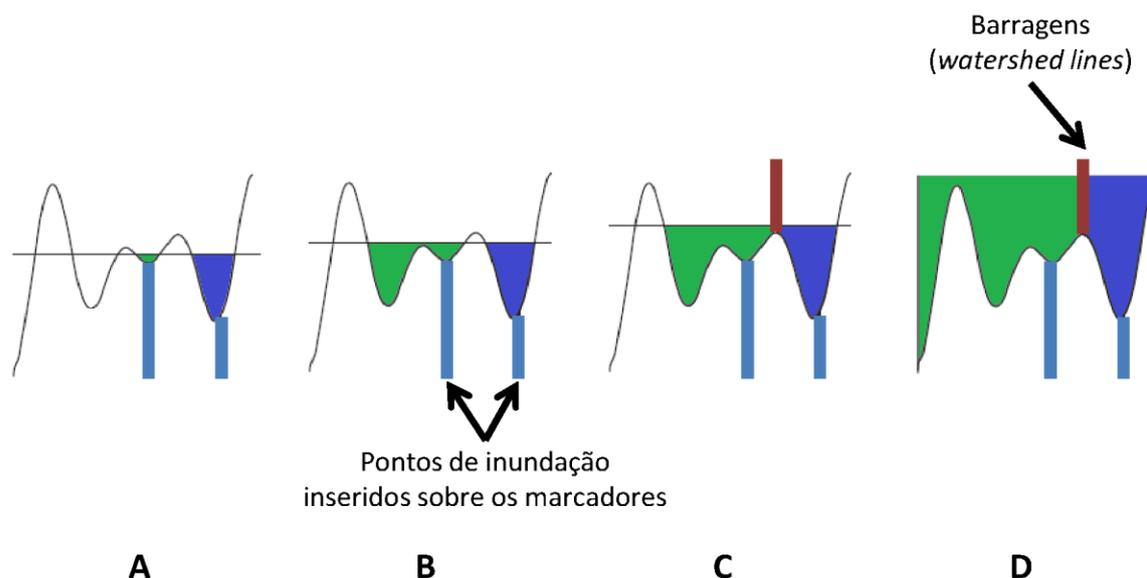
A transformada watershed quando aplicada diretamente sobre o gradiente da imagem resulta, geralmente, em uma imagem supersegmentada, devido ao número excessivo de mínimos regionais presentes no gradiente (LIN *et al.*, 2003). As abordagens para solucionar o problema da supersegmentação encontram-se basicamente em três categorias: (A) filtragem dos mínimos regionais do gradiente da imagem (LOTUFO *et al.*, 2008); (B) definição de marcadores no interior dos objetos para imposição de mínimos regionais (MALPICA *et al.*, 1997; HUANG *et al.*, 2010; JUNG; KIM, 2010); (C) identificação e fusão dos objetos supersegmentados (ADIGA; CHAUDHURI, 2001; LIN *et al.*, 2003).



**Figura 2.24:** Ilustração do processamento de um sinal 1D pela transformada watershed clássica. (A) O sinal de entrada. (B) Início do processo de inundação. Pontos de inundação são criados em todos os mínimos regionais do sinal e a água começa a emergir uniformemente a partir desses pontos. (C) Quando a água proveniente de dois mínimos regionais distintos estão prestes a se encontrar, cria-se uma barragem (*watershed lines*). (D) Ao final do processo de inundação, as barragens representam a segmentação dos objetos presentes na imagem. Adaptado de (LOTUFO *et al.*, 2008).

### 2.4.5.1 Transformada Watershed com Marcadores

O uso de marcadores para os mínimos regionais é uma técnica efetiva para reduzir o problema da supersegmentação da transformada watershed (LOTUFO *et al.*, 2008). Marcadores são definidos para cada um dos objetos da imagem e mínimos regionais são impostos sobre eles. O processo de inundação partirá apenas dos mínimos regionais explicitamente impostos nos marcadores (Figura 2.25). Definir marcadores singulares para todos os objetos em uma imagem é uma tarefa difícil (LIN *et al.*, 2003). Se algum objeto não receber um marcador ele pode ser inundado pela *catchment basin* de um objeto adjacente e gerar um erro de subsegmentação, ou ainda ser inundado pela *catchment basin* do fundo e o objeto não ser identificado. Caso algum objeto receba mais de um marcador ele será supersegmentado e se alguma marcação for definida fora do interior de algum objeto, um artefato será criado (ROSS, 2008; GONZALEZ *et al.*, 2009).



**Figura 2.25:** Aplicação da transformada watershed com marcadores. (A) Pontos de inundação são criados apenas sobre os marcadores. (B) Quando a água que emana de um ponto de inundação (verde) encontra um mínimo regional sem marcador (branco) ela transborda para dentro deste. (C) Quando as águas de pontos de inundação distintos (azul e verde) estão prestes a se encontrar, uma barragem (*watershed line*) é criada. (D) O processo de inundação termina quando a superfície da água cobrir todos os máximos regionais. Figura adaptada de (LOTUFO *et al.*, 2008).

#### 2.4.5.2 Transformada Watershed sobre o Gradiente da Imagem

A transformada watershed pode ser aplicada diretamente sobre a imagem de intensidades ou ainda sobre o gradiente da imagem (LOTUFO *et al.*, 2008). Na seção anterior (Seção 2.4.5.1) foi apresentado um método para evitar a supersegmentação da watershed por meio de imposição de mínimos locais em marcadores selecionados. Outras estratégias consistem em aplicar a watershed diretamente sobre o gradiente da imagem ou até mesmo sobre a própria imagem de intensidades. Nesse caso, é necessário definir algum método para evitar, ou corrigir, a supersegmentação da imagem. Uma maneira simples para contornar esse problema é apresentada em (LOTUFO *et al.*, 2008) e consiste em filtrar o número excessivo de mínimos regionais no gradiente da imagem. Note que é uma estratégia diferente de impor artificialmente os mínimos regionais a partir de marcadores de objetos. A filtragem pode ser realizada por meio de operações como fechamento morfológico ou transformada h-mínima.

### 2.4.6 Análise de Formas e Classificação de Objetos

Durante o processo de segmentação e identificação de neurônios nas imagens de microscopia é necessário definir, preferencialmente de forma automática, quais objetos realmente correspondem a neurônios. Para isso, características relacionadas ao formato dos neurônios devem ser selecionadas e processadas por meio de algoritmos de classificação de padrões. Nesta seção, são apresentadas algumas características de formas eficientes para a discriminação de células, assim como, alguns algoritmos de classificação de padrões utilizados em trabalhos na literatura relacionados à segmentação de células em imagens de microscopia.

Basicamente, classificação pode ser entendida como o processo de atribuir um indivíduo (objeto) a uma classe específica, com base em um conjunto de medidas (características) tomadas desse objeto. A classificação é sempre realizada de acordo com um conjunto de características (medidas, atributos, propriedades) selecionadas a partir dos objetos. O classificador reúne, em uma mesma classe, objetos que compartilham características semelhantes, ao mesmo tempo em que atribui objetos com características diferentes a classes distintas, levando a uma partição do espaço de características (COSTA; CESAR-JR., 2000). Os algoritmos que realizam essa partição do espaço de características, ou simplesmente a classificação dos objetos, precisam construir modelos adequados das classes, por meio de um processo denominado aprendizagem. A aprendizagem seleciona os parâmetros dos modelos de classes, diretamente a partir dos dados, buscando reduzir o erro de classificação (DUDA *et al.*, 2000). Algoritmos de aprendizagem podem ser de diferentes tipos, os principais são os algoritmos de aprendizagem supervisionados e os não supervisionados.

A aprendizagem supervisionada considera a existência de um conjunto de treinamento, ou seja, um conjunto de objetos previamente classificados que servem como protótipo para classificar os demais objetos (COSTA; CESAR-JR., 2000; DUDA *et al.*, 2000).

A aprendizagem não supervisionada, ou agrupamento (*clustering*), não conta com um conjunto de treinamento. Sistemas baseados em classificação não supervisionada criam agrupamentos de objetos com base apenas nas características de cada um, buscando maximizar a similaridade entre os objetos de uma mesma classe ao mesmo tempo em que minimiza a similaridade entre objetos de classes distintas (COSTA; CESAR-JR., 2000).

As etapas básicas de um sistema de classificação de padrões são: extração ou seleção das características, normalização das características e a classificação, conforme a Figura 2.26.

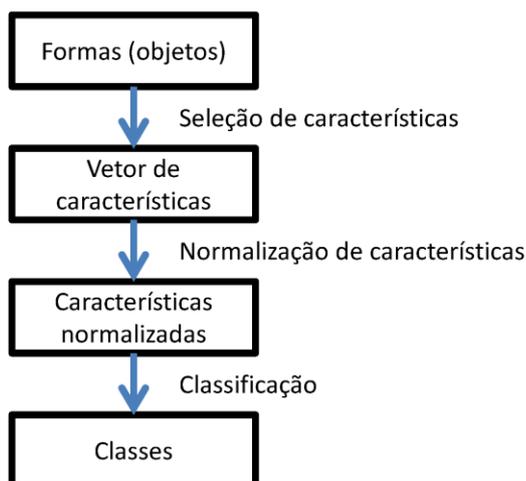


Figura 2.26: Etapas de um sistema de classificação de formas: seleção das características a partir das formas dos objetos, normalização das características e a classificação. Figura adaptada de (COSTA; CESAR-JR., 2000).

#### 2.4.6.1 Características de Formas para Classificação de Neurônios

Tipos diferentes de neurônios podem ser diferenciados por meio de características das suas formas. A forma de um tipo específico de neurônio pode ser caracterizada por um conjunto de medidas, ou características, morfológicas. Na Seção 3.4.5 deste trabalho utiliza-se a área, a circularidade, a excentricidade, intensidade média e desvio padrão das intensidades dos pixels para classificar neurônios DRG nas imagens de microscopia. É necessário cuidado na seleção das características, uma vez que a sua escolha é mais crítica do que a escolha do próprio classificador para o sucesso da aplicação (RIPLEY, 1996; COSTA; CESAR-JR., 2000).

Em Lin *et al.* (LIN *et al.*, 2003) selecionou-se um conjunto de características relacionadas ao formato 2D e 3D de neurônios de hipocampo de rato. As características de formas bidimensionais escolhidas foram: circularidade, área, raio médio e excentricidade. Essas características são calculadas a partir de uma projeção 2D das imagens volumétricas ao longo do eixo z. Os métodos utilizados por (LIN *et al.*, 2003) para calcular as medidas são mostradas a seguir.

**Circularidade:** A circularidade  $C$  é computada por meio da distância entre o pixel central  $p'$  e todos os demais pixels  $\mathbf{p}$ , denotada por  $\mathbf{d} = \|\mathbf{p} - p'\|$ . Dessa forma,  $C$  é definido pela Equação (2.35).

$$C = \text{média}(\mathbf{d}) / \text{desvio padrão}(\mathbf{d}) \quad (2.35)$$

**Área:** A área,  $A$ , é o número de pixels que fazem parte da projeção da célula.

**Raio médio:** Primeiro, computa-se um vetor,  $\mathbf{R}$ , composto pelas distâncias entre todos os pixels de borda,  $B(\mathbf{p})$ , e o pixel central,  $p'$ , como  $\mathbf{R} = \|p' - B(\mathbf{p})\|$ . O raio médio é a média de todos os valores de  $\mathbf{R}$ .

**Excentricidade:** A excentricidade,  $E$ , foi estimada como a razão entre o maior e o menor raio (Equação (2.36)).

$$E = \max(\mathbf{R})/\min(\mathbf{R}) \quad (2.36)$$

Os seguintes parâmetros 3D são computados por Lin *et al.* sobre imagens volumétricas 3D: volume, textura, convexidade e forma. Essas medidas 3D são computadas da seguinte forma.

**Volume:** O volume,  $V$ , é o número total de voxels no interior dos objetos.

**Textura:** Uma forma simples de medir a textura,  $T$ , é por meio do desvio padrão das intensidades dos pixels (ou voxels) que a compõem.

**Convexidade:** A convexidade,  $S$ , é definida pela razão entre o volume do objeto e o volume do fecho convexo do mesmo objeto.

**Forma:** A característica de forma,  $U$ , é definida pela Equação (2.37),

$$U = \frac{|B(\mathbf{p})|}{64\pi \times V} \quad (2.37)$$

em que  $B(\mathbf{p})$  são os voxels na borda do objeto e  $V$  é o volume.

#### 2.4.6.2 Normalização das características

As características obtidas a partir dos objetos possuem uma dimensão, por exemplo: a área pode ser medida em  $\mu\text{m}^2$ , o perímetro e diâmetro podem ser medidos em  $\mu\text{m}$ , já a circularidade, que é adimensional, varia de 0 até 1. Colocar características com dimensões diferentes em um mesmo espaço de características irá influenciar nas distâncias entre os objetos. Para evitar a discrepância entre distâncias medidas, decorrente das características com dimensões diferentes, é necessário transformá-las em características sem dimensão (COSTA; CESAR-JR., 2000). Uma estratégia comum para padronizar as características é a Transformação Normal de Características.

A Transformação Normal de Características consiste em aplicar a Equação (2.38) sobre as características,

$$f'(i, j) = \frac{f(i, j) - \mu_j}{\sigma_j} \quad (2.38)$$

em que  $f(i, j)$  é a característica  $j$  do objeto  $i$ , assim como  $f'(i, j)$  é a versão normalizada.  $\mu_j$  e  $\sigma_j$  são, respectivamente, a média e o desvio padrão da característica  $j$  de todos os  $i$  objetos. Após a normalização, todo o conjunto de características possuirá média 0 e desvio padrão 1 (COSTA; CESAR-JR., 2000).

#### 2.4.6.3 Máquinas de Vetor de Suporte (SVM – *Support Vector Machines*)

As máquinas de vetor de suporte (SVM – *support vector machines*) (BOSER *et al.*, 1992; CORTES; VAPNIK, 1995) constituem uma classe de funções de discriminação lineares. Primeiramente, a SVM realiza um mapeamento dos objetos  $\mathbf{x}_k$ , representados pelos respectivos vetores de características, para uma dimensão elevada  $\mathbf{y}_k = \varphi(\mathbf{x}_k)$ . Em uma dimensão suficientemente elevada, dados pertencentes a duas classes distintas podem ser separadas por um hiperplano (DUDA *et al.*, 2000), como ilustrado na Figura 2.27(A-B). Considerando a função de discriminação linear generalizada,  $g(\mathbf{y})$ , definida pela Equação (2.39),

$$g(\mathbf{y}) = \sum_{i=1}^d \mathbf{a}_i \varphi(\mathbf{x}_i) \quad (2.39)$$

em que  $\mathbf{a}$  é o vetor de pesos e  $d$  é a dimensão elevada após a transformação, a função discriminante  $g(\mathbf{y})$  define um hiperplano linear no espaço de características (aumentado) quando  $g(\mathbf{x}) = 0$ . Dessa forma, um objeto  $\mathbf{y}_k$  é classificado em  $C_1$  ou  $C_2$  de acordo com a Equação (2.40).

$$g(\mathbf{y}_k) \begin{matrix} > \\ < \end{matrix} \begin{matrix} C_1 \\ C_2 \end{matrix} > 0 \quad (2.40)$$

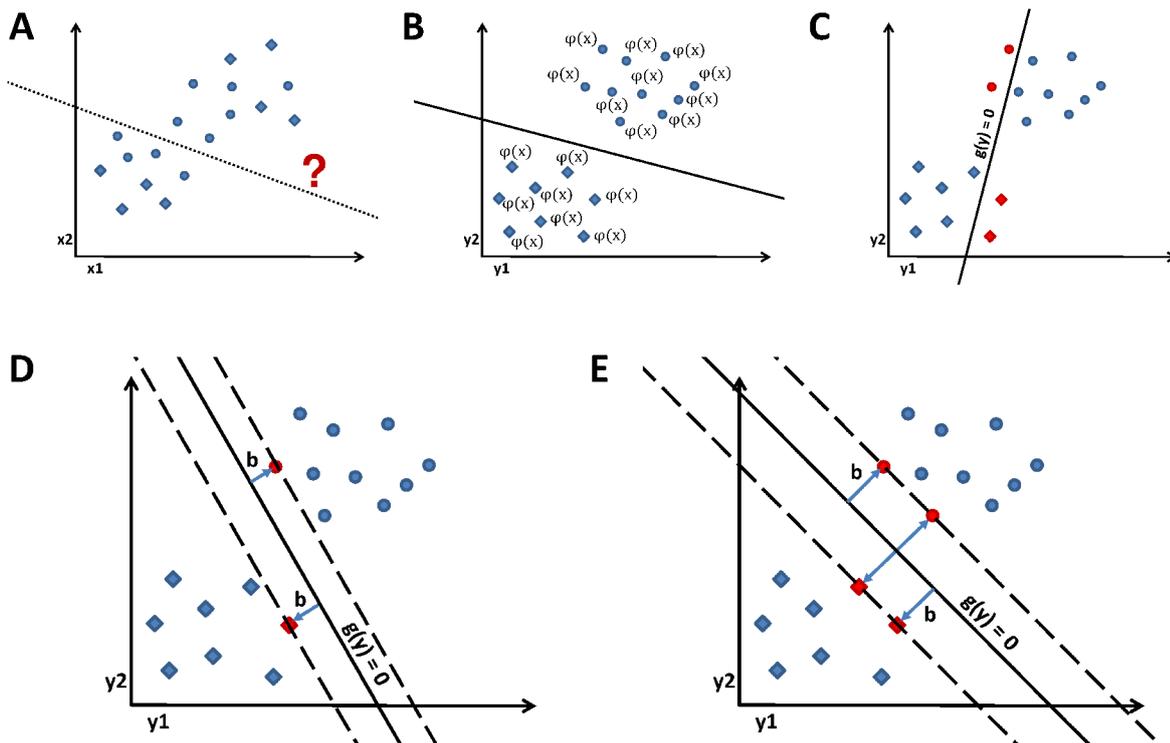


Figura 2.27: Ilustração do processo de treinamento de um classificador SVM, em que os padrões (objetos) do conjunto de treinamento pertencem a duas classes  $C_1$  (losangos, em que  $z_k = -1$ ) e  $C_2$  (círculos, em que  $z_k = 1$ ). (A) No espaço original de características os padrões não são linearmente separáveis. (B) Os padrões são transformados para um espaço de características de dimensão aumentada, em que os mesmos padrões são linearmente separáveis. (C) Nesta figura, o hiperplano  $g(y)$  não separa adequadamente as classes de padrões (objetos em vermelho). (D) O hiperplano separa adequadamente os padrões pertencentes às classes  $C_1$  e  $C_2$ , entretanto a margem de separação,  $b$ , não é a maior possível. Os vetores de suporte são mostrados em vermelho. (E) O algoritmo de treinamento do SVM busca maximizar a margem que separa os vetores de suporte (em vermelho) do hiperplano.

Como para todos os padrões de treinamento,  $z_k$  define se o objeto  $\mathbf{y}_k$  pertence à classe  $C_1$  ( $z_k = +1$ ) ou à classe  $C_2$  ( $z_k = -1$ ), dessa forma, pode-se reescrever a Equação (2.40) pela Equação (2.41) (DUDA *et al.*, 2000).

$$z_k g(\mathbf{y}_k) \geq 1 \quad (2.41)$$

Por enquanto, a função  $g(\mathbf{y}_k)$  define um hiperplano que separa os elementos  $\mathbf{y}_k$  da classe  $C_1$  dos da classe  $C_2$ , entretanto, o objetivo do treinamento do SVM é obter um hiperplano de separação que seja ótimo (DUDA *et al.*, 2000). Um hiperplano de separação ótimo também pode ser entendido como um hiperplano com a maior margem possível, sendo que a margem corresponde à menor distância que separa o hiperplano de algum objeto  $\mathbf{y}_k$ .

Considerando que o valor da margem é positivo, ou seja, todos os objetos  $\mathbf{y}$  estão do lado correto do hiperplano e que a distância entre um objeto  $\mathbf{y}$  e o hiperplano é computado como  $|g(\mathbf{y})| / \|\mathbf{a}\|$ , pode-se afirmar que (Equação (2.42)),

$$\frac{z_k g(\mathbf{y}_k)}{\|\mathbf{a}\|} \geq b, \quad \text{para } k = 1, \dots, n \quad (2.42)$$

ou seja, não existe nenhum ponto do espaço de características aumentado cuja distância em relação ao hiperplano seja menor do que  $b$  (Figura 2.27(C)). Dessa forma, o algoritmo de aprendizagem do SVM busca determinar os valores do vetor de pesos  $\mathbf{a}$  que maximiza  $b$ . Obtêm-se assim, os chamados vetores de suporte, que são os objetos (no espaço de características aumentado) mais próximos do hiperplano e que, por esse motivo, são os mais representativos para a classificação de objetos (Figura 2.27(D-E)). Ao maximizar as margens, o SVM busca aumentar o poder de generalização do classificador e diminuir assim a probabilidade de erros (DUDA *et al.*, 2000).

Após escolher a função de mapeamento  $\varphi$  mais adequada para transformar os dados de treinamento  $\mathbf{x}$  para um espaço de dimensão mais elevada  $\mathbf{y}$ . O treinamento da SVM consiste em minimizar  $\|\mathbf{a}\|$ , que equivale a maximizar  $b$ , utilizando o método dos multiplicadores indeterminados de Lagrange de acordo com a Equação (2.43).

$$L(\mathbf{a}, \alpha) = \frac{1}{2} \|\mathbf{a}\|^2 - \sum_{k=1}^n \alpha_k [z_k \mathbf{a}' \mathbf{y}_k - 1] \quad (2.43)$$

buscando minimizar  $L$  em relação a  $\mathbf{a}$  e maximizar  $L$  em relação a  $\alpha_k \geq 0$ . Dessa forma, o processo pode ser reformulado em termos de maximizar a Equação (2.44),

$$L(\alpha) = \sum_{k=1}^n \alpha_k - \frac{1}{2} \sum_{k,j} \alpha_k \alpha_j z_k z_j \mathbf{y}'_j \mathbf{y}_k \quad (2.44)$$

respeitando a restrição da Equação (2.45).

$$\sum_{k=1}^n z_k \alpha_k = 0, \quad \alpha_k \geq 0, \quad k = 1, \dots, n \quad (2.45)$$

#### 2.4.6.4 K-means

O k-means é uma técnica de classificação por agrupamentos baseado no critério de mínima dispersão entre classes. O algoritmo executa sobre um conjunto de  $N$  objetos caracterizados pelos seus vetores de características e busca classificá-los em  $K$  classes, sendo que o valor de  $K$  deve ser conhecido *a priori* (COSTA; CESAR-JR., 2000; DUDA *et al.*, 2000). Um conjunto de  $K$  protótipos, representando os centros dos agrupamentos são definidos no espaço de características, geralmente de forma aleatória. Uma matriz de distâncias,  $D$ , armazena as distâncias entre cada protótipo e todos os objetos. Utilizando a matriz  $D$ , localizam-se, para cada protótipo, os objetos mais semelhantes a ele do que a quaisquer outros protótipos, levando a uma partição do espaço de características de acordo com o diagrama de Voronoi (Seção 2.4.7) dos protótipos. As posições dos protótipos são atualizadas pela posição média dos objetos localizados dentro da sua região de Voronoi. O algoritmo termina quando algum critério de estabilidade é alcançado, como por exemplo, o deslocamento de cada centroide ser menor que um limiar pré-definido (COSTA; CESAR-JR., 2000). Existe variação do algoritmo k-means, que considera as probabilidades de cada objeto pertencer a múltiplas classes, denominado fuzzy C-means (BEZDEK, 1981).

#### 2.4.7 Triangulação de Delaunay e Diagramas de Voronoi

O Diagrama de Voronoi (EDELSBRUNNER; SEIDEL, 1986; AURENHAMMER, 1991) de um conjunto de pontos  $P = \{p_1, p_2, \dots, p_N\}$  em  $R^n$  decompõe o espaço em um conjunto de polígonos convexos. Cada polígono de Voronoi consiste em todos os pontos em  $R^n$  mais próximos a  $p_k$  do que de qualquer outro ponto em  $P$ . O polígono de Voronoi de algum ponto de interesse representa a região de influencia deste ponto.

Considerando uma imagem binária, pode-se computar o seu Diagrama de Voronoi como um conjunto de linhas (formando polígonos convexos) que decompõem a imagem em regiões formadas pelos pixels localizados mais próximos de algum componente conectado, do que de quaisquer outros. Para um pixel  $p$ , que não pertence a nenhum componente conectado, sua região de Voronoi é o conjunto de todos os pixels cuja distância Euclidiana é menor ou igual à distância entre  $p$  e qualquer outro componente conectado (EDELSBRUNNER; SEIDEL, 1986). O diagrama de Voronoi pode ser construído a partir da transformada da distância (ABDUL-RAHMAN, ALIAS; PILOUK, 2008).

A triangulação de Delaunay é uma construção dual do diagrama de Voronoi. A triangulação de Delaunay de uma imagem binária consiste de todos os triângulos que conectam os centroides dos componentes conectados, desde que, a circunferência dos triângulos não possua nenhum outro ponto em seu interior (EDELSBRUNNER; SEIDEL, 1986).

A Figura 2.28 ilustra o diagrama de Voronoi e a triangulação de Delaunay de uma imagem binária.

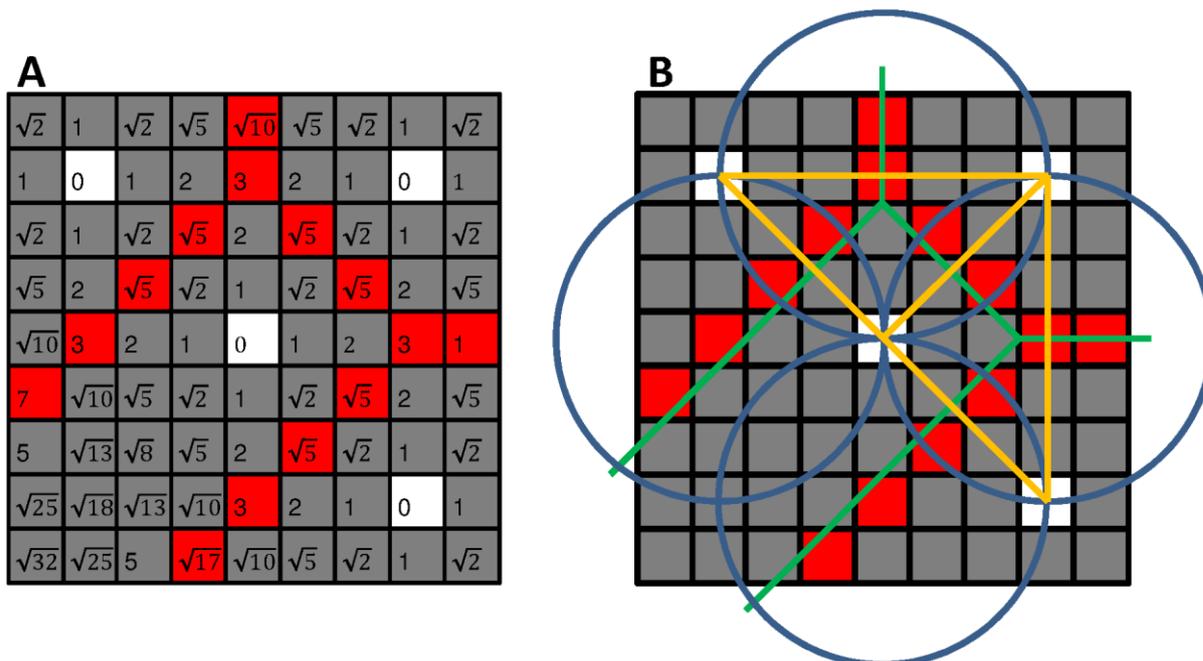


Figura 2.28: Ilustração das construções triangulação e Delaunay e diagrama de Voronoi. (A) Uma imagem binária e sua transformada da distância Euclidiana externa. Os pixels brancos são os objetos na imagem, os pixels vermelhos representam as bordas das regiões de Voronoi e as demais cores são as regiões de Voronoi de cada objeto. Os valores nos pixels representam a distância em relação ao pixel de objeto mais próximos. (B) As linhas verdes são o diagrama de Voronoi e as linhas alaranjadas são os lados dos triângulos de Delaunay. As circunferências de cada triângulo são mostradas em azul.

### 2.4.8 Detecção de Círculos em Imagens

A transformada de Hough circular, ou algoritmo de Illingworth (ILLINGWORTH; KITTLER, 1987), é um método eficiente para detectar padrões circulares em uma imagem. Peng *et al.* (PENG *et al.*, 2007) propuseram algumas modificações sobre o algoritmo de Illingworth. O algoritmo de Peng *et al.* inicia computando o campo gradiente,  $\nabla I$ , de uma imagem de intensidades,  $I$ , por meio da Equação (2.46),

$$\nabla I(i, j) = (V_x, V_y)_{(i, j)} = (I(i, j) - I(i, j - 1), I(i, j) - I(i - 1, j)) \tag{2.46}$$

em que  $\nabla I(i, j)$  é o vetor gradiente do pixel  $(i, j)$ , composto por um componente horizontal  $V_x$  e um vertical  $V_y$ .

Os vetores gradiente do campo vetorial apontam na direção do centro dos círculos, ou para longe deles. O campo vetorial é então mapeado para um acumulador com as mesmas dimensões da imagem  $I$ . A intensidade de cada pixel do acumulador corresponde à probabilidade daquele pixel pertencer ao centro de um círculo na imagem original. A construção do acumulador é realizada por um processo de votação. Cada vetor gradiente  $\nabla I(i, j)$  no campo vetorial  $\nabla I$ , com valor diferente de zero, define um segmento de reta (Figura 2.29(A)). Atribui-se o valor da magnitude de  $\nabla I(i, j)$  aos pixels do acumulador localizados nos segmentos de reta definidos por  $\nabla I(i, j)$ . O tamanho dos segmentos de reta definidos pelos vetores gradiente é limitado ao diâmetro máximo dos círculos que se espera encontrar na imagem, dessa forma, é possível definir valores máximos e mínimos para padrões circulares de interesse. Após contabilizar os votos de todos os vetores gradiente não nulos, os pixels que receberam maior número de votos, denominados picos, representam o centro dos círculos presentes nas imagens. Na Figura 2.29(B) o pixel que recebeu maior número de votos é o mais escuro e representa o centro do círculo.

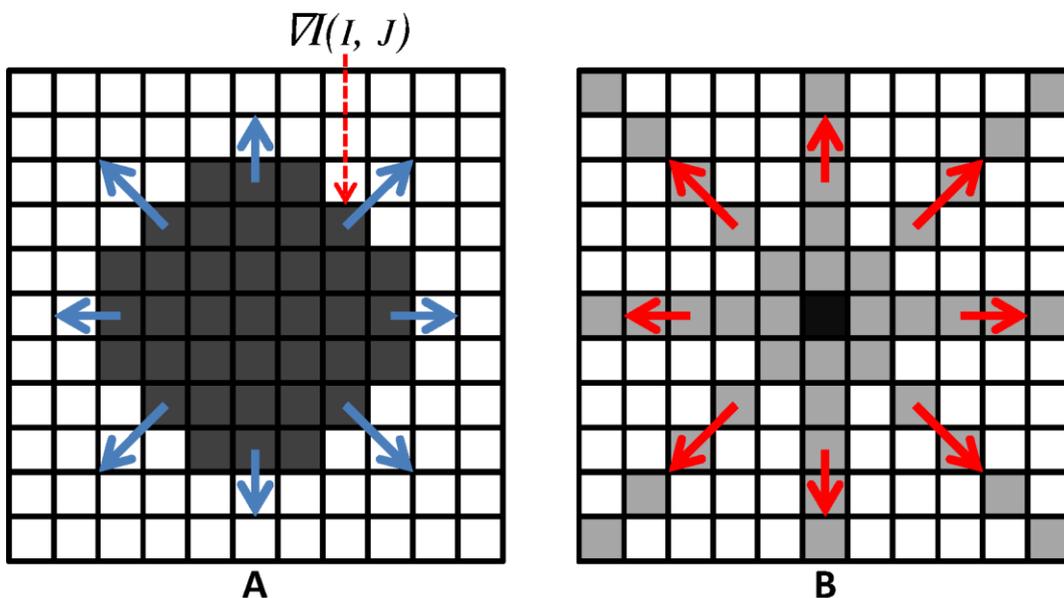


Figura 2.29: Construção do acumulador a partir do campo vetorial por meio de algoritmo de votação. (A) É possível definir um segmento de reta a partir da direção do vetor gradiente do pixel  $\nabla I(i, j)$ . (B) No acumulador, para cada pixel no caminho de algum segmento de reta definido por algum  $\nabla I(i, j)$  é atribuído o valor da magnitude do vetor gradiente  $\nabla I(i, j)$ . Ao contabilizar a contribuição de todos os vetores, os pixels com maior intensidade no acumulador representam o centro de um círculo na imagem original. Figura adaptada de (PENG *et al.*, 2007).

Entretanto, ainda é necessário um processo criterioso para detectar quais pixels com alta intensidade do acumulador realmente representam círculos. Para isso, deve-se adotar o seguinte processo para detecção de picos.

Passo 1 – Aplica-se a filtragem pelo Laplaciano da Gaussiana (LoG) sobre o acumulador, a fim de preencher as áreas entre picos com valores nulos e negativos.

Passo 2 – Após a filtragem por LoG, o acumulador é segmentado utilizando um limiar definido em 25% do pixel com maior intensidade.

Passo 3 – A região englobada pelos círculos com os centros nos picos detectados é estimada por um algoritmo de crescimento de regiões.

### 2.4.9 Registro de Imagens

Microscópios confocais possibilitam imagear espécimes com alta resolução espacial, porém, em muitos casos o tamanho dos espécimes excede o campo de visão do microscópio. Imagear o espécime com uma magnitude menor irá gerar imagens com baixa resolução, dessa forma, torna-se necessário obter várias imagens em alta resolução tomadas de diferentes regiões do espécime. Em muitas aplicações, é necessário uma imagem única, com alta resolução e campo de visão extenso, para isso, as diferentes imagens obtidas devem ser combinadas buscando representar de forma precisa o espécime original (YU; PENG, 2011).

O registro de imagens (também chamado *stitching*) é um método que busca definir uma transformação geométrica nas imagens de forma a maximizar uma função de similaridade entre imagens adjacentes. Métodos de registro de imagens são classificados em: métodos baseados em pontos de controle (*landmarks*), baseados em intensidade e métodos híbridos (AL-KOFAHI *et al.*, 2003; YU; PENG, 2011). Métodos baseados em pontos de controle funcionam por meio da extração de características bem definidas e que são compartilhadas por pares de imagens adjacentes a serem registradas. Em um contexto de imagens de culturas de células, podem-se utilizar os núcleos segmentados como características para registro, porém neste trabalho optou-se por utilizar os centros dos microeletrodos. Os métodos baseados em intensidades consideram apenas as informações sobre a intensidade dos voxels das imagens. Os métodos híbridos combinam elementos de ambas as abordagens para registrar as imagens (AL-KOFAHI *et al.*, 2003; YU; PENG, 2011).

### 2.4.10 Superfícies Poligonais - Visualização Tridimensional

Para efeitos de visualização de informações e imagens volumétricas são consideradas duas classes de algoritmos: algoritmos de visualização direta de volumes e visualização de superfícies. A visualização direta de volumes permite visualizar objetos 3D sem que seja necessário definir a geometria da superfície (WRIGHT *et al.*, 1993).

A visualização de volumes envolve atribuir níveis de opacidade e cores a cada voxel da imagem 3D, simular as características de orientação das superfícies no que diz respeito à fonte de iluminação e ao observador, e finalmente a projeção da imagem 3D em algum ambiente de visualização. A visualização de volumes permite uma eficiente visualização de estruturas biológicas 3D, porém esse método é restrito apenas à visualização e dificulta a obtenção de informações quantitativas, além de a qualidade ser limitada pela baixa resolução ao longo do eixo z (EILS; ATHALE, 2003).

Algoritmos de visualização de superfícies consistem em projetar um conjunto de polígonos em um ambiente de visualização. O usuário pode examinar a estrutura por diferentes pontos de vista e níveis de *zoom* (EILS; ATHALE, 2003). Para visualizar espécimes 3D dessa forma, são necessários algoritmos de reconstrução de superfícies 3D. Algoritmos de reconstrução de superfícies 3D buscam aproximar a superfície de um objeto 3D, representado por uma imagem volumétrica, ou um conjunto de pontos. O método mais difundido de geração de superfícies poligonais é o *marching cubes* (LORENSEN; CLINE, 1987). Outros algoritmos buscam interpolar os objetos segmentados em seções planares adjacentes (BOISSONNAT, 1988).

O algoritmo *marching cubes* (LORENSEN; CLINE, 1987) permite extrair a iso-superfície de objetos presentes em uma imagem volumétrica, na forma de uma superfície poligonal. O algoritmo considera que a imagem é composta por cubos (ou paralelepípedos), em que os vértices de cada cubo correspondem a oito voxels adjacentes na imagem, quatro em cada seção adjacente. O algoritmo percorre todos os voxels que compõem a imagem volumétrica, determinando se a iso-superfície intercepta ou não o cubo. Para isso, é necessário determinar um valor limiar (iso-valor), de forma que os voxels com intensidade inferior a esse limiar (parte externa do objeto) sejam separados daqueles com intensidade superior (parte interna) por uma superfície poligonal (SCHROEDER *et al.*, 2004). Dessa forma, caso um cubo seja interceptado pela iso-superfície, é atribuída a ele a mais adequada dentre as 256 formas diferentes que um cubo pode ser dividido por um polígono (O'CONNOR *et al.*, 2004).

Pela eliminação de casos semelhantes ou duplicados pela simetria é possível reduzir o número de testes para 14 (Figura 2.30).

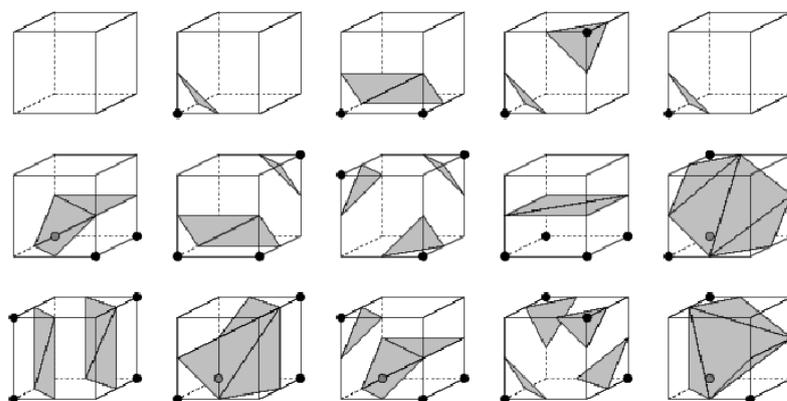


Figura 2.30: As 14 possíveis formas de interceptar um cubo por uma iso-superfície (O'CONOR *et al.*, 2004).

Iso-valores altos irão resultar em superfícies poligonais menores, enquanto iso-valores pequenos irão gerar superfícies maiores (SCHROEDER *et al.*, 2004), dessa forma, qualquer medida obtida a partir das superfícies poligonais são afetadas diretamente pela escolha desses valores.

Em alguns casos, o algoritmo *marching cubes* pode gerar uma reconstrução poligonal incorreta da superfície, inserindo buracos na superfície gerada (O'CONOR *et al.*, 2004). Para solucionar esses problemas, o algoritmo *marching cubes* ganhou uma adaptação onde cada cubo é decomposto em cinco tetraedros, e cada tetraedro pode ser interceptado de cinco formas distintas, como mostra a Figura 2.31, recebendo a denominação *marching tetrahedron* (GUEZIEC; HUMMEL, 1995). Tanto o *marching cubes* quanto o *marching tetrahedron* geram superfícies com uma quantidade muito grande de polígonos. Para uma visualização eficiente pode ser necessário aplicar algoritmos de simplificação e suavização de superfícies (HOPPE *et al.*, 1993; WOOD *et al.*, 2004).

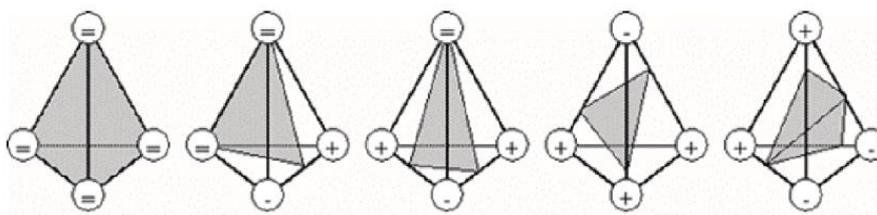


Figura 2.31: As cinco maneiras possíveis que uma iso-superfície pode interceptar um tetraedro (O'CONOR *et al.*, 2004).

A grande vantagem em combinar segmentação e reconstrução de superfícies é o acesso quase imediato a informações quantitativas correspondentes aos dados visualizados (EILS *et al.*, 1996; EILS; ATHALE, 2003).

## **2.5 Considerações Finais**

Neste capítulo foram apresentados os conceitos fundamentais sobre: (A) a tecnologia de Matrizes de Microeletrodos; (B) culturas de neurônios DRG em MEAs; (C) imageamento de culturas neuronais em MEAs; (D) conceitos, técnicas e algoritmos de processamento de imagens e outras áreas que serão utilizadas pelos métodos apresentados nos próximos capítulos deste documento. No próximo capítulo são descritos os métodos propostos nesta tese de doutorado.

# Capítulo 3

## MATERIAL E MÉTODOS

---

---

### 3.1 Considerações Iniciais

Neste capítulo são descritos os métodos propostos nesta tese de Doutorado: (Seção 3.3) Método para identificação automática dos microeletrodos e suas posições nas imagens do canal de luz de transmissão; (Seção 3.3.4) Registro de várias imagens menores, porém com alta resolução, com o objetivo de formar uma imagem que comtemple toda a área de gravação da MEA; (Seção 3.4) Segmentação de neurônios em imagens 2D; (Seção 3.5) Análise quantitativa da morfologia, da distribuição espacial e da topologia dos neurônios e microeletrodos em um contexto 2D; (Seção 3.6) Reconstrução e visualização 3D das culturas de neurônios por meio de superfícies poligonais; (Seção 3.7) Análise quantitativa da morfologia, assim como do relacionamento espacial entre neurônios e microeletrodos em um contexto 3D.

A presente tese de Doutorado consiste no estudo e desenvolvimento de métodos de processamento de imagens 2D e 3D obtidas por meio de microscopia de fluorescência ou confocal de fluorescência a partir de culturas de neurônios DRG em MEAs. Os métodos buscam identificar e visualizar neurônios e microeletrodos nas imagens e computar medidas quantitativas relacionadas às culturas nas MEAs. A partir dos métodos propostos, pretende-se contribuir com estudos que envolvem a análise da atividade eletrofisiológica obtida por meio de MEAs. A análise da atividade eletrofisiológica em conjunto com as características morfológicas e a distribuição espacial e topológica das culturas de neurônios na MEA podem auxiliar em estudos relacionados ao comportamento de neurônios e redes neuronais, mais especificamente os neurônios do tipo DRG.

Os métodos propostos, implementados e testados nesta tese constituem uma ferramenta útil nas pesquisas que envolvem a análise dos sinais eletrofisiológicos capturados pela MEA ao fornecerem, de forma automatizada e padronizada, uma série de medidas quantitativas relacionadas à cultura neuronal por meio do processamento das imagens de microscopia tomadas dessas culturas. Com exceção dos métodos de visualização e análise quantitativa 3D, os métodos foram implementados utilizando a ferramenta MATLAB (*The Mathworks Inc., Natick, MA*).

A Figura 3.1 resume as principais etapas dos métodos propostos, assim como a forma com que eles se relacionam entre si. A primeira coluna representa o método para identificação dos microeletrodos. O método recebe como entrada uma imagem obtida do canal de luz de transmissão, tomada a partir de um dos quadrantes da área de gravação da MEA cuja cultura de neurônios foi plaqueada. Caso a imagem seja 3D (obtida a partir de um microscópio confocal), a mesma é convertida para uma imagem 2D por meio de projeção de intensidades (MinIP). O método retorna uma imagem binária contendo os microeletrodos presentes na imagem. A coluna do meio representa o método para segmentação dos neurônios a partir da imagem. A entrada do método é uma imagem 2D que contempla toda a região de gravação da MEA, obtida por meio do registro de imagens menores em alta-resolução obtidas a partir do canal de fluorescência. A imagem de entrada é convertida para 2D, caso necessário, por meio de técnica de projeção de intensidades (MIP). O resultado do método é uma imagem binária cujos componentes conectados são os neurônios segmentados. A coluna da direita representa o método de visualização 3D das culturas de neurônios em MEA por meio de superfícies poligonais. A análise quantitativa 2D é realizada por meio do processamento dos resultados do método de segmentação 2D em conjunto com o microeletrodos identificados após o registro. A análise quantitativa 3D é realizada a partir do processamento das superfícies poligonais resultantes da etapa de visualização 3D em conjunto com a imagem contendo os microeletrodos após registro.

### 3.2 Cultura de Células e Aquisição das Imagens

As culturas de células foram obtidas a partir de ratos Wistar jovens (100 g), de ambos os sexos, anestesiados com CO<sub>2</sub> e sacrificados por decapitação de acordo com a *International Association for the Study of Pain (IASP)* e aprovado pelo Comitê de Ética para a Utilização de

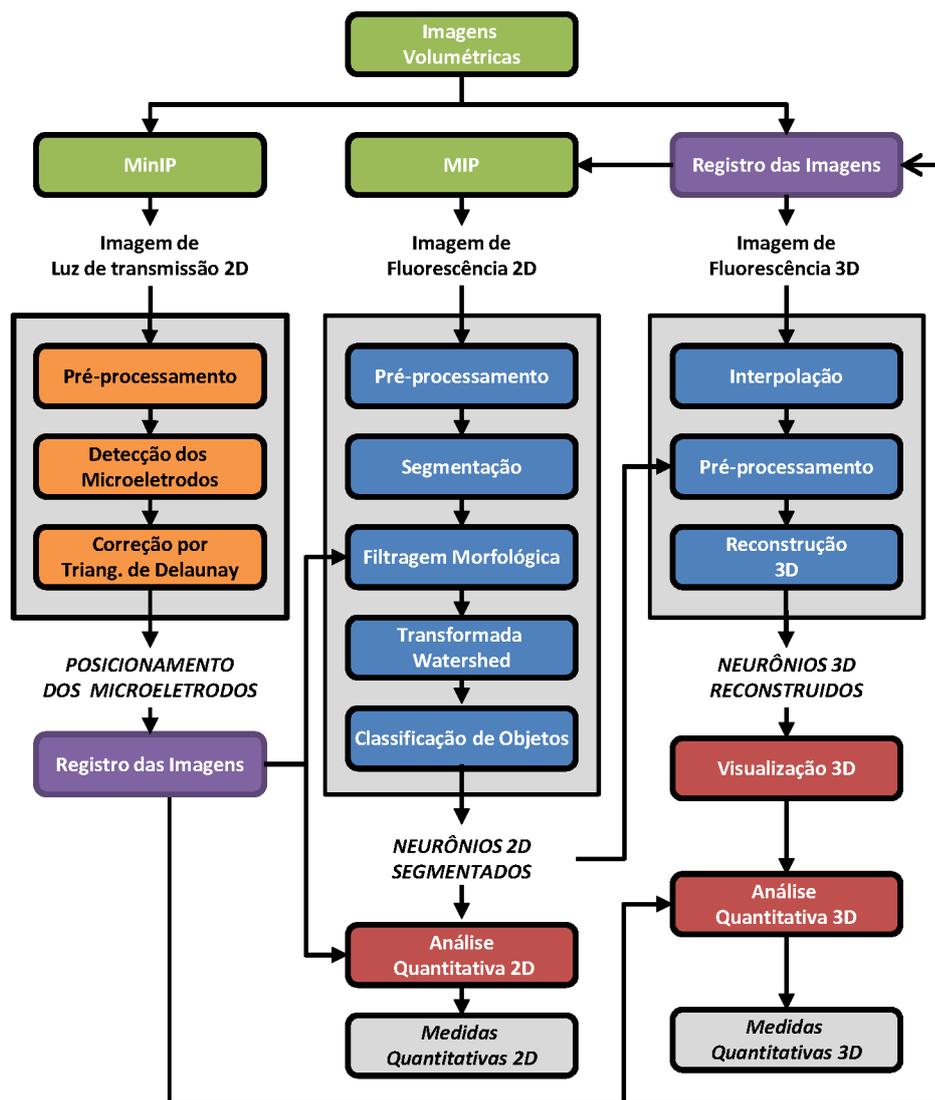
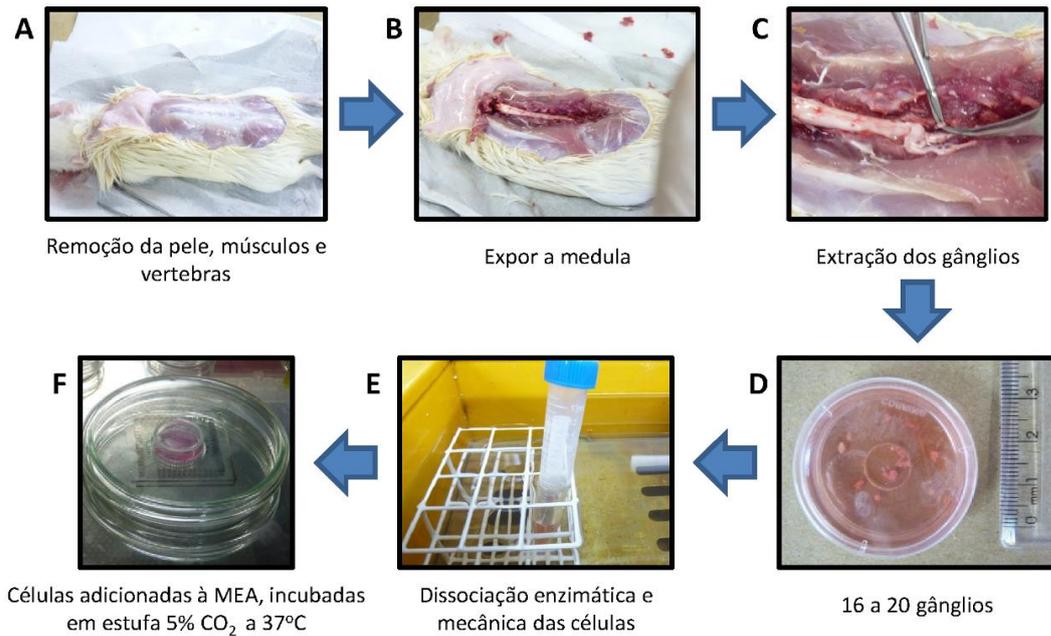


Figura 3.1: Ilustração geral das etapas dos métodos propostos e os relacionamento entre eles. Coluna da esquerda: Identificação dos microeletrodos. Coluna central: Segmentação dos neurônios 2D. Coluna da direita: Visualização 3D dos neurônios por meio de superfícies poligonais.

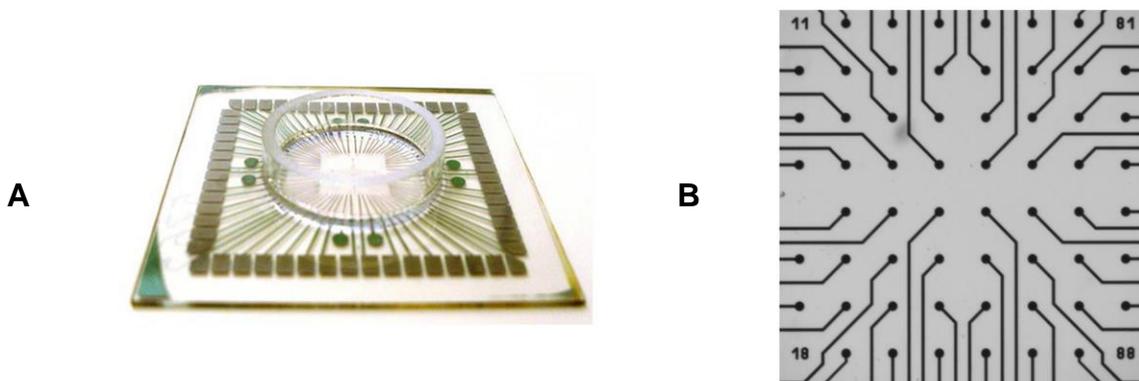
Animais (CEUA/UFU). Os gânglios da raiz dorsal (DRGs) foram colhidos das regiões lombar e torácica e transferidos para solução tampão de Hank contendo collagenase 0.28 U/ml (tipo 2, Sigma) por 75 minutos a 37°C e na sequência foram transferidos para uma solução de tripsina a 0,25% (Sigma) por 12 minutos, de acordo com (LINHART *et al.*, 2003). Após três lavagens em DMEN suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, penicilina (50 U/ml) e estreptomicina (50 mg/ml), os gânglios foram dissociados usando uma pipeta Pasteur de vidro. As células dissociadas foram plaqueadas em MEAs revestidas com matrigel, e mantidas em uma atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C com o mesmo meio descrito anteriormente. O processo de realização das culturas é ilustrado na Figura 3.2:



**Figura 3.2:** Processo de extração dos gânglios da raiz dorsal de ratos Wistar, preparação das culturas de neurônios e deposição das mesmas nas MEAs.

Utilizaram-se MEAs (*Multichannel Systems, Reutlingn, Alemanha*) de 60 microeletrodos com 30  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 200  $\mu\text{m}$  de separação entre os microeletrodos. A Figura 3.3(A) mostra uma visão geral de uma placa MEA60 e na Figura 3.3(B) é possível observar 59 microeletrodos, sendo que o localizado na linha 5 e coluna 1 é utilizado como microeletrodo de referência.

Após 24-48 horas em cultura, as células foram incubadas com DiBAC<sub>4</sub>(3), 5  $\mu\text{M}$ , *Molecular Probes*, um corante sensível a voltagem, e em seguida foram imageadas por um microscópio confocal de varredura a laser invertido *Zeiss LSM 510 META* (Figura 3.4).



**Figura 3.3:** Modelos de MEA utilizados nos experimentos. (A) Visão geral de uma matriz de microeletrodos (MEA-60 da *Multichannel Systems*). (B) Detalhe da área de gravação da MEA, onde é possível observar a disposição dos microeletrodos.



**Figura 3.4: Modelo do microscópio de varredura confocal de fluorescência utilizado para obter as imagens utilizadas nos experimentos (Zeiss LSM 510-Meta).**

As imagens volumétricas foram adquiridas utilizando laser Ar/ArKr com comprimento de onda de 488 nm e um filtro de barreira de 510-574 nm. As culturas foram imageadas em dois canais, um canal de fluorescência e um canal de luz de transmissão, utilizando lentes objetivas de imersão em ar “EC Plan Neofluar 10×/0.30 M27”. Cada canal gera uma imagem em níveis de cinza. Nas imagens do canal de fluorescência, células neuronais, arborização de neuritos e células da glia são representadas por regiões mais claras, com maior intensidade. As imagens obtidas pelo canal de luz de transmissão permitem observar a forma e posição dos microeletrodos, em que esses são representados pelos pixels mais escuros, com menor intensidade.

A preparação das culturas de neurônios DRG e o imageamento foram realizados durante o curso de mestrado da aluna Amanda Ferreira Neves no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica na Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Mais informações sobre os respectivos processos podem ser obtidos por meio de sua dissertação de mestrado (NEVES, 2012).

### **3.3 Identificação Automatizada de Microeletrodos em Imagens 2D**

A Figura 3.5 ilustra o método proposto para realizar a identificação automática dos microeletrodos. O método consiste nas seguintes etapas: (A) Imagem original; (B) Pré-

processamento; (C) Detecção de estruturas circulares utilizando a transformada de Hough circular; (D-G) Correção de microeletrodos identificados via triangulação de Delaunay e regressão linear; (H) Imagem final contendo apenas os microeletrodos. As imagens finais, obtidas após a detecção dos microeletrodos, são submetidas ao método de registro (Seção 3.3.4) e, na sequência, são utilizadas nas etapas de pré-processamento pelos métodos de segmentação de neurônios 2D, de visualização 3D, e de análise quantitativa 2D e 3D. A forma como o método se relaciona com os demais é ilustrado na Figura 3.6. As demais seções descrevem os detalhes do método.

### 3.3.1 Pré-processamento das Imagens do Canal de Luz de Transmissão

A iluminação não homogênea de fundo da imagem é corrigida aplicando-se a transformada bottom-hat (LOTUFO *et al.*, 2008) sobre a imagem, após filtragem pela mediana (GONZALEZ; WOODS, 2007) para redução do ruído.

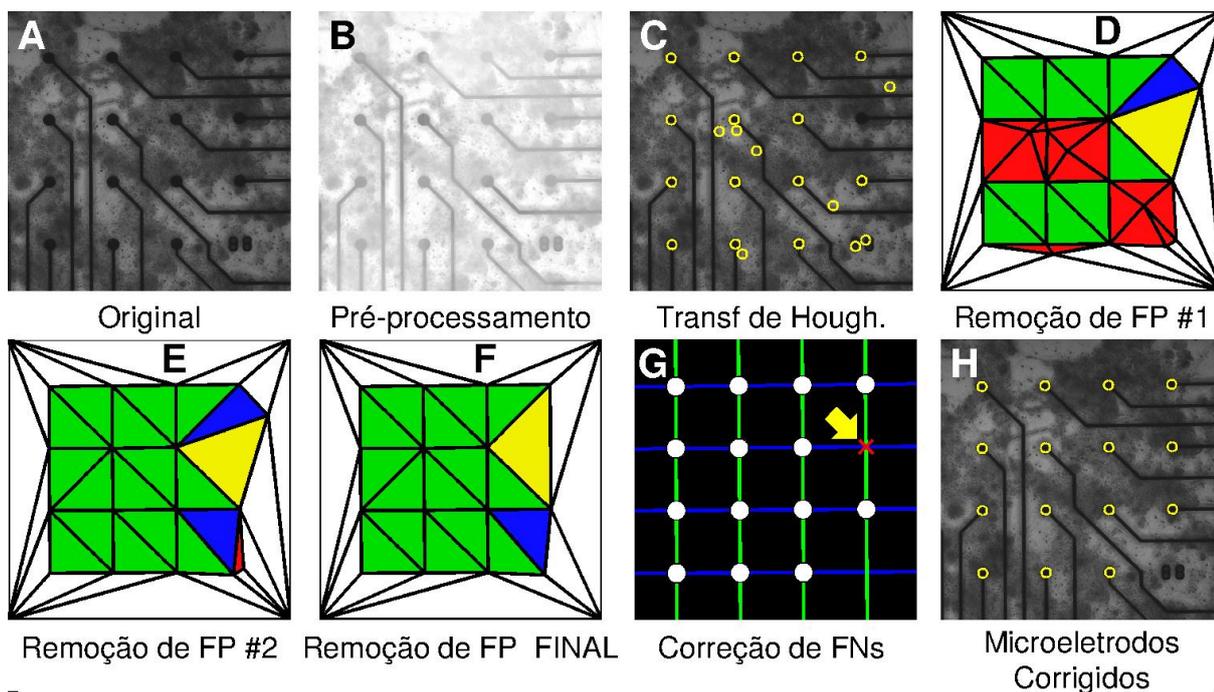


Figura 3.5: O método proposto para a identificação dos microeletrodos. (A) Imagem original obtida a partir do canal de luz de transmissão (MinIP). (B) Pré-processamento. (C) Detecção de estruturas circulares pela transformada de Hough circular. (D-F) Remoção de falsos-positivos por meio da triangulação de Delaunay (D – triangulação inicial, E – critério #1 e F – critério #2). (G) Construção de uma grade, utilizando regressão linear, para correção de pequenos erros de posicionamento e inserção de falsos-negativos. (H) Detecção final dos microeletrodos, após a correção.

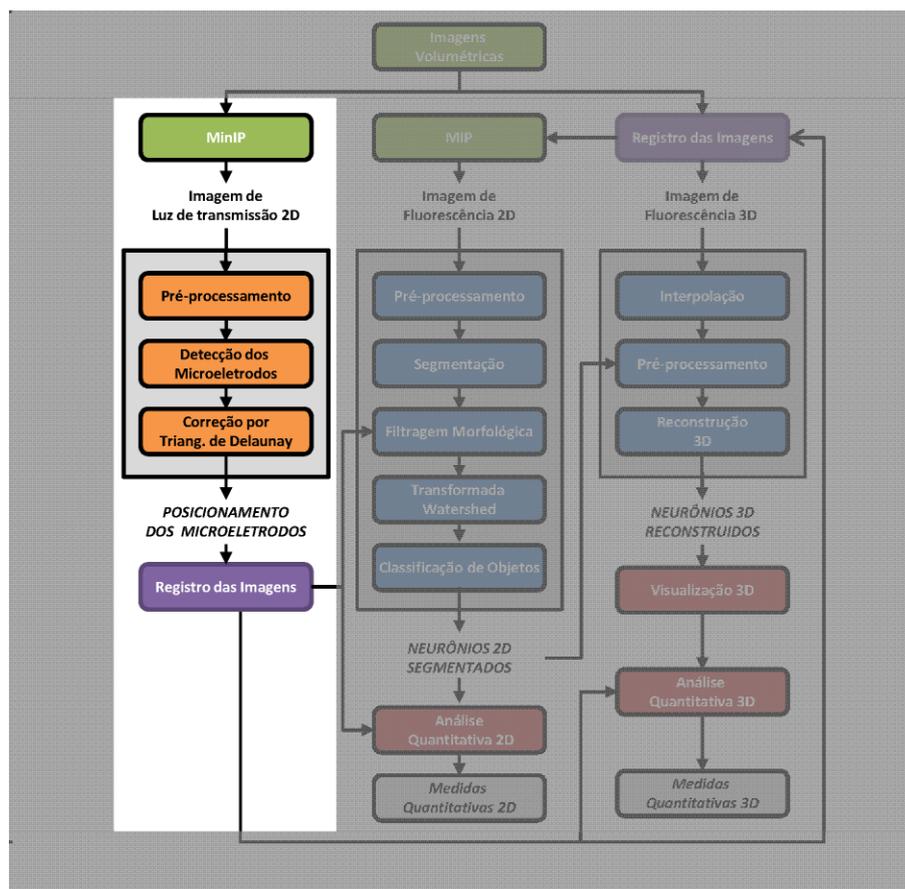


Figura 3.6: Relacionamento do método de identificação de microeletrodos com os demais métodos propostos.

### 3.3.2 Detecção de Estruturas Circulares – Transformada de Hough Circular

Os microeletrodos presentes no substrato da MEA possuem formato circular e diâmetro conhecido, de acordo com o modelo de MEA utilizado. O modelo utilizado neste estudo, MEA-60 da *Multichannel*, possui microeletrodos com 30  $\mu\text{m}$  de diâmetro. A fim de detectar automaticamente os centros dos microeletrodos utilizou-se a transformada de Hough circular (Seção 2.4.8). Utilizou-se a implementação da transformada de Hough circular presente no *plug-in* para MATLAB, desenvolvido por Peng e colaboradores, de acordo com o artigo de Peng *et al.* (PENG *et al.*, 2007).

Após terem sido detectadas pela transformada de Hough circular, as posições dos centros dos microeletrodos são multiplicadas pelo tamanho real dos pixels, para corresponder às medidas reais, como na Equação (3.1).

$$CENT_i = CENT_i(x, y) \times PIXEL\_SIZE, \quad i = 1, \dots, E. \tag{3.1}$$

em que  $E$  é o número de microeletrodos,  $PIXEL\_SIZE$  é o tamanho do pixel ao longo dos eixos  $X$  e  $Y$  (em  $\mu\text{m}$ ), e  $CENT_i(x, y)$  é a posição do centro do microeletrodo  $i$  (em pixels).

### 3.3.3 Correção Automática dos Microeletrodos por Triangulação de Delaunay

As estruturas presentes nas culturas de neurônios (os próprios neurônios, neuroglia e artefatos) podem ser confundidas com os microeletrodos nas imagens (veja a Figura 3.7(A)). Estas características podem resultar em microeletrodos não identificados e um grande número de microeletrodos identificados erroneamente pela transformada de Hough circular. Desenvolveu-se um método para corrigir automaticamente os microeletrodos identificados erroneamente. O método baseia-se no conhecimento *a priori* da disposição dos microeletrodos na forma de uma matriz quadrada e na triangulação de Delaunay dos microeletrodos identificados pela transformada de Hough circular.

O método consiste em computar a triangulação de Delaunay considerando como pontos de entrada os microeletrodos identificados pela transformada de Hough circular, além de mais quatro pontos inseridos artificialmente nas bordas da imagem. Na sequência, todos os triângulos de Delaunay são processados, exceto pelos triângulos formados por algum vértice localizado em algum dos cantos da imagem (triângulos brancos na Figura 3.5(D)). Como a distância entre microeletrodos adjacentes é conhecida, 200  $\mu\text{m}$  neste caso, os triângulos de Delaunay são processados de acordo com dois critérios. O critério #1 baseia-se no perímetro dos triângulos: apenas os triângulos cujas medidas de seus perímetros sejam próximas às de um triângulo retângulo com catetos medindo 200  $\mu\text{m}$  são considerados triângulos corretos, i.e., são compostos por vértices que correspondem a microeletrodos identificados corretamente (triângulos verdes). Os microeletrodos identificados erroneamente são os vértices nos triângulos que não respeitam o critério de perímetro (triângulos vermelhos se foram pequenos e amarelos se foram grandes) e que não são compartilhados com triângulos corretos (Figura 3.5 (D)). A remoção de microeletrodos identificados erroneamente é repetida até que não seja possível remover mais nenhuma estrutura.

O critério #2 tem o objetivo de identificar os triângulos de Delaunay que satisfazem o critério #1, porém não constituem triângulos retângulos ou cujos catetos não possuam a mesma medida. A remoção dos microeletrodos identificados erroneamente ocorre da mesma forma como no critério #1: o vértice nestes triângulo que não é compartilhado com o triângulo correto é removido. O processo também se repete enquanto for possível remover microeletrodos. Caso um número suficiente de microeletrodos seja identificado (pelo menos

dois para cada linha e coluna) constrói-se uma grade utilizando regressão linear (Figura 3.5(G)). As posições finais dos microeletrodos correspondem às intersecções entre as linhas, o que permite corrigir pequenos erros na identificação dos microeletrodos e também inserir microeletrodos não identificados pela transformada de Hough circular (seta na Figura 3.5(H)).

### 3.3.4 Registro de Imagens para Construir uma Imagem da MEA Completa

Para que seja possível adquirir uma única imagem em alta resolução que contemple toda a região de gravação da MEA foi necessário dividir a região em quadrantes, imagear cada quadrante em alta resolução e, em seguida, reuni-los em uma única imagem por meio de técnicas de registro de imagem (YU; PENG, 2011). O registro dessas imagens é necessário para tornar possível realizar medidas quantitativas que contemplem toda a cultura depositada sobre a área de gravação da MEA. Adotou-se um método de registro de imagens baseado em pontos de controle (Seção 2.4.9), em que os pontos de controle consistem dos microeletrodos identificados pelo método descrito na Seção 3.3.

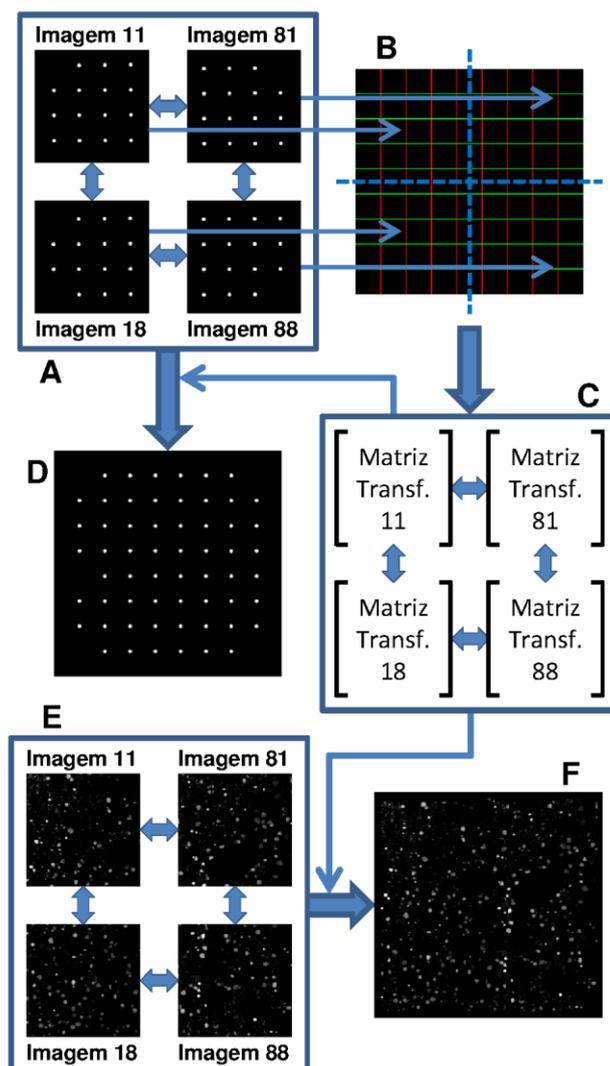
A criação da imagem registrada tem início com a construção de uma grade considerando a distância intereletrodos. O processo de registro envolve gerar matrizes de transformação para as imagens de cada quadrante, baseado nas posições dos microeletrodos e nas intersecções do reticulado. As matrizes de transformação calculadas a partir das imagens dos microeletrodos são armazenadas em arquivo para que possam ser utilizadas no registro das imagens do canal de fluorescência ou até mesmo das imagens do canal de luz de transmissão para fins de visualização.

As informações relacionadas ao posicionamento dos microeletrodos no modelo de MEA (como distância intereletrodos) facilitam estabelecer a correlação entre os pontos de controles nas imagens não registradas e na imagem final. O modelo de MEA utilizado nos experimentos possui distância entre microeletrodos de  $200 \times 200 \mu\text{m}$ . Ao incluir informações sobre o posicionamento dos microeletrodos, o método de registro ganha em automação e eficiência, pois, uma vez conhecidas as distâncias entre eles, tem-se uma boa suposição da posição correta das imagens no espaço. Em outros cenários em que não estão disponíveis pontos de controle com posicionamento previamente definidos, como no caso dos microeletrodos nesta aplicação, é necessário definir outros pontos de controle baseado em características localizadas nas partes compartilhadas entre as imagens. Essas características podem ser, por exemplo, os centroides de componentes conectados ou outras características de neurônios localizados em regiões compartilhadas entre imagens adjacentes.

A Figura 3.7 ilustra o processo de registro das imagens. (A) As imagens não registradas com os microeletrodos identificados (resultantes do método descrito na Seção 3.3). Os microeletrodos são utilizados com pontos de controle para guiar o processo de registro. (B) A partir das especificações do modelo de MEA utilizado, mais especificamente a distância intereletrodo, constrói-se uma grade em que as intersecções entre linhas e colunas são os pontos de controle sobre os quais os microeletrodos devem ser posicionados pelo método de registro. (C) A partir dos conjuntos de pontos de controle calculam-se matrizes de transformação para cada uma das quatro imagens. Estas matrizes são utilizadas para gerar uma imagem completa dos microeletrodos identificados (D) e são armazenadas em arquivos para possibilitar o registro de outras imagens. (E) As imagens obtidas a partir do canal de fluorescência são registradas considerando as matrizes de transformação computadas sobre as imagens dos microeletrodos. (F) A imagem final, após o registro das imagens, das imagens obtidas do canal de fluorescência mostradas em (E).

### 3.4 Segmentação de Neurônios 2D

Nesta seção é proposto um método eficiente para segmentação de neurônios DRG a partir de imagens 2D obtidas por meio de microscopia de fluorescência. Após a aquisição, as imagens são pré-processadas e os objetos são separados do fundo da imagem. Os componentes conectados são extraídos, e os que apresentam área inferior a um limiar são removidos. Eventuais buracos no interior dos objetos são preenchidos. Componentes conectados que representam agrupamentos de células sobrepostas ou muito próximas são separadas utilizando a transformada watershed. Um método de classificação é aplicado para separar os objetos segmentados em neurônios e artefatos, eliminando os artefatos (falso-positivos). O resultado da segmentação é utilizado para obter uma série de medidas quantitativas relacionadas ao desenvolvimento da cultura, à morfologia das células, e ao relacionamento espacial entre as células e os microeletrodos.



**Figura 3.7: Método para o registro das imagens.** (A) O conjunto de imagens não registradas contendo os microeletrodos identificados nas imagens dos quadrantes de uma cultura de neurônios em MEA. (B) Construção da grade de acordo com as medidas relativas ao modelo de MEA utilizado. Na grade, os pontos de controle são as interseções entre linhas e colunas. (C) As matrizes de transformação são computadas de acordo com os pontos de controle nas imagens de microeletrodos e na grade. (D) Resultado do registro das imagens com os microeletrodos. (E) Conjunto de imagens não registradas obtidas a partir do canal de fluorescência. (F) Resultado de registro das imagens do canal de fluorescência, considerando as mesmas matrizes de transformação obtidas para as imagens com os microeletrodos.

A Figura 3.8 ilustra com detalhes cada uma das etapas do método proposto. (A) Imagem original. (B) Pré-processamento. (C) Segmentação. (D) Filtragem morfológica, incluindo correção de oclusões. (E) Definição de marcadores para transformada watershed. (F) Classificação de objetos. A imagem final contendo os neurônios segmentados será utilizada, juntamente com a imagem resultante do método de identificação de microeletrodos, na etapa de análise quantitativa. Será utilizada também durante o pré-processamento das imagens volumétricas no método de visualização 3D (Seção 3.6).

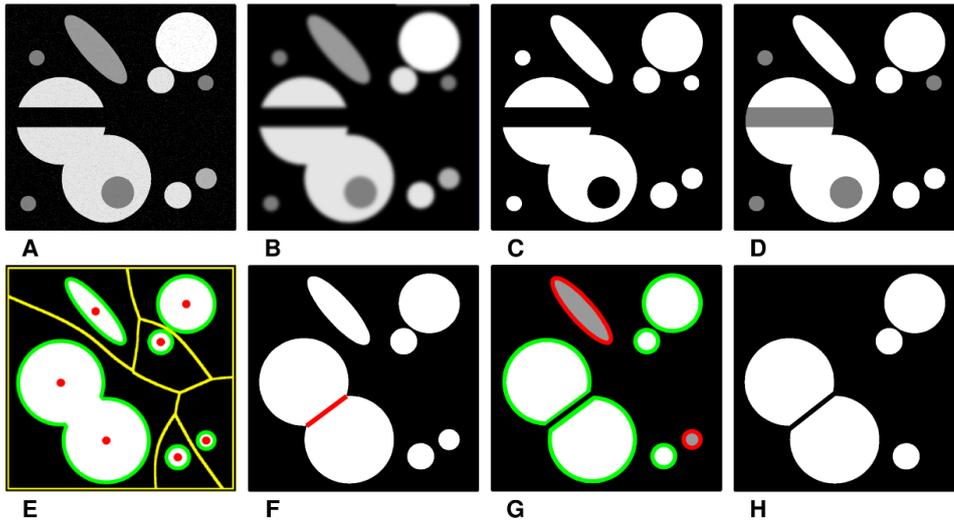


Figura 3.8: Ilustração do método proposto para a segmentação dos neurônios. (A) Região de interesse da imagem original obtida a partir do canal de fluorescência. (B) Pré-processamento. (C) Segmentação por limiarização. (D) Filtragem morfológica, incluindo correção de oclusões. (E) Definição dos marcadores para a transformada watershed. (F) Resultado da transformada watershed. (G) Classificação de objetos. (H) Imagem com os neurônios segmentados.

A Figura 3.9 mostra como o método de segmentação 2D se relaciona com os demais métodos.

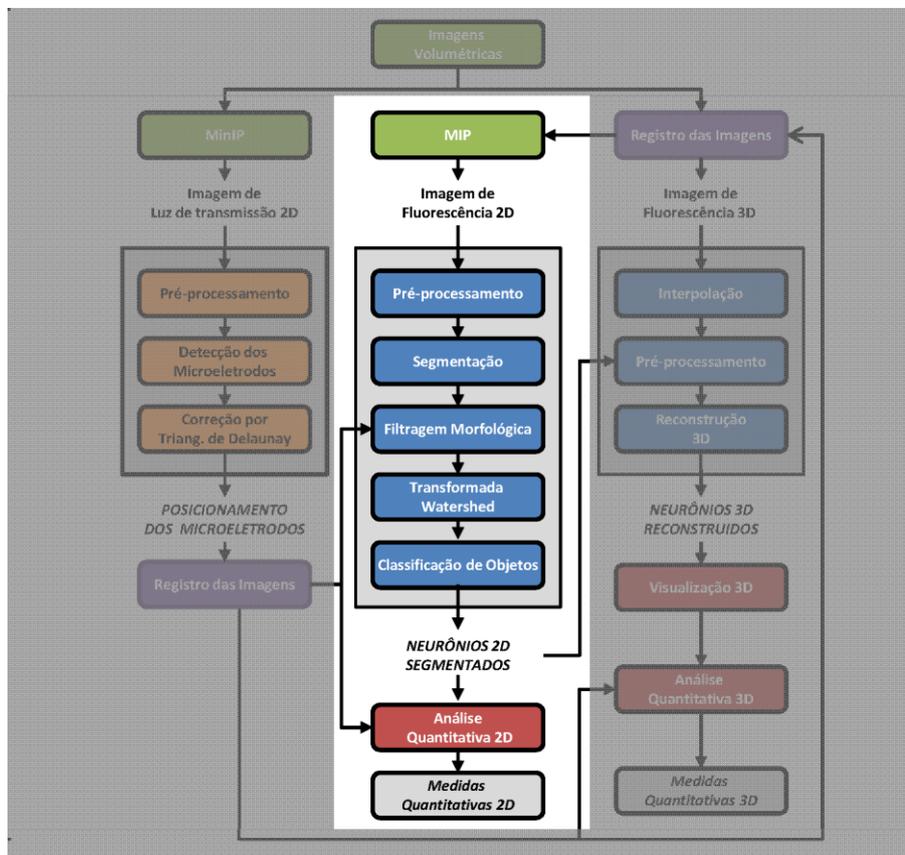


Figura 3.9: Ilustração de como o método de segmentação 2D se relaciona com os demais métodos.

O método proposto pode ser aplicado diretamente sobre cada uma das seções ópticas da série-z, ou ainda sobre o resultado da projeção das intensidades dos voxels ao longo do eixo-z. Métodos para obter uma representação 2D das imagens 3D são apresentados na Seção 2.4.1.4. Imagens 2D obtidas por meio de microscopia de fluorescência convencional também podem ser utilizadas.

Se o método for aplicado sobre alguma seção óptica individual, as medidas quantitativas não serão representativas da cultura toda, pois a imagem 2D contém informações apenas de uma fatia muito fina do espécime (BAGGETT *et al.*, 2005). Quando aplicado sobre a projeção de uma série-z, informações referentes a todo o espécime imageado são consideradas e, dessa forma, as medidas quantitativas obtidas representam todos os neurônios presentes na área imageada.

### 3.4.1 Pré-processamento

As imagens são submetidas a uma etapa de pré-processamento a fim de reduzir o ruído, inerente ao processo de aquisição das imagens, e corrigir o fundo não homogêneo presente nas imagens, evitando o surgimento de erros de segmentação.

A filtragem pela mediana é adotada para reduzir o ruído por ser mais eficiente na preservação da forma original dos objetos do que outros filtros passa-baixas, como a filtragem por média e por borramento gaussiano (GONZALEZ; WOODS, 2007).

A correção do fundo não homogêneo é realizada aplicando-se a filtragem top-hat utilizando um elemento estruturante em forma de disco com o diâmetro maior do que o das células presentes na imagem. A transformada top-hat consiste em subtrair de uma imagem a abertura morfológica dela mesma (LOTUFO *et al.*, 2008).

Se o método for aplicado sobre seções ópticas individuais pode ser necessário aplicar algum método para corrigir a atenuação do sinal ao longo do eixo-z, resultado da dispersão da luz e do processo de *photobleaching*. Métodos eficientes para correção da atenuação do sinal geralmente possuem alto custo computacional (LILJEBORG *et al.*, 1995; MARGADANT *et al.*, 1996; GUAN *et al.*, 2008). Para alguns trabalhos, métodos mais simples e com menor custo computacional podem ser mais adequados (LIN *et al.*, 2003; KO; GUNASEKARAN, 2007; INDHUMATHI *et al.*, 2012). A Seção 2.4.1.6 discute alguns métodos para correção da atenuação do sinal.

### 3.4.2 Segmentação da Imagem em Fundo e Objetos

Após a etapa de pré-processamento, a imagem em níveis de cinza é segmentada. A operação de segmentação separa a imagem em pixels de fundo e pixels de objetos, resultando em uma imagem binária, em que os pixels de fundo são representados pelo valor 0 e os pixels de objetos pelo valor 1. Conjuntos de pixels de objeto conectados representam um objeto na imagem binária e são denominados componentes conectados (TELEA, 2007; LOTUFO *et al.*, 2008).

Utilizou-se o algoritmo de limiarização aplicado localmente. Para isso, dividiram-se as imagens em  $num\_tiles \times num\_tiles$  imagens menores, aplicando na sequência o algoritmo de Otsu (OTSU, 1979) em cada uma delas individualmente. O algoritmo do Otsu é descrito na Seção 2.4.2.1, sua versão local desconsidera a variação de intensidade ao longo da imagem completa evitando que alguns neurônios não sejam identificados.

Métodos de segmentação por limiarização, como o método de Otsu, não consideram a relação espacial entre os pixels e fazem com que os algoritmos sejam fortemente afetados pelo ruído. Esse problema é solucionado por meio da aplicação de filtros espaciais na etapa de pré-processamento e, principalmente, por meio da etapa de filtragem morfológica descrita na seção seguinte.

### 3.4.3 Filtragem Morfológica e Correção das Oclusões de Neurônios

Alguns componentes conectados presentes na imagem binária representam estruturas de interesse, neste caso os neurônios DRG. Já os outros componentes conectados surgem devido à presença de ruído ou artefatos na cultura (Figura 3.10(A)). A operação de abertura por área (Seção 2.4.3.2) é capaz de eliminar componentes conectados com área inferior a um limiar predefinido. A operação de reconstrução morfológica (Seção 2.4.3.4) é utilizada para preencher eventuais buracos presentes no interior dos objetos (Figura 3.10(B)).

Algumas partes dos neurônios localizadas sobre os microeletrodos ou trilhas são obstruídas e não são visíveis nas imagens do canal de fluorescência, como pode ser observado na Figura 3.11(C) e na Figura 3.12(A). Essa característica pode levar a erros de segmentação, principalmente de supersegmentação. Para contornar este problema e melhorar os resultados da segmentação propõe-se um método para identificar as bordas das células que fazem fronteira com os microeletrodos e trilhas e, dessa forma, inferir a parte obstruída do neurônio.

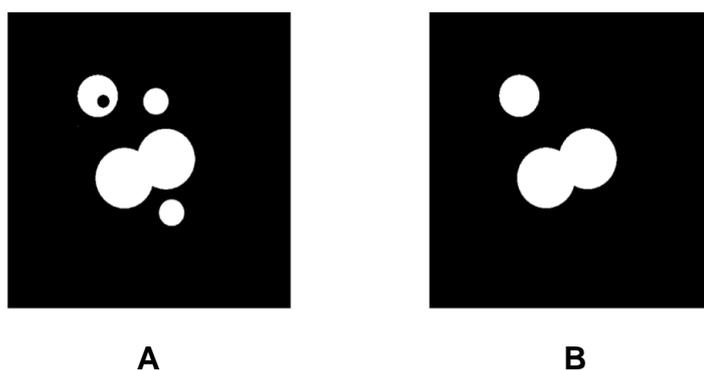


Figura 3.10: Ilustração da aplicação da etapa de filtragem morfológica. (A) Imagem binária com quatro componentes conectados. (B) Os componentes conectados com área inferior a um valor limiar são removidos pela operação de abertura por área. A reconstrução morfológica preenche eventuais buracos no interior dos componentes conectados.

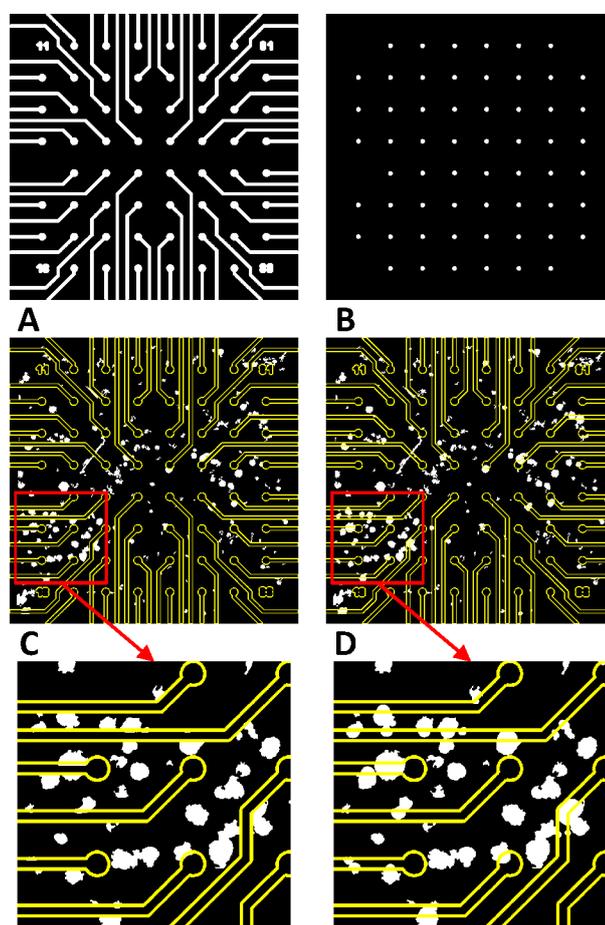
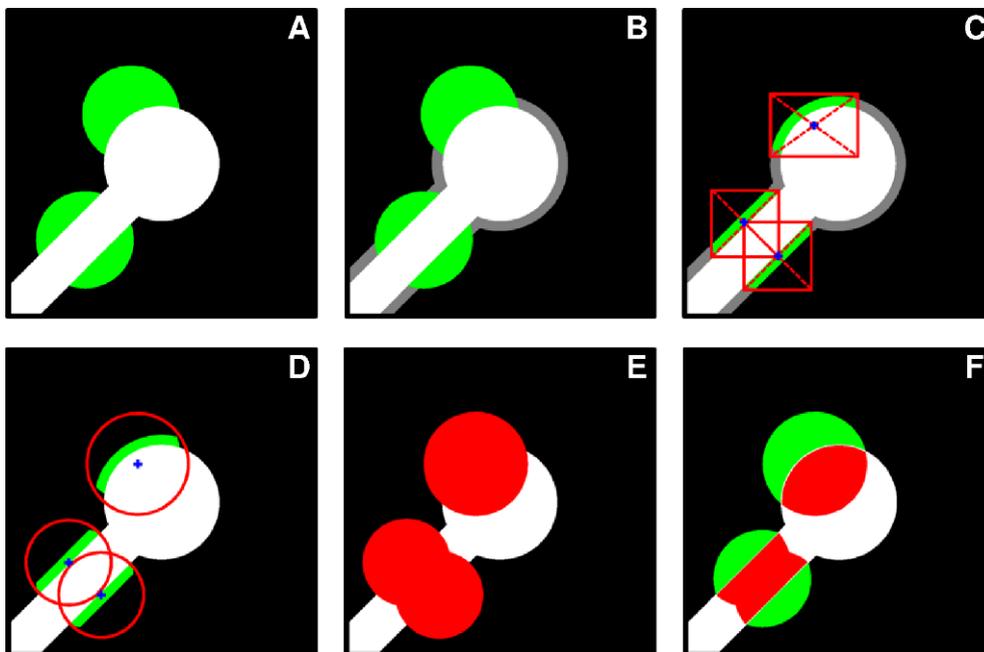


Figura 3.11: Detalhes do processo de correção da oclusão de neurônios pelos microeletrodos. (A) Imagem gabarito das trilhas e microeletrodos correspondente ao modelo de MEA utilizado. (B) Imagem resultando da detecção dos microeletrodos na cultura que esta sendo processada. (C) Imagem resultante da etapa de filtragem morfológica sobreposta pelo gabarito da MEA, após o registro. (D) Imagem após correção de oclusão sobreposta pela imagem gabarito do modelo de MEA. As imagens na linha inferior mostram detalhes das imagens C e D, respectivamente.

O método consiste em registrar a imagem binária resultante da operação de filtragem morfológica (Figura 3.11(A)) com um gabarito do modelo de MEA que contém as trilhas e os microeletrodos (Figura 3.11(B)). Para obter os pontos de controle utilizou-se a imagem contendo os microeletrodos (Figura 3.11(C)) e o resultado é uma máscara que será utilizada para identificar células que possuem partes localizadas sobre microeletrodos ou trilhas (Figura 3.11(D)).

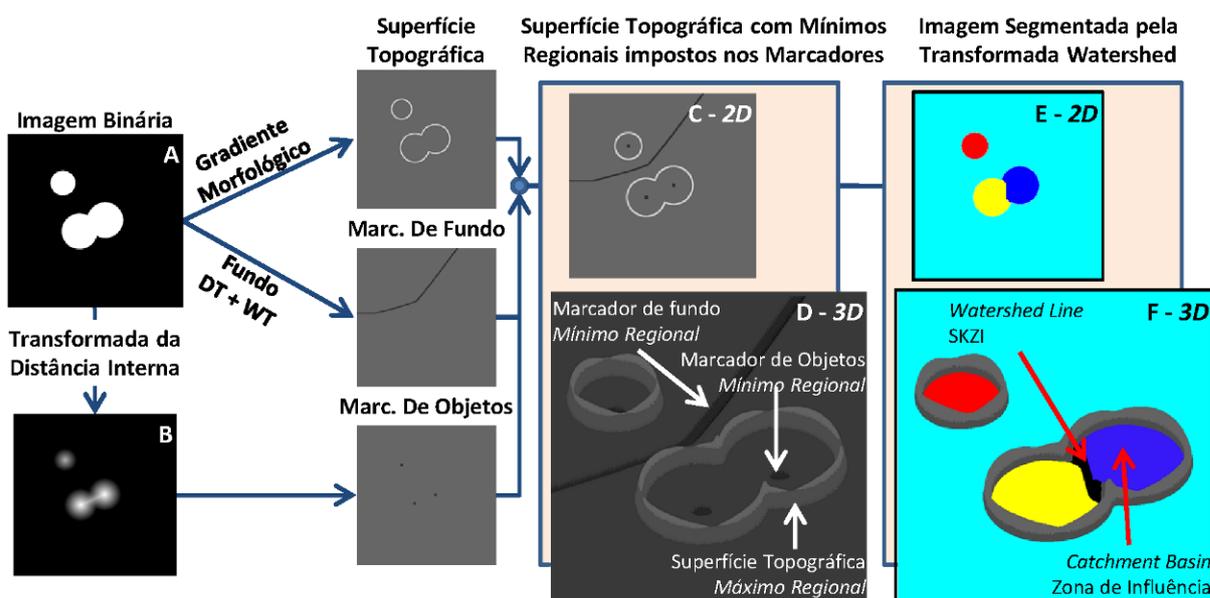
Na sequência, as trilhas e microeletrodos na imagem gabarito da MEA são dilatadas (dilatação morfológica por um elemento estruturante em forma de disco com raio 4) para forçar a ocorrência de intersecções com as fronteiras dos neurônios obstruídos (Figura 3.12(B)). Considera-se que os objetos que possuem intersecção com as trilhas ou microeletrodos estão em contato com os mesmos e, conseqüentemente uma parte deles está obstruída. Com base nos *bounding boxes* das intersecções identificadas constroem-se círculos com centro e diâmetros que correspondem, respectivamente, aos centros e diagonais dos *bounding boxes* (C-E). As partes dos círculos que fazem intersecção com os microeletrodos e trilhas são uma aproximação das partes dos neurônios ocluídas por estes (em vermelho no item (F)).



**Figura 3.12:** O método de correção de oclusão de neurônios. (A) Imagem contendo dois neurônios que possuem partes ocluídas por um microeletrodo e sua trilha. (B) Os microeletrodos e trilha são dilatados. (C) Caso exista intersecção entre os neurônios e a parte dilatada dos microeletrodos e trilha considera-se que parte dos neurônios está localizada sobre o microeletrodos. (D-E) Computa-se o *bounding-box* da intersecção entre neurônios e microeletrodos e constrói-se um círculo com centro e diâmetro iguais à diagonal do *bounding-box*. (F) A parte do neurônio ocluída pelo microeletrodos é inferida como sendo a intersecção entre os círculos e os microeletrodos.

### 3.4.4 Transformada Watershed

A segmentação pelo método de Otsu em conjunto com a filtragem morfológica é capaz de separar os pixels de objetos dos pixels de fundo na imagem (TELEA, 2007). No entanto esse tipo de abordagem não é suficiente para segmentar corretamente os componentes conectados formados por grupos de células localizadas muito próximas ou sobrepostas (Figura 3.13(A)) (EDLUND, 2008). A transformada watershed é uma técnica eficiente e muito utilizada para separar esse tipo de estrutura (HUANG *et al.*, 2010). Como discutido na Seção 2.4.5, a transformada watershed sofre com o problema da supersegmentação. Para contornar esse problema adotou-se a transformada watershed com marcadores utilizando transformada da distância binária e transformada máxima estendida.



**Figura 3.13:** O procedimento para separação de componentes conectados subsegmentados. (A) Imagem binária gerada por limiarização da imagem pré-processada. (B) Transformada da distância da imagem binária. (C) Marcadores para os objetos são extraídos do mapa de distâncias utilizando a transformada máxima estendida. Marcadores para o fundo da imagem são obtidos computando a transformada watershed da transformada da distância exterior da imagem binária. O gradiente morfológico é computado sobre a imagem binária e os marcadores de objetos e fundo são impostos como mínimos regionais sobre a mesma. (D) A superfície topográfica descrita em (C) mostrada em 3D, onde é possível visualizar os máximos regionais (fronteiras dos componentes conectados destacados pelo gradiente) e os mínimos regionais (impostos nos marcadores). (E) Resultado da segmentação watershed. As watershed lines são criadas para separar as águas provenientes de pontos de inundação distintos. Cada catchment basin é mostrada com uma cor diferente. (F) O resultado da transformada watershed mostrada em 3D, onde é possível observar a watershed line criada para separar os componentes conectados subsegmentados.

### 3.4.4.1 Transformada Watershed com Marcadores

A transformada watershed com marcadores é utilizada para separar os componentes conectados. Os passos descritos a seguir descrevem o procedimento adotado para aplicar o algoritmo watershed com marcadores a partir da transformada da distância e transformada máxima estendida.

**Marcadores de objetos.** Ao aplicar a transformada da distância (Seção 2.4.4) sobre os componentes conectados da imagem binária, observa-se que componentes conectados formados por duas ou mais células sobrepostas ou em contato resultam em múltiplos picos na imagem transformada, como pode ser observado na Figura 3.13(B).

Os máximos regionais (componentes cercados por pixels com intensidade menor) do mapa de distância são bons marcadores para as células. Uma imagem contendo apenas os máximos regionais, RMAX, pode ser obtida a partir de uma imagem I utilizando reconstrução morfológica, conforme a Equação (3.2),

$$RMAX(I) = I + 1 - (I + 1 \Delta_E I) \quad (3.2)$$

em que  $\Delta_E$  é o operador de reconstrução morfológica. A transformada h-máxima, HMAX<sub>h</sub>, remove qualquer objeto com altura menor ou igual a h, e decreta a altura dos demais em h. HMAX<sub>h</sub> pode ser calculada reconstruindo a imagem I após subtrair h dela mesma, de acordo com a Equação (3.3),

$$HMAX_h(I) = I \Delta_E (I - h) \quad (3.3)$$

A transformada máxima estendida (*extended máxima transform*), EMAX<sub>h</sub>, é definida como os máximos regionais da transformada h-máxima (SOILLE, 2003) (Equação (3.4)),

$$EMAX_h(I) = RMAX(HMAX_h(I)) \quad (3.4)$$

Devido às irregularidades nas bordas dos objetos e a obstrução de partes de algumas células pelos microeletrodos, ainda pode ser possível observar um número excessivo de máximos regionais, o que podem gerar artefatos e erros de supersegmentação. A transformada

máxima estendida filtra os máximos regionais com altura inferior a  $h$ , restando apenas os mais relevantes para serem utilizados como marcadores de células. A escolha do valor para o parâmetro  $h$  é extremamente importante para o resultado da segmentação. Valores muito baixos de  $h$  podem aumentar a quantidade de falso-positivos (artefatos e erros de supersegmentação), enquanto valores muito altos podem elevar o número de falso-negativos (células não identificadas e erros de subsegmentações).

**Marcadores de fundo.** O esqueleto por zonas de influência (SKIZ) da imagem é computado aplicando-se a transformada watershed sobre a transformada da distância externa da imagem binária (ADIGA; CHAUDHURI, 2001; LOTUFO *et al.*, 2008). O SKIZ da imagem binária, após a filtragem morfológica, é um bom marcador para o fundo da imagem. O SKIZ se estende ao longo de todo o componente conectado do fundo da imagem e está localizado o mais distante possível de todos os objetos (Figura 3.13(C)).

**Superfície topográfica e imposição dos mínimos locais.** Os marcadores de objetos e de fundo são utilizados para impor mínimos regionais, ou pontos de inundação, sobre uma superfície topográfica. Essa superfície é obtida computando-se o gradiente morfológico da imagem binária após a filtragem morfológica. O gradiente morfológico é obtido subtraindo a imagem dilatada da imagem original e funciona como um mecanismo de extração de fronteiras (GONZALEZ; WOODS, 2007). As bordas dos componentes conectados presentes na imagem binária tornam-se máximos regionais no gradiente da imagem.

**Aplicação da transformada watershed sobre os marcadores.** A superfície topológica, obtida pelo cálculo do gradiente da imagem binária, será inundada pela transformada watershed a partir dos mínimos regionais impostos nos marcadores, formando as *catchment basins* (Figura 3.13(C-D)). As águas provenientes de mínimos regionais localizados em componentes conectados distintos tendem a se encontrar nos máximos locais da superfície topográfica, onde são construídas as *watershed lines*. Dessa forma, as *catchment basins* terão o formato muito próximo ao das células (Figura 3.13(C)). Como foi dito anteriormente, a segmentação por limiarização gera componentes conectados subsegmentados na imagem binária, que por sua vez, apresentam múltiplos mínimos regionais no seu interior (Figura 3.13(C-D)). A inundação realizada a partir desses mínimos regionais levará a uma partição desse componente conectado de acordo com as zonas de influência da cada um dos mínimos regionais. A zona de influência de um mínimo regional é definida pelos pixels localizados mais próximos desse mínimo regional pela métrica geodésica, e equivalem às *catchment basins* (Figura 3.13(E-F)). Os limites entre as zonas de influência são denominados

esqueletos por zona de influência, SKIZ, e correspondem às *watershed lines* (Figura 3.13(E-F)) (ADIGA; CHAUDHURI, 2001; LOTUFO *et al.*, 2008).

O resultado da transformada watershed é uma matriz de rótulos, ou seja, os pixels de cada componente conectado são identificados por um rótulo diferente (GONZALEZ; WOODS, 2007; TELEA, 2007). A matriz de rótulos é convertida em uma imagem binária, em que os pixels das *watershed lines* e da *catchment basin* do fundo da imagem são convertidos em pixels de fundo (0), e os pixels das demais *catchment basins* são convertidos em pixels de objeto (1). Os componentes conectados extraídos da imagem binária correspondem aos objetos identificados pela transformada watershed.

### 3.4.5 Classificação dos Objetos

Após a aplicação da transformada watershed é possível observar um grande número de erros de segmentação, principalmente artefatos (falso-positivos). Propõe-se, dessa forma, uma etapa para a classificação desses objetos com o objetivo de remover os artefatos. Baseado na literatura (MARTÍNEZ-GUTIÉRREZ; CASTELLANOS, 2007) e na observação dos neurônios DRG construiu-se um modelo paramétrico desse tipo de neurônios baseado nas seguintes características: área, circularidade, excentricidade, intensidade média e desvio padrão (um descritor de textura simples). O vetor de características computado para cada objeto é utilizado para classifica-los como “neurônios” ou “artefatos”. Como estas características são apresentadas em diferentes faixas de valores, aplicou-se a Transformada Normal de Características (TNC) (COSTA; CESAR-JR., 2000) sobre todo o conjunto de características de forma que este venha a apresentar média 0 e desvio padrão 1, conforme descrito na Seção 2.4.6.2.

A área é calculada pela soma do número de pixels no interior do componente conectado multiplicado pela área real do pixel (Equação (3.5)),

$$AREA = k \times PIXEL\_AREA \quad (3.5)$$

em que  $k$  é o número de pixels do componente conectado e  $PIXEL\_AREA$  é a área real de um pixel (em  $\mu\text{m}^2$ ). As dimensões reais dos pixels geralmente constam como meta-dados nas imagens geradas pelo microscópio.

A circularidade de um objeto é calculada com base na área e no perímetro do objeto, de acordo com a Equação (3.6).

$$ROUND = \frac{4 \times \pi \times AREA}{PERIM^2} \quad (3.6)$$

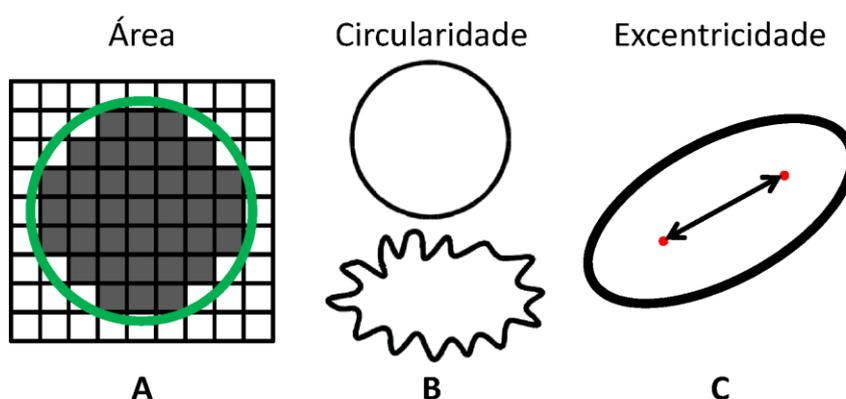
A circularidade de um objeto varia de 0 (baixa circularidade) até 1 (alta circularidade).

A excentricidade mede o grau de alongamento de uma forma e é calculada sobre uma elipse com os mesmos segundos-momentos do objeto. A excentricidade é a razão da distância entre os focos da elipse e o seu maior eixo. A excentricidade varia de 0 até 1, sendo que 0 corresponde a um círculo perfeito e 1 a um segmento de linha.

Intensidade média dos objetos é obtida por meio da média dos valores de intensidade de cada um dos pixels que compõe o componente conectado.

O desvio padrão dos pixels que compõem os componentes conectados é utilizado como um descritor de textura simples e eficiente (LIN *et al.*, 2003).

Os parâmetros área, circularidade e excentricidade são ilustrados na Figura 3.14.



**Figura 3.14:** Algumas das características utilizadas para classificar os objetos segmentados em neurônios DRG ou falso-positivos. (A) A área do objeto é aproximada pela soma da área dos pixels que o compõem. (B) O círculo na parte superior possui alta circularidade enquanto na parte inferior possui baixa circularidade. (C) A excentricidade mede o alongamento da forma por meio da razão entre o foco (seta dupla) e o maior eixo.

Os componentes conectados inferiores a um limiar foram removidos durante a etapa de filtragem morfológica (Seção 3.4.3), porém, outros pequenos fragmentos podem surgir após a aplicação da transformada watershed.

Para a escolha dos classificadores considerou-se artigos da literatura relacionados com a classificação de neurônios e outros tipos de células em imagens obtidas por microscopia, um cenário muito parecido com o abordado neste trabalho. Optou-se por utilizar algoritmos de classificação por agrupamentos k-means (CHEN *et al.*, 2012), assim como o algoritmo de classificação supervisionado *Support Vector Machine* (SVM) (BURGES, 1998; MARCUZZO

*et al.*, 2008) em três estratégias, buscando tornar o processo de classificação mais eficiente e factível em aplicações reais.

Os três diferentes esquemas de classificação são empregados em diferentes cenários de utilização: (A) um esquema de classificação completamente não supervisionados baseado no algoritmo de classificação k-means, aplicado sobre uma única imagem. (B) Um esquema de classificação semi-supervisionado baseado em Máquinas de Vetor de Suporte (SVM), em que a SVM é treinada a partir de objetos rotulados (neurônios e artefatos) pelo algoritmo k-means. (C) Um esquema completamente supervisionado em que o SVM é treinado com base em uma pequena porção (20%) dos objetos em cada uma das imagens do conjunto manualmente classificados.

Independente do esquema de classificação escolhido, todos os objetos presentes na imagem de entrada serão classificados como “neurônios” ou “artefatos”. A Figura 3.15 ilustra os esquemas de classificação. A estratégia completamente não supervisionada é adequada quando apenas uma, ou muito poucas, imagens deste tipo de neurônios estão disponíveis. Quando se tem disponível um conjunto de imagens relativamente grande, porém não se dispõe de alguém habilitado para delinear uma parcela dos objetos em cada imagem, a estratégia semi-supervisionada deve ser utilizada. É importante destacar que quanto maior é o conjunto de informações sobre os neurônios, as taxas classificação tendem a ser melhores do que as obtidas pela estratégia puramente não supervisionada, em que estão disponíveis apenas informações contidas em uma única imagem. Caso se disponha de um especialista que possa classificar manualmente uma pequena parcela de algumas das imagens do conjunto a classificação supervisionada deve ser aplicada.

Após cada processo de classificação as características dos objetos rotulados são armazenadas em um banco de dados com o objetivo enriquecer o conhecimento sobre aquele tipo de células e, dessa forma, melhorar futuras classificações.

### **3.5 Análise Quantitativa 2D**

A análise quantitativa automatizada da cultura é realizada por meio do processamento das imagens binárias resultantes do processo de segmentação de neurônios descrito nas seções anteriores. Os componentes conectados extraídos da imagem binária, em conjunto com a informação sobre o posicionamento dos microeletrodos na MEA são utilizados para computar

uma série de medidas quantitativas importantes para monitorar o desenvolvimento dos neurônios plaqueados na MEA e para estudar as relações entre a atividade eletrofisiológica dos neurônios gravada pela MEA e a morfologia, distribuição espacial e topologia dos neurônios em relação aos microeletrodos.

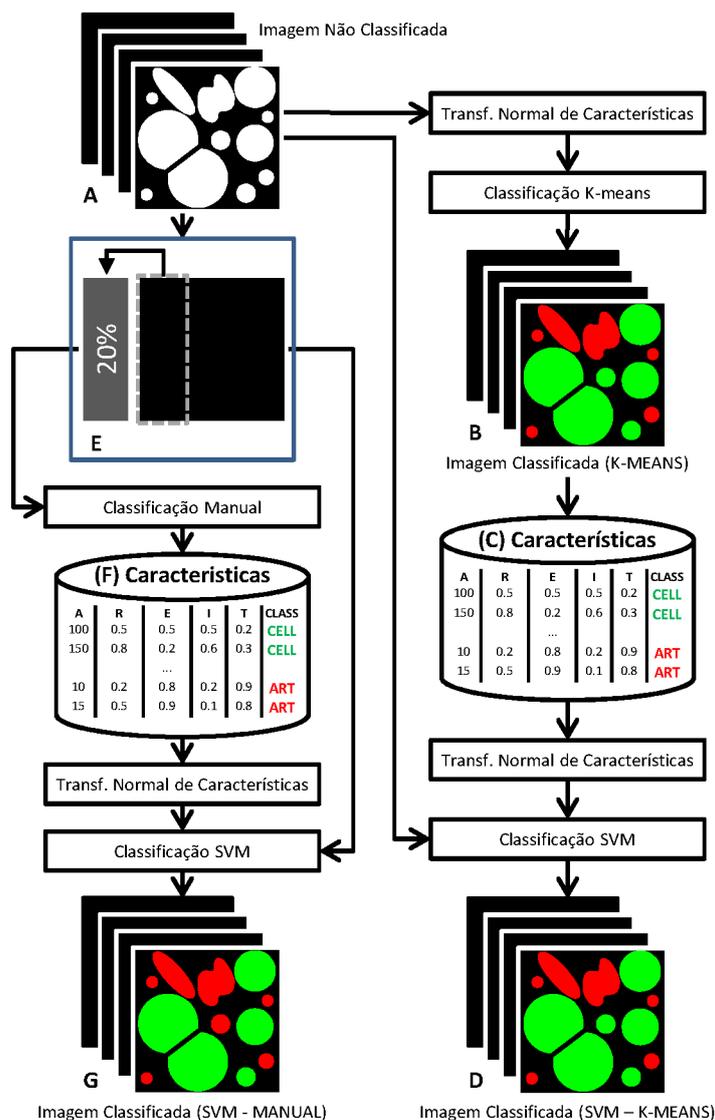
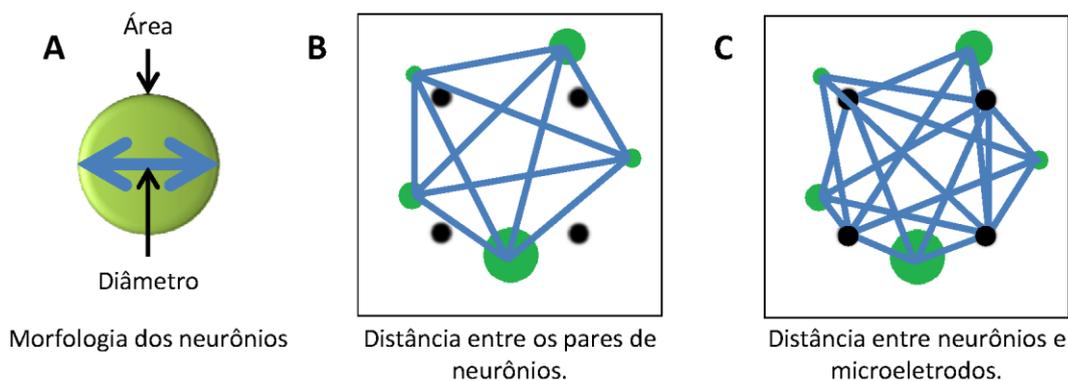


Figura 3.15: Esquemas de classificação de objetos. (A) Imagens não classificadas, resultantes da etapa de transformada watershed. (B) Aplicação do algoritmo k-means sobre cada uma das imagens, após a TNC. (C) Banco de dados contendo as características dos objetos e respectivos rótulos obtidos pelo algoritmo k-means. (D) O banco de dados em (C) é utilizado como conjunto de treinamento para a SVM. (E) 20% dos objetos nas imagens originais são manualmente classificados por um especialista. (F) Banco de dados com os resultados da classificação manual. (G) SVM treinada com o banco de dados em F. Características dos objetos: (A) área, (R) circularidade, (E) excentricidade, (I) intensidade média e (T) desvio padrão.

### 3.5.1 Análise Morfológica e Topológica

As seguintes medidas quantitativas básicas são calculadas: (A) o número de neurônios presentes na área imageada; (B) o perímetro dos neurônios; (C) o diâmetro dos neurônios; (D) a área dos neurônios; (E) as distâncias entre todos os pares de neurônios; (F) as distâncias entre os neurônios e os microeletrodos. O perímetro, diâmetro e área dos neurônios são calculados sobre uma projeção 2D de uma célula. As medidas de diâmetro e área dos neurônios estão relacionadas com a sua morfologia, já as distâncias entre pares de neurônios e as distâncias entre microeletrodos e neurônios estão relacionadas com a distribuição espacial dos neurônios na MEA. A forma como essas medidas são computadas é apresentada na sequência e a Figura 3.16 ilustra algumas delas.



**Figura 3.16: Medidas quantitativas 2D básicas da morfologia dos neurônios (A) e do relacionamento espacial entre os pares de neurônios (B) e entre neurônios e microeletrodos (interface neurônio-eletrodo) (C). Círculos pretos representam microeletrodos e círculos verdes representam células.**

O número de neurônios presentes na imagem é obtido naturalmente ao final do processo de segmentação, e corresponde ao número de componentes conectados remanescentes.

O perímetro, PERIM, de um objeto é calculado pelo somatório das distâncias entre cada par de pixels adjacentes ao longo da borda do objeto. O valor obtido é multiplicado pelo tamanho real do pixel.

O diâmetro, DIAM, de uma célula é estimado a partir do seu perímetro de acordo com a Equação (3.7).

$$DIAM = \frac{PERIM}{\pi} \quad (3.7)$$

Uma estimativa da área,  $\hat{ÁREA}$ , das células é obtida pelo número de pixels que compõem cada componente conectado multiplicado pela área real dos pixels (Equação (3.8)),

$$\hat{ÁREA} = k \times PIXEL\_ÁREA \quad (3.8)$$

em que  $k$  é o número de pixels que compõem o componente conectado e  $PIXEL\_ÁREA$  é a área real de um pixel (em  $\mu m^2$ ).

O centroide de um objeto com densidade uniforme corresponde ao seu centro de massa. O centroide da cada célula é calculado pela média das posições de todos os pixels do componente conectado e multiplicado pela dimensão real dos pixels, de acordo com a Equação (3.9),

$$CENT_{Célula}(x, y) = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M p_i(x, y) \times PIXEL\_SIZE \quad (3.9)$$

em que  $M$  é o número de pixels naquele componente conectado,  $p_i(x, y)$ , é a posição do pixel  $i$  na imagem, e  $PIXEL\_SIZE$  é o tamanho de um pixel.

Os centroides das células são utilizados para calcular a distância Euclidiana entre todos os pares de neurônios ( $i, j$ ). As distâncias são armazenadas em uma matriz de distâncias,  $DIST$ , de acordo a Equação (3.10),

$$DIST(i, j) = \left\| CENT_i(x, y) - CENT_j(x, y) \right\|, \quad i, j = 1, \dots, C \quad (3.10)$$

em que  $C$  é o número de células identificadas na imagem, e  $CENT_i(x, y)$  é o centroide do componente conectado que representa aquela célula.

As distâncias entre os centros dos microeletrodos (identificados de acordo com a Seção 3.3) e os centroides das células são calculadas e armazenadas em uma matriz de distâncias,  $DIST\_E$ , de acordo com a Equação (3.11),

$$DIST\_E(elec(i), célula(j)) = \|CENT_{elec(i)} - CENT_{célula(j)}\|, \quad i = 1, \dots, E; j = 1, \dots, C \quad (3.11)$$

em que  $E$  é o número de microeletrodos e  $C$  é o número de células presentes na imagem.

### 3.5.2 Classificação Morfológica e Topológica

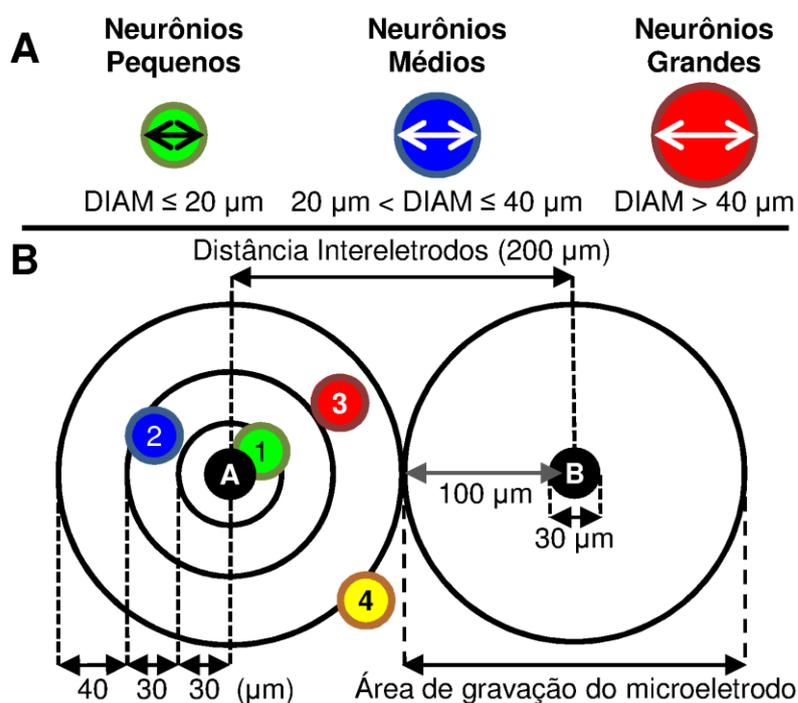
Os neurônios foram classificados de acordo com o tamanho de suas somas. A área da superfície da célula em contato com o microeletrodo é uma característica determinante para a aquisição dos sinais eletrofisiológicos pelo sistema MEA e está diretamente relacionada ao tamanho das células. As características morfológicas desse tipo de neurônio estão relacionadas com a propagação dos sinais eletrofisiológicos no corpo (HARPER; LAWSON, 1985). Os neurônios presentes nas imagens foram classificados de acordo com o seu diâmetro, DIAM, em: (A) neurônios pequenos ( $DIAM \leq 20 \mu m$ ); (B) neurônios médios ( $20 < DIAM \leq 40 \mu m$ ); (C) neurônios grandes ( $DIAM > 40 \mu m$ ). Os valores foram definidos de acordo com classificações presentes na literatura (MARTÍNEZ-GUTIÉRREZ; CASTELLANOS, 2007).

A matriz que contém as distâncias entre os centroides dos neurônios e dos microeletrodos, DIST\_E, é utilizada para classificar os neurônios de acordo com a distância em relação aos microeletrodos. Como a distância intereletrodos é de  $200 \mu m$ , apenas os neurônios localizados a até  $100 \mu m$  de distância do centro dos microeletrodos são considerados, o que leva a uma estimativa da taxa de neurônios por microeletrodos. O diâmetro dos microeletrodos ( $30 \mu m$ ) é mais ou menos semelhante aos dos neurônios DRG ( $15 - 50 \mu m$ ), dessa forma as células dentro da área de gravação de cada microeletrodo são classificadas como: (A) potencialmente conectadas ( $DIST\_E \leq 30 \mu m$ ); (B) vizinhas dos microeletrodos ( $30 < DIST\_E \leq 60$ ); (C) distantes dos microeletrodos ( $DIST\_E > 60$ ). A Figura 3.17 ilustra o processo de classificação, o neurônio '1' é classificado como potencialmente conectado, o neurônio '2' está na região de vizinhança, o neurônio '3' está distante do microeletrodo, porém ainda na área de gravação. O neurônio '4' está fora da área de gravação do microeletrodo A.

As classificações morfológica e topológica são realizadas considerando toda a região de gravação da MEA, com o objetivo de descrever a cultura como um todo. As classificações também são realizadas considerando cada microeletrodos individualmente, ou seja, buscando caracterizar morfológica e topologicamente cada microeletrodos da MEA no que diz respeito aos neurônios localizados mais próximos a ele.

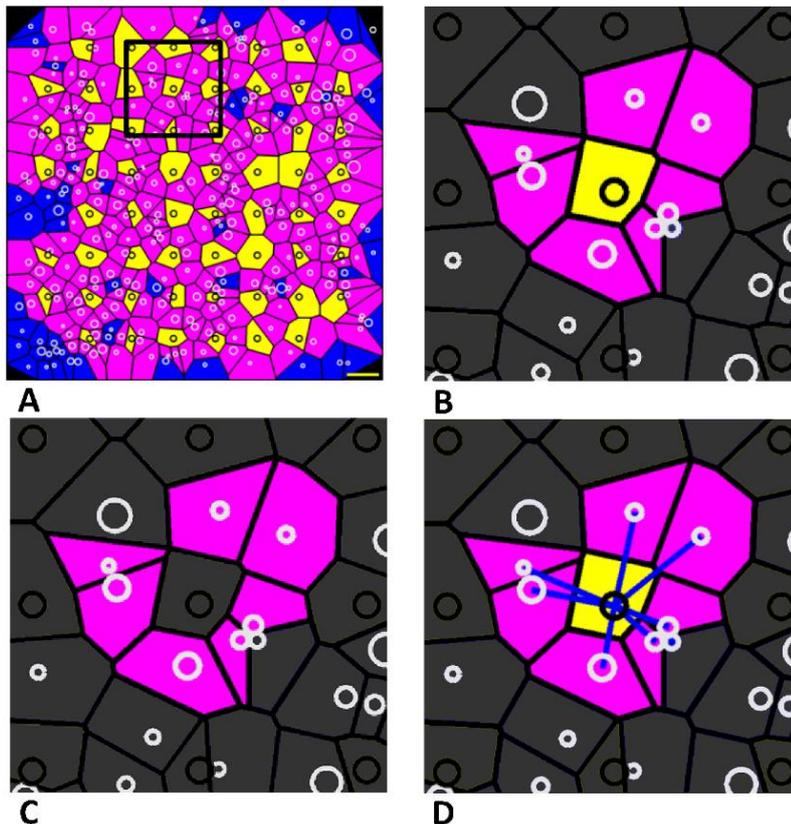
### 3.5.3 Análise Topológica baseada no Diagrama de Voronoi

Os neurônios topologicamente mais próximos de cada microeletrodo são selecionados de acordo com o diagrama de Voronoi. Para isso, computa-se o diagrama de Voronoi dos neurônios da cultura em conjunto com os microeletrodos. A ideia principal desta classificação é que os polígonos de Voronoi de cada neurônio (ou microeletrodo) está relacionado com a sua região de influência: com a propagação dos sinais eletrofisiológica no caso dos neurônios e com a capacidade de gravação destes sinais no caso dos microeletrodos. Todos os neurônios cujos polígonos são adjacentes (compartilham alguma aresta) com o polígono de Voronoi de algum microeletrodo pertencem ao chamado 1-anel deste microeletrodos. Os neurônios que pertencem ao 1-anel de um microeletrodos são considerados, topologicamente, muito próximos a ele e possuem maior influência, pelo menos probabilisticamente, na formação do sinal capturado pelo microeletrodos do que os neurônios topologicamente mais distantes. Em alguns casos, um neurônio pode pertencer a dois ou mais 1-anéis, o que configura uma influência máxima em mais de um microeletrodos.



**Figura 3.17:** Ilustração das classificações dos neurônios de acordo com as suas medidas quantitativas morfológicas e topológicas. (A) Classificação morfológica dos neurônios de acordo com o diâmetro das somas: neurônios pequenos, médios e grandes. (B) Classificação dos neurônios de acordo com a distância em relação aos microeletrodos em: neurônios conectados (neurônio 1); neurônios na área de vizinhança (neurônio 2); neurônios distantes porém ainda na área de gravação de algum microeletrodo (neurônio 3) e neurônios fora da área de gravação de qualquer microeletrodo (neurônio 4).

A Figura 3.18 ilustra a classificação topológica dos neurônios de acordo com o diagrama de Voronoi. (A) Computa-se o diagrama de Voronoi de todos os neurônios da cultura juntamente com os microeletrodos. Os polígonos de Voronoi amarelos representam os microeletrodos, os magentas representam neurônios pertencentes ao 1-anel de um microeletrodo e os azuis são os neurônios que não fazem parte de nenhum 1-anel. (B) A área de influência de cada microeletrodo considerando o seu 1-anel, denotado por  $A$ . Na figura,  $A$  é a soma das áreas dos polígonos pertencentes ao 1-anel (em magenta) e do polígono de Voronoi do próprio microeletrodo (em amarelo). (C) Outra medida relacionada a cada microeletrodo é a área média do seu 1-anel, denotada por  $A'$ , não incluindo o polígono de influência do microeletrodo. (D) Finalmente, tem-se a média das distâncias entre o microeletrodo e os neurônios que compõem o seu 1-anel, denotado por  $D'$



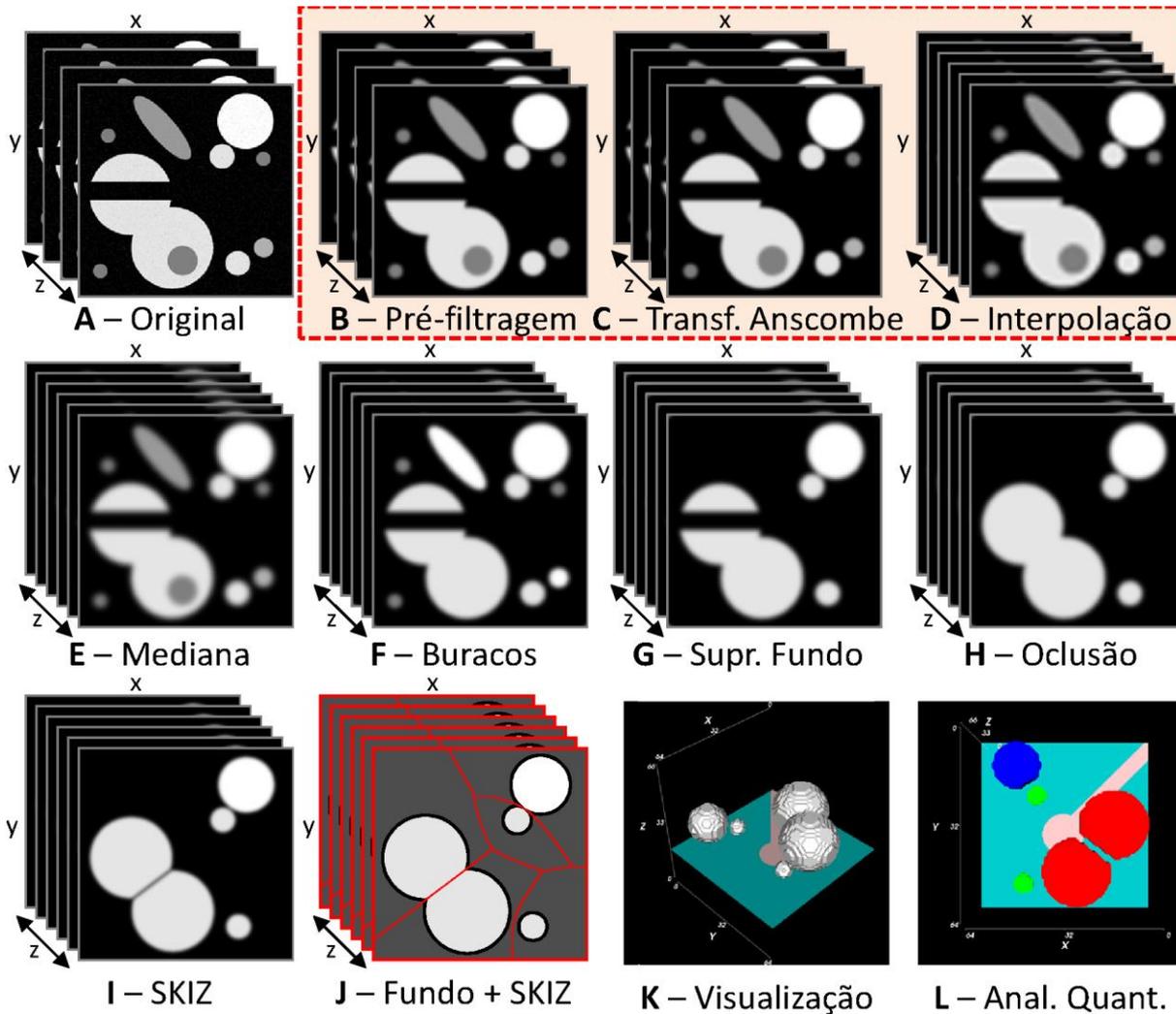
**Figura 3.18: Ilustração da análise quantitativa baseada no diagrama de Voronoi. (A) Diagrama de Voronoi considerando todos os neurônios e microeletrodos. Os polígonos amarelos representam a área de influência dos microeletrodos, os magentas representam a região de influência dos neurônios que fazem parte do 1-anel de algum microeletrodo e os azuis os demais neurônios. (B) A área de influência de um único microeletrodo, considerando a área do microeletrodo somado a área do seu 1-anel (amarelo + magenta). (C) Área do 1-anel de um único microeletrodo, desconsiderando a área de influência do microeletrodo. Nos resultados, esta medida é representada pela média dos polígonos. (D) A média das distâncias entre um microeletrodos e os neurônios localizados no seu 1-anel.**

### 3.6 Reconstrução Poligonal e Visualização de Neurônios 3D

Nesta seção é proposto um método para possibilitar a visualização tridimensional dos neurônios e também obter medidas quantitativas relacionadas à morfologia tridimensional, ao relacionamento espacial entre os pares de neurônios e entre neurônios e microeletrodos.

As características morfológicas dos neurônios possuem importância fundamental nas funções desempenhada por elas, assim como na forma que processam os sinais recebidos de outros neurônios (HARPER; LAWSON, 1985), já a distribuição espacial das células possibilita identificar quais células efetivamente participam para a formação da atividade eletrofisiológica capturada por cada um dos microeletrodos da MEA (PELT, VAN *et al.*, 2004; FEJTL *et al.*, 2006). Essas informações, obtidas considerando a natureza tridimensional das células, assim como a possibilidade de visualização do ambiente da cultura de maneira interativa, por diferentes pontos de vista e níveis de *zoom*, tendem a acrescentar informações valiosas para o trabalho de biólogos e neurocientistas às aquelas obtidas com a análise puramente 2D descrita na Seção 3.4.

A Figura 3.19 resume o método proposto para reconstrução das superfícies, visualização 3D da cultura de células e análise quantitativa 3D. Os passos são descritos nas seções seguintes. O fluxo de trabalho inicia com a preparação das culturas de neurônios dissociadas que são então plaqueadas nas MEAs, e em seguida, as culturas são imageadas tridimensionalmente por meio do microscópio confocal de fluorescência, conforme descrito na Seção 3.2. As etapas de geração das superfícies poligonais, visualização 3D e análise quantitativa 3D são desenvolvidas utilizando a linguagem Java e a biblioteca de visualização científica VTK ([www.vtk.org](http://www.vtk.org)) (SCHROEDER *et al.*, 2004). A etapa de pré-processamento foi desenvolvida utilizando o ambiente MATLAB.



**Figura 3.19:** Etapas do método proposto para a visualização tridimensional e análise quantitativa 3D. (A) Imagem volumétrica original. As imagens nos itens (B-D) ilustram as etapas anteriores ao processo de reamostragem. (B) Pré-filtragem pelo filtro da mediana. (C) Filtragem no domínio de Anscombe. (D) Interpolação. As imagens nos itens (E-J) ilustram as etapas de pré-processamento das imagens volumétricas antes da geração das superfícies poligonais. (E) Filtragem pela mediana 3D. (F) Preenchimento de buracos. (G) Supressão do fundo das imagens. (H) Correção da oclusão dos neurônios. (I) Evitar a formação de agrupamentos de neurônios utilizando o SKIZ. (J) Visualização das operações de supressão de fundo (cinza), e do SKIZ (vermelho). (K) Visualização 3D dos neurônios após reconstrução das superfícies. (L) Análise quantitativa computada a partir das superfícies poligonais.

A forma como o método de reconstrução e visualização 3D se relaciona com os demais métodos é mostrado na Figura 3.20.

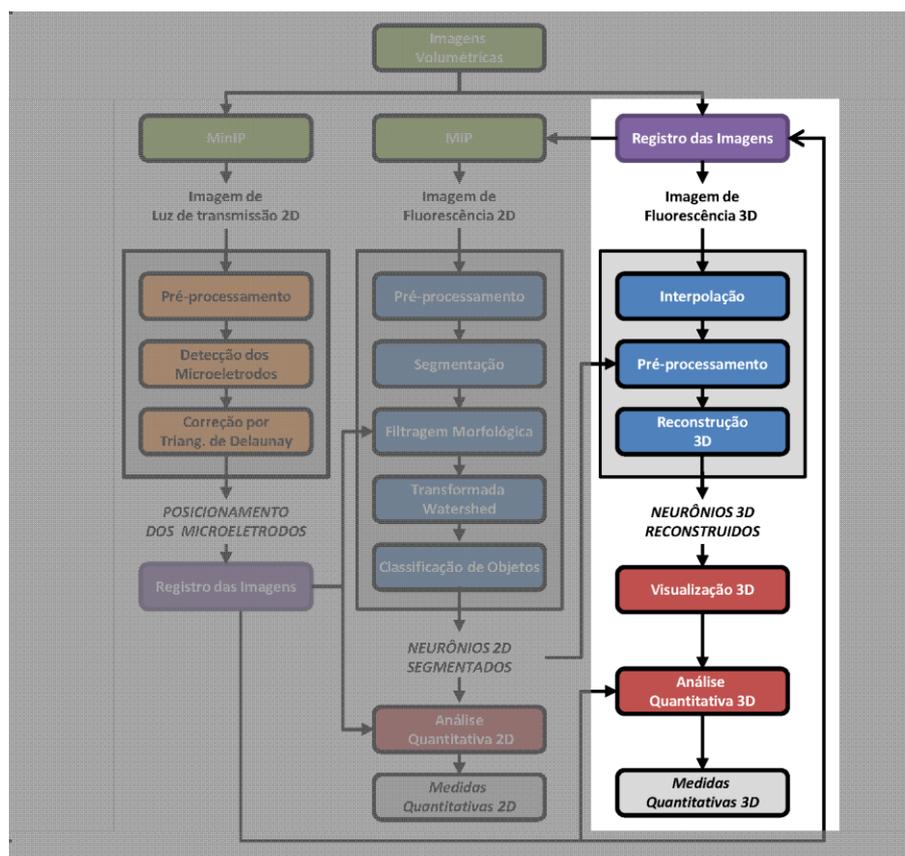
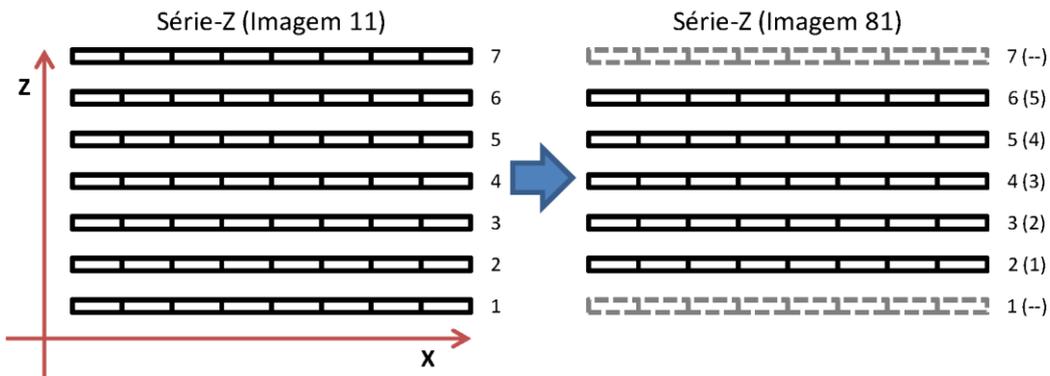


Figura 3.20: Ilustração do relacionamento do método de reconstrução de superfícies e visualização 3D com os demais métodos.

### 3.6.1 Registro e Alinhamento das Imagens Volumétricas

As imagens de entrada para os experimentos de visualização e análise quantitativa 3D são as imagens resultantes do processo de registro descrito na Seção 3.3.4. Lembrando que o processo de registro de imagens proposto resulta em imagens 3D quando as imagens de entrada são 3D. As seções ópticas de cada imagem são registradas com as seções ópticas na mesma altura. Quando uma das imagens volumétricas (séries-z) não registradas possui número menor de seções ópticas, estas são centralizadas em relação às demais. O tamanho da série-z (pilha de seções ópticas) é definido pela imagem não registrada com maior número de seções. A Figura 3.21 ilustra detalhes do processo de registro das imagens em relação ao eixo-Z.



**Figura 3.21:** Ilustração do processo de registro de duas imagens volumétricas (séries-z) adjacentes quando estas possuem número diferentes de seções ópticas. A série-z da esquerda possui mais seções ópticas do que a da direita. As seções ópticas são registradas uma a uma, para isso é necessário criar novas seções ópticas na posição 1 e 7 da série-z à direita, centralizando a série-z menor em relação à maior.

### 3.6.2 Filtragem do Ruído e Interpolação das Imagens

Imagens obtidas por meio de microscopia confocal são comumente corrompidas por ruído de baixa contagem de fótons (ruído Poisson) além do ruído Gaussiano decorrente do processo de aquisição das imagens (ver Seção 2.4.1.3).

Com o objetivo de reduzir o ruído nas imagens optou-se por aplicar os seguintes métodos de filtragem: (A) filtro da mediana; (B) filtro da média; (C) filtro de suavização Gaussiana. (D) Filtro de médias não locais. Utilizou-se a implementação do algoritmo de médias não locais disponibilizado na forma de um *plug-in* para MATLAB por Kroon (KROON, 2010), baseado no algoritmo descrito em (BUADES *et al.*, 2005). Esses filtros são descritos com mais detalhes na Seção 2.4.1.1. Devido à presença do ruído Poisson nas imagens optou-se também por experimentar a aplicação desses filtros no domínio de Anscombe por meio da transformada de Anscombe e da sua inversa, ambas descritas na Seção 2.4.1.3.

Testou-se também o comportamento da operação de filtragem no domínio de Anscombe com pré-filtragem pela mediana. A pré-filtragem pela mediana resultou em bons resultados em (COUPÉ *et al.*, 2012).

O método utilizado para estabelecer qual combinação que resultou nos melhores resultados é descrita em detalhes na Seção 4.7.1 de acordo com os índices de qualidade: erro quadrático médio (MSE – *Mean Squared Error*) e relação sinal-ruído de pico (PSNR – *Peak Signal-to-Noise Ratio*). Pode-se adiantar aqui que a combinação escolhida para a aplicação do

método foi: pré-filtragem pelo filtro da mediana, transformada de Anscombe, filtro de médias não locais e transformada inversa de Anscombe.

Devido ao aspecto anisotrópico dos voxels, causado pelo tamanho dos voxels ser maior ao longo do eixo-z, os resultados da visualização e da análise quantitativa podem ser afetados. Dessa forma, deve-se reamostrar a imagem ao longo do eixo-z, buscando obter voxels cúbicos ou quase cúbicos, por meio dos métodos de interpolação apresentados na Seção 2.4.1.5. Ao mesmo tempo em que o aspecto anisotrópico dos voxel é corrigido o processo de reamostragem busca também diminuir a resolução lateral imagem (x-y) com o objetivo de diminuir o custo computacional demandado na etapa da de geração e manipulação das superfícies poligonais.

### 3.6.3 Pré-processamento das Imagens Volumétricas

O pré-processamento das imagens resultantes da reamostragem por interpolação consiste nas seguintes etapas, também mostradas na Figura 3.19 nos itens (E-I): (E) Aplicação de filtragem pela mediana 3D. (F) Preenchimento de buracos no interior dos objetos. (G) Supressão de artefatos no fundo das imagens subtraindo o resultado da segmentação de neurônios 2D das seções ópticas. (H) Correção de oclusão dos neurônios pelos microeletrodos. (I) Subtração do SKIZ, computado a partir do resultado da segmentação 2D, de cada seção-óptica individual para evitar que neurônios próximos sejam reconstruídos com um objeto único.

As etapas pertencentes ao pré-processamento assemelham-se às aplicadas sobre as imagens 2D, descritas na Seção 3.4.1. Primeiramente, aplica-se a filtragem pela mediana 3D sobre toda a imagem volumétrica com o objetivo de suavizar a região de fronteira das células com o fundo da imagem e obtendo, dessa forma, uma representação mais suave das superfícies poligonais sem distorcer o seu formato original (Figura 3.21(E)). Na sequência, aplica-se a operação de reconstrução morfológica sobre cada seção óptica individual para preencher eventuais buracos no interior dos neurônios (Figura 3.21(F)).

Para evitar o surgimento de artefatos (falso-positivos) subtrai-se de cada seção óptica a imagem binária resultante da aplicação do método de segmentação 2D (Seção 3.4). Antes de efetuar as subtrações, a imagem binária é dilatada por um elemento estruturante em forma de disco com raio 4 (Figura 3.21(G)).

O operação de correção de neurônios ocluídos por microeletrodos e trilhas utilizado pelo método de segmentação de neurônios 2D (Seção 3.4.3) é aplicado sobre cada uma das

seções ópticas da imagem. No método de segmentação 2D, o método de correção de oclusão é aplicado diretamente a uma imagem binária. Entretanto, no método de visualização 3D é necessário realizar a operação sobre uma imagem em níveis de cinza. Dessa forma, computa-se uma versão binária temporária de cada seção óptica sobre a qual se pode aplicar o método para inferir as áreas ocluídas. A principal diferença é que a região inferida é preenchida pela intensidade média das regiões adjacentes de cada neurônio ao invés de 1 como ocorre no método 2D (Figura 3.21(H)).

Grupos de neurônios localizados muito próximos uns dos outros podem levar a erros de subsegmentação e aumentar o número de resultados falso-negativos na visualização 3D, assim como na análise quantitativa 3D. Utilizou-se a esqueletização por zona de influência (SKIZ) das imagens binárias 2D resultantes pelo método de segmentação 2D apresentado na Seção 3.4.4.1. A imagem correspondente ao SKIZ é subtraída das seções planares da série-z para evitar a reconstrução de superfícies 3D em que dois ou mais neurônios próximos sejam reconstruídos por uma única estrutura.

As estratégias para supressão do fundo da imagem assim como para evitar erros de subsegmentação são possíveis porque as culturas de neurônios DRG em MEA tendem a se fixar no fundo da placa e formar uma camada planar, topologicamente bidimensional (HALES *et al.*, 2010). Em uma cultura com células em dispersão, essa técnica não seria viável, e outras técnicas precisariam ser testadas para solucionar o problema adequadamente, como por exemplo, a transformada da distância 3D (JONES *et al.*, 2006) em conjunto com transformada watershed 3D (LIN *et al.*, 2003), ou até mesmo, a segmentação dos neurônios em seções planares individuais, como descrito em (ROSS, 2008).

### 3.6.4 Geração das Superfícies Poligonais

Para obter um modelo poligonal da superfície das células a partir das imagens volumétricas utilizou-se uma implementação do algoritmo *marching cubes* (LORENSEN; CLINE, 1987) presente na biblioteca de visualização científica VTK.

O resultado da reconstrução 3D realizada pelo algoritmo *marching cubes* é dependente do iso-valor escolhido (Seção 2.4.10), dessa forma, medidas quantitativas relacionadas à área da superfície e ao volume das células são diretamente afetados pelo valor definido para o limiar. O iso-valor é determinado calculando-se o limiar de Otsu considerando os valores de todos os voxels da imagem volumétrica resultante da etapa de pré-processamento. Ao contrário das medidas morfológicas, as medidas topológicas, como as relacionadas à distância

entre neurônios e microeletrodos não são afetadas, pois consideram o centro de massa dessas superfícies poligonais.

### 3.6.5 Visualização 3D

Após a geração das superfícies poligonais a partir das imagens volumétricas, é possível visualizar as culturas de neurônios em um ambiente interativo 3D, em conjunto com os microeletrodos da MEA. O módulo de visualização permite realizar operações de translação, rotação e *zoom* em tempo real. Dessa forma, é possível visualizar todos os neurônios, inseridos no ambiente interativo 3D, a partir de qualquer ponto de vista e nível de *zoom*.

A Figura 3.22 ilustra uma cultura de neurônios sobre a região de gravação de uma MEA a partir de pontos de vista diferentes: (A) Visão frontal; (B) Visão diagonal com a câmera, sobre a coordenada  $X=0$  e  $Y=0$  e ponto focal no centro da MEA. Em (C) observa-se o resultado de um *zoom* sobre um pequeno número de neurônios.

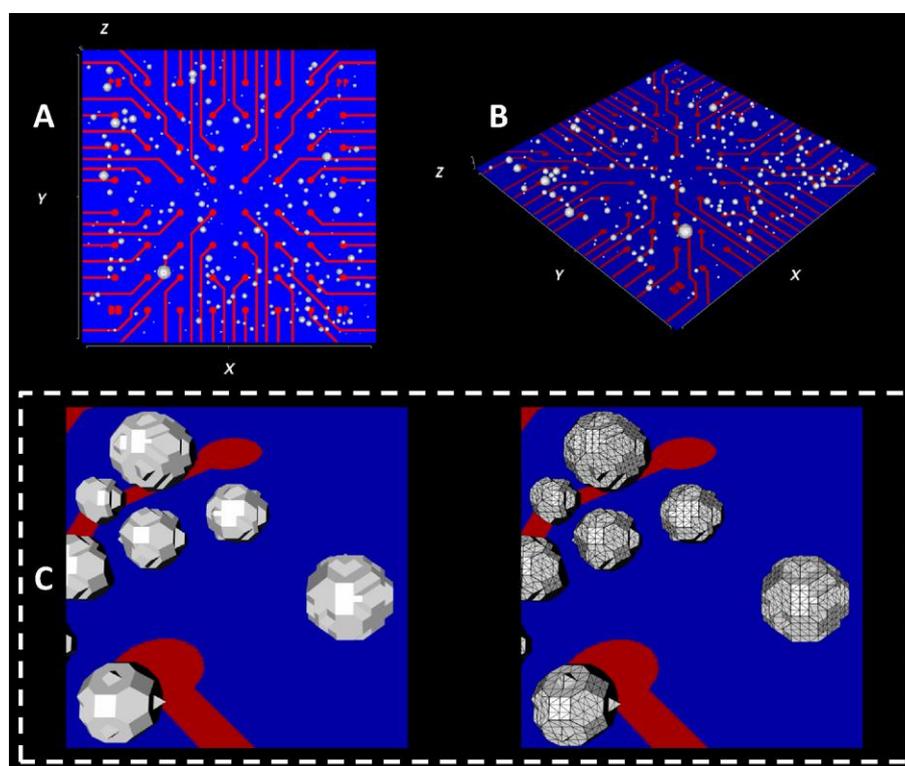


Figura 3.22: Ilustração do processo de visualização 3D da cultura. O método permite visualizar a cultura de neurônios e os microeletrodos por diferentes pontos de vista e níveis de *zoom* (A) Visão frontal de uma cultura gerada artificialmente sobre uma MEA (B) Visão diagonal da mesma cultura. (C) *Zoom* em um pequeno grupo de neurônios reconstruídos. À esquerda visão dos polígonos (padrão) e à direita visão em *wireframe*.

### 3.7 Análise Quantitativa 3D

Desenvolveu-se um sistema capaz de realizar a análise quantitativa automatizada das culturas de neurônio a partir das superfícies poligonais reconstruídas. O sistema proposto calcula uma série de medidas quantitativas por meio do processamento das superfícies poligonais geradas nas etapas anteriores do método, em conjunto com as informações referentes ao posicionamento dos microeletrodos na MEA. As medidas quantitativas calculadas pelo método são: (A) o número de neurônios presentes na região imageadas; (B) área da superfície de cada neurônio (em  $\mu\text{m}^2$ ); (C) o centro de massa (CoM) de cada neurônio; (D) as distâncias entre os neurônios no espaço 3D e no plano 2D; (E) as distâncias entre microeletrodos e neurônios considerando o centro de massa de ambos. Essas medidas quantitativas complementam as obtidas na etapa de processamento das imagens 2D e são, da mesma forma, importantes para o monitoramento do desenvolvimento dos neurônios plaqueados na MEA, assim como para o estudo das relações entre a atividade eletrofisiológica gravada pelos microeletrodos com morfologia das células e com a densidade e distribuição espacial dos neurônios ao longo da MEA. O número de neurônios pode apresentar alguma variação em relação ao resultado 2D devido a diferenças entre o processo de reconstrução 3D e de segmentação de neurônios 2D para alguns neurônios. A área da superfície das células complementa e expande as medidas morfológicas 2D, como área da seção transversal 2D da célula, circularidade, e excentricidade.

O número de neurônios presente em cada imagem é obtido naturalmente após a etapa de classificação de objetos e corresponde ao número de superfícies poligonais remanescentes. A área da superfície de todos os neurônios,  $\text{ÁREA}_{\text{Célula}}$ , é calculada pela soma das áreas de cada triângulo,  $\text{ÁREA}_{\text{Triângulo}}$ , que compõe a superfície do modelo poligonal, de acordo com a Equação (3.12),

$$\text{ÁREA}_{\text{Célula}} = \sum_{i=1}^N \text{ÁREA}_{\text{Triângulo}(i)} \quad (3.12)$$

em que N é o número de triângulos que compõem a superfície poligonal. Essa medida é fortemente influenciada pelo iso-valor utilizado pelo algoritmo *marching cubes*.

O centro de massa, CoM, de cada célula corresponde ao seu centroide, se considerarmos sua densidade homogênea, e pode ser calculado de acordo com a Equação (3.13),

$$CoM_{Célula}(x, y, z) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N v_i(x, y, z) \quad (3.13)$$

em que  $v_i$  é o centro do triângulo  $i$ . O CoM é utilizado para calcular as distâncias entre os pares de células, assim como as distâncias entre as células e os microeletrodos.

As distâncias Euclidianas entre todos os pares de células presentes na imagem são calculadas e então armazenadas em uma matriz de distâncias,  $DIST(i, j)$ , considerando o CoM dos neurônios, de acordo com a Equação (3.14),

$$DIST(i, j) = \|CoM_i(x, y, z) - CoM_j(x, y, z)\|, \quad i, j = 1, \dots, N \quad (3.14)$$

em que  $N$  é o número de neurônios.

O mesmo procedimento é adotado no plano X-Y, ou seja, desconsiderando a informação de posicionamento no eixo Z, conforme a Equação (3.15).

$$DIST(i, j) = \|CoM_i(x, y) - CoM_j(x, y)\|, \quad i, j = 1, \dots, N \quad (3.15)$$

Essas medidas devem ser bastante semelhantes às obtidas pelo método de segmentação 2D (Seção 3.5.1), exceto pelo fato de que como a identificação e delineamento das células é feito por métodos diferentes, algum erro é esperado.

As distâncias entre cada microeletrodo e as células são calculadas e armazenadas em uma matriz de distâncias,  $DIST\_E$ , considerando apenas a informação de posicionamento no plano x-y, de acordo com a Equação (3.16),

$$DIST\_E(i, j) = \|CoM_{Célula(i)} - CoM_{Eletrodo(j)}\|, \quad i = 1, \dots, N; j = 1, \dots, M \quad (3.16)$$

em que  $N$  é o número de neurônios e  $M$  é o número de microeletrodos. As distâncias entre neurônios e microeletrodos não considera a informação de profundidade (eixo- $z$ ), pois não se pode verificar com precisão a localização do substrato em relação aos neurônios reconstruídos ao longo desse eixo.

Com base no cálculo das áreas das superfícies poligonais 3D, os neurônios são classificados em neurônios pequenos, médios ou grandes. Diferente da etapa de classificação morfológica 2D, em que os intervalos são fixos de acordo com valores presentes na literatura (MARTÍNEZ-GUTIÉRREZ; CASTELLANOS, 2007), os intervalos que definem qual a classe que os neurônios pertencem são estabelecidos dividindo-se o intervalo entre o menor e o maior neurônio em três faixas iguais, de acordo com a área de suas superfícies.

Quanto à classificação dos neurônios em relação à distância para o microeletrodo mais próximo, desconsidera-se a informação relativa ao eixo- $Z$ , pois podem ser afetada pelo tamanho do neurônio, ou por eventuais inconsistências apresentadas no processo de geração de superfícies poligonais, uma vez que se considera o CoM das Células e microeletrodos para a computação das medidas. Os intervalos considerados para tal classificação são os mesmos utilizados para o classificação 2D: neurônios potencialmente conectados ( $DIST\_E \leq 30$  um), neurônios vizinhos ( $30 > DIST\_E \leq 60$  um), neurônios distantes ( $60 > DIST\_E \leq 100$  um), neurônios mais próximos deste microeletrodos do de nenhum outro, porém mais distante do que 100 um são considerados fora da região de gravação daquele microeletrodo.

### **3.8 Considerações Finais**

Neste capítulo foram apresentados os métodos propostos e implementados nesta de tese de Doutorado. No próximo capítulo são descritos os resultados obtidos, assim como a discussão sobre os mesmos.

# Capítulo 4

## RESULTADOS

---

---

### 4.1 Considerações Iniciais

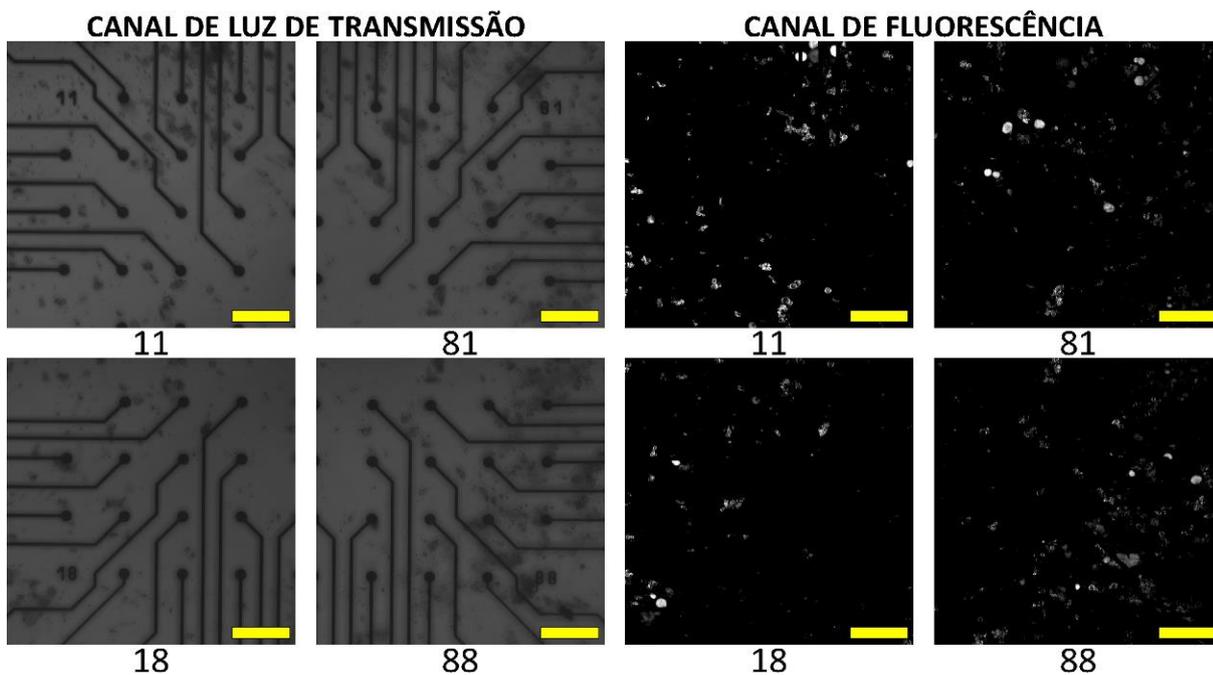
Neste capítulo são mostrados os resultados desta tese de Doutorado obtidos com a aplicação dos métodos apresentados no capítulo anterior. A Seção 4.2 descreve as imagens utilizadas para os experimentos. A Seção 4.3 e Seção 4.4 mostram os resultados obtidos na etapa de identificação dos microeletrodos e de registro das imagens. A Seção 4.5 mostra os resultados da segmentação de neurônios 2D e a Seção 4.6 a análise quantitativa 2D. A Seção 4.7 mostra os resultados da visualização 3D e a Seção 4.8 a análise quantitativa 3D. No Apêndice B são mostradas as GUIs dos métodos propostos e desenvolvidos neste trabalho e utilizados para gerar os resultados apresentados neste capítulo.

### 4.2 Imagens Utilizadas nos Experimentos

O Conjunto de dados, denominado DS4, possui imagens que contemplam toda área de gravação das MEAs. Devido às limitações do processo de aquisição, que poderiam levar a imagens com baixa resolução, foi necessário imagear a área de gravação da MEA em quatro imagens, cada uma delas obtida a partir de um dos quadrantes da MEA. É possível gerar uma representação única e com alta resolução da cultura por meio de técnicas de registro de imagens (Seção 2.4.9). O conjunto de dados DS4 é composto por imagens obtidas a partir de

seis culturas diferentes, denominadas: MEA\_01, MEA\_02, MEA\_04, MEA\_05, MEA\_11 e MEA\_13.

As Figuras 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, e 4.6 mostram os conjuntos de imagens obtidas a partir das culturas MEA01 (DIV 01), MEA02 (DIV 01), MEA04 (DIV 01), MEA05 (DIV01), MEA11 (DIV02), MEA13 (DIV03), respectivamente. Os valores entre parênteses representam com quantos dias *in vitro* (DIV) a cultura estava quando a imagem foi adquirida. Em cada figura são mostradas as imagens dos quadrantes de cada MEA obtidas a partir dos canais de luz de transmissão (visualizadas por MinIP) e do canal de fluorescência (visualizadas por MIP). As imagens obtidas dos canais de fluorescência são utilizadas para observar os neurônios, enquanto as imagens do canal de luz de transmissão permitem observar os microeletrodos.



**Figura 4.1:** Conjunto de imagens obtidas a partir da cultura MEA01 no DIV 1. A cultura foi imageada em dois canais, um de luz de transmissão (visualizada por MinIP) e um de fluorescência (visualizada por MIP), onde é possível visualizar microeletrodos e neurônios, respectivamente. Cada cultura foi dividida em quadrantes imageados separadamente. Cada quadrante foi nomeado de acordo com o número gravado em cada canto da MEA. Na figura, os quadrantes são mostrados de acordo com a organização original.

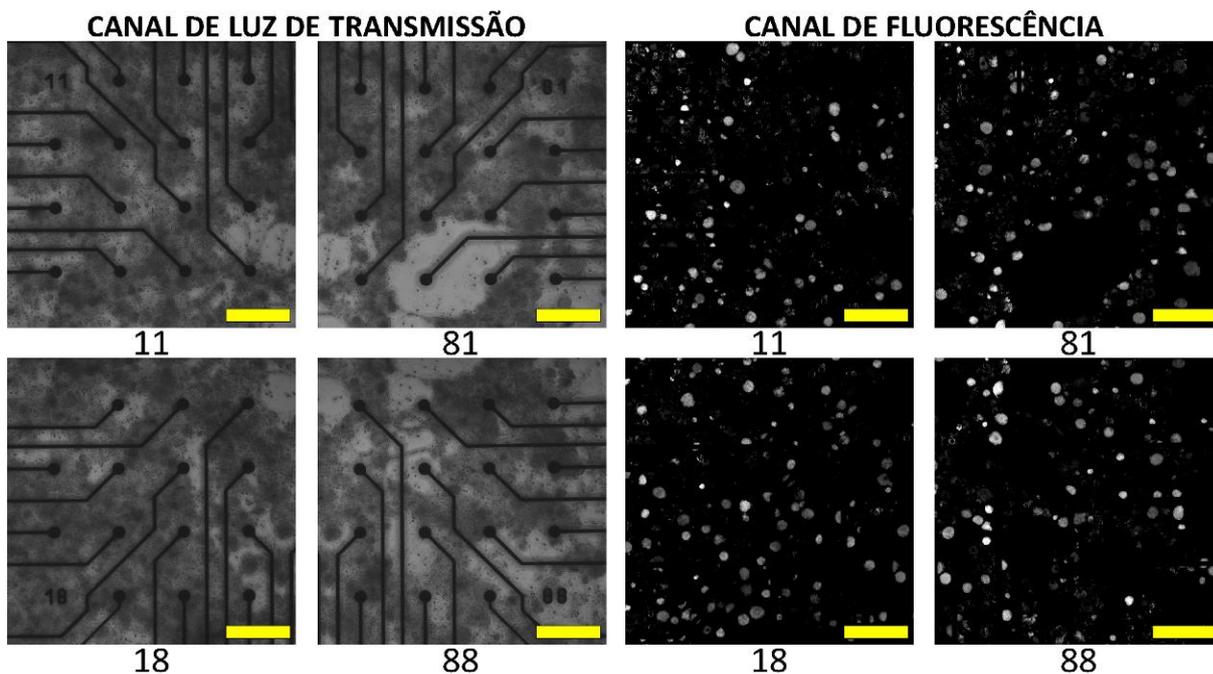


Figura 4.2: Conjunto de imagens obtidas a partir das cultura MEA02 no DIV 1. A cultura foi imageada em dois canais, um de luz de transmissão (visualizada por MinIP) e um de fluorescência (visualizada por MIP), onde é possível visualizar microeletrodos e neurônios, respectivamente. Cada cultura foi dividida em quadrantes imageados separadamente. Cada quadrante foi nomeado de acordo com o número gravado em cada canto da MEA. Na figura, os quadrantes são mostrados de acordo com a organização original.

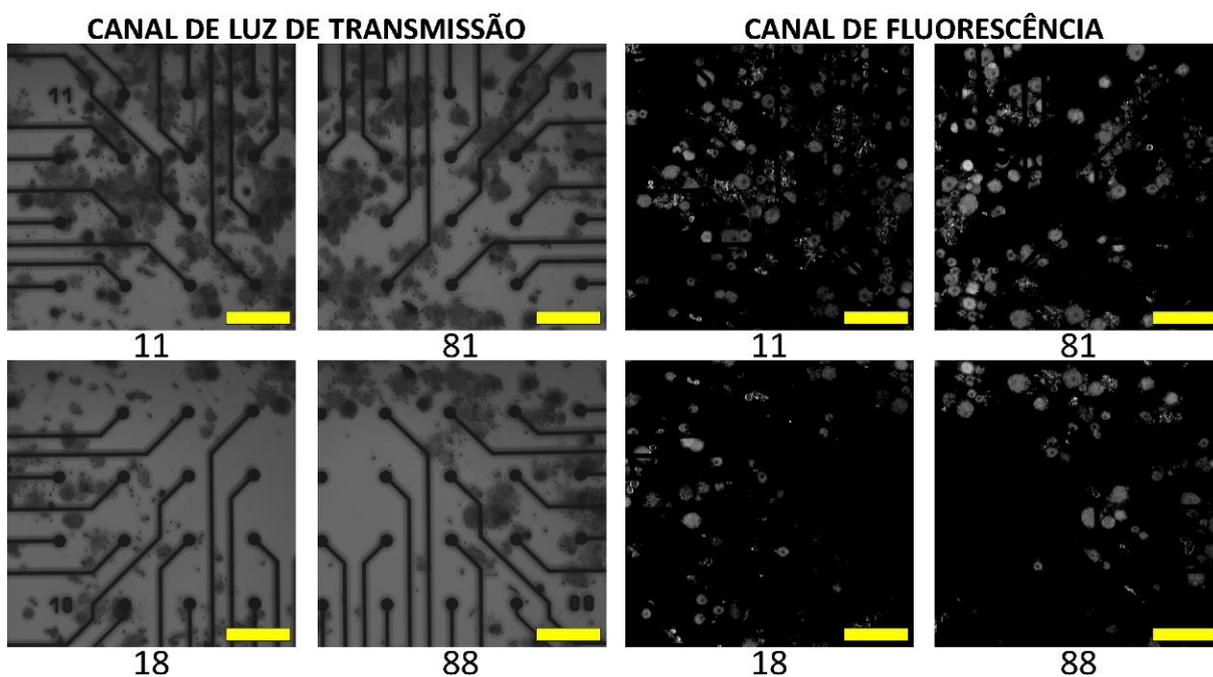


Figura 4.3: Conjunto de imagens obtidas a partir das cultura MEA04 no DIV 1. A cultura foi imageada em dois canais, um de luz de transmissão (visualizada por MinIP) e um de fluorescência (visualizada por MIP), onde é possível visualizar microeletrodos e neurônios, respectivamente. Cada cultura foi dividida em quadrantes imageados separadamente. Cada quadrante foi nomeado de acordo com o número gravado em cada canto da MEA. Na figura, os quadrantes são mostrados de acordo com a organização original.

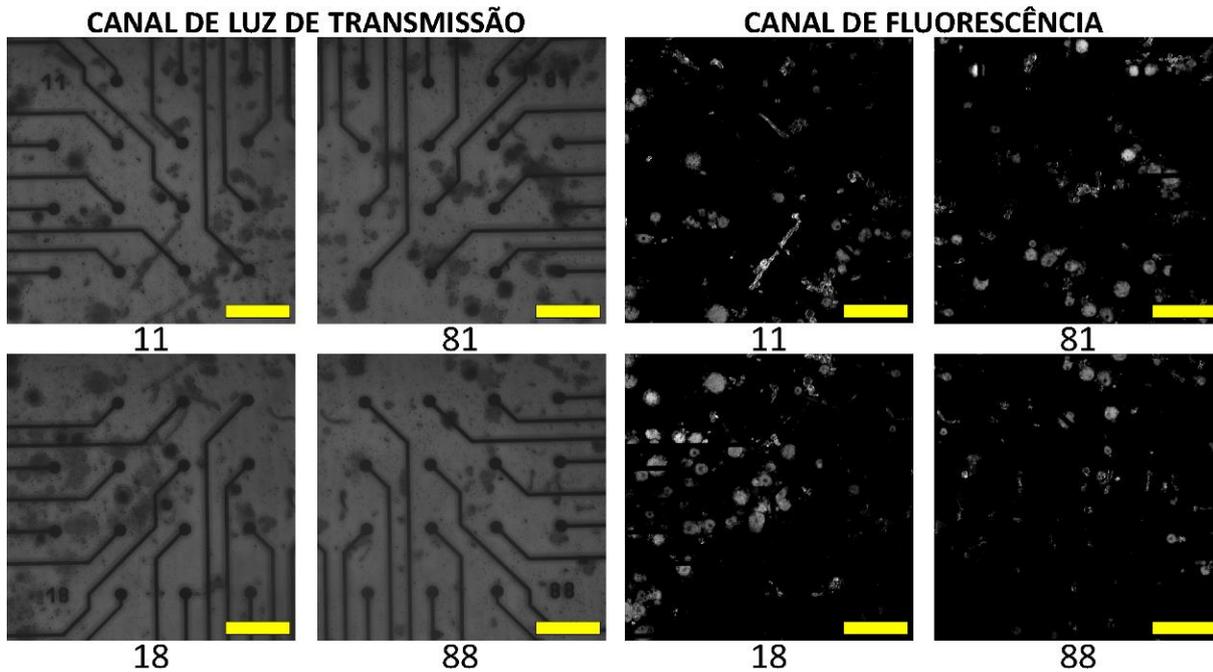


Figura 4.4: Conjunto de imagens obtidas a partir das cultura MEA05 no DIV 1. A cultura foi imageada em dois canais, um de luz de transmissão (visualizada por MinIP) e um de fluorescência (visualizada por MIP), onde é possível visualizar microeletrodos e neurônios, respectivamente. Cada cultura foi dividida em quadrantes imageados separadamente. Cada quadrante foi nomeado de acordo com o número gravado em cada canto da MEA. Na figura, os quadrantes são mostrados de acordo com a organização original.

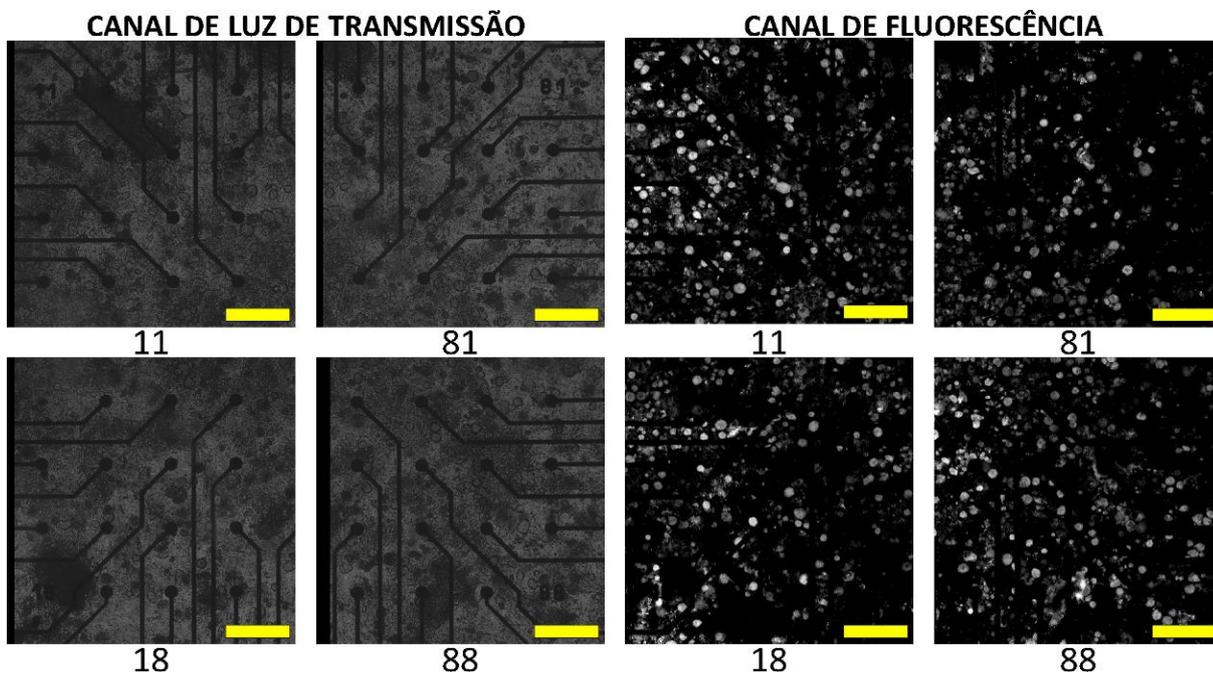
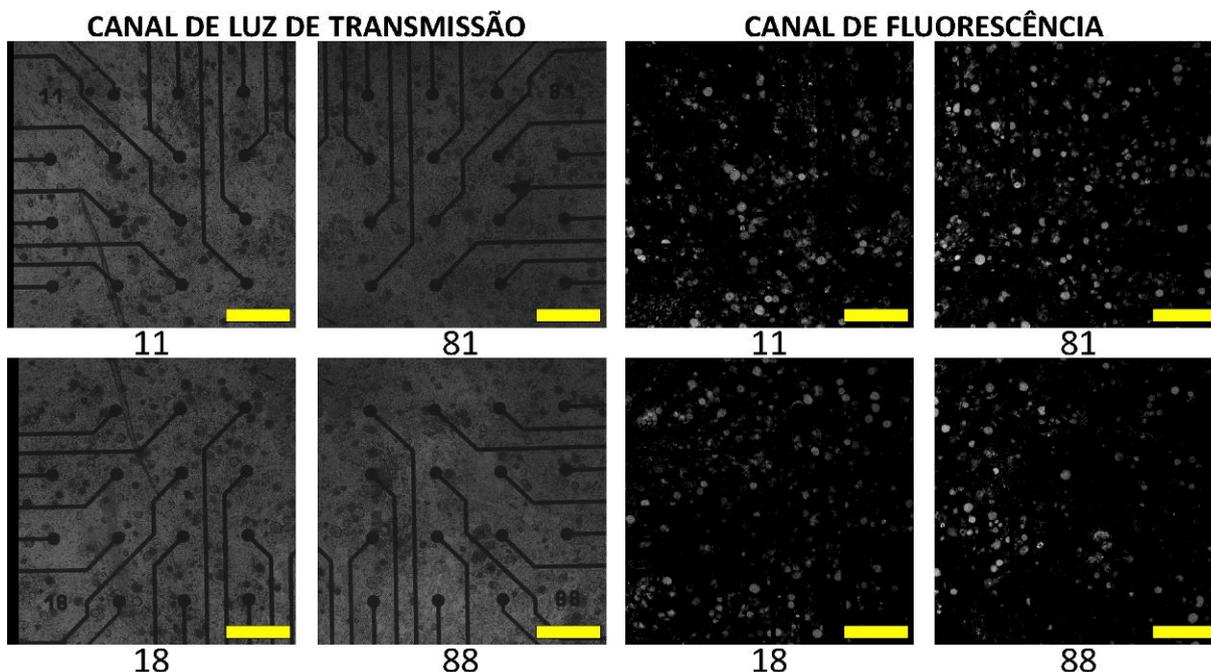


Figura 4.5: Conjunto de imagens obtidas a partir das cultura MEA11 no DIV 1. A cultura foi imageada em dois canais, um de luz de transmissão (visualizada por MinIP) e um de fluorescência (visualizada por MIP), onde é possível visualizar microeletrodos e neurônios, respectivamente. Cada cultura foi dividida em quadrantes imageados separadamente. Cada quadrante foi nomeado de acordo com o número gravado em cada canto da MEA. Na figura, os quadrantes são mostrados de acordo com a organização original.



**Figura 4.6:** Conjunto de imagens obtidas a partir das cultura MEA13 no DIV 1. A cultura foi imageada em dois canais, um de luz de transmissão (visualizada por MinIP) e um de fluorescência (visualizada por MIP), onde é possível visualizar microeletrodos e neurônios, respectivamente. Cada cultura foi dividida em quadrantes imageados separadamente. Cada quadrante foi nomeado de acordo com o número gravado em cada canto da MEA. Na figura, os quadrantes são mostrados de acordo com a organização original.

É possível observar, por meio de inspeção visual nas imagens das Figuras 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, e 4.6 que as culturas possuem características bastante heterogêneas entre elas, dentre as quais se podem destacar: diferentes densidades de neurônios, neuroglia e artefatos (refletem em fundo da imagem não homogêneo e sujo). A cultura MEA\_01 possui baixa densidade de neurônios e fundo não homogêneo em alguns pontos. A cultura MEA\_02 possui densidade de neurônios média e fundo bastante homogêneo. As culturas MEA\_04 e MEA05 possuem densidade de neurônios média e fundo não homogêneo em alguns pontos. A cultura MEA\_11 possui alta densidade de neurônios e fundo não homogêneo ao longo de toda a cultura. Finalmente, a MEA\_13 possui densidade de neurônios média e fundo não homogêneo em alguns pontos.

O protocolo utilizado para realização das culturas e aquisição das imagens é descrito na Seção 3.2. As imagens foram obtidas com lentes “EC Plan Neofluar 10×/0.30 M27” O tamanho de cada seção óptica (número de pixels) é  $1024 \times 1024$  pixels, para todas as seis imagens. O número de seções óticas para cada imagem, assim como a profundidade real (em  $\mu\text{m}$ ) dos voxels e o tamanho real das imagens constam na Tabela 4.1. O comprimento de onda da luz utilizada para excitação do fluorocromo foi 488 nm, a faixa de comprimentos de onda

que o filtro de barreira permite atingir o fotomultiplicador foi definido como 510-574 nm e a abertura do *pinhole* em 74  $\mu\text{m}$ .

**Tabela 4.1: Informações e detalhes sobre as imagens utilizadas nos experimentos.**

	MEA_01		MEA_02	
<i>Quadrante:</i>	11	81	11	81
<i>Tamanho XY (pixels):</i>	1024 × 1024	1024 × 1024	1024 × 1024	1024 × 1024
<i>Núm. de Seções Ópticas:</i>	13	13	12	12
<i>Tamanho do Voxel (<math>\mu\text{m}</math>):</i>	0,9765625 × 6,021	0,9765625 × 6,0209844	0,8789063 × 6,021	0,8789063 × 6,021
<i>Tamanho da Imagem (<math>\mu\text{m}</math>):</i>	1000 × 1000 × 72,252	1000 × 1000 × 72,2518	900 × 900 × 66,231	900 × 900 × 66,231
<i>Quadrante:</i>	18	88	18	88
<i>Tamanho XY (em pixels):</i>	1024 × 1024	1024 x 1024	1024 × 1024	1024 × 1024
<i>Núm de Seções Ópticas:</i>	13	13	12	12
<i>Tamanho do Voxel (<math>\mu\text{m}</math>):</i>	0,9765625 × 6,0209844	0,9765625 × 6,0209844	0,8789063 × 6,021	0,8789063 × 6,021
<i>Tamanho da Imagem (<math>\mu\text{m}</math>):</i>	1000 × 1000 × 72,2518	1000 × 1000 × 72,2518	900 × 900 × 66,231	900 × 900 × 66,231
	MEA_04		MEA_05	
<i>Quadrante:</i>	11	81	11	81
<i>Tamanho XY (em pixels):</i>	1024 × 1024	1024 x 1024	1024x1024	1024 x 1024
<i>Núm de Seções Ópticas:</i>	11	11	10	14
<i>Tamanho do Voxel (<math>\mu\text{m}</math>):</i>	0,8789063 × 6,021	0,8789063 × 6,021	0,8789063 × 6,021	0,8789063 × 6,021
<i>Tamanho da Imagem (<math>\mu\text{m}</math>):</i>	900 × 900 × 60,21	900 × 900 × 60,21	900 × 900 × 54,189	900 × 900 × 78,273
<i>Quadrante:</i>	18	88	18	88
<i>Tamanho XY (pixels):</i>	1024 × 1024	1024 x 1024	1024 x 1024	1024 x 1024
<i>Núm de Seções Ópticas:</i>	11	11	9	10
<i>Tamanho do Voxel (<math>\mu\text{m}</math>):</i>	0,8789063 × 6,021	0,8789063 × 6,021	0,8789063 × 6,021	0,8789063 × 6,021
<i>Tamanho da Imagem (<math>\mu\text{m}</math>):</i>	900 × 900 × 60,21	900 × 900 × 60,21	900 × 900 × 48,168	900 × 900 × 54,189
	MEA_11		MEA_13	
<i>Quadrante:</i>	11	81	11	81
<i>Tamanho XY (pixels):</i>	1024 × 1024	1024 x 1024	1024 x 1024	1024 x 1024
<i>Núm de Seções Ópticas:</i>	10	10	7	8
<i>Tamanho do Voxel (<math>\mu\text{m}</math>):</i>	0,8789063 × 6,021	0,8789063 × 6,021	0,8789063 × 6,021	0,8789063 × 6,021
<i>Tamanho da Imagem (<math>\mu\text{m}</math>):</i>	900 × 900 × 54,189	900 × 900 × 54,189	900 × 900 × 36,126	900 × 900 × 42,174
<i>Quadrante:</i>	18	88	18	88
<i>Tamanho XY (pixels):</i>	1024 × 1024	1024 x 1024	1024 x 1024	1024 x 1024
<i>Núm de Seções Ópticas:</i>	10	11	8	8
<i>Tamanho do Voxel (<math>\mu\text{m}</math>):</i>	0,8789063 × 6,021	0,8789063 × 6,021	0,8789063 × 6,021	0,8789063 × 6,021
<i>Tamanho da Imagem (<math>\mu\text{m}</math>):</i>	900 × 900 × 54,189	900 × 900 × 60,21	900 × 900 × 42,174	900 × 900 × 42,174

Nas seções seguintes são apresentados os resultados obtidos a partir da aplicação dos métodos propostos sobre todas as seis imagens. Os gráficos e tabelas contemplam todas as seis imagens, entretanto, são mostradas as figuras relacionadas à aplicação dos métodos sobre as imagens obtidas da cultura MEA\_02. As figuras contendo as imagens relacionadas com as demais culturas (MEA\_04, MEA\_05, MEA\_11 e MEA\_13) são mostradas no Apêndice A.

### 4.3 Identificação Automatizada de Microeletrodos

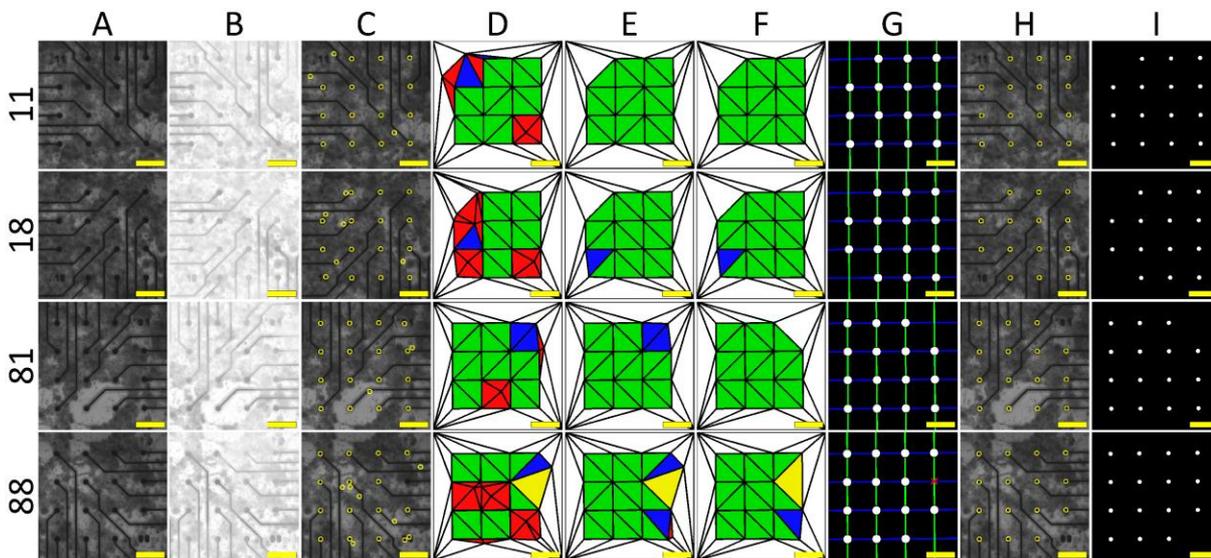
O conjunto de imagens utilizadas nos experimentos é composto por imagens volumétricas (3D) com o objetivo de possibilitar experimentos relacionados aos métodos de

visualização e análise quantitativa 3D, descritos na Seção 3.6 e na Seção 3.7. Dessa forma, para a aplicação do método de identificação de microeletrodos foi necessário converter as imagens do canal de luz de transmissão para uma representação 2D por meio da operação de Projeção de Intensidades Mínimas (MinIP) (ver Seção 2.4.1.4).

Os parâmetros  $KERNEL\_SIZE_E$  e  $SE\_BOTHAT_E$  são utilizados na etapa de pré-processamento das imagens do canal de luz de transmissão antes de aplicar a transformada de Hough circular. O parâmetro  $KERNEL\_SIZE_E$  é para a filtragem da mediana. A filtragem bottom-hat corrige a não homogeneidade do fundo da imagem destacando as estruturas que casam com um elemento estruturante em forma de disco com diâmetro  $SE\_BOTHAT_E$ . Para evitar a detecção de falso-positivos e reduzir o custo computacional, apenas estruturas circulares com medida de raio entre os parâmetros  $MIN\_RAD$  e  $MAX\_RAD$  são consideradas. Esses parâmetros são estimados de acordo com o conhecimento *a priori* das dimensões dos microeletrodos da MEA. As MEAs consideradas para os experimentos são do tipo MEA-60 da *Multichannel Systems* (Seção 3.2) e possuem microelétrodos com 30  $\mu\text{m}$  de diâmetro. O parâmetro  $MIN\_RAD$  foi definido em 15  $\mu\text{m}$  e o parâmetro  $MAX\_RAD$  em 25  $\mu\text{m}$  porque os objetos aparecem um pouco maiores na imagem devido ao borramento inserido pelo processo de imageamento. O parâmetro  $SE\_BOTHATE$  foi definido como o diâmetro de um círculo de raio  $MAX\_RAD \times N_E$ . Os valores dos parâmetros, em pixels, são obtidos por meio da divisão dos valores reais (em  $\mu\text{m}$ ) pela dimensão lateral do pixel. Os demais parâmetros considerados pelo *plug-in* do Peng são  $GRDTHRES$ ,  $FLTR$  e  $MULTIRAD$ . O parâmetro  $GRDTHRES$  controla a limiarização na imagem da magnitude do campo vetorial após a construção do acumulador. Valores grandes do parâmetro  $FLTRLM\_4$  permitem detectar círculos menos perfeitos. O parâmetro  $MULTIRAD$  define a tolerância com que o método detecta círculos concêntricos, fixado como 1,0 para todas as imagens, de forma que nenhum círculo concêntrico seja localizado.

A imagem na Figura 4.7 mostram os resultados das principais etapas do método de identificação dos microeletrodos para as imagens relativas aos quadrantes '11', '18', '81' e '88' obtidas das culturas MEA02 e MEA13 respectivamente. (A) As imagens originais do canal de transmissão (visualizada por MinIP). (B) Pré-processamento das imagens. Notem como as estruturas que representam os microeletrodos são realçadas em relação às imagens originais devido à transformada bottom-hat. (C) Identificação dos microeletrodos por meio da transformada de Hough circular. (D) Computação da triangulação de Delaunay e identificação dos triângulos compostos por algum vértice errado. (E) Após a primeira rodada de remoção dos microeletrodos identificados erroneamente (critério #1 – perímetro). (F) Após a segunda

etapa de remoção dos microeletrodos identificados erroneamente (critério #2 – ângulo reto). (G) Correção dos microeletrodos não identificados e correção de pequenas variações no posicionamento dos demais microeletrodos por meio de regressão linear. As linhas horizontais e verticais são obtidas por meio da regressão linear dos microeletrodos remanescentes. Os marcadores ‘×’ representam onde foram incluídos microeletrodos não identificados. (H) Identificação final dos microeletrodos após correção utilizando triangulação de Delaunay. (I) Imagem binária contendo cujos objetos representam os microeletrodos identificados. Esta imagem utilizada para o método de registro de imagens e para as análises quantitativas 2D e 3D.



**Figura 4.7:** Resultado das etapas de identificação automática de microeletrodos nas imagens do canal de luz de transmissão. Cada linha mostra os resultados para as imagens de cada um dos quadrantes da cultura MEA\_02. (A) Imagem original (MinIP). (B) Imagem pré-processada. (C) Microeletrodos identificados por meio da transformada de Hough circular. (D) Triangulação de Delaunay dos microeletrodos identificados para detecção automática de erros. (E) Após remover microeletrodos falso-positivos de acordo com o critério de perímetro (vermelho). (F) Após remover microeletrodos falso-positivos que não respeitam o critério de ângulo reto. (G) Grade construída por regressão linear para identificar microeletrodos falso negativos. (H) Resultado da correção automática. (I) Imagem final com os microeletrodos identificados.

A Tabela 4.2 descreve os parâmetros utilizados para obter estes resultados, bem como os valores de validação relacionados à eficiência do método para cada uma das imagens. Pode-se observar que o método proposto foi capaz de identificar corretamente todos os eletrodos presentes em todas as imagens exceto pelas imagens 11 e 18 da cultura MEA\_11. A presença de alta quantidade de neuroglia e artefatos torna o fundo destas imagens muito sujo, dificultando a identificação dos limites entre fundo e objetos. Em imagens com fundo homogêneo (e mais claro) valores para  $KERNEL\_SIZE_E=5$  e  $N_E=5$  resultam em bons

resultados (MEA\_01, MEA02, MEA04 e MEA05), já para imagens com fundo mais escuro e menos homogêneo foi necessário definir  $KERNEL\_SIZE_E=3$  (MEA\_11 e MEA\_13). O parâmetro FLTR deve ser definido empiricamente, entretendo esta é uma tarefa fácil visto que o usuário/pesquisador pode facilmente visualizar quando um microeletrodo é identificado corretamente ou não. Note que é mais importante minimizar o numero de microeletrodos não identificados (falsos negativos) em detrimento de maximizar os microeletrodos identificados erroneamente, uma vez que é mais fácil remover microeletrodos do que inserir novos por meio do processo de correção automatizado. Para possibilitar a continuidade aos experimentos os microeletrodos não identificados na MEA\_11 foram inseridos manualmente.

**Tabela 4.2: Valores dos parâmetros e efetividade dos passos do método utilizado para a identificação dos microeletrodos para cada quadrante (QUAD) das culturas imageadas. REF é o número real de microeletrodos em cada quadrante. CORR é o número de microeletrodos identificados corretamente, FP é o número de falso-positivos e FN é o número de falso-negativos.**

MEA DISH	QUAD	REF	KERNEL_SIZE <sub>E</sub>	N <sub>E</sub>	FLTR	HOUGH			DELAUNAY		
						CORR	FP	FN	CORR	FP	FN
MEA_01	11	15	5	5	4	15	0	0	15	0	0
	18	14	5	5	4	14	3	0	14	0	0
	81	15	5	5	4	15	1	0	15	0	0
	88	15	5	5	4	15	3	0	15	0	0
MEA_02	11	15	5	5	6	15	3	0	15	0	0
	18	14	5	5	6	14	6	0	14	0	0
	81	15	5	5	6	15	3	0	15	0	0
	88	15	5	5	5	14	8	1	15	0	0
MEA_04	11	15	5	5	5	13	2	2	15	0	0
	18	14	5	5	5	14	2	0	14	0	0
	81	15	5	5	5	13	4	2	15	0	0
	88	15	5	5	5	15	4	0	15	0	0
MEA_05	11	15	5	5	5	14	2	1	15	0	0
	18	14	5	5	5	13	6	1	14	0	0
	81	15	5	5	5	14	3	1	15	0	0
	88	15	5	5	5	15	2	0	15	0	0
MEA_11	11	15	3	5	13	6	5	4	9	0	6
	18	14	3	5	13	13	12	1	13	0	1
	81	15	3	5	13	15	16	0	15	0	0
	88	15	3	5	13	13	22	2	15	0	0
MEA_13	11	15	3	5	12	15	7	0	15	0	0
	18	14	3	5	12	13	5	1	14	0	0
	81	15	3	5	11	15	0	0	15	0	0
	88	15	3	5	11	15	2	0	15	0	0

Os resultados obtidos por este método (itens (I) na Figura 4.7) são utilizados para gerar os resultados descritos nas seguintes etapas: registro das imagens (Seção 4.4); análise quantitativa 2D (Seção 4.6); visualização 3D (Seção 4.7) e análise quantitativa 3D (Seção 4.8).

## 4.4 Registro das Imagens

Com o objetivo de obter uma representação em alta resolução que contemple toda a área de gravação da MEA adotou-se um processo de registro das imagens de alta resolução tomadas a partir regiões menores da MEA. O método para registro é baseado em pontos de controle, sendo que foram considerados como pontos de controle os microeletrodos identificados na etapa anterior e uma grade construída a partir de informações sobre a disposição dos microeletrodos da MEA. Como as imagens foram adquiridas com o mesmo nível de *zoom*, e pequeno nível de rotações, apenas operações de translação e rotação foram necessárias para deslocar as imagens e realizar o registro.

A Figura 4.8 mostra o resultado final do registro de todas as imagens utilizadas nos experimentos. (A) As imagens contendo os microeletrodos identificados pelo método (mostrados na seção anterior) foram registradas em relação a uma imagem composta por uma grade construída de acordo com as especificações do modelo de MEA utilizado, neste caso uma grade  $8 \times 8$  com espaçamento de  $200 \mu\text{m}$  entre elas, as intersecções representam o posicionamento correto de cada microeletrodos. (B) Resultado do registro das imagens contendo os microeletrodos identificados (será utilizado como entrada para a etapa de análise quantitativa 2D e 3D). (C) Registro das imagens do canal de luz de fluorescência utilizando as matrizes de transformação computadas a partir das imagens de microeletrodos. As imagens são mostradas em representação MinIP, porém o registro é realizado para cada seção óptica individualmente para que possam ser utilizadas nos experimentos 3D (D) Registro das imagens do canal de fluorescência, considerando também as matrizes de transformação computadas em (A). Neste caso, as imagens são mostradas em uma representação MIP, porém também foram registradas considerando cada seção óptica individual.

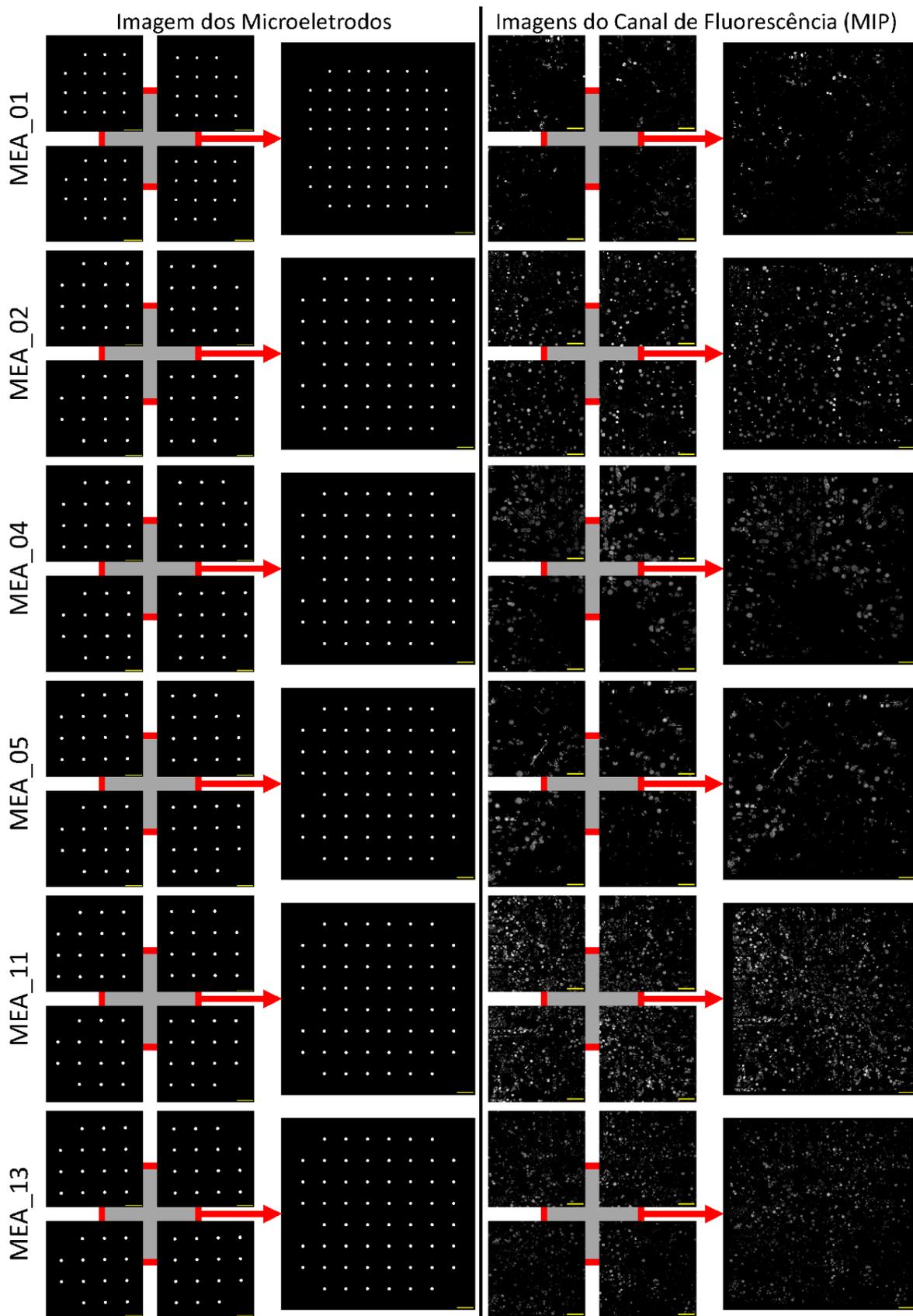


Figura 4.8: Imagens obtidas das culturas em MEA antes e após os registros das quatro imagens originais (não registradas). Cada linha mostra as imagens de uma das culturas de neurônios em MEA. Coluna da esquerda: Imagem com os microeletrodos. Coluna da direita: Imagens do canal de fluorescência (visualizada por MIP).

## 4.5 Segmentação de Neurônios a partir de Imagens 2D

Nesta seção são apresentados os resultados obtidos a partir da aplicação do método proposto para segmentação dos neurônios nas imagens do canal de fluorescência (descrito na Seção 3.4).

Os parâmetros `KERNEL_SIZE`, `SE_TOPHAT`, `SE_OPEN` e `NUM_TILES` são utilizados pelas operações de filtragem por mediana, filtragem top-hat, abertura por área e limiarização local, respectivamente. `DRG_MIN_AREA` é a área, em pixels, de um neurônio pequeno (15  $\mu\text{m}$  de diâmetro) e `DRG_MAX_DIAM` é o diâmetro, em pixels, de um neurônio DRG grande (50  $\mu\text{m}$  de diâmetro). Em conjunto com os parâmetros `N` e `R` eles são utilizados para estimar os valores de `SE_TOPHAT` e `SE_OPEN`. A forma como esses parâmetros foram estimados é detalhada na Seção 0.

Devido ao formato esférico apresentado pelos neurônios DRG, escolheu-se um elemento estruturante em forma de disco para ser utilizado pela transformada top-hat. O parâmetro `SE_TOPHAT` define o diâmetro do elemento estruturante (em pixels) e é escolhido a partir da projeção 2D de um neurônio esférico grande. A transformada top-hat corrige a iluminação de fundo realçando os objetos menores do que o elemento estruturante, dessa forma, o parâmetro `SE_TOPHAT` deve ser `N` vezes maior do que o diâmetro de um neurônio esférico grande. Dessa forma, as estruturas compostas por agrupamentos de neurônios são preservados. O parâmetro `SE_TOPHAT` é definido pela Equação (4.1),

$$SE\_TOPHAT = \frac{MAX\_DIAM \times N}{PIXEL\_SIZE} \quad (4.1)$$

em que `MAX_DIAM` é o diâmetro (em  $\mu\text{m}$ ) de um neurônio grande.

O parâmetro `SE_OPEN`, utilizado na operação de abertura morfológica, define um limiar para eliminar componentes conectados muito pequenos. A escolha desse parâmetro é realizada a partir da estimativa da área da projeção 2D de um neurônio DRG muito pequeno. Os neurônios DRG possuem formato esférico, e dessa forma a área da sua projeção é calculada pela Equação (4.2),

$$MIN\_ÁREA = \pi \times (MIN\_DIAM / 2)^2 \quad (4.2)$$

em que MIN\_DIAM e MIN\_AREA são o diâmetro e a área (em  $\mu\text{m}$  e  $\mu\text{m}^2$ ), respectivamente, de um neurônio esférico muito pequeno. Considerando que o diâmetro de neurônios DRG varia entre 15 e 50  $\mu\text{m}$ , a área da projeção de um neurônio desse tipo não deve ser superior a  $\sim 176 \mu\text{m}^2$ . Devido às variações na intensidade na fluorescência o parâmetro SE\_OPEN deve ser R vezes menor do que a estimativa obtida por meio da projeção 2D de um neurônio pequeno, a fim de evitar que alguns neurônios não sejam identificados (Equação (4.3)),

$$SE\_OPEN = \frac{MIN\_ÁREA - MIN\_ÁREA \times R}{PIXEL\_ÁREA} \quad (4.3)$$

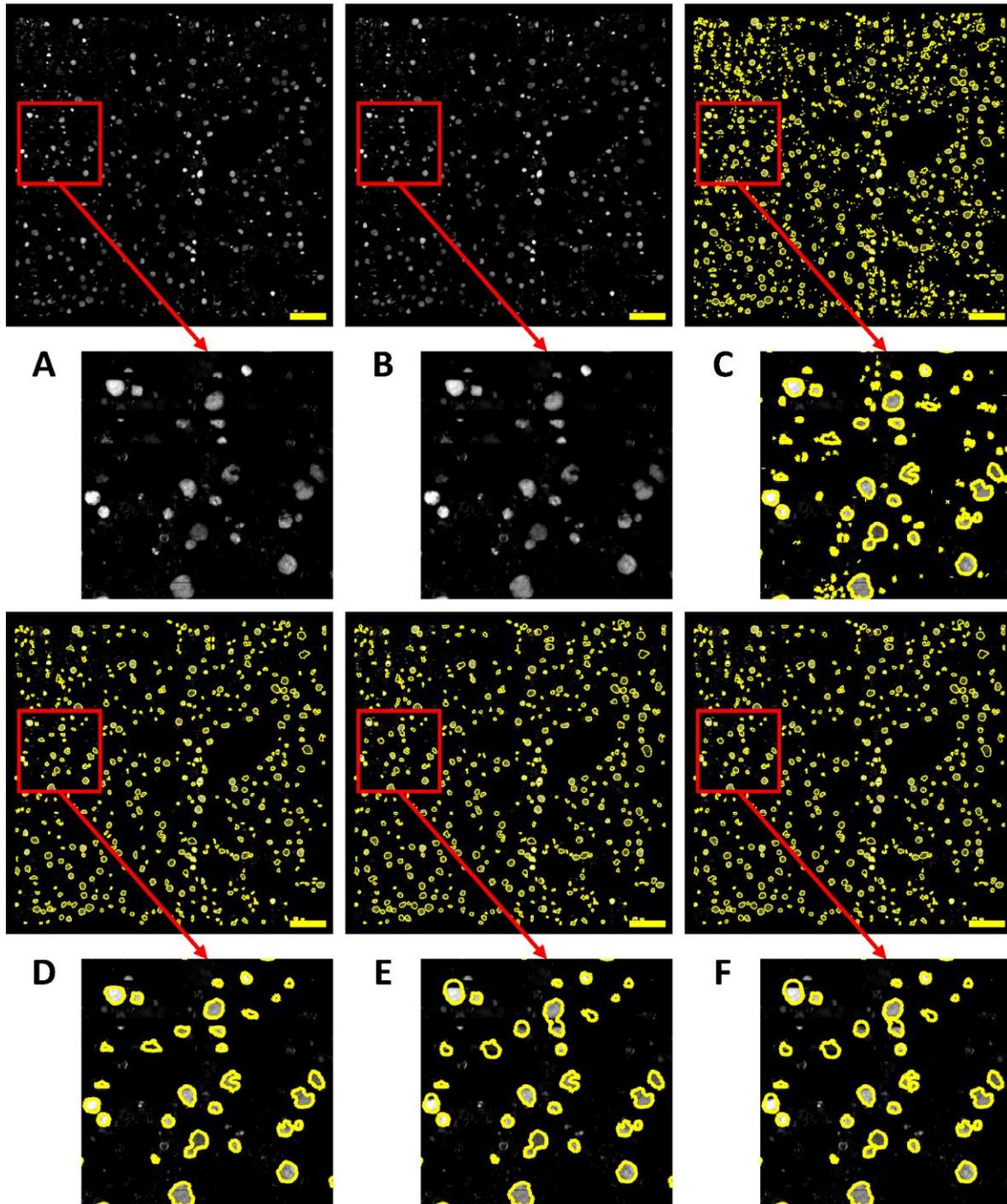
em que R define a redução de MIN\_AREA.

O parâmetro h utilizado pela transformada h-máxima, assim como pela transformada máxima estendida, é definido empiricamente e possui alta influência na separação adequada dos componentes conectados. Enquanto valores muito grandes de h podem gerar erros de subsegmentação, valores muito pequenos podem levar a erros de supersegmentação.

O método para escolha dos parâmetros KERNEL\_SIZE, N e NUM\_TILES é descrito e discutido na Seção 0. Para melhor apreciação dos resultados mostrados nesta seção, adianta-se que os valores escolhidos para os parâmetros são: KERNEL\_SIZE=3, N=2 e NUM\_TILES=32. Lembrando que o objetivo do método para objeto estes valores buscam não apenas minimizar os índices de validação, mas, ao mesmo tempo identificar um conjunto de valores que possa ser utilizado com nenhuma (ou com muito poucas) modificação para rodar as imagens do conjunto de dados. Observou-se empiricamente que os parâmetros R=0,5 e h=1 obtiveram resultados satisfatórios para todas as imagens.

Os valores dos parâmetros R e h foram definidos empiricamente em 0,5 e 1 e resultam em bons resultados nas imagens testadas.

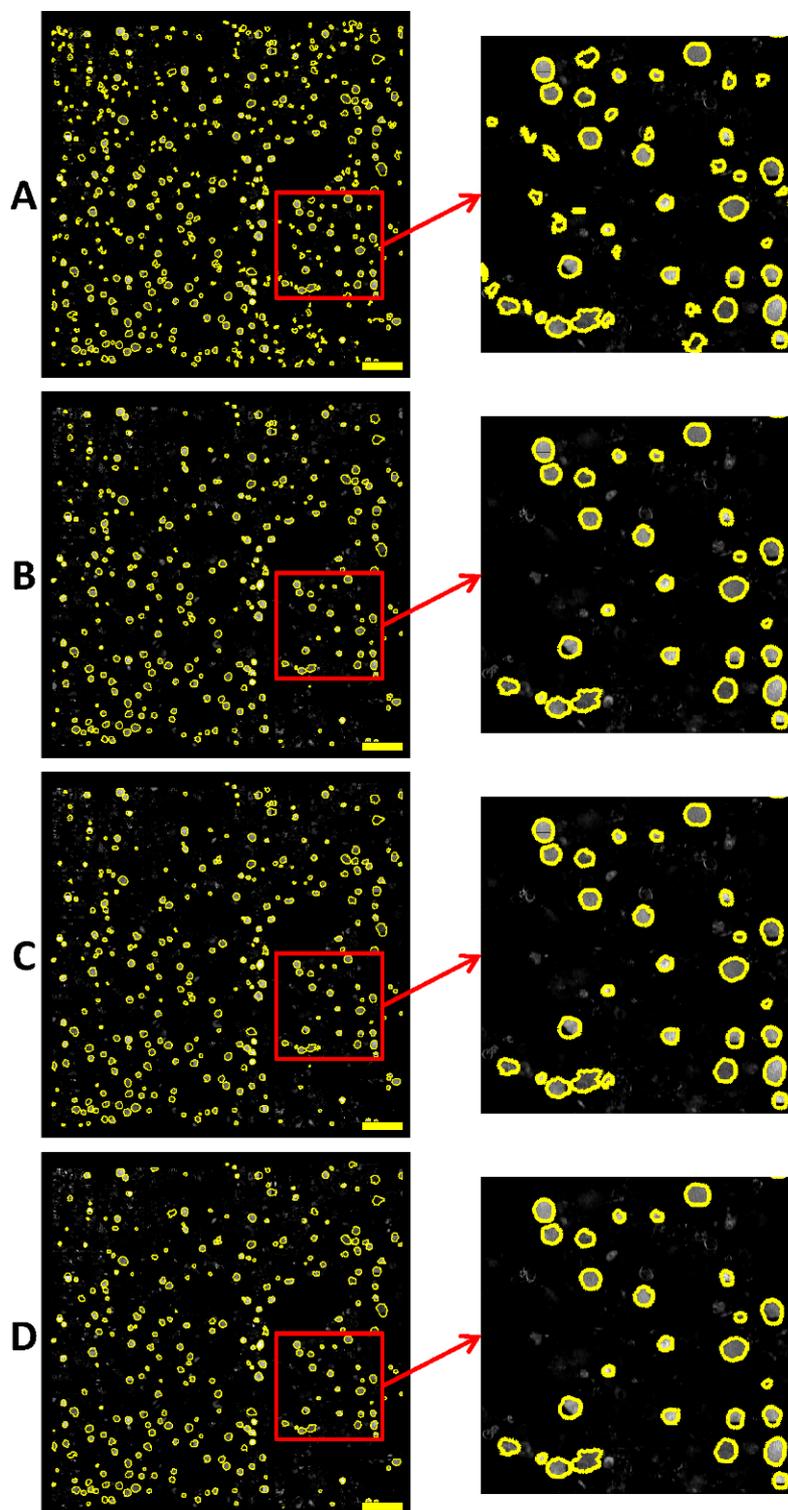
A Figura 4.9 mostra os resultados das etapas do processo de segmentação das imagens antes da etapa de classificação. (A) Imagem original após projeção de intensidades (MIP). (B) A imagem após o pré-processamento. (C) O resultado da segmentação por limiarização local. (D) O resultado da filtragem morfológica. (E) O método para correção de oclusão dos neurônios pelos microeletrodos. (F) O resultado da transformada watershed.



**Figura 4.9:** Resultado das etapas do método proposto para segmentação 2D de neurônios considerando as imagens obtidas a partir da MEA\_02. (A) Imagem 2D obtida por MIP. (B) Imagem pré-processada; (C) Segmentação por limiarização local; (D) Filtragem Morfológica; (E) Correção da oclusão de neurônios; (F) Transformada watershed.

A Figura 4.10 mostra os resultados da etapa de classificação considerando as três estratégias propostas. (A) classificação não supervisionada (k-means). (B) classificação semi-supervisionada (SVM + k-means). (C) Classificação supervisionada (SVM + manual). A

validação e discussão dos resultados referentes a estas imagens são apresentadas na seção seguinte.



**Figura 4.10:** Resultado da etapa de classificação de objetos considerando as três estratégias propostas para a imagem MEA\_02. (A) Imagem a ser classificada, resultante da transformada watershed (B) Classificação pelo algoritmo k-means. (C) Classificação utilizando o algoritmo SVM treinado com o resultado das classificações por k-means (SVM + k-means). (D) Classificação utilizando o algoritmo SVM treinado com os resultados da classificação manual de 20% de cada uma das imagens do conjunto de dados (SVM + manual).

### 4.5.1 Validação da Segmentação

Para validar o método e verificar a sua eficácia utilizam-se imagens de referência, em que os neurônios presentes nas imagens são identificados e delineados manualmente por um biólogo especialista sobre uma projeção de intensidades máximas (MIP) das imagens volumétricas. As imagens delineadas, denotadas por R, são utilizadas como referência para avaliar a segmentação realizada pelos métodos propostos. Devido ao caráter subjetivo da definição de R, o processo é repetido duas vezes, gerando duas imagens de referência para cada imagem. Os resultados dos experimentos são comparados com ambas as imagens de referência,  $R_1$  e  $R_2$ , e o considera-se a média dos índices de validação.

As imagens segmentadas pelo método proposto são comparadas com as imagens de referência. Os objetos segmentados são classificados em: (A) células segmentadas corretamente; (B) falso-positivos (artefatos ou objetos supersegmentados); (C) falso-negativos (células não identificadas e grupos de células subsegmentadas).

A segmentação é avaliada quanto ao número de neurônios identificada corretamente, ao número de falso-positivos e de falso-negativos, e à morfologia dos neurônios corretamente identificados.

A diferença normalizada,  $dN_{MR}$ , entre o número de células identificadas pelo especialista,  $N_R$ , e o número de células segmentadas corretamente pelo método,  $N_M$ , é calculada pela Equação (4.4).

$$dN_{MR} = \frac{|N_M - N_R|}{N_R} \quad (4.4)$$

A relação entre o número de falso-positivos,  $N_{FP}$ , falso-negativos,  $N_{FN}$ , e o número de células identificadas pelo especialista,  $N_R$  são denotadas respectivamente por FP e FN nas Equações (4.5) e (4.6).

$$FP = \frac{N_{FP}}{N_R} \quad (4.5)$$

$$FN = \frac{N_{FN}}{N_R} \quad (4.6)$$

É necessário avaliar também a qualidade dos neurônios segmentados corretamente, para isso foram computadas as diferenças normalizadas entre os perímetros,  $dP_{MR}$ , e as áreas,  $dA_{MR}$ , das células segmentadas pelo método e pelo especialista, de acordo com as Equações (4.7) e (4.8),

$$dP_{SR} = \frac{|P_M - P_R|}{P_R} \quad (4.7)$$

$$dA_{SR} = \frac{|A_M - A_R|}{A_R} \quad (4.8)$$

em que  $P_M$  e  $A_M$  são as médias dos perímetros e áreas calculados sobre os objetos identificados corretamente pelo método, e  $P_R$  e  $A_R$  são, respectivamente, a média dos perímetros e das áreas calculados sobre os objetos da imagem de referência.

Para possibilitar a comparação entre os índices de validação apresentados anteriormente, quanto menores são os valores melhor é o resultado obtido. Como uma forma de comparar os resultados considerando múltiplos índices, três médias são definidas: (A) MEDIA\_1, definida como a média dos índices  $dN_{MR}$ , FP e FN, desconsiderando informações sobre a qualidade das segmentações individuais; (B) MEDIA\_2, definido como a média entre os índices  $dN_{MR}$ , FP, FN e  $dA_{MR}$ , agora considerando a qualidade da segmentação de cada neurônio; e (3) MEDIA\_3 definido como a média entre os índices  $dN_{MR}$  e  $dA_{MR}$  utilizada para avaliar apenas a capacidade do método em segmentar corretamente os neurônios, desconsiderando os erros.

A Tabela 4.3 mostra os índices de validação obtidos a partir dos experimentos, com o objetivo de avaliar a segmentação ao longo das etapas do método: (SEG) segmentação por limiarização; (MORPH) filtragem morfológica; e (WAT) transformada watershed. Foram consideradas os índices  $dN_{MR}$ , FP e FN.

**Tabela 4.3: Índices de validação ao longo das etapas do método, exceto pela etapa de classificação que são mostradas na Tabela 4.4. SEG é a etapa da segmentação; MORF de filtragem morfológica, incluindo a correção de oclusão e WAT é a transformada watershed.**

MEA	Index	SEG	MORPH	WAT
MEA01	$dN_{MR}$	0.2155	0.1913	0.1334
	FP	24.0203	3.7570	5.5997
	FN	0.0627	0.0997	0.0707
	$dA_{MR}$	----	----	0.2669
	<b>MEAN 1</b>	8.0995	1.3493	1.9346
	<b>MEAN 2</b>	6.0746	1.0120	1.5177
MEA02	$dN_{MR}$	0.1126	0.0712	0.0447
	FP	6.1474	0.6060	0.8063
	FN	0.0116	0.0447	0.0249
	$dA_{MR}$	----	----	0.2374
	<b>MEAN 1</b>	2.0905	0.2406	0.2920
	<b>MEAN 2</b>	1.5679	0.1805	0.2783
MEA04	$dN_{MR}$	0.3296	0.2951	0.1312
	FP	3.7529	0.5993	1.1512
	FN	0.0646	0.1272	0.0173
	$dA_{MR}$	----	----	0.2313
	<b>MEAN 1</b>	1.3824	0.3405	0.4332
	<b>MEAN 2</b>	1.0368	0.2554	0.3827
MEA05	$dN_{MR}$	0.3499	0.3534	0.1049
	FP	6.4873	1.0019	1.8943
	FN	0.0710	0.1475	0.0169
	$dA_{MR}$	----	----	0.2311
	<b>MEAN 1</b>	2.3027	0.5009	0.6720
	<b>MEAN 2</b>	1.7271	0.3757	0.5618
MEA11	$dN_{MR}$	0.2183	0.2366	0.0730
	FP	4.3286	4.3286	1.1643
	FN	0.0715	0.0715	0.0317
	$dA_{MR}$	----	----	0.2374
	<b>MEAN 1</b>	1.5395	1.5395	0.4230
	<b>MEAN 2</b>	1.1546	1.1546	0.3766
MEA13	$dN_{MR}$	0.1666	0.2149	0.0868
	FP	6.2726	0.7032	0.9916
	FN	0.0493	0.1189	0.0535
	$dA_{MR}$	----	----	0.2380
	<b>MEAN 1</b>	2.1628	0.3457	0.3773
	<b>MEAN 2</b>	1.6221	0.2592	0.3425
MEA13	<b>MEAN 3</b>			0.1624

Os dados mostrados na Tabela 4.3 são interessantes, pois permitem observar a influência das diversas etapas no resultado final do processo de segmentação. Observa-se, a partir dos valores apresentados, um grande número de falso-positivos (FP) resultantes da etapa de segmentação (SEG). A etapa de filtragem morfológica (MORPH) é capaz de eliminar uma grande quantidade de resultados falso-positivos (FP), porém não melhora o índice neurônios identificadas corretamente ( $dN_{MR}$ ). A aplicação da transformada watershed, cuja função é separar os componentes conectados subsegmentados, melhora os índices de neurônios segmentados corretamente ( $dN_{MR}$ ), entretanto pode gerar alguns artefatos que deverão ser eliminados na etapa de classificação de objetos. Isso ocorre, pois a sua função se restringe a separar os componentes conectados formados por agrupamentos de células.

A Tabela 4.4 mostra os resultados da etapa de classificação de objetos, considerando as três estratégias: (K-MEANS) classificação não supervisionada utilizando apenas o algoritmo k-means; (SVM+K-MEANS) classificação semi-supervisionada utilizando o SVM treinado com os resultados das classificações por K-MEANS; e (SVM+MANUAL) classificação supervisionada utilizando SVM treinada a partir de uma parcela de cada imagem classificada manualmente. A validação do resultado da transformada Watershed (WAT) é mostrada como referência.

**Tabela 4.4: Valores dos índices de validação considerando todas as estratégias de classificação: k-means, SVM+k-means e SVM+Manual. O resultado da transformada watershed (WAT) é mostrado para comparação.**

MEA	Index	WAT	K-MEANS	SVM+K-MEANS	SVM+MANUAL
MEA01	$dN_{MR}$	0.1334	0.5164	0.3764	0.4295
	FP	5.5997	1.2707	1.6320	0.7201
	FN	0.0707	0.4826	0.3427	0.3958
	$dA_{MR}$	0.2669	0.2100	0.2172	0.2080
	<b>MEAN_1</b>	<b>1.9346</b>	<b>0.7565</b>	<b>0.7837</b>	<b>0.5151</b>
	<b>MEAN_2</b>	<b>1.5177</b>	<b>0.7837</b>	<b>0.6420</b>	<b>0.4383</b>
MEA02	$dN_{MR}$	0.0447	0.1590	0.1242	0.1606
	FP	0.8063	0.0844	0.0811	0.0530
	FN	0.0249	0.1457	0.1126	0.1590
	$dA_{MR}$	0.2374	0.2202	0.2259	0.2147
	<b>MEAN_1</b>	<b>0.2920</b>	<b>0.1297</b>	<b>0.1060</b>	<b>0.1242</b>
	<b>MEAN_2</b>	<b>0.2783</b>	<b>0.1523</b>	<b>0.1359</b>	<b>0.1468</b>
MEA04	$dN_{MR}$	0.1312	0.2475	0.3231	0.2260
	FP	1.1512	0.2866	0.2327	0.1705
	FN	0.0173	0.1808	0.2886	0.1831
	$dA_{MR}$	0.2313	0.2154	0.1964	0.2119
	<b>MEAN_1</b>	<b>0.4332</b>	<b>0.2383</b>	<b>0.2815</b>	<b>0.1932</b>
	<b>MEAN_2</b>	<b>0.3827</b>	<b>0.2325</b>	<b>0.2602</b>	<b>0.1979</b>
MEA05	$dN_{MR}$	0.1049	0.2351	0.2181	0.2257
	FP	1.8943	0.4520	0.4395	0.2370
	FN	0.0169	0.1847	0.1762	0.1881
	$dA_{MR}$	0.2311	0.2019	0.2048	0.2038
	<b>MEAN_1</b>	<b>0.6720</b>	<b>0.2906</b>	<b>0.2779</b>	<b>0.2169</b>
	<b>MEAN_2</b>	<b>0.5618</b>	<b>0.2684</b>	<b>0.2596</b>	<b>0.2136</b>
MEA11	$dN_{MR}$	0.0730	0.2921	0.2283	0.2377
	FP	1.1643	0.1823	0.2314	0.1613
	FN	0.0317	0.2706	0.2078	0.2171
	$dA_{MR}$	0.2374	0.2227	0.2272	0.2236
	<b>MEAN_1</b>	<b>0.4230</b>	<b>0.2483</b>	<b>0.2225</b>	<b>0.2053</b>
	<b>MEAN_2</b>	<b>0.3766</b>	<b>0.2419</b>	<b>0.2237</b>	<b>0.2099</b>
MEA13	$dN_{MR}$	0.0868	0.3621	0.3904	0.3277
	FP	0.9916	0.1387	0.1077	0.1009
	FN	0.0535	0.3483	0.3780	0.3190
	$dA_{MR}$	0.2380	0.2069	0.2050	0.2107
	<b>MEAN_1</b>	<b>0.3773</b>	<b>0.2830</b>	<b>0.2920</b>	<b>0.2492</b>
	<b>MEAN_2</b>	<b>0.3425</b>	<b>0.2640</b>	<b>0.2702</b>	<b>0.2396</b>

Considerando o índice MEAN\_2, que leva em consideração a qualidade da morfologia de cada objeto segmentado corretamente, os resultados apresentados pela estratégia supervisionada (SVM+MANUAL) obtiveram resultados melhores do que os obtidos pela estratégia semi-supervisionada (SVM+K-MEANS), que por sua vez foi melhor do que a puramente não supervisionada (K-MEANS). As médias dos índices MEAN\_2, para todas as

imagens, foram: 0,5766 para WAT, 0,3238 para K-MEANS, 0,2986 para SVM+K-MEANS e 0,2410 para SVM+MANUAL. Apesar dos resultados apresentados pela estratégia supervisionada serem um pouco melhores, escolheram-se os resultados da estratégia semi-supervisionada para aplicar a análise quantitativa, devido a maior simplicidade deste método.

#### 4.5.2 Sensibilidade dos Parâmetros

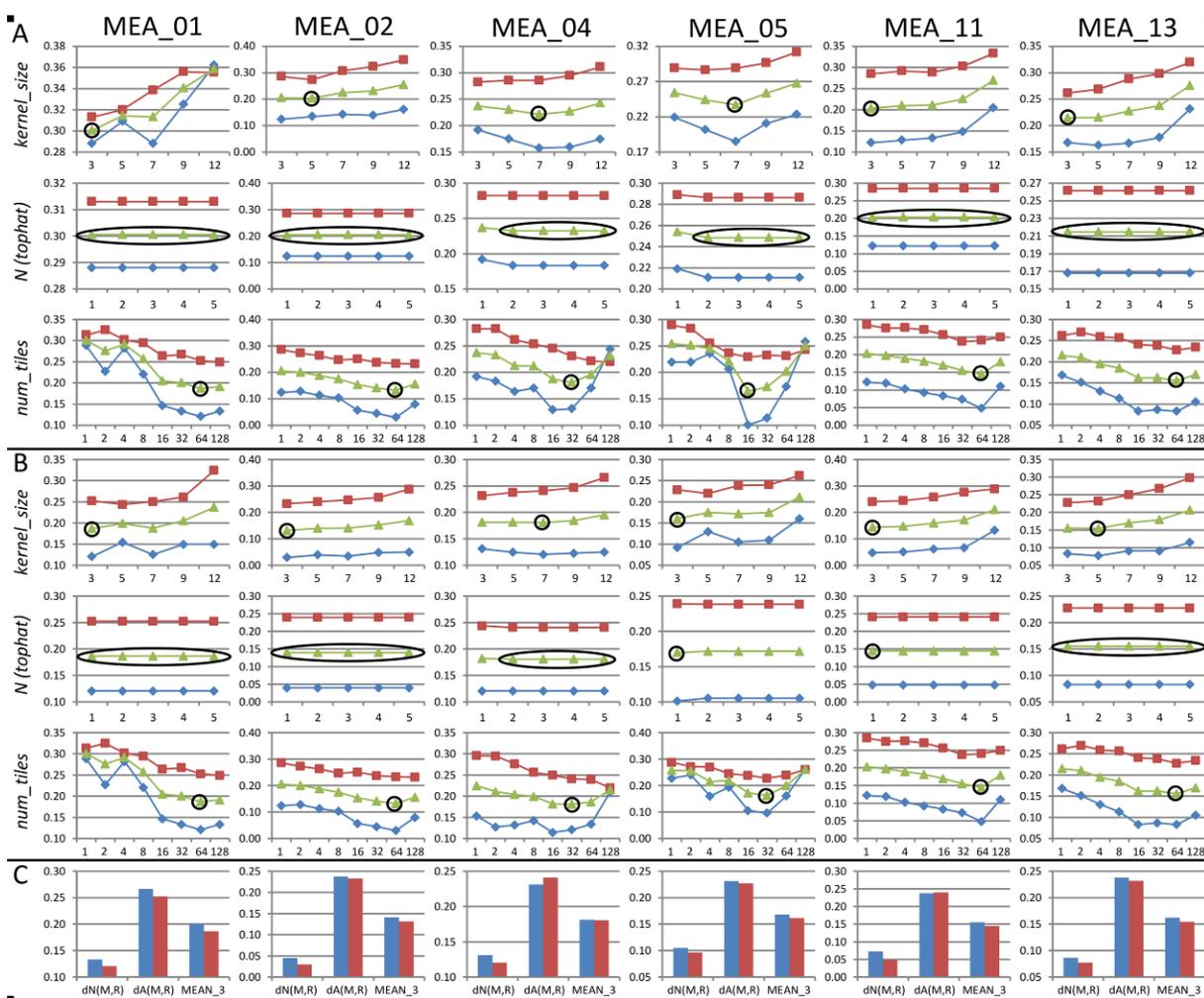
Esta seção analisa a sensibilidade do método à variação dos parâmetros. O objetivo desta análise é estabelecer um conjunto de parâmetros que maximiza o desempenho da identificação ao mesmo tempo em que minimiza a variação dos valores dos parâmetros ao longo das diferentes imagens que compõem o conjunto de dados estudado. Para as etapas de segmentação, filtragem morfológica (incluindo correção de oclusão) e transformada watershed o objetivo é minimizar os índices  $dN_{MR}$  e  $dA_{MR}$ , desconsiderando valores altos do índice FP (MÉDIA\_3). Em uma primeira rodada, variaram-se os valores dos parâmetros de acordo com o esquema descrito abaixo e os resultados são mostrados na Figura 4.11(A):

(A) O valor do parâmetro `KERNEL_SIZE` (filtro da mediana) variando em {3, 5, 78, 9, 12}, com valores fixos de `N` (top-hat) e `NUM_TILES` (limiarização local) = 1;

(B) O valor do parâmetro `N` (top-hat) variando em {1, 2, 4, 8, 16, 32, 64} com valores fixos de `KERNEL_SIZE`=3 e `NUM_TILES`=1;

(C) O valor do parâmetro `NUM_TILES` variando em {1, 2, 4, 8, 16, 32, 64}, com valores fixos de `KERNEL_SIZE`=3 e `N`=1;

Em uma segunda rodada, os melhores valores para os parâmetros definidos na primeira rodada, ou seja, os valores dos parâmetros que minimizam os índices  $dN_{MR}$  e  $dA_{MR}$  (MÉDIA\_3) são fixados enquanto os demais parâmetros são variados, da mesma forma que em (A), (B) e (C). Os resultados da rodada #2 são mostrados na Figura 4.11(B).



**Figura 4.11:** Análise da sensibilidade dos parâmetros no método de segmentação de neurônios para todas as imagens. Cada coluna está relacionada a uma das imagens do conjunto de dados, e cada linha representa um parâmetro. Os quadrados são o  $dN_{MR}$ , losangos são  $dA_{MR}$  e os triângulos são a média entre os dois (MÉDIA\_3). (A) Cada parâmetro é variado contra valores fixados dos demais parâmetros. Para a rodada #1, KERNEL\_SIZE é fixado em 3, N e NUM\_TILES em 1. (B) Na segunda rodadas os parâmetros são variados novamente, porém dessa vez os valores fixados de cada parâmetro correspondem aos melhores resultados obtidos na rodada #1. (C) Computa-se o conjunto de valores dos parâmetros que sejam constantes para todas as imagens e que, ao mesmo tempo, apresentem a menor variação em relação aos seus melhores resultados. A primeira coluna representa as medidas de validação do conjunto de parâmetros definido (KERNEL\_SIZE=3, N=2 e NUM\_TILES=32) enquanto a segunda representa os índices resultantes dos melhores parâmetros para cada imagem.

Para este tipo de aplicação é importante minimizar a variação dos valores dos parâmetros ao se processar diferentes imagens tomadas a partir de culturas de um mesmo tipo de neurônio. Espera-se que o método proposto resulte em bons resultados com pouca ou nenhuma variação dos parâmetros quando aplicado sobre imagens de culturas de neurônios DRG. Baseado nos valores mostrados na Figura 4.11(B) escolheu-se os valores KERNEL\_SIZE=3, N=2 e NUM\_TILES=32. Mesmo que estes valores não resultem nos melhores resultados para todas as imagens, eles apresentam variação mínima em relação aos

melhores resultados. Por exemplo, a maior diferença em relação ao melhor conjunto de parâmetros foi obtida a partir da imagem MEA\_01 (0.0136), e a menor diferença pela imagem MEA\_04 (0,0006).

## 4.6 Análise Quantitativa 2D

A partir das informações obtidas por meio da segmentação dos neurônios e do posicionamento dos microeletrodos foram calculadas medidas quantitativas relacionadas à morfologia e distribuição dos neurônios, à topologia da rede neural e a interface entre neurônios e microeletrodos.

A Tabela 4.5 mostra um resumo das medidas quantitativas básicas obtidas a partir das imagens. As seguintes medidas foram obtidas: o número de neurônios na imagem (Num); o perímetro (Perim), a área (Área), o diâmetro (Diam), a circularidade (Round) e a excentricidade (Eccent) dos neurônios. Em relação a distribuição espacial de neurônios e microeletrodos são mostradas: a distância média entre todos os pares de células (D(n,n)) e a distância entre os microeletrodos e os neurônios (D(n,E)). Com exceção do número de neurônios as medidas são mostradas como média  $\pm$  desvio padrão.

**Tabela 4.5: Medidas quantitativas computadas após correção dos erros de segmentação remanescentes.**

MEDIDAS	MEA_01	MEA_02	MEA_04	MEA_05	MEA_11	MEA_13
Num	109	292	215	147	586	293
Perim ( $\mu\text{m}$ )	74.74 $\pm$ 35.35	86.96 $\pm$ 31.14	102.42 $\pm$ 52.04	112.12 $\pm$ 54.48	79.92 $\pm$ 31.17	74.94 $\pm$ 24.94
Area ( $\mu\text{m}^2$ )	23.79 $\pm$ 11.25	27.68 $\pm$ 9.91	38.33 $\pm$ 16.57	35.69 $\pm$ 17.34	25.44 $\pm$ 9.92	23.86 $\pm$ 7.94
Diam ( $\mu\text{m}$ )	392.55 $\pm$ 369.57	543.79 $\pm$ 354.27	937.5 $\pm$ 708.25	791.43 $\pm$ 654.44	421.44 $\pm$ 260.19	391.51 $\pm$ 217.92
Round (0-1)	0.78 $\pm$ 0.15	0.83 $\pm$ 0.1	0.74 $\pm$ 0.12	0.72 $\pm$ 0.16	0.8 $\pm$ 0.14	0.84 $\pm$ 0.11
Eccent (0-1)	0.61 $\pm$ 0.15	0.54 $\pm$ 0.15	0.56 $\pm$ 0.14	0.57 $\pm$ 0.16	0.56 $\pm$ 0.15	0.5 $\pm$ 0.14
D(n,n) ( $\mu\text{m}$ )	955.99 $\pm$ 483.81	885.78 $\pm$ 422.79	818.19 $\pm$ 417.49	836.39 $\pm$ 443.26	856.86 $\pm$ 415.78	853.01 $\pm$ 410.09
D(n,E) ( $\mu\text{m}$ )	907.13 $\pm$ 413.06	841.88 $\pm$ 397.15	839.1 $\pm$ 395.23	834.37 $\pm$ 395.94	829.53 $\pm$ 393.36	823.34 $\pm$ 390.21

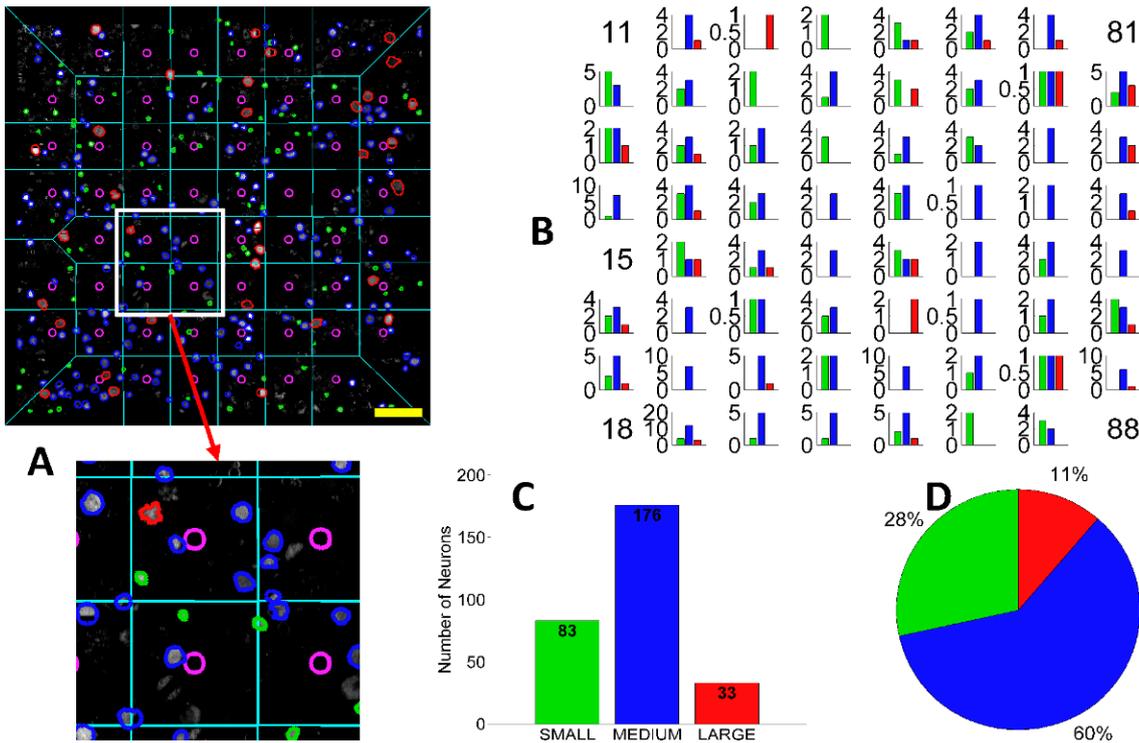
\* Média  $\pm$  desvio padrão.

O número de células identificadas permite estabelecer a densidade local de neurônios na região imageada da MEA. O diâmetro e a área da projeção 2D dos neurônios estão relacionados com a área da superfície dos neurônios. A área da superfície é uma medida importante, pois a qualidade do sinal gravado pela MEA está relacionada com a área de contato entre membrana da soma do neurônio e a superfície dos microeletrodos (PELT, VAN *et al.*, 2004). A matriz resultante do cálculo das distâncias entre todos os pares de células,

DIST, fornece uma descrição concisa e simplificada da topologia da rede neural formada pela cultura. As distâncias entre os microeletrodos e as células, DIST\_E, são fundamentais para caracterizar a interface neurônio-microeletrodo, por meio do relacionamento espacial entre os dois. Os neurônios localizados sobre, ou muito próximas aos microeletrodos, estão mais propensas a ter os sinais eletrofisiológicos capturados com maior qualidade pela MEA do que os neurônios mais distantes.

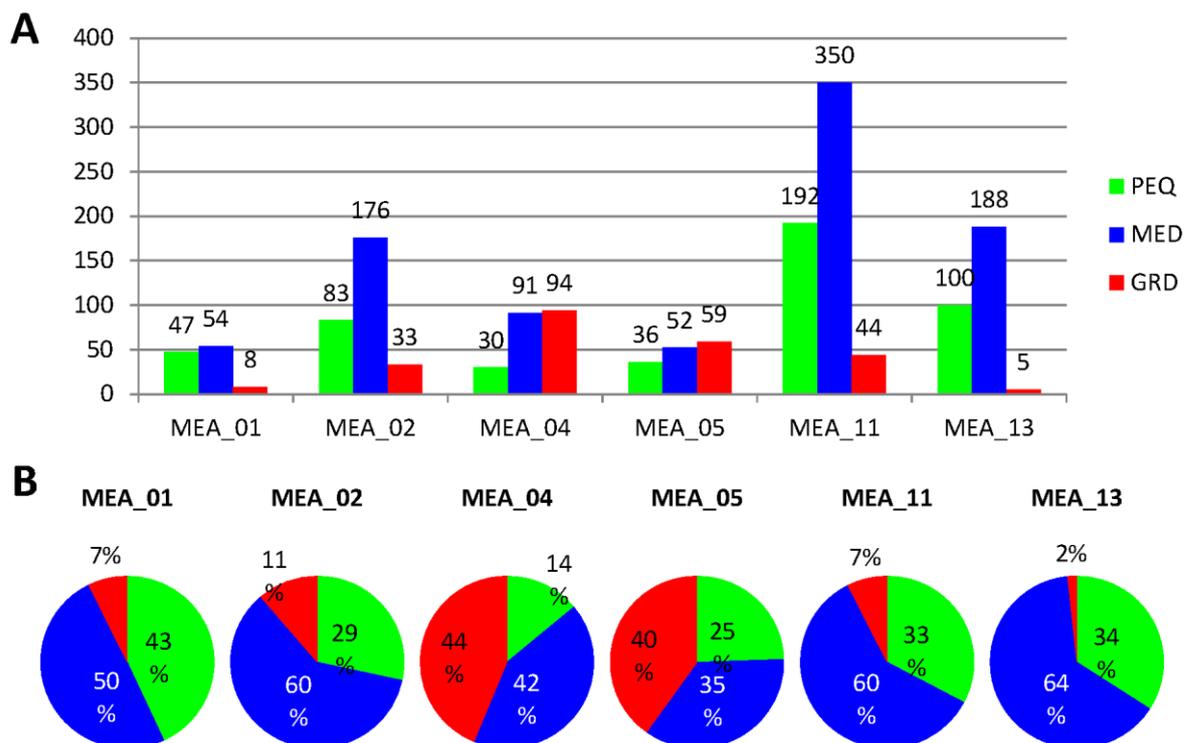
#### **4.6.1 Classificação Morfológica e Topológica de Neurônios.**

A Figura 4.12 ilustra a classificação morfológica realizada sobre as imagens tomadas a partir da cultura MEA\_02. (A) Visualização dos neurônios classificados de acordo com o seu diâmetro. Neurônios verdes são pequenos, azuis são médios e os vermelhos são grandes. Os microeletrodos estão marcados em magenta e as linhas em ciano representam a região de influência de cada microeletrodo, computada a partir do seu diagrama de Voronoi. (B) Gráficos de barras mostram o número de neurônios em cada classe, considerando apenas os neurônios dentro da área de influência de cada microeletrodo. (C) Gráfico de barras mostrando a classificação dos neurônios de acordo com a morfologia. É possível observar a quantidade de neurônio em cada classe. (D) Gráfico de pizza ilustrando a porcentagens de neurônios em cada classe de acordo com o diâmetro de sua soma.



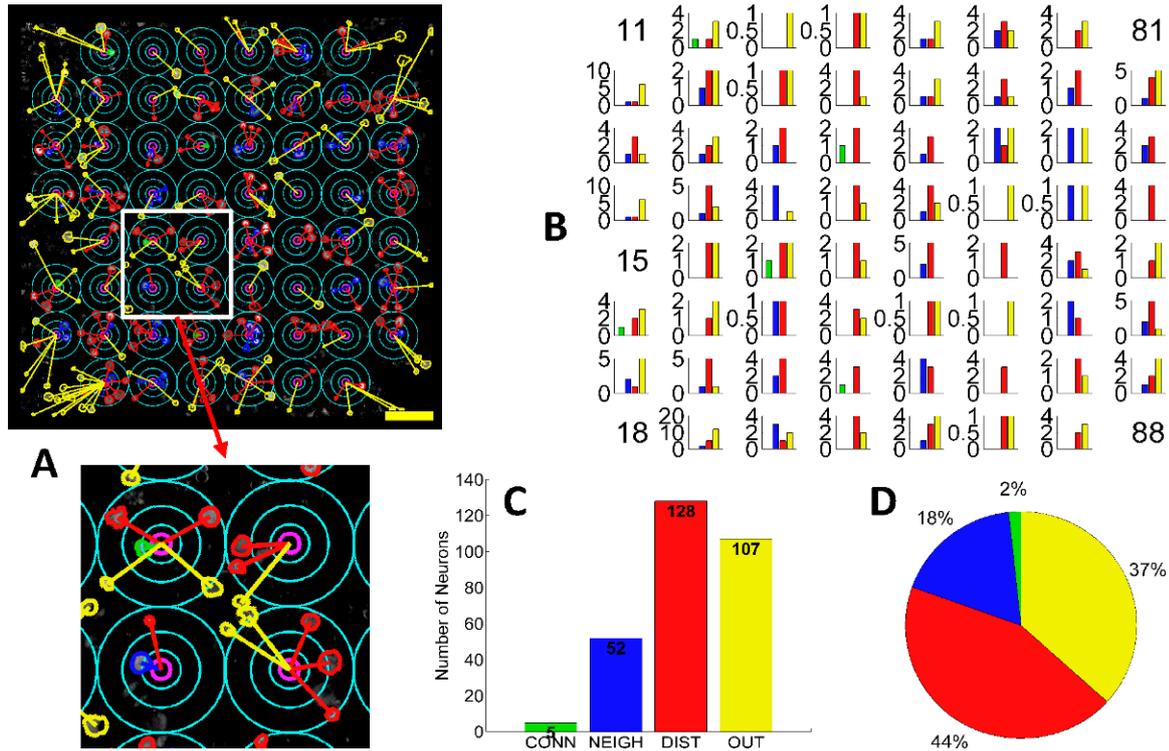
**Figura 4.12: Resultado da classificação morfológica da cultura MEA\_02. (A) Visualização da classificação morfológica. As linhas retas são o diagrama de Voronoi dos microeletrodos. (B) Histograma da distribuição dos neurônios de acordo com seus diâmetros, considerando cada microeletrodo individualmente. (C) Histograma da distribuição dos neurônios considerando toda a MEA. (D) Porcentagens de neurônios em cada classe, também considerando toda a MEA.**

Os gráficos na Figura 4.13 resumem a classificação morfológica 2D realizada sobre todas as imagens das culturas (MEA\_01, MEA\_02, MEA\_04, MEA\_05, MEA\_11 e MEA\_13) considerando a cultura toda. (A) Os gráficos de barra mostram os valores absolutos. (B) Os gráficos de pizza mostram as porcentagens.



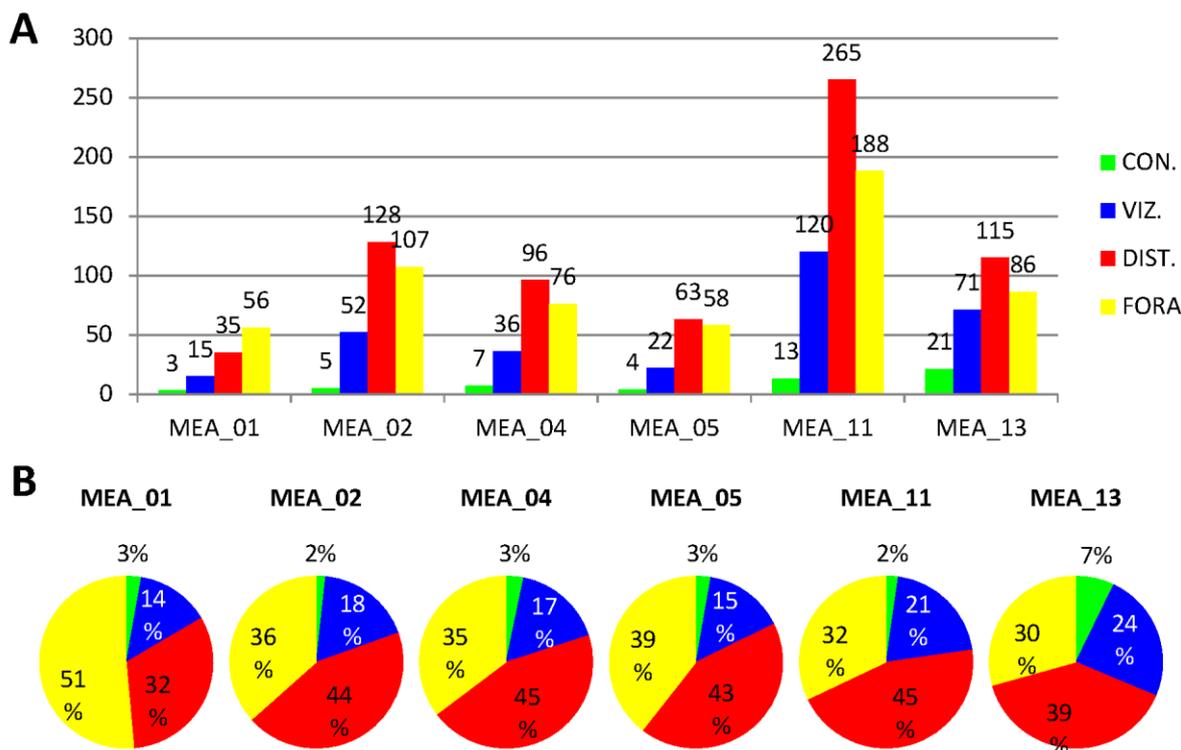
**Figura 4.13:** A distribuição dos neurônios de acordo com os seus diâmetros considerando todos os neurônios da MEA. (A) Gráficos de barras, considerando o número absoluto de neurônios em cada classe. (B) Gráficos de pizza considerando a porcentagem de neurônios em cada uma das classes. PEQ são neurônios pequenos, MED são médios e GRD são grandes.

A Figura 4.14 ilustra os resultados das análises quantitativas consideração a distância entre os neurônios e os microeletrodos, para a imagem da cultura MEA\_02. (A) Visualização dos neurônios classificados. Neurônios potencialmente conectados a algum microeletrodo são marcados em verde, neurônios na vizinhança de algum microeletrodos são marcados em azul, neurônios distantes em vermelho, e fora da região de cada microeletrodo considerada para gravação são marcados em amarelo. Uma linha reta, na mesma cor dos neurônios os conectam ao microeletrodos mais próximo. Os microeletrodos, por sua vez, estão marcados em magenta. Os círculos concêntricos representam os limites que definem cada classe de neurônios.



**Figura 4.14: Resultado da classificação topológica para a cultura MEA\_02. (A) Visualização da classificação topológica. Os círculos concêntricos são os limites entre as classes de neurônios. (B) Histograma da distribuição dos neurônios de acordo com a distância em relação aos microeletrodos. (C) Histograma da distribuição dos neurônios considerando toda a MEA. (D) Porcentagens de neurônios em cada classe, também considerando toda a MEA.**

Os gráficos na Figura 4.15 resumem a classificação nos neurônios em relação a distância 2D dos microeletrodos realizada para todas as culturas (MEA\_01, MEA\_02, MEA\_04, MEA\_05, MEA\_11 e MEA\_13) considerando a cultura toda. (A) Os gráficos de barra mostram os valores absolutos. (B) Os gráficos de pizza mostram as porcentagens.



**Figura 4.15:** A distribuição dos neurônios de acordo com a distância em relação ao microeletrodo mais próximo para todos os neurônios da MEA. (A) Gráficos de barras, considerando o número absoluto de neurônios em cada classe. (B) Gráficos de pizza considerando a porcentagem de neurônios em cada uma das classes. CON são conectados, VIZ são vizinhos, DIST. são distantes e FORA são fora da área considerada para gravação.

Observa-se, de acordo com as porcentagens de neurônios classificados quanto à distância em relação aos microeletrodos, que a cultura MEA\_13 possui a maior quantidade de neurônios potencialmente conectados e na vizinhança de algum microeletrodo, enquanto as demais culturas possuem aproximadamente as mesmas porcentagens de neurônios potencialmente conectados (entre 2 e 3%). No que diz respeito ao número de neurônios distantes de algum microeletrodo a maior concentração está nas culturas MEA\_02, MEA\_04, MEA\_05 e MEA\_11 (44, 45, 43 e 45%) enquanto nas culturas MEA\_01 e MEA\_13 são um pouco menores (32 e 24%).

Estas medidas topológicas são úteis quando se analisa a proporção entre o número de neurônios potencialmente conectados e na vizinhança de um microeletrodo com o total de neurônios na cultura. Dessa forma é possível quantificar a efetividade com que a cultura plaqueada na MEA irá influenciar na atividade eletrofisiológica capturada pelos microeletrodos. Neurônios próximos aos microeletrodos possuem maior influência na formação do sinal adquirido pelos microeletrodos (PELT, VAN *et al.*, 2004; FEJTL *et al.*, 2006). Quando uma alta proporção de neurônios de uma cultura esteja em uma dessas classes,

ocorre um cenário em que uma parcela grande desta cultura se mostra predisposta a ter a sua atividade capturada por algum microeletrodo. A maior proporção entre neurônios potencialmente conectados e vizinhos aos microeletrodos é observada na cultura MEA\_13 (0,31), enquanto a menor é observada na cultura MEA\_01 (0,16). As demais culturas apresentam pouca variação na proporção de neurônios potencialmente conectados e vizinhos: 0,18 para a MEA\_05, 0,19 para a MEA\_02, 0,2 para a MEA\_04 e 0,23 para a MEA\_11.

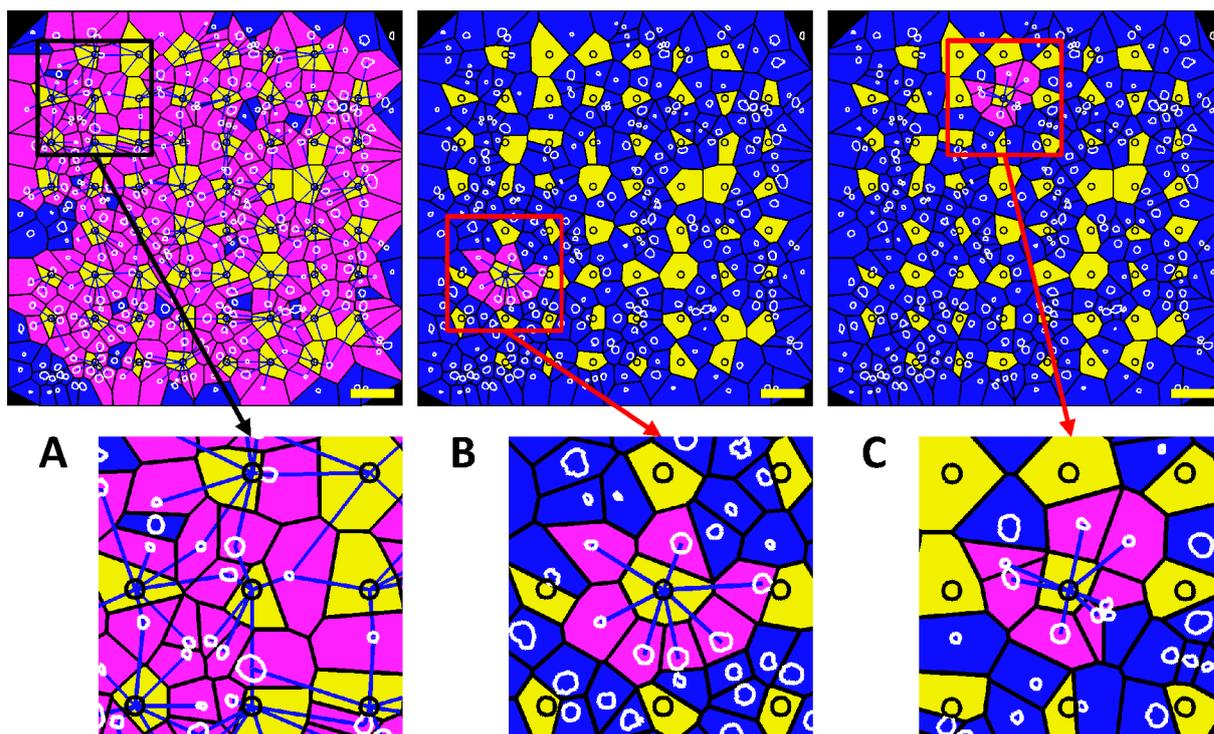
Outra observação possível, porém com resultados equivalentes é a proporção entre os neurônios potencialmente conectados e vizinhos em relação ao total de neurônios distantes e fora da área de conexão dos microeletrodos.

#### **4.6.2 Análise Topológica baseada no Diagrama de Voronoi**

Nesta seção são apresentados os resultados da análise topológica realizada a partir do Diagrama do Voronoi computada sobre os microeletrodos e neurônios. O método para classificação é descrito com detalhes na Seção 3.4.5.

Os valores obtidos a partir dos polígonos de Voronoi são úteis para descrever quantitativamente as relações topológicas entre os microeletrodos e os neurônios próximos a ele. Cada polígono de Voronoi representa a região de influência de um elemento (neurônio ou microeletrodo). Todos os neurônios cujo respectivo polígono possui adjacência com o polígono de um microeletrodo é considerado como parte do seu 1-anel. O 1-anel de cada microeletrodo quantifica informações sobre a densidade neuronal local em torno de cada microeletrodo, assim como ao relacionamento do microeletrodo com os microeletrodos vizinhos em termos dos neurônios compartilhados com outros 1-anel.

A Figura 4.16 ilustra os resultados da classificação topológica baseada no diagrama de Voronoi para as imagens das culturas MEA\_01, MEA\_02, MEA\_04, MEA\_05, MEA\_11 e MEA\_13, respectivamente. Nas imagens, cada polígono de Voronoi representa a região de influência de um neurônio ou microeletrodo: Os polígonos amarelos estão relacionados aos microeletrodos, os magentas ao 1-anel de um microeletrodo e os azuis são a área de influência dos neurônios fora do 1-anel de nenhum microeletrodo. O conjunto de linhas que emana dos microeletrodos representa as distâncias entre os microeletrodos e os neurônios no seu 1-anel.



**Figura 4.16:** Visualização da classificação topológica baseada no diagrama de Voronoi aplicada sobre as imagens da cultura MEA\_02. (A) Classificação realizada considerando todos os microeletrodos. (B) Classificação considerando apenas o microeletrodo 26. (C) Classificação considerando apenas o microeletrodo 42.

A Tabela 4.6 apresenta os dados relacionados com a classificação topológica baseada na triangulação de Delaunay. Cada linha representa um microeletrodo. A é a área de influencia do 1-anel do microeletrodo incluindo área de influencia do microeletrodo. A' é a média da área de influencia do 1-anel do microeletrodo, não considerando a área de influencia do microeletrodo. D' é a distância média entre o microeletrodo e os neurônios pertencentes ao seu 1-aneal. Quanto menores os valores para quaisquer índices da tabela, maior é a densidade local de neurônios ao redor do microeletrodo. Valores pequenos são mostrados próximos do verde (alta densidade neuronal) e valores maiores são mostrados próximos do vermelho (baixa densidade).

**Tabela 4.6: Informações relacionadas à distribuição topológica dos neurônios vizinhos de cada microeletrodo. Cada linha representa um microeletrodo. S é o número de neurônios que compõem o 1-anel do microeletrodo. A é a área total do 1-anel do microeletrodo, incluindo sua própria área (em  $\mu\text{m}^2$ ). A' é a área média do 1-anel, não considerando a área do microeletrodo (em  $\mu\text{m}^2$ ). D' é a média das distancias entre os microeletrodos e os neurônios no seu 1-anel.**

E	MEA_01				MEA_02				MEA_04				MEA_05				MEA_11				MEA_13			
	S	A	A'	D'	S	A	A'	D'	S	A	A'	D'	S	A	A'	D'	S	A	A'	D'	S	A	A'	D'
1	4	319204.2	67189.7	165.8	7	209374.8	26558.3	123.6	3	53654.6	16234.1	34.9	4	306128.8	65371.4	153.1	6	58744.6	8376.3	69.9	6	120440.9	17308.2	101.0
2	5	125179.7	19385.6	97.4	8	172812.1	19570.1	99.5	7	153273.9	17029.6	92.1	5	208355.6	36831.4	123.3	7	43026.6	5351.8	58.3	6	106866.2	15831.9	81.5
3	8	190530.5	20260.9	133.3	6	135239.4	18925.4	105.9	5	254719.8	39606.6	149.3	6	269005.3	35142.5	172.4	9	144073.0	14104.3	105.4	7	278880.3	34764.2	145.8
4	5	264251.8	44736.5	147.6	4	129959.7	29150.1	78.9	9	203546.2	20145.5	114.4	6	95682.4	13898.8	80.9	6	59767.4	9004.2	62.5	8	254171.1	28395.5	131.6
5	5	265033.2	42974.4	167.0	5	121410.6	21481.9	88.9	6	303099.9	39306.7	156.6	5	101990.6	11974.5	81.5	4	103354.0	24689.4	54.4	7	183868.7	21465.0	143.8
6	7	432945.0	55317.5	146.3	7	245999.6	31997.4	122.4	4	33212.2	7010.6	43.6	2	278879.3	89681.8	132.2	6	78489.0	10566.4	96.5	5	196438.7	33691.2	119.6
7	4	223654.3	38216.6	196.6	6	133573.8	19486.8	93.2	5	81647.8	14307.3	69.3	5	263049.2	38303.0	184.0	7	42896.9	5156.6	61.0	5	11759.2	20110.4	74.1
8	4	127698.2	19228.4	130.0	6	162403.5	16373.7	134.2	6	117673.0	18008.1	89.4	6	143289.1	18053.9	130.8	4	33309.1	7114.2	46.9	7	111851.0	13816.7	83.8
9	8	203065.9	21755.9	134.0	6	102090.4	13990.8	85.8	6	133285.8	19079.9	100.7	7	147215.6	15969.4	117.7	5	38264.3	6702.3	48.3	6	130668.8	18270.8	119.5
10	4	167173.1	35157.2	121.3	6	128732.8	17804.1	111.3	8	269946.8	28032.1	154.6	9	208032.7	20110.6	125.8	8	95527.7	9521.9	98.1	5	103412.7	18686.7	70.1
11	4	184037.4	33416.9	154.2	7	167363.0	19793.5	127.1	3	121036.4	32628.7	76.8	6	112603.6	15996.1	94.4	5	78118.3	13512.3	75.4	6	183815.6	26450.4	116.3
12	4	123711.4	26178.6	61.0	7	115462.6	14510.0	90.6	5	243810.1	37771.1	172.4	4	107704.9	20320.5	91.1	8	99234.9	10977.8	88.0	4	157913.0	27700.0	136.1
13	4	417359.3	73270.3	204.7	7	90015.4	11634.5	71.0	4	193999.0	37251.2	114.0	5	409118.4	33131.8	238.6	5	60455.1	10622.6	55.9	5	85095.8	15438.8	52.7
14	5	82470.6	14085.2	85.0	5	277385.9	2777.1	174.9	5	121938.8	21510.1	109.8	5	52951.2	66555.7	204.6	6	85209.7	12258.6	76.0	6	184355.6	26698.4	127.0
15	4	92878.9	11024.0	93.7	5	174750.3	28245.6	114.3	5	106311.0	18601.0	88.5	5	197904.4	29947.9	162.1	5	75026.7	12922.2	70.7	5	136985.6	24285.4	94.4
16	1	108706.8	34937.3	155.9	6	163661.6	23119.8	114.4	6	164174.6	24072.0	114.8	5	128183.0	23874.4	78.4	5	54795.6	9832.7	53.1	6	146246.4	20705.2	112.4
17	6	157379.4	20607.7	98.2	6	113385.2	16647.5	75.2	6	220902.7	29495.6	149.5	10	166581.0	14232.7	119.0	6	75235.8	10682.7	76.3	5	80957.4	13125.8	83.7
18	5	184584.4	28725.7	138.2	6	110678.0	6147.6	89.7	4	211039.8	42297.9	149.3	6	168654.8	1953.6	134.6	6	78069.2	11255.8	70.3	6	133604.7	19187.8	99.1
19	3	170887.5	34030.8	211.6	6	133585.5	18438.1	116.0	2	161707.2	47786.3	142.5	5	111158.3	18709.7	93.4	6	111958.9	15957.5	88.3	6	177418.0	24724.5	115.1
20	2	146364.5	34169.5	204.7	5	93341.7	16248.0	71.3	2	163677.0	48654.3	162.1	6	233842.7	29370.5	157.4	7	74744.4	8803.5	76.9	7	215994.4	32477.3	145.7
21	2	470354.5	77911.5	356.8	4	106217.0	24056.0	61.0	2	360564.6	49271.3	202.7	2	365440.2	35444.2	187.3	7	127733.8	15481.1	108.8	6	118384.4	17385.6	85.0
22	6	286975.6	40185.3	166.3	6	236752.5	32851.6	146.0	5	90371.1	15834.7	79.0	4	288687.8	84895.6	176.0	5	78933.6	12971.0	80.1	7	180941.5	21620.7	131.9
23	4	125173.5	18809.8	115.7	7	145246.1	18109.9	96.8	7	170371.8	21084.0	109.9	5	243559.8	38480.2	194.0	5	62166.8	11017.6	56.1	8	200923.5	22725.0	106.8
24	1	109610.6	28223.9	250.4	4	114685.2	24758.6	76.9	7	187963.2	22465.1	126.1	5	140749.0	25468.8	81.8	7	107282.4	13194.1	93.0	5	165601.1	27876.1	126.8
25	1	106116.9	37818.9	119.7	6	222366.5	22843.0	148.5	5	101658.5	19046.8	57.3	8	205307.4	22580.1	114.8	5	41049.7	7309.2	42.0	6	151832.8	20945.4	112.4
26	2	145499.9	39273.9	162.3	8	184379.6	18987.6	134.4	5	218548.0	33930.2	152.8	5	219556.2	33548.2	164.6	8	87920.0	9464.4	84.7	5	75531.9	13545.7	62.0
27	1	14400.7	40728.9	156.6	6	145154.4	20642.5	97.9	2	171233.0	42457.7	216.1	4	207987.6	41766.2	129.2	6	82226.2	12372.7	67.9	5	140728.1	23584.6	108.8
28	0	82116.0	----	----	7	153493.8	19576.1	97.3	0	91039.1	----	----	3	199716.4	43288.9	180.8	6	147527.3	20457.6	114.3	5	152772.4	25802.4	97.8
29	3	312725.4	----	----	9	193201.3	18858.2	114.2	0	299098.8	----	----	2	372311.2	250951.6	270.1	8	227690.8	24697.0	144.9	4	186640.6	36642.5	102.8
30	4	235322.1	43052.7	164.4	6	138688.1	19108.7	112.2	6	71493.9	10152.7	72.8	3	142107.6	38567.2	90.3	8	159835.5	17873.5	104.7	5	97666.4	17822.8	92.2
31	5	135592.0	22183.5	116.3	7	160015.4	19908.9	110.9	4	50772.5	11722.7	56.4	4	191523.6	35808.4	149.5	6	66662.0	9491.3	79.2	6	87958.9	12659.8	86.4
32	3	141084.7	25154.9	153.5	7	133622.2	16723.9	95.8	6	121926.5	16428.2	111.6	4	195444.9	32699.5	169.9	6	124025.2	17100.8	103.5	4	93569.0	20140.4	79.3
33	1	111758.8	30200.9	239.1	7	129588.6	16234.7	84.0	4	87464.1	19252.1	67.8	4	152868.5	30481.8	125.8	6	61500.3	8786.2	65.1	7	168365.2	20396.9	113.2
34	1	110797.4	30200.9	226.5	5	98126.2	17273.6	68.0	5	206619.6	32404.0	143.6	4	252603.3	42528.3	153.0	7	47951.9	5999.1	57.7	6	148442.3	22206.0	100.6
35	0	81861.0	----	----	5	157776.6	25188.6	125.2	2	164477.7	40694.1	204.7	3	187618.6	44121.0	151.0	6	49503.6	7549.3	46.1	5	153236.6	25715.2	122.3
36	1	86361.3	39801.9	19.6	6	85301.8	13210.7	54.6	1	123872.3	45272.8	134.7	1	172912.3	34157.5	178.8	7	102594.7	12849.2	79.8	5	42662.4	7625.8	39.8
37	3	316823.3	72174.9	152.9	5	99272.3	17338.2	77.5	1	331834.7	45272.8	160.2	1	206036.0	54854.8	250.1	6	104102.6	16034.2	62.9	4	293242.4	43570.8	165.4
38	5	214180.3	36525.4	133.6	5	127414.0	23211.8	81.2	5	176975.0	28874.2	119.0	5	363139.5	54939.2	220.2	5	107495.4	19151.1	81.9	5	75104.6	13685.0	51.5
39	5	198656.2	31037.1	154.1	6	143188.9	20699.8	107.7	7	145032.8	16919.3	116.1	4	225732.8	41709.8	164.1	7	87369.8	10715.7	82.8	5	104334.2	18333.3	91.7
40	2	152179.5	38841.9	189.8	5	85123.3	15050.5	78.7	7	168665.4	19549.5	132.4	5	209314.8	31186.4	158.6	5	54861.6	9667.9	56.2	6	120663.1	17084.4	109.6
41	2	13695.4	28036.7	97.2	6	161893.3	18819.4	139.3	8	190848.5	19551.2	143.3	6	206323.0	29774.9	121.3	6	63559.3	9426.1	62.8	6	119413.3	17346.7	97.2
42	1	17050.9	29242.4	164.3	6	147006.4	19275.7	115.4	5	136989.1	23794.6	96.0	4	157652.7	33023.0	106.2	6	65157.8	9314.6	77.8	7	130563.3	16218.9	90.1
43	1	110034.0	28284.0	271.4	7	220596.6	24211.4	164.0	4	172316.8	30339.5	141.1	4	205868.7	35410.5	162.7	7	69949.2	8403.3	75.8	5	170718.4	27529.5	137.9
44	3	166772.3	36129.6	151.9	8	180887.1	19030.0	123.9	3	134449.9	31302.7	104.3	1	113475.6	33184.4	142.9	8	78140.7	8430.8	79.6	5	154257.2	25241.0	116.5
45	3	290212.1	86991.5	97.3	6	227853.8	32728.5	128.0	4	405714.1	55048.6	193.1	2	184710.0	56007.2	137.2	4	45305.3	9931.4	52.9	7	377507.5	27378.9	194.4
46	4	406791.4	58726.3	173.7	7	242006.6	29741.4	139.3	4	90025.5	20700.8	57.4	4	192486.8	39480.1	104.8	7	206883.8	25547.5	117.3	4	70819.1	15633.0	55.9
47	3	260917.3	68630.0	166.4	5	116736.0	19984.0	101.1	7	132331.8	16863.2	93.2	4	170372.0	34960.1	111.2	6	92935.2	13102.5	80.7	6			

eletrofisiológica em vários tipos de análise como, por exemplo, a influência da densidade neural sobre os sinais adquiridos nos experimentos, assim como, em estudos relacionados com a eficiência de algoritmos de detecção e classificação de *spikes* (QUIROGA *et al.*, 2004; BONGARD *et al.*, 2014).

A análise quantitativa realizada e apresentada nesta seção permite determinar o posicionamento dos neurônios na MEA, assim como quantificar a relação espacial, tanto geométrica quanto topológica, dos neurônios com os microeletrodos assim como com os outros neurônios. Dessa forma, é possível expandir os resultados obtidos com os experimentos *in vitro* utilizando as informações quantitativas sobre a morfologia, topologia e posicionamento dos neurônios em simulações computacionais como em (SAITO *et al.*, 2013). Estas simulações permitiriam prolongar e expandir estudos que seriam impossíveis devido às limitações físicas dos sistemas de MEA.

A Figura 4.17 apresenta uma forma mais intuitiva de apresentar os resultados das análises quantitativas morfológica, topológica e baseada no diagrama de Voronoi, para a cultura MEA\_02. Os valores estão organizados da mesma forma que na placa da MEA. Na primeira linha estão: o número do microeletrodo, seguido pelo número de neurônios pequenos (P), médios (M) e grandes (G). Na segunda linha estão o número de neurônios potencialmente conectados (C), neurônios vizinhos (V), neurônios distantes (D) e os neurônios que estão fora da área de gravação de qualquer microeletrodo. A terceira linha mostra o número de neurônios no 1-anel (R) e a área de influência daquele microeletrodo. Finalmente, a quarta linha apresenta a área média do 1-anel e a média das distâncias entre o microeletrodo e os neurônios pertencentes ao seu 1-anel ( $D'$ ). A posição que seria ocupada pelo microeletrodo 11 mostra um gabarito das medidas informadas nas demais posições.

11	S	M	L	21	2	3	0	31	0	0	1	41	0	3	0	51	3	1	1	61	0	2	0	71	0	4	0				
C	N	D	0	0	1	2	2	0	0	0	1	0	0	2	1	0	1	1	3	0	0	2	0	0	2	0	2		81		
R		A	7	245999.6	5	277385.9	6	236752.5	6	138688.1	5	127414.0	7	242006.6																	
A'	D'		31997.4	122.4	42777.1	174.9	32851.6	146.0	19108.7	112.2	23211.8	81.2	29741.4	139.3																	
12	5	3	0	22	1	5	0	32	2	0	0	42	2	2	0	52	3	0	2	62	2	4	1	72	0	2	0	82	0	6	1
0	1	1	6	0	0	4	2	0	0	1	1	1	0	3	0	0	1	1	3	0	2	3	2	0	1	0	1	0	1	2	4
7	209374.8	4	114685.2	5	174750.3	7	145246.1	7	160015.4	6	143188.9	5	116736.0	5	145634.6																
26558.3	123.6	24758.6	76.9	28245.6	114.3	18109.9	96.8	19908.9	110.9	20699.8	107.7	19984.0	101.1	25570.5	88.3																
13	2	2	1	23	2	1	1	33	1	2	0	43	1	5	0	53	1	3	0	63	2	3	0	73	1	1	1	83	2	5	3
0	1	3	1	0	0	2	2	0	1	2	0	0	0	4	2	0	1	3	0	0	1	3	1	0	0	2	1	0	1	4	5
8	172812.1	8	162403.5	6	163661.6	4	114685.2	7	133622.2	5	85123.3	4	112006.5	7	148330.9																
19570.1	99.5	16373.7	134.2	23119.8	114.4	24758.6	76.9	16723.9	95.8	15050.5	78.7	21504.1	90.2	19851.1	85.5																
14	2	3	1	24	0	7	0	34	2	3	0	44	2	0	0	54	3	4	0	64	0	1	0	74	0	4	1	84	0	3	2
1	0	2	3	0	1	5	1	0	4	0	1	0	0	1	1	0	1	4	2	0	0	0	1	0	0	2	3	0	2	3	0
6	135239.4	6	102090.4	6	113385.2	8	222366.5	7	129588.6	6	161893.3	8	234011.0	6	195957.9																
18925.4	105.9	13990.8	85.8	16647.5	75.2	22843.0	148.5	16234.7	84.0	18819.4	139.3	23035.0	169.0	29769.8	102.7																
		25	0	4	1	35	1	3	1	45	1	4	0	55	3	2	2	65	1	2	0	75	1	1	1	85	0	3	1		
		1	0	1	3	1	0	2	2	0	0	4	1	0	2	5	0	0	0	3	0	0	1	2	0	0	0	4	0		
		6	128732.8	6	110678.0	8	184379.6	5	98126.2	6	147006.4	6	134154.2	5	173414.6																
		17804.1	111.3	16147.6	89.7	18987.6	134.4	17273.6	68.0	19275.7	115.4	20059.0	89.2	28937.5	113.8																
16	1	7	0	26	3	4	1	36	1	1	0	46	3	0	0	56	0	0	2	66	2	0	0	76	2	4	0	86	0	3	0
0	1	1	6	0	1	5	2	0	1	1	0	1	0	2	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	2	3	1	0	0	1	2
4	129959.7	7	167363.0	6	133585.5	6	145154.4	5	157776.6	7	220596.6	4	106912.8	6	97550.6																
29150.1	78.9	19793.5	127.1	18438.1	116.0	20642.5	97.9	25188.6	125.2	24211.4	164.0	23420.4	79.5	14839.6	72.0																
17	2	5	1	27	0	3	0	37	0	5	1	47	0	3	0	57	0	7	0	67	3	2	0	77	1	2	0	87	4	3	1
0	2	1	5	0	0	1	2	0	2	4	0	0	0	2	1	0	4	3	0	0	2	1	2	0	2	1	0	0	2	5	1
5	121410.6	7	115462.6	5	93341.7	7	153493.8	6	85301.8	8	180887.1	5	182184.5	7	232052.1																
21481.9	88.9	14510.0	90.6	16248.0	71.3	19576.1	97.3	13210.7	54.6	19030.0	123.9	28523.5	134.9	28541.5	127.4																
		28	4	12	3	38	1	5	0	48	2	3	0	58	2	5	1	68	0	1	0	78	3	2	0						
		0	2	5	12	0	3	1	2	0	0	3	2	0	1	3	4	0	0	0	1	0	0	2	3						
		7	90015.4	4	106217.0	9	193201.3	5	99272.3	6	227853.8	4	180503.7																		
		11634.5	71.0	24056.0	61.0	18858.2	114.2	17338.2	77.5	32728.5	128.0	37542.9	117.4																		

Figura 4.17: Tabela que resume e organiza as principais medidas quantitativas obtidas da cultura de neurônios na MEA. A tabela segue a distribuição espacial dos microeletrodos no modelo de MEA. Cada bloco delimitado por bordas escuras representam um microeletrodo numerado na primeira célula da primeira linha. O restante da primeira linha armazena as medidas morfológicas. A segunda linha armazena as medidas topológicas. A terceira e quarta linhas armazenam valores relacionados ao 1-anel do microeletrodo.

## 4.7 Reconstrução Poligonal e Visualização 3D

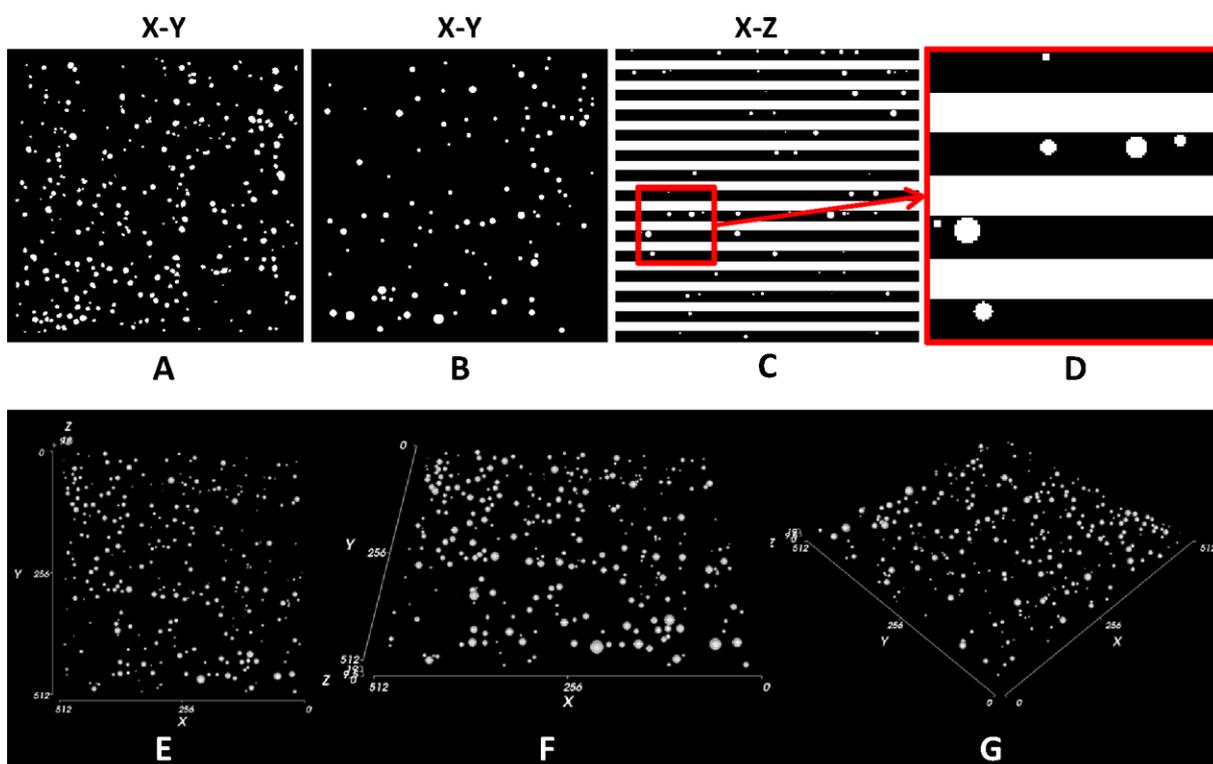
Nesta seção são apresentados os resultados obtidos com o método proposto para reconstrução dos neurônios por superfícies poligonais e a visualização 3D.

Os experimentos realizados com estes métodos utilizam as imagens resultantes da etapa de registro de imagens (descrito na Seção 4.4). Lembrando ainda que as imagens volumétricas foram registradas considerando as seções ópticas individuais.

### 4.7.1 Filtragem do Ruído nas Imagens

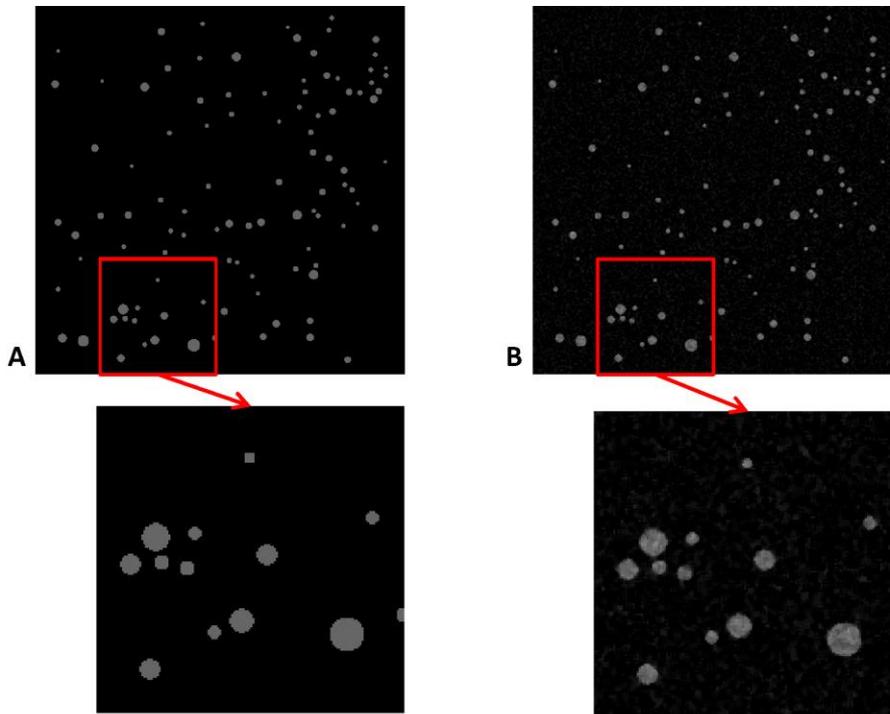
Com o objetivo de avaliar a melhor estratégia para realizar a filtragem do ruído nas imagens volumétricas construiu-se imagens sintéticas para quantificar a melhoria na qualidade das imagens sob condições controladas, o que não seria possível utilizando as imagens de microscopia reais. Para que se assemelhassem ao máximo com as imagens de

microscopia reais, as imagens sintéticas foram construídas com base no posicionamento e no diâmetro dos neurônios segmentados a partir de imagens tomadas das culturas de neurônios DRG em MEAs, mais especificamente, os resultados da segmentação 2D das imagens relativas às culturas MEA\_02 e MEA04, descritas na Seção 4.5. Cada imagem sintética é composta por um conjunto de círculos perfeitos cujos diâmetros e posição nos eixos X e Y correspondem aos valores obtidos das imagens segmentadas. No eixo Z as esferas estão alinhadas pela sua parte inferior. As imagens sintéticas foram corrompidas por ruído Poisson e com ruído Gaussiano com média 0 e variância 0.01. A Figura 4.18 ilustra a imagem sintética gerada a partir das informações da cultura MEA\_02. (A) Imagem obtida a partir da segmentação da imagem obtida a partir da cultura MEA\_02. (B) Seção óptica central (9) da imagem artificial construída a partir do posicionamento e dos diâmetros dos neurônios na imagem em (A). (C) Imagem artificial visualizada a partir dos eixos X-Z. (D) O quadro vermelho mostra detalhes das imagens. (E-G) Reconstrução 3D da imagem artificial visualizada por diversos ângulos de visão: (E) Visão superior e (F-G) diagonal.



**Figura 4.18: Processo de construção da imagem sintética. (A) Imagem resultante da segmentação 2D da cultura MEA\_02. (B) Seção-óptica central (9) da imagem sintética. (C) Visão de várias seções-ópticas da imagem sintética a partir dos eixos X-Z. (D) Detalhe das imagens em (C). (E-G) Visão da imagem sintética reconstruída em 3D por diversos pontos de vista.**

A Figura 4.19 mostra a seção óptica central (9) da imagem volumétrica artificial antes de ser corrompida pelo ruído em (A) e após inserção do ruído em (B).



**Figura 4.19: Imagem sintética. (A) Imagem sintética original, sem a adição de ruído (Seção-óptica 9). (B) Imagem sintética após a inserção de ruído (Seção-óptica 9). Os quadros vermelhos mostram detalhes das imagens.**

A imagem ruidosa foi submetida a uma série de filtros diferentes para redução do ruído, sendo eles: (A) Filtro da mediana; (B) Filtro da média; (C) Filtro de suavização Gaussiana e (D) Filtro de médias não locais. Esses filtros foram testados seguindo três estratégias distintas: (A) Aplicação de cada filtro individualmente. (B) Aplicação de cada um dos filtros no domínio de Anscombe. (C) Aplicação de cada um dos filtros no domínio de Anscombe com pré-filtragem pela mediana. Para a aplicação dos filtros no domínio de Anscombe aplicou-se a transformada adiante de Anscombe (Seção 2.4.1.3) antes da aplicação dos filtros descritos acima, e logo após aplicou-se a transformada inversas de Anscombe (Seção 2.4.1.3) para obter a representação final da imagem filtrada. Os resultados foram avaliados de acordo com os índices de qualidade MSE e PSNR e são apresentados na Tabela 4.7.

O cálculo do erro quadrático médio (MSE) entre a imagem original, não degradada,  $I$ , e a imagem filtrada,  $I'$ , é dado pela Equação (4.9).

$$MSE(I, I') = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^n (I'_i - I_i)^2 \quad (4.9)$$

O cálculo da relação sinal-ruído de pico é dado (PSNR) pela entre a imagem original, não degradada,  $I$ , e a imagem filtrada,  $I'$ , é dado pela Equação (4.10).

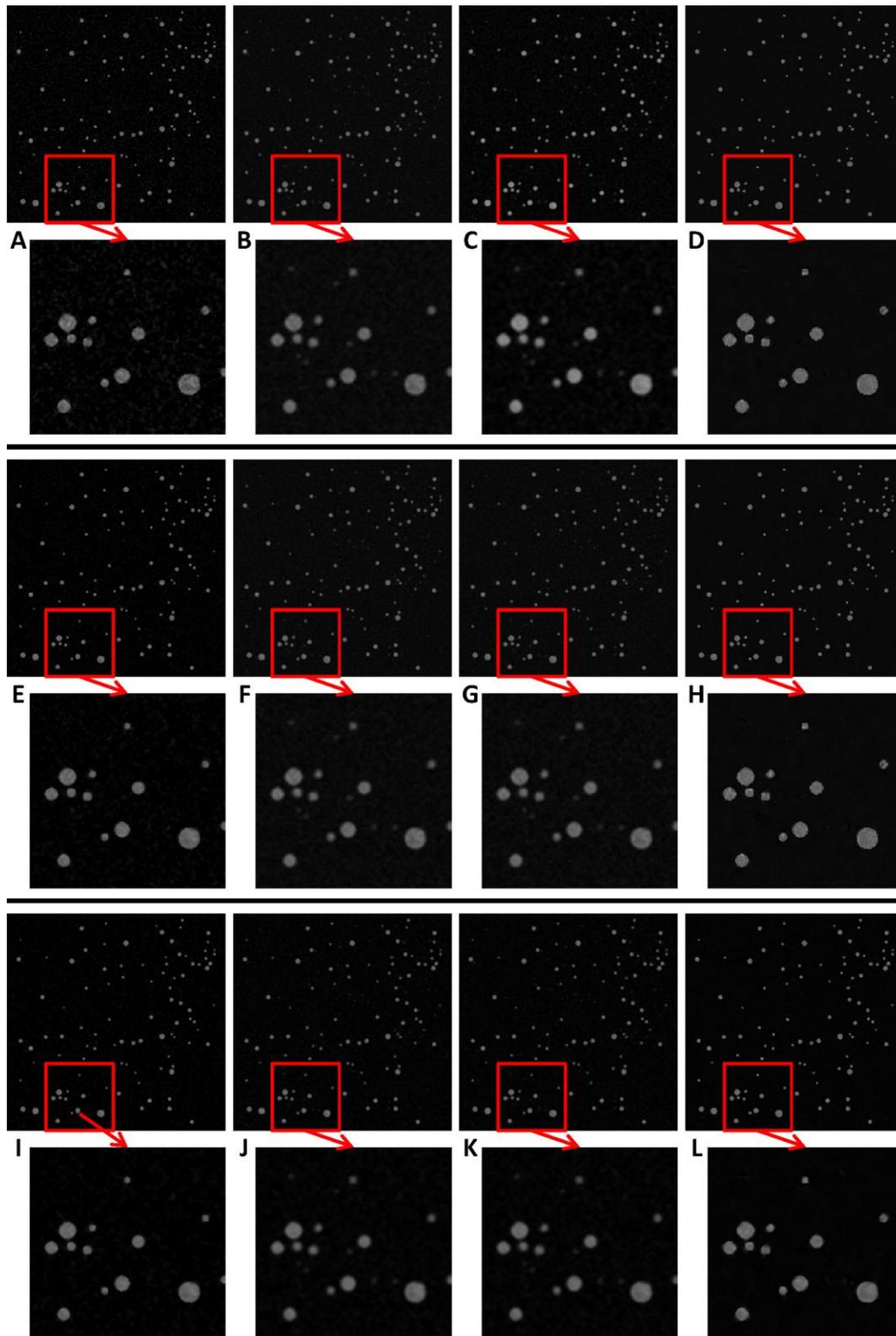
$$PSNR(I, I') = 10 \cdot \log_{10} \left( \frac{\max(I)^2}{MSE(I, I')} \right) \quad (4.10)$$

em que  $\max(I)$  é o maior valor de intensidade na imagem  $I$ .

**Tabela 4.7: Índices de qualidade das computada sobre as imagens ruidosas, antes e depois do processo de filtragem.**

<i>MÉTODO DE FILTRAGEM/IMAGEM</i>	<i>MEA_02</i>		<i>MEA_04</i>	
	<i>PSNR</i>	<i>MSE</i>	<i>PSNR</i>	<i>MSE</i>
<i>Original</i>	Inf	0	Inf	0
<i>Ruidosa</i>	22.3704	0.0051	22.4570	0.0052
<i>Mediana</i>	25.2318	0.0010	25.7874	0.0010
<i>Média</i>	20.5723	0.0021	20.9516	0.0021
<i>Gaussiana</i>	20.6101	0.0021	21.0853	0.0021
<i>Médias Não Locais</i>	24.5104	0.0016	24.6219	0.0016
<i>Ansc. (Mediana )</i>	26.6093	0.0006	27.4358	0.0005
<i>Ansc. (Média)</i>	20.8192	0.0019	21.2109	0.0019
<i>Ansc. (Gaussiana)</i>	20.8634	0.0019	21.3473	0.0019
<i>Ansc. (Médias Não Locais)</i>	24.9786	0.0014	25.3038	0.0014
<i>Mediana + Ansc. (Mediana)</i>	26.5042	<b>0.0005</b>	27.5619	<b>0.0004</b>
<i>Mediana + Ansc. (Média)</i>	24.7977	0.0008	24.7926	0.0007
<i>Mediana + Ansc. (Gaussiana)</i>	24.9053	0.0008	24.9693	0.0007
<i>Mediana + Ansc. (Médias Não Locais)</i>	<b>28.6974</b>	<b>0.0005</b>	<b>28.6927</b>	<b>0.0004</b>

A Figura 4.20 ilustra os resultados das diferentes estratégias de filtragem aplicados sobre a imagem sintética construída a partir da cultura MEA\_02. As imagens (A-D) representam a aplicação individual dos filtros a mediana, da média, de suavização gaussiana e de médias não locais. As imagens na linha central (E-H) mostram a aplicação dos mesmos filtros no domínio de Anscombe utilizando a transformada de Anscombe e a transformada inversa de Anscombe. Já as imagens (I-L) mostram o resultado da aplicação dos mesmos filtros, no domínio de Anscombe, com pré-filtragem utilizando o filtro da mediana.



**Figura 4.20:** Visualização dos resultados de diferentes estratégias de filtragem do ruído nas imagens. Na linha superior (A-D) são mostrados os resultados da aplicação simples dos métodos de filtragem: (A) Filtragem pela mediana; (B) Filtragem pela média; (C) Suavização Gaussiana; (D) Filtro de médias não locais. Na linha central (E-H) são mostrados os mesmos filtros aplicados no domínio de Anselmi. Na linha inferior (I-L) os métodos de filtragem no domínio de Anselmi são precedidos por pré-filtragem pela mediana.

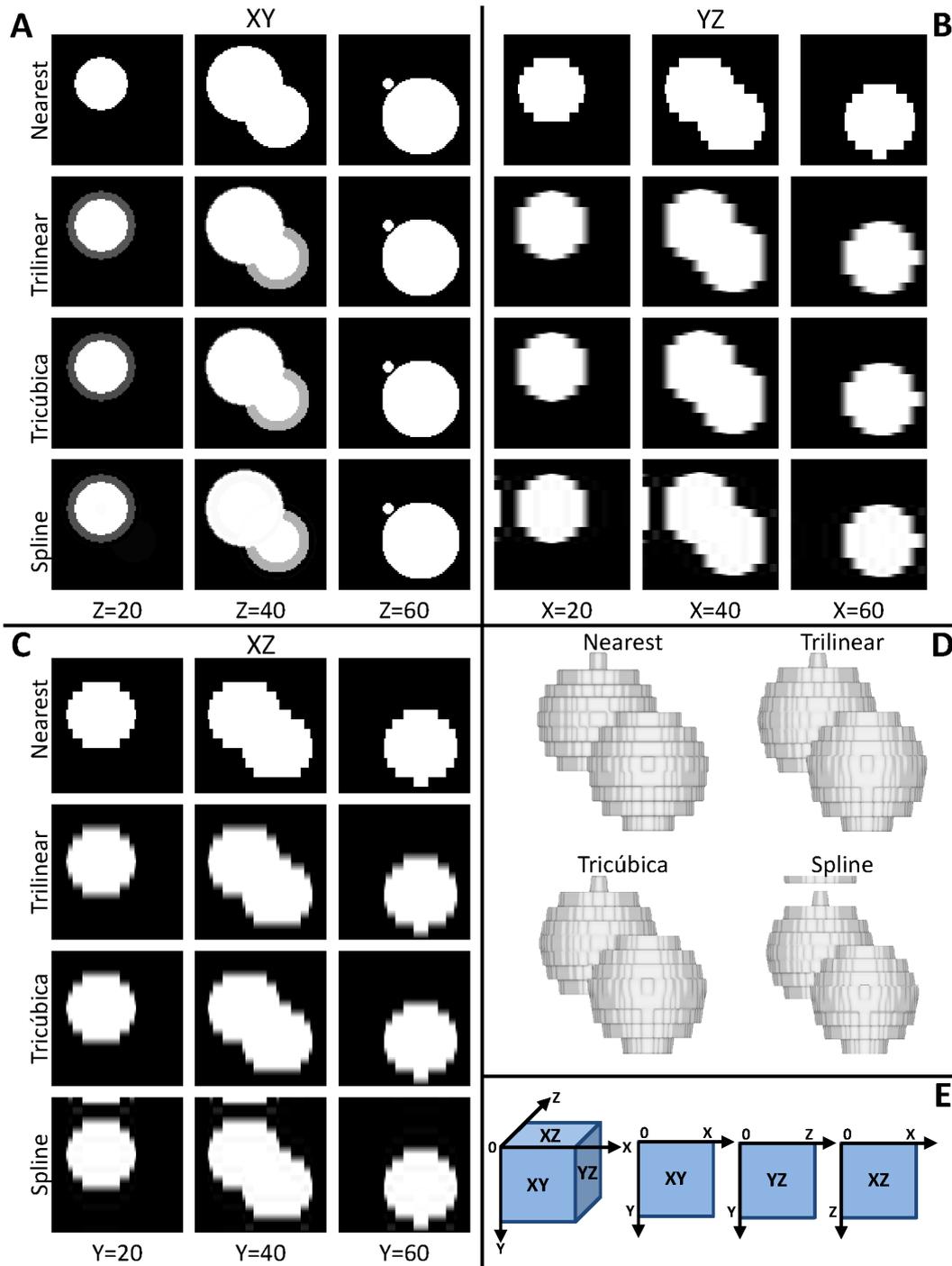
Observa-se a partir dos dados na tabela e das por inspeção visual das imagens que a transformada de Anscombe apresenta melhorias em relação à aplicação dos filtros apenas. É possível ainda observar que o pré-processamento utilizando o filtro da mediana torna estes resultados ainda melhores. Dessa forma, escolheu-se aplicar a pré-filtragem pela mediana seguida da aplicação do filtro de médias não locais no domínio de Anscombe sobre as imagens volumétricas utilizadas nos experimentos. Os resultados da aplicação da filtragem nas imagens reais são mostrados na próxima seção, juntamente com os resultados da reamostragem das imagens volumétricas por meio de interpolação.

### 4.7.2 Interpolação das Imagens

Os experimentos realizados consideram a execução de uma etapa de interpolação, que possui a função de converter o formato dos voxels, que inicialmente apresentam aspecto anisotrópico, para um formato próximo de cubos perfeitos. Outra característica importante do processo de interpolação é reduzir a resolução das imagens e, conseqüentemente, demandar menor poder computacional, possibilitando a geração e o processamento das superfícies poligonais em tempo satisfatório apesar do alto custo computacional dos algoritmos. Testou-se a influencia das etapas de pré-processamento sobre as imagens 3D.

Primeiramente, testaram-se diferentes algoritmos de interpolação em uma imagem 3D gerada artificialmente: (A) baseada em vizinhos mais próximos; (B) interpolação tri-linear, e (C) tri-cúbico. A imagem artificial possui  $81 \times 81 \times 81$  pixels nos eixos X-Y-Z e foi subamostrada ao longo do eixo Z por um fator de  $6 \times$ , ou seja, os voxels são 6 vezes maior ao longo do eixo Z do que ao longo de X-Y. A Figura 4.21 mostra os resultados dos três tipos de interpolação em todas as seis imagens.

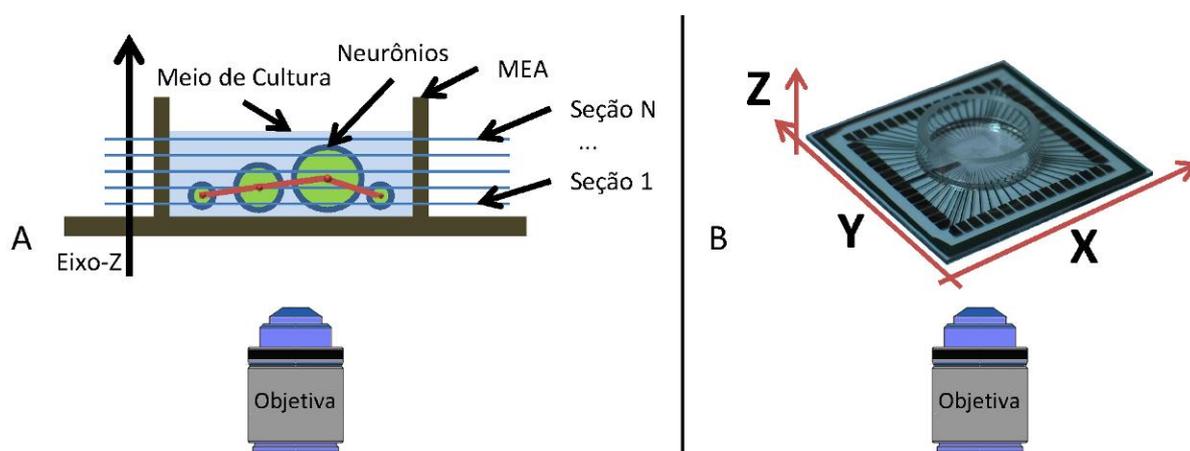
Na sequência, selecionou-se por inspeção visual nas imagens da Figura 4.21, o algoritmo de interpolação tri-cúbica que resultou uma imagem mais suave e nítida. O resultado da interpolação por Spline resultou em alguns artefatos próximos de  $Z=0$ , além de apresentar maior custo computacional. Dessa forma o método de reamostragem pelo algoritmo de interpolação tri-cúbica foi aplicado sobre as imagens volumétricas resultantes da filtragem por médias não locais no domínio de Anscombe, conforme descrito na Seção 4.7.1.



**Figura 4.21:** Teste realizado sobre uma imagem artificial, subamostrada ao longo do eixo Z, com o objetivo de definir o melhor algoritmo de interpolação a ser utilizado pelo método proposto. (A) Visão dos eixos X-Y. (B) Visão dos eixos Y-Z. (C) Visão dos eixos X-Z. (D) Reconstrução das superfícies. (E) Sistema de coordenadas.

O sistema de coordenadas utilizado para representar as imagens volumétricas é mais bem compreendido quando se entende a sua relação com a aquisição das imagens 3D. Conforme descrito na Seção 3.2, utilizou-se um microscópio invertido para obtenção das imagens. Dessa forma, o espécime é posicionado acima das lentes objetivas. A luz de

transmissão é emitida de cima do espécime, atravessando-o e atingindo a lente objetiva, enquanto a luz de fluorescência é emitida a partir da própria lente, e a fluorescência emitida pelo espécime retorna para a lente objetiva. A Figura 4.22 ilustra a relação entre a cultura na MEA e o sistema de coordenadas definido pelo processo de aquisição. (A) Ilustração da visão lateral em que é possível observar a cultura depositada na MEA e a numeração das seções ópticas na imagem volumétrica adquirida. (B) Visão diagonal da MEA em que se observa a relação entre as coordenadas de X, Y e Z.



**Figura 4.22: Relação entre o processo de aquisição das imagens volumétricas pelo microscópio confocal invertido e o sistema de coordenadas das imagens obtidas. (A) Visão lateral do processo de imageamento, em que se observam as coordenadas do eixo-Z. (B) Visão diagonal em que pode se observar as relações entre as coordenadas X, Y e Z.**

A Figura 4.23 ilustra os resultados das etapas de filtragem de ruído e de reamostragem por interpolação tri-cúbica aplicadas sobre a imagem volumétrica obtida da cultura MEA\_02. (A) A imagem volumétrica original. (B) Após a aplicação da filtragem de ruído conforme descrito na Seção 4.7.1. (C) A imagem reamostrada, apresentando os voxel com aspecto cubico ao longo do eixo-Z. É importante observar que a resolução no eixo Z foi aumentada para a correção do efeito anisotrópico dos voxels, ao mesmo tempo em que a resolução nos eixos X-Y foi reduzida para possibilitar o processamento das superfícies poligonais em tempo real na próxima etapa do método. As imagens resultantes do processo de reamostragem por interpolação são submetidas a mais uma etapa de pré-processamento cujos resultados são mostrados na seção seguinte.

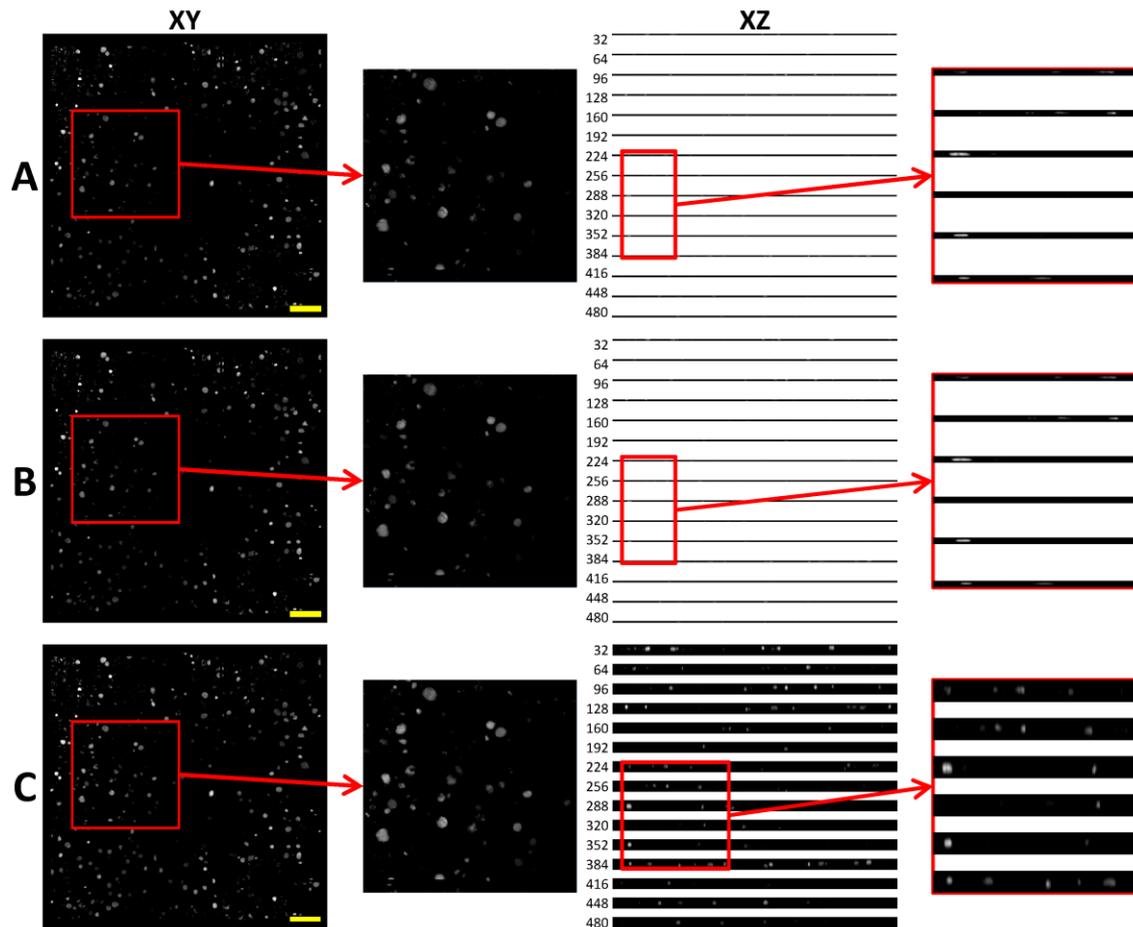


Figura 4.23: Resultado do processo de filtragem do ruído no domínio de Anselm seguido da reamostragem da imagem por interpolação tri-cúbica aplicados sobre a imagem volumétrica da cultura MEA\_02. (A) Imagem volumétrica original. (B) Resultado da filtragem do ruído utilizando o filtro de médias não locais, no domínio de Anselm, com pré-filtragem pelo filtro da mediana. (C) Imagem reamostrada utilizando interpolação tri-cúbica. A imagem foi subamostrada por um fator de 4 nos eixos X e Y, e super-amostrada no eixo-Z para apresentar aspecto isotrópico. A coluna da esquerda mostra a visão dos eixos X-Y da seção óptica central (4 para A e B e 8 para C). A coluna da direita mostra seções transversais (X-Z) em diferentes valores de Y. Os quadros em vermelho mostram detalhes de cada imagem.

### 4.7.3 Pré-processamento das Imagens Volumétricas

A Figura 4.24 mostram as imagens resultantes da sequência de etapas que compõe o pré-processamento das imagens volumétricas após a interpolação para as imagens da cultura MEA\_02. As etapas são descritas em detalhes na Seção 3.6.3, sendo elas: (A) filtragem pela mediana 3D e reconstrução morfológica (em níveis de cinza) para preenchimento de buracos no interior dos objetos; (B) remoção do fundo da imagem por meio da subtração, em cada seção óptica, da imagem resultante da segmentação 2D; (C) Correção da oclusão de neurônios pelos microeletrodos e trilhas; (E) separação de agrupamentos de neurônios subtraindo-se o SKIZ da imagem resultante da segmentação 2D de todas as seções ópticas.

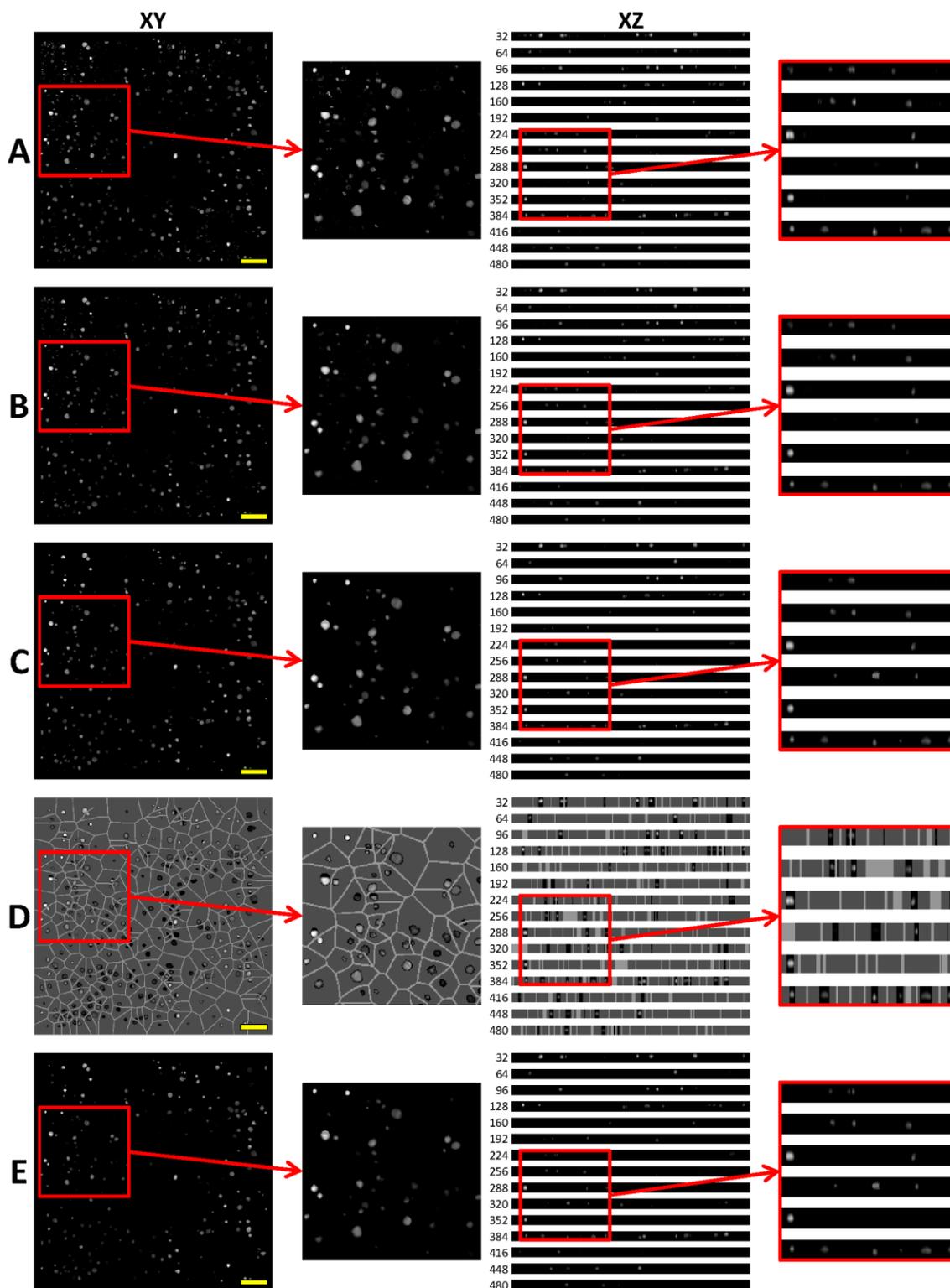


Figura 4.24: Sequencia de operações da etapa de pré-processamento das imagens da cultura MEA\_02. A coluna da esquerda mostra a visão da seção óptica central (8) visto a partir de X-Y. A coluna da direita mostra 15 seções obtidas ao longo do eixo Y a partir de X-Z. (A) Imagem original, resultante do processo de interpolação. (B) resultado da filtragem pela mediana 3D e do preenchimento de buracos. (C) Correção da oclusão dos neurônios pelos microeletrodos e trilhas, seguida pela supressão do fundo. (D) Ilustração do processo de supressão do fundo e separação de agrupamentos de neurônios. As regiões em cinza são o fundo da imagem resultante do método de segmentação 2D e as regiões em branco são o SKIZ. (E) Resultado da subtração do fundo e do SKIZ da imagem segmentada. Esta imagem será submetida à reconstrução das superfícies tridimensionais.

Estas imagens volumétricas são utilizadas como entrada para a etapa seguinte, em que são geradas superfícies poligonais. Na sequência as superfícies são submetidas ao processamento para computação de medidas quantitativas 3D.

#### 4.7.4 Geração das Superfícies Poligonais – Visualização 3D

Sobre as imagens resultantes dos experimentos descritos na seção anterior, aplicou-se o algoritmo *marching cubes*, presente na biblioteca VTK (Versão 5.10.1) com os limiares (iso-valores) definidos por meio do método de Otsu. Utilizaram-se os limiares de Otsu calculados diretamente sobre toda a imagem 3D. Os isovalores computados para cada imagem são 54, 44, 27, 34, 39 e 29 para as imagens das culturas MEA\_01, MEA\_02, MEA\_04, MEA\_05, MEA\_11 e MEA\_13, respectivamente. A faixa de valores considerada para os voxels das imagens é 0-255.

A Figura 4.25 mostra o resultado obtido na etapa de geração das superfícies poligonais para a imagem MEA\_02. Os modelos poligonais das culturas de neurônios são mostrados por diferentes pontos de vista: (A) Visão superior. (B) Visão diagonal a partir da parte inferior da MEA. (C) Visão Diagonal, a partir da borda próxima ao microeletrodos 88.

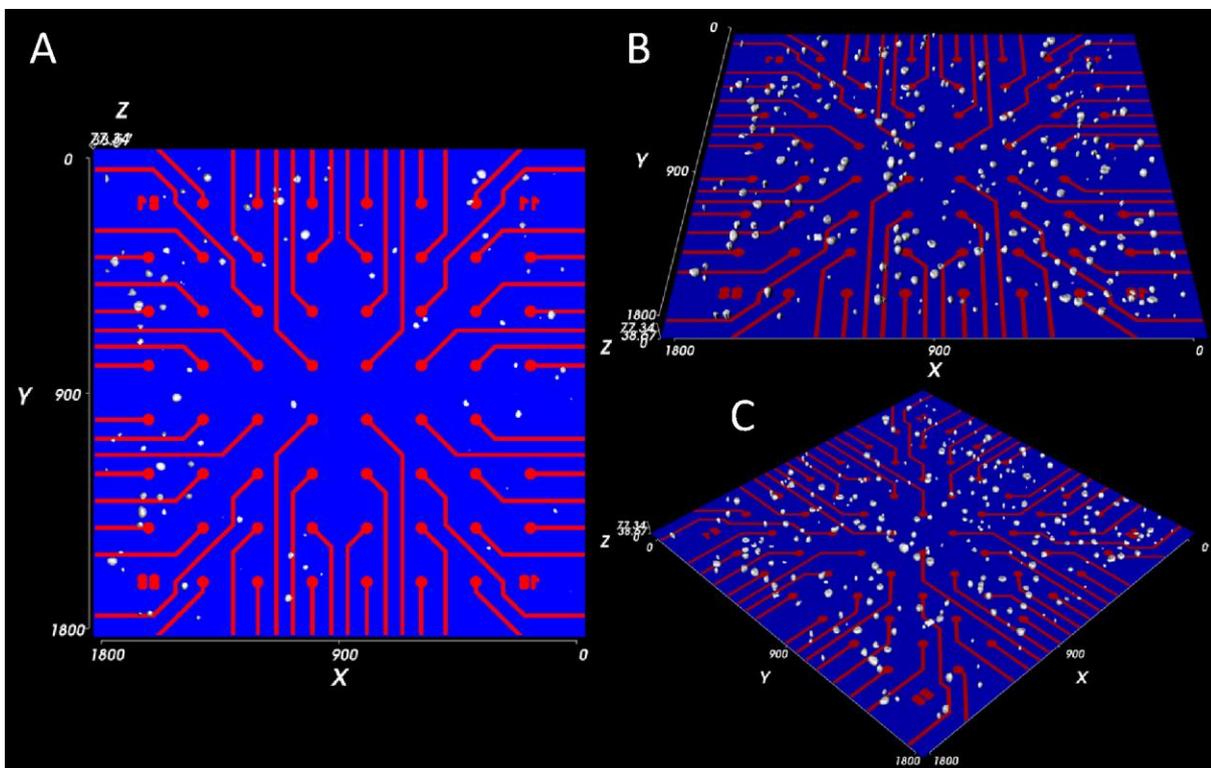
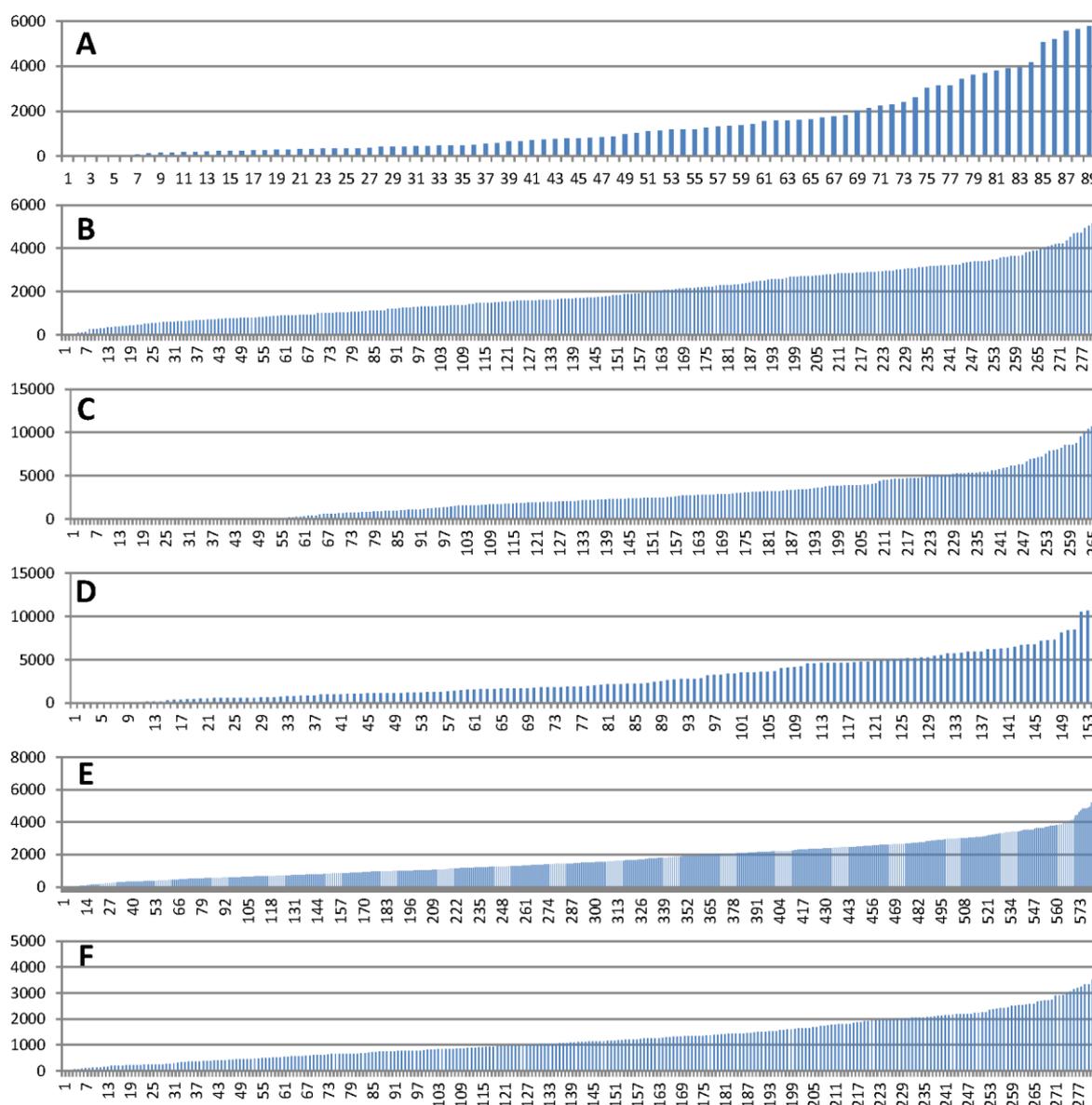


Figura 4.25: Visualização da cultura MEA\_02, após reconstrução das superfícies poligonais. (A) Visão frontal das culturas. (B) Visão das culturas por um ponto de vista diagonal. (C) Visão por um ponto de vista diagonal da cultura com a câmera posicionada próxima ao canto inferior esquerdo da MEA. Isovalor = 46.

## 4.8 Análise Quantitativa 3D

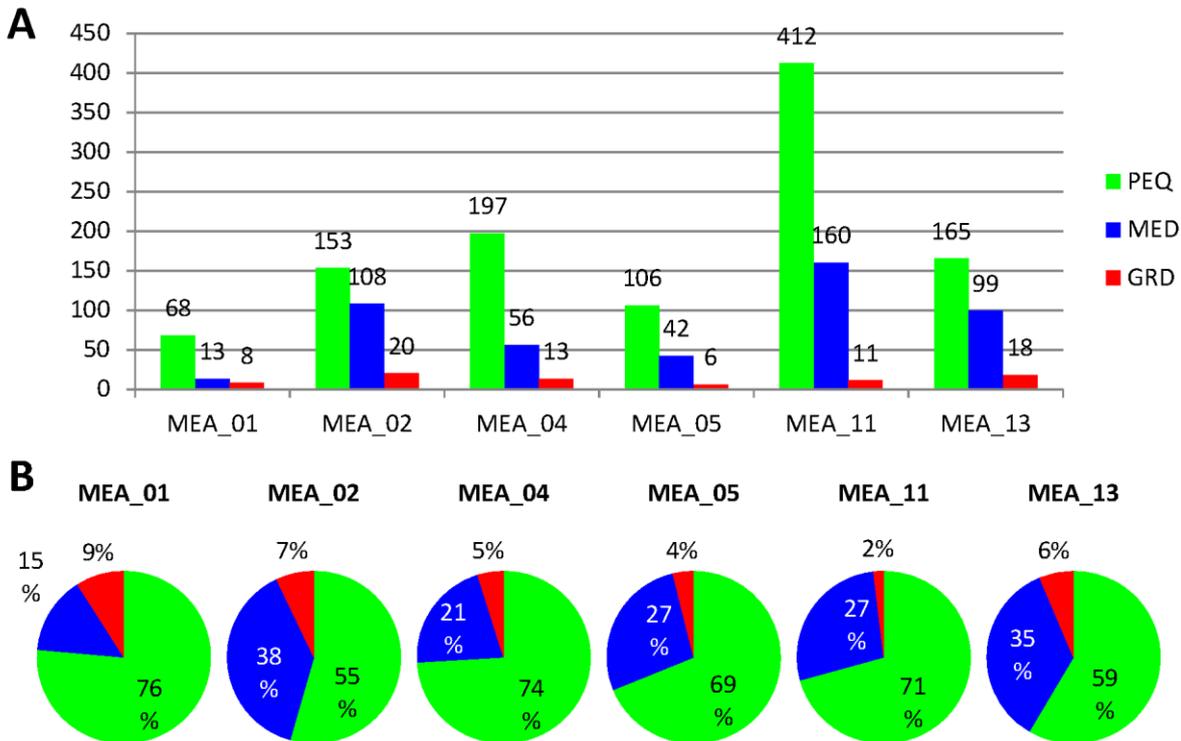
Os gráficos de barra na Figura 4.26 mostram as áreas da superfície dos neurônios (em  $\mu\text{m}^2$ ), classificadas em ordem crescente após a aplicação de todas as etapas do método proposto. O número de células em cada imagem é apresentado na Tabela 4.8.



**Figura 4.26: Neurônios ordenados pela área da superfície. (A) Imagem MEA\_01; (B) Imagem MEA\_02. (C) MEA\_04. (D) MEA\_05. (E) MEA\_11. (F) MEA\_13.**

A Figura 4.27 mostra o histograma da distribuição das células de acordo com a área das superfícies em neurônios pequenos, médios e grandes. Os intervalos foram definidos de

acordo com as medidas das áreas da superfície dos neurônios em cada uma das imagens, por meio da diferença entre o maior e o menor neurônio em três faixas de valores iguais. Por exemplo, para a cultura MEA\_02, a maior célula da imagem possui  $5.643,65 \mu\text{m}^2$ , e o menor  $6,18 \mu\text{m}^2$ , dessa forma, neurônios medindo até  $1.8885,34 \mu\text{m}^2$  foram classificados como pequenas, até  $3.765,5 \mu\text{m}^2$  como médios e os maiores foram considerados grandes.

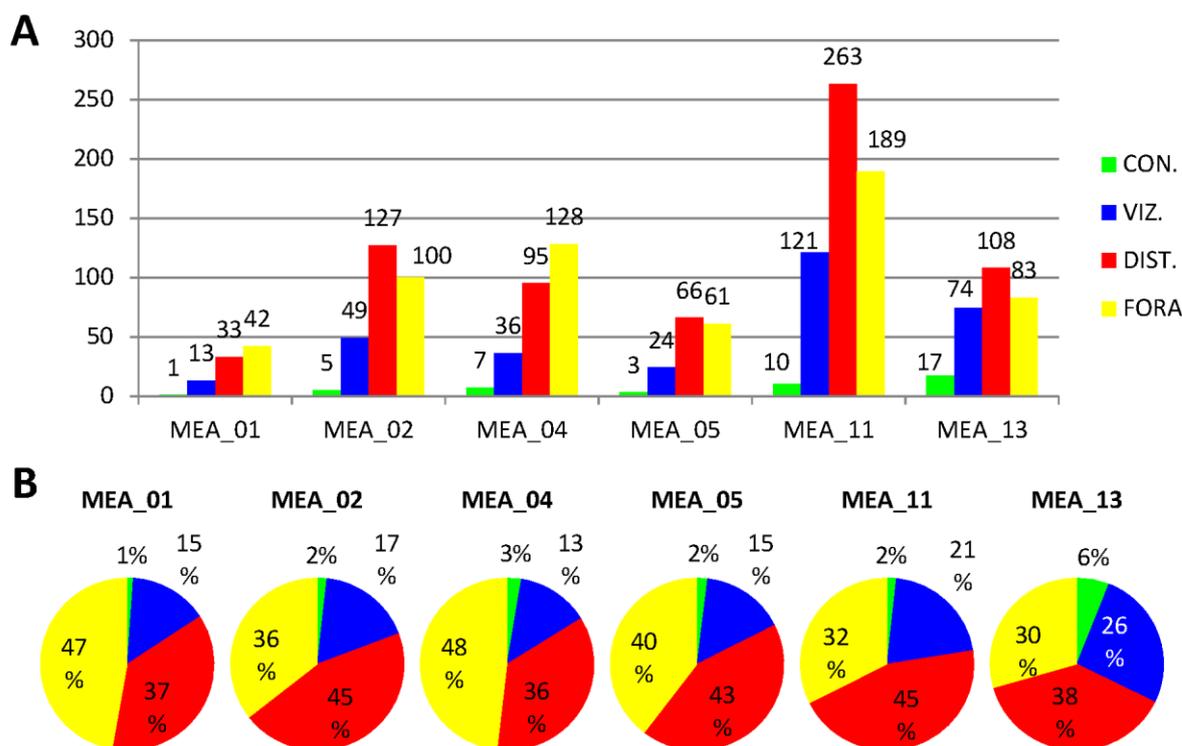


**Figura 4.27:** A distribuição dos neurônios de acordo com a área da superfície dos corpos celulares. (A) Gráficos de barras, considerando o número absoluto de neurônios em cada classe. (B) Gráficos de pizza considerando a porcentagem de neurônios em cada uma das classes. PEQ são neurônios pequenos, MED são médios e GRD são grandes.

A definição de área de superfície apresentada na Tabela 4.5 da Seção 4.6.1 (análise quantitativa 2D) é diferente da área da superfície do neurônio considerada no método 3D apresentado nesta seção. A primeira corresponde à área de uma projeção bidimensional de um neurônio no plano X-Y, enquanto que a segunda corresponde à área da superfície celular do neurônio no espaço 3D, ou seja, é uma variedade 2D em  $\mathbb{R}^3$  e conseqüentemente deve ser muito maior do que as medidas obtidas na primeira definição.

A Figura 4.28 mostra os histogramas de distribuição das distâncias entre neurônios e microeletrodos. Para cada imagem, os neurônios foram classificados de acordo com a distância entre eles e os microeletrodos. Neurônios localizados entre  $0$  e  $30 \mu\text{m}$  ( $\text{DIST}_E(i, j) \leq 30 \mu\text{m}$ ) de distância do centro de algum microeletrodo são classificados como

potencialmente conectados àquele microeletrodo, neurônios localizados até 60 μm ( $30 \mu\text{m} < \text{DIST\_E}(i, j) \leq 60 \mu\text{m}$ ) de distância estão na área de vizinhança do microeletrodo, já os neurônios localizados a até 100 μm ( $60 \mu\text{m} < \text{DIST\_E}(i, j) \leq 100 \mu\text{m}$ ) são considerados distantes, porém ainda na área de gravação do microeletrodo. Esse esquema de classificação é idêntico ao realizado pelo método de processamento 2D, apresentado na Seção 4.6.1, por isso a semelhança entre os resultados obtidos.

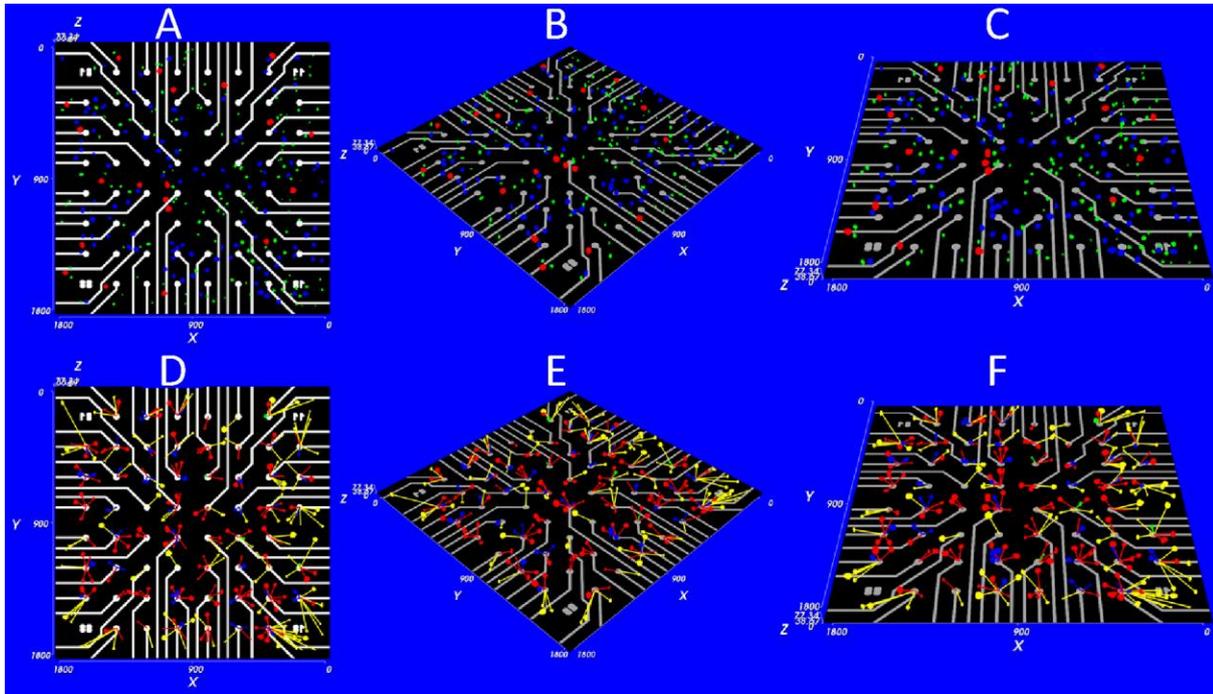


**Figura 4.28:** A distribuição dos neurônios de acordo com a distância em relação aos microeletrodos. (A) Gráficos de barras, considerando o número absoluto de neurônios em cada classe. (B) Gráficos de pizza considerando a porcentagem de neurônios em cada uma das classes.

Os resultados apresentados na Figura 4.28 são extremamente importantes, uma vez que permitem obter informações sobre a interface neurônio-microeletrodo. Neurônios localizados sobre, ou muito próximos, dos microeletrodos possuem uma contribuição maior na composição do sinal gravado, conseqüentemente o sinal desses neurônios próximos aos microeletrodos serão adquiridos com maior qualidade.

A Figura 4.29 mostra a visualização da classificação dos neurônios de acordo com a sua morfologia e distância em relação aos microeletrodos. As cores definem qual classe pertencem os neurônios. Em (A), (B) e (C), para a classificação morfológica os neurônios verdes são pequenos, os azuis são médios e os vermelhos são grandes. Em (D), (E) e (F) para

a classificação topológica os neurônios verdes são conectados, os azuis estão na vizinhança de algum microeletrodo, os vermelhos estão distantes e os amarelos fora das regiões de gravação ( $> 100 \mu\text{m}$ ) de qualquer microeletrodo.



**Figura 4.29:** Visualização das classificações morfológica e topológica dos neurônios para a MEA\_02. Em (A), (B) e (C) são mostradas a classificação morfológica por visualização frontal, diagonal e diagonal a partir da parte inferior da MEA, respectivamente. Em (D), (E) e (F) é mostrada a classificação topológica por visualização frontal, diagonal e diagonal a partir da parte inferior da MEA, respectivamente.

A Tabela 4.8 resume todas as principais medidas quantitativas obtidas com os experimentos 3D. Além do número de neurônios reconstruídos, são apresentadas a médias e o desvio-padrão das áreas de superfície das células (Área), distâncias entre pares de neurônios em 2D ( $D(n,n)$  2D), distâncias entre pares de neurônios em 3D ( $D(n,n)$  3D) e distâncias entre neurônios e microeletrodos em 2D ( $D(n,E)$  2D).

**Tabela 4.8:** A média e o desvio padrão de todas as medidas quantitativas computadas sobre as superfícies poligonais.

MEASURES	MEA_01	MEA_02	MEA_04	MEA_05	MEA_11	MEA_13
Num	89	281	266	154	583	282
Area ( $\mu\text{m}^2$ )	$1379.52 \pm 1462.93$	$1930.80 \pm 1163.70$	$2568.28 \pm 2402.42$	$2818.26 \pm 2436.01$	$1694.76 \pm 1117.54$	$1235.75 \pm 799.03$
$D(n,n)$ 2D ( $\mu\text{m}$ )	$889.30 \pm 469.00$	$883.80 \pm 422.72$	$840.24 \pm 443.27$	$837.73 \pm 447.14$	$857.82 \pm 416.15$	$846.68 \pm 409.83$
$D(n,n)$ 3D ( $\mu\text{m}$ )	$889.53 \pm 469.00$	$883.90 \pm 422.67$	$840.30 \pm 443.22$	$837.83 \pm 447.11$	$857.86 \pm 416.13$	$846.70 \pm 409.83$
$D(n,E)$ 2D ( $\mu\text{m}$ )	$878.03 \pm 404.48$	$826.20 \pm 393.16$	$848.75 \pm 394.46$	$823.96 \pm 394.30$	$815.42 \pm 389.00$	$802.94 \pm 385.15$

## **4.9 Considerações Finais**

Neste capítulo foram apresentados os resultados obtidos com as experimentações. Apresentou também uma discussão sobre os resultados obtidos em cada um dos experimentos descritos. No Apêndice B são mostradas as GUIs dos métodos utilizados para gerar os resultados apresentados neste capítulo. A seguir apresentam-se as conclusões referentes ao presente trabalho.



# Capítulo 5

## CONCLUSÕES

---

---

Esta tese descreve a proposta e o desenvolvimento de métodos para auxiliar e complementar estudos relacionados a culturas de neurônios plaqueadas em MEAs. Os métodos propostos têm como objetivo obter medidas quantitativas das culturas de neurônios DRG em MEAs a partir de imagens adquiridas por microscopia confocal de fluorescência. Os seguintes métodos foram desenvolvidos e testados para atingir este propósito: (A) Identificação de microeletrodos; (B) Registro de imagens para obter uma representação única em alta resolução da cultura depositada sobre a área de gravação da MEA; (C) Segmentação dos neurônios em imagens 2D; (D) Análise quantitativa 2D a partir das neurônios segmentados e dos microeletrodos identificados; (E) Reconstrução de modelos poligonais 3D dos neurônios a partir de imagens volumétricas e visualização interativa desses modelos; e (F) Análise quantitativa 3D por meio do processamento dos modelos poligonais e dos microeletrodos.

O método de identificação de microeletrodos se mostrou bastante eficiente, devido principalmente ao método desenvolvido para correção automática de erros utilizando a triangulação de Delaunay. O método de registro das imagens permitiu gerar uma imagem em alta resolução da cultura toda e, dessa forma, obter resultados quantitativos abrangentes para o experimento em questão. O método para identificação de neurônios se mostrou robusto e eficiente, apresentando alta taxa de acertos (até 84%). Nesse método, destacam-se: a etapa de correção de oclusão dos neurônios pelos microeletrodos, pois não é um problema comum em outras aplicações em imagens de microscopia e a etapa de classificação combinando algoritmos supervisionados e não supervisionados no sentido de aumentar a automação do método sem prejudicar as taxas de acerto. A etapa de reconstrução de superfícies 3D possibilitou visualizar a cultura por diferentes pontos de vista e níveis de *zoom*.

As análises quantitativas permitem obter medidas relacionadas à morfologia dos neurônios, distribuição espacial e topologia dos neurônios e microeletrodos. Essas medidas são importantes, pois permitem realizar análises integradas dos sinais eletrofisiológicos com o posicionamento dos neurônios obtidos a partir das imagens de microscopia. Os estudos eletrofisiológicos podem ser expandidos para além das capacidades fisiológicas das culturas ao considerar as informações quantitativas obtidas por meio dos métodos propostos. Pode-se, por exemplo, estender os experimentos por meio de simulações computacionais que utilizam como entrada as informações sobre o posicionamento e topologia dos neurônios e relação aos microeletrodos, explorando um grande número de configurações que seriam impossíveis em culturas de neurônios reais.

A área dos neurônios em contato com os microeletrodos é uma condição importante para a aquisição de sinais com qualidade em MEA. As distâncias entre os neurônios e microeletrodos provêm uma forma simples e efetiva de descrever a relação entre neurônios e microeletrodos, além de outros aspectos como a migração de neurônios. A topologia dos neurônios e dos microeletrodos, computados por meio do diagrama de Voronoi e descritos utilizando o conceito de 1-anel, estão relacionados com a densidade local de neurônios ao redor de cada microeletrodo. As informações sobre a densidade local de neurônios associadas ao 1-anel fornecem informações importantes em estudos conjuntos com atividade elétrica como, por exemplo, estudos relacionados com algoritmos de detecção e classificação de *spikes* e simulação computacional de neurônios. Finalmente a análise quantitativa 3D, principalmente considerando a morfologia dos neurônios (área da superfície) expandem informações obtidas com a análise 2D.

## 5.1 Trabalhos Futuros

Como o objetivo deste trabalho é possibilitar a efetiva utilização das imagens de microscopia nos estudos de culturas de neurônios em MEAs, espera-se que os métodos mostrados nesta tese abram caminhos para um grande número de novas pesquisas. Dentre elas pode-se citar:

(A) Aumentar o número de medidas quantitativas obtidas a partir das imagens.

(B) Atualmente, cada um dos métodos desenvolvidos nesta tese possuem GUIs individuais. Pretende-se reuni-los em um aplicativo único e com GUI integrada para, dessa

forma, permitir que pesquisadores das áreas de biologia e neurociências possam utiliza-lo sem que sejam necessários conhecimentos mais elaborados sobre processamento de imagens e computação.

(C) Utilizar os resultados das análises quantitativas obtidas a partir das imagens em estudos relacionados com a atividade elétrica capturada pela MEA.

(D) Utilizar os resultados da análise quantitativa, principalmente relacionados com o posicionamento e topologia das redes neuronais e dos microeletrodos, em simulações computacionais, com o objetivo de prolongar e expandir estudos com culturas reais em MEA.

(E) Desenvolver ou melhorar métodos de detecção e classificação de *spikes* suportado pelas informações sobre a distribuição espacial e topológica das redes neuronais obtidas a partir das imagens.

(F) Métodos que estudam o desenvolvimento, crescimento e migração de neurônios ao longo do tempo também podem ser melhorados com a aplicação dos métodos descritos.

(G) Como os neurônios considerados nesta tese foram DRG, estender a aplicação dos métodos para outros tipos de neurônios, como neurônios corticais e hipocampais, que apresentam atividade eletrofisiológica espontânea, sem estimulação, o que não acontece com os neurônios DRG.



# REFERÊNCIAS

---

---

- ABDUL-RAHMAN, ALIAS; PILOUK, M. **Spatial Data Modelling for 3D GIS**. Springer, 2008.
- ABRÀMOFF, M. D. Image processing with ImageJ. **Biophotonics international**, v. 11, n. 7, p. 36–42, 2004.
- ABRÀMOFF, M. D.; VIERGEVER, M. A. Computation and visualization of three-dimensional soft tissue motion in the orbit. **IEEE Transactions on Medical Imaging**, v. 21, n. 4, p. 296–304, 2002.
- ADIGA, P. S. U.; CHAUDHURI, B. B. An efficient method based on watershed and rule-based merging for segmentation of 3-D histo-pathological images. **Pattern Recognition**, v. 34, n. 7, p. 1449–1458, 2001. Elsevier.
- AERTSEN, A. M. H. J.; GERSTEIN, G. L. Evaluation of neuronal connectivity: Sensitivity of cross-correlation. **Brain Research**, v. 340, n. 2, p. 341–354, 1985.
- AL-KOFAHI, O.; CAN, A.; LASEK, S.; *et al.* Algorithms for accurate 3D registration of neuronal images acquired by confocal scanning laser microscopy. **Journal of Microscopy**, v. 211, n. 1, p. 8–18, 2003.
- AL-KOFAHI, Y.; LASSOUED, W.; LEE, W.; ROYSAM, B. Improved automatic detection and segmentation of cell nuclei in histopathology images. **IEEE transactions on bio-medical engineering**, v. 57, n. 4, p. 841–52, 2010.
- ANSCOMBE, F. J. The Transformation of Poisson, Binomial and Negative-Binomial Data. **Biometrika**, v. 35, n. 3/4, p. 246–254, 1948.
- AOYAGI, Y.; STEIN, R. B.; BRANNER, A.; PEARSON, K. G.; NORMANN, R. A. Capabilities of a penetrating microelectrode array for recording single units in dorsal root ganglia of the cat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 128, n. 1-2, p. 9–20, 2003.
- AURENHAMMER, F. Voronoi diagrams---a survey of a fundamental geometric data structure. **ACM Computing Surveys**, v. 23, n. 3, p. 345–405, 1991.
- BAGGETT, D.; NAKAYA, M.; MCAULIFFE, M.; YAMAGUCHI, T. P.; LOCKETT, S. Whole cell segmentation in solid tissue sections. **Cytometry Part A**, v. 67A, n. 2, p. 137–143, 2005.
- BAKKUM, D. J.; GAMBLIN, P. M.; BEN-ARY, G.; CHAO, Z. C.; POTTER, S. M. MEART: The semi-living artist. , v. 1, n. November, p. 2–11, 2007.
- BELAID, L. J.; MOUROU, W. Image Segmentation: A Watershed Transformation Algorithm. **Image Analysis & Stereology**, v. 28, n. 2, p. 93–102, 2009.

- BERDONDINI, L.; MASSOBRIO, P.; CHIAPPALONE, M.; *et al.* Extracellular recordings from locally dense microelectrode arrays coupled to dissociated cortical cultures. **Journal of neuroscience methods**, v. 177, n. 2, p. 386–96, 2009.
- BERGER, T. W.; HAMPSON, R. E.; SONG, D.; *et al.* A cortical neural prosthesis for restoring and enhancing memory. **Journal of neural engineering**, v. 8, n. 4, p. 046017, 2011.
- BEUCHER, S.; MEYER, F. The morphological approach of segmentation: the watershed transformation. In: E. R. Dougherty (Ed.); **Mathematical Morphology in Image Processing**. p.433–481, 1992. New York: CRC Press.
- BEZDEK, J. C. **Pattern Recognition with Fuzzy Objective Function Algorithms**. Norwell, MA, USA: Kluwer Academic Publishers, 1981.
- BIGGS, D. S. C. Clearing up deconvolution. **Biophotonics International**, v. 11, n. 2, p. 32–37, 2004.
- BJORNSSON, C. S.; LIN, G.; AL-KOFAHI, Y.; *et al.* Associative image analysis: a method for automated quantification of 3D multi-parameter images of brain tissue. **Journal of neuroscience methods**, v. 170, n. 1, p. 165–78, 2008.
- BOIDO, D.; FARISELLO, P.; CESCO, F.; *et al.* Cortico-hippocampal hyperexcitability in synapsin I/II/III knockout mice: age-dependency and response to the antiepileptic drug levetiracetam. **Neuroscience**, v. 171, n. 1, p. 268–83, 2010. Elsevier Inc.
- BOISSONNAT, J.-D. Shape reconstruction from planar cross sections. **Computer Vision, Graphics, and Image Processing**, v. 44, n. 1, p. 1–29, 1988.
- BONGARD, M.; MICOL, D.; FERNÁNDEZ, E. NEV2lkit: a new open source tool for handling neuronal event files from multi-electrode recordings. **International journal of neural systems**, v. 24, n. 4, p. 1450009, 2014.
- BORGEFORS, G. Distance transformations in arbitrary dimensions. **Computer Vision, Graphics, and Image Processing**, v. 27, n. 3, p. 321–345, 1984.
- BORGEFORS, G. Distance transformations in digital images. **Computer Vision, Graphics, and Image Processing**, v. 34, n. 3, p. 344–371, 1986.
- BOSER, B. E.; GUYON, I. M.; VAPNIK, V. N. A training algorithm for optimal margin classifiers. Proceedings of the fifth annual workshop on Computational learning theory - COLT '92. **Anais...** p.144–152, 1992. New York, New York, USA: ACM Press.
- BREIT, S.; SCHULZ, J. B.; BENABID, A.-L. Deep brain stimulation. **Cell and tissue research**, v. 318, n. 1, p. 275–88, 2004.
- BUADES, A.; COLL, B.; MOREL, J.-M. A non-local algorithm for image denoising. **2005 IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR'05)**, v. 2, n. 0, p. 60–65, 2005. IEEE.

BUITENWEG, J. R.; RUTTEN, W. L. C.; MARANI, E. Modeled channel distributions explain extracellular recordings from cultured neurons sealed to microelectrodes. **IEEE transactions on bio-medical engineering**, v. 49, n. 12 Pt 2, p. 1580–90, 2002.

BUITENWEG, J. R.; RUTTEN, W. L. C.; MARANI, E. Geometry-based finite-element modeling of the electrical contact between a cultured neuron and a microelectrode. **IEEE transactions on bio-medical engineering**, v. 50, n. 4, p. 501–9, 2003.

BURGES, C. J. C. A Tutorial on Support Vector Machines for Pattern Recognition. (U. Fayyad, Ed.) **Data Mining and Knowledge Discovery**, NetGames '06., v. 2, n. 2, p. 121–167, 1998. Springer.

CAJAL, S. R. Y. **Manual de histología normal y técnica micrográfica**. P. Aguilar, 1889.

CASTRO, F. S.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Notas históricas acerca do debate mente e cérebro. **Com Ciência - Revista Eletrônica de Jornalismo Científico**, 2012.

COLLINS, T. J. ImageJ for microscopy. **BioTechniques**, 2007.

COSMOS. Computational Optical Sectioning Microscopy Open Source (COSMOS) Software package. , 2015. Computational Imaging Research Laboratory - The University of Memphis. Disponível em: <<http://cirl.memphis.edu/cosmos>>.

CHEN, S.; ZHAO, M.; WU, G.; YAO, C.; ZHANG, J. Recent advances in morphological cell image analysis. **Computational and mathematical methods in medicine**, v. 2012, p. 101536, 2012.

CHENG, J.; RAJAPAKSE, J. C. Segmentation of clustered nuclei with shape markers and marking function. **IEEE transactions on bio-medical engineering**, v. 56, n. 3, p. 741–8, 2009.

CHIAPPALONE, M.; BOVE, M.; VATO, A.; TEDESCO, M.; MARTINOIA, S. Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during in vitro development. **Brain research**, v. 1093, n. 1, p. 41–53, 2006.

CHIAPPALONE, M.; VATO, A.; TEDESCO, M. (B. .; *et al.* Networks of neurons coupled to microelectrode arrays: a neuronal sensory system for pharmacological applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, n. 5-6, p. 627–634, 2003.

COLICOS, M. A.; SYED, N. I. Neuronal networks and synaptic plasticity: understanding complex system dynamics by interfacing neurons with silicon technologies. **The Journal of experimental biology**, v. 209, n. Pt 12, p. 2312–9, 2006.

CONCHELLO, J.; LICHTMAN, J. W. Optical sectioning microscopy. **Nature methods**, v. 2, n. 12, p. 920–31, 2005.

CORTES, C.; VAPNIK, V. Support-vector networks. **Machine Learning**, v. 20, n. 3, p. 273–297, 1995.

COSTA, L. DA F.; CESAR-JR., R. M. **Shape analysis and classification: teory and practice**. CRC Press, 2000.

COUPÉ, P.; MUNZ, M.; MANJÓN, J. V; RUTHAZER, E. S.; COLLINS, D. L. A CANDLE for a deeper in vivo insight. **Medical image analysis**, v. 16, n. 4, p. 849–64, 2012.

CUNHA, T. M.; ROMAN-CAMPOS, D.; LOTUFO, C. M.; *et al.* Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3Kgamma/AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 9, p. 4442–7, 2010.

DEVOR, M. Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. **Pain**, v. Suppl 6, p. S27–35, 1999.

DICKINSON, M. E.; DAVIDSON, M. W. Introduction to Spectral Imaging and Linear Unmixing.

DUBLIN, P.; HANANI, M. Satellite glial cells in sensory ganglia: their possible contribution to inflammatory pain. **Brain, behavior, and immunity**, v. 21, n. 5, p. 592–8, 2007.

DUDA, R. O.; HART, P. E.; STORK, D. G. **Pattern Classification**. 2nd ed. Wiley-Interscience, 2000.

EDELSBRUNNER, H.; SEIDEL, R. Voronoi diagrams and arrangements. **Discrete & Computational Geometry**, v. 1, n. 1, p. 25–44, 1986.

EDLUND, P. K. **Methods and models for 2D and 3D image analysis in microscopy , in particular for the study of muscle cells**, 2008. Uppsala University.

EGERT, U.; HÄMMERLE, H. Application of the microelectrode-array (MEA) technology in pharmaceutical drug research. (J. P. Baselt & G. Gerlach, Eds.) **Sensoren im Fokus neuer Anwendungen**. w.e.b. Universitätsverlag, p. 51–54, 2002. Dresden.

EICHLER, M.; DAHLHAUS, R.; SANDKÜHLER, J. Partial correlation analysis for the identification of synaptic connections. **Biological cybernetics**, v. 89, n. 4, p. 289–302, 2003.

EILS, R.; ATHALE, C. Computational imaging in cell biology. , p. 477–481, 2003.

EILS, R.; DIETZEL, S.; BERTIN, E.; *et al.* Three-dimensional reconstruction of painted human interphase chromosomes: active and inactive X chromosome territories have similar volumes but differ in shape and surface structure. **The Journal of cell biology**, v. 135, n. 6 Pt 1, p. 1427–40, 1996.

EYTAN, D.; MAROM, S. Dynamics and effective topology underlying synchronization in networks of cortical neurons. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 33, p. 8465–76, 2006.

FABBRI, R.; COSTA, L. D. F.; TORELLI, J. C.; BRUNO, O. M. 2D Euclidean distance transform algorithms. **ACM Computing Surveys**, v. 40, n. 1, p. 1–44, 2008.

- FEBER, J. LE; RUTTEN, W. L. C.; STEGENGA, J.; *et al.* Conditional firing probabilities in cultured neuronal networks: a stable underlying structure in widely varying spontaneous activity patterns. **Journal of neural engineering**, v. 4, n. 2, p. 54–67, 2007.
- FEJTL, M.; STETT, A.; NISCH, W.; BOVEN, K.; MÖLLER, A. On micro-electrode array revival: its development, sophistication of recording, and stimulation. **Advances in Network Electrophysiology Using Multi-Electrode Arrays**. p.24–38, 2006.
- FENG, D.; MARSHBURN, D.; JEN, D.; *et al.* Stepping into the third dimension. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 47, p. 12757–12760, 2007.
- FORSTER, B.; VILLE, D. VAN DE; BERENT, J.; SAGE, D.; UNSER, M. Complex wavelets for extended depth-of-field: a new method for the fusion of multichannel microscopy images. **Microscopy research and technique**, v. 65, n. 1-2, p. 33–42, 2004.
- FROMHERZ, P. Neuroelectronic interfacing: semiconductor chips with ion channels, nerve cells, and brain. **Nanoelectronics and information technology**, p. 781–810, 2003.
- GETREUER, P. Linear Methods for Image Interpolation. **Image Processing On Line**, v. 1, n. 7, p. 1069–1080, 2011.
- GIUGLIANO, M.; MARTINOIA, S. Substrate Arrays of Microelectrodes for in vitro Electrophysiology. In: M. Akay (Ed.); **Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering**, 2006. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. **Digital Image Processing**. 3rd ed. Prentice Hall, 2007.
- GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E.; EDDINS, S. L. **Digital Image Processing Using MATLAB**. 2nd ed. Gatesmark Publishing, 2009.
- GRAY, H.; LEWIS, W. H. **Anatomy of the Human Body**. 20th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1918.
- GREVE, F.; FRERKER, S.; BITTERMANN, A. G.; *et al.* Molecular design and characterization of the neuron-microelectrode array interface. **Biomaterials**, v. 28, n. 35, p. 5246–58, 2007.
- GREVERA, G. J.; UDUPA, J. K. Shape-based interpolation of multidimensional grey-level images. **IEEE transactions on medical imaging**, v. 15, n. 6, p. 881–92, 1996. IEEE.
- GROSS, G. The use of neuronal networks on multielectrode arrays as biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 10, n. 6-7, p. 553–567, 1995.
- GROSS, G. W.; RIESKE, E.; KREUTZBERG, G. W.; MEYER, A. A new fixed-array multi-microelectrode system designed for long-term monitoring of extracellular single unit neuronal activity in vitro. **Neuroscience Letters**, v. 6, n. 2-3, p. 101–105, 1977.

- GUAN, Y. Q.; CAI, Y. Y.; ZHANG, X.; LEE, Y. T.; OPAS, M. Adaptive correction technique for 3D reconstruction of fluorescence microscopy images. **Microscopy research and technique**, v. 71, n. 2, p. 146–57, 2008.
- GUEZIEC, A.; HUMMEL, R. Exploiting triangulated surface extraction using tetrahedral decomposition. **IEEE Transactions on Visualization and Computer Graphics**, v. 1, n. 4, p. 328–342, 1995.
- HALES, C. M.; ROLSTON, J. D.; POTTER, S. M. How to culture, record and stimulate neuronal networks on micro-electrode arrays (MEAs). **Journal of visualized experiments : JoVE**, , n. 39, p. 1–7, 2010.
- HAMILL, O.; MARTY, A.; NEHER, E.; SAKMANN, B.; SIGWORTH, F. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. **Pflügers Archiv**, p. 6768, 1981.
- HANANI, M. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. **Brain research. Brain research reviews**, v. 48, n. 3, p. 457–76, 2005.
- HARPER, A.; LAWSON, S. Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones. **The Journal of physiology**, p. 31–46, 1985.
- HODNELAND, E.; BUKORESHTLIEV, N. V; EICHLER, T. W.; *et al.* A unified framework for automated 3-d segmentation of surface-stained living cells and a comprehensive segmentation evaluation. **IEEE transactions on medical imaging**, v. 28, n. 5, p. 720–38, 2009.
- HOPPE, H.; DEROSE, T.; DUCHAMP, T.; MCDONALD, J.; STUETZLE, W. Mesh optimization. Proceedings of the 20th annual conference on Computer graphics and interactive techniques - SIGGRAPH '93. **Anais...** . p.19–26, 1993. New York, New York, USA: ACM Press.
- HUANG, Y.; SUN, X.; HU, G. An automatic integrated approach for stained neuron detection in studying neuron migration. **Microscopy research and technique**, v. 73, n. 2, p. 109–18, 2010.
- IDE, A.; CHIAPPALONE, M.; BERDONDINI, L.; SANGUINETI, V.; MARTINOIA, S. Cross-correlation based methods for estimating the functional connectivity in cortical networks. **BMC Neuroscience**, v. 89, n. 4, p. 4–5, 2007.
- ILLINGWORTH, J.; KITTLER, J. The Adaptive Hough Transform. **IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence**, v. PAMI-9, n. 5, p. 690–698, 1987.
- INDHUMATHI, C.; CAI, Y. Y.; GUAN, Y. Q.; OPAS, M. 3D boundary extraction of confocal cellular images using higher order statistics. **Journal of microscopy**, v. 235, n. 2, p. 209–20, 2009.
- INDHUMATHI, C.; CAI, Y. Y.; GUAN, Y. Q.; OPAS, M.; ZHENG, J. Adaptive-weighted cubic B-spline using lookup tables for fast and efficient axial resampling of 3D confocal microscopy images. **Microscopy research and technique**, v. 75, n. 1, p. 20–7, 2012.

- JAIN, A. K.; MURTY, M. N.; FLYNN, P. J. Data clustering: a review. **ACM Computing Surveys**, CSUR., v. 31, n. 3, p. 264–323, 1999. ACM.
- JONES, M. W.; BAERENTZEN, J. A.; SRAMEK, M. 3D distance fields: a survey of techniques and applications. **IEEE transactions on visualization and computer graphics**, v. 12, n. 4, p. 581–99, 2006.
- JUNG, C.; KIM, C. Segmenting clustered nuclei using H-minima transform-based marker extraction and contour parameterization. **IEEE transactions on bio-medical engineering**, v. 57, n. 10, p. 2600–4, 2010.
- KIM, S.; JUNG, U.; BAEK, J.; KANG, S.; KIM, J. Simultaneous measurement of neural spike recordings and multi-photon calcium imaging in neuroblastoma cells. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 11, p. 15281–91, 2012. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- KO, S.; GUNASEKARAN, S. Error correction of confocal microscopy images for in situ food microstructure evaluation. **Journal of Food Engineering**, v. 79, n. 3, p. 935–944, 2007.
- KROON, D.-J. Fast Non-Local Means 1D, 2D Color and 3D. , 2010. MATLAB Central File Exchange. Disponível em: <<http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/27395-fast-non-local-means-1d--2d-color-and-3d>>. .
- LAUREYS, S.; BOLY, M.; TONONI, G. Functional neuroimaging. In: S. Laureys; G. Tononi (Eds.); **THE NEUROLOGY OF CONSCIOUSNESS: Cognitive Neuroscience and Neuropathology**. p. Steven Laureys, Giulio Tononi, 2009. New York: Elsevier.
- LEBEDEV, M. A; NICOLELIS, M. A L. Brain-machine interfaces: past, present and future. **Trends in neurosciences**, v. 29, n. 9, p. 536–46, 2006.
- LENT, R. **Cem Bilhões de Neurônios? Conceitos Fundamentais de Neurociência**. 2ed: ed. Editora Atheneu, 2001.
- LILJEBORG, A.; CZADER, M.; PORWIT, A. A method to compensate for light attenuation with depth in three-dimensional DNA image cytometry using a confocal scanning laser microscope. **Journal of Microscopy**, v. 177, n. 2, p. 108–114, 1995.
- LIN, G.; ADIGA, U.; OLSON, K.; *et al.* A hybrid 3D watershed algorithm incorporating gradient cues and object models for automatic segmentation of nuclei in confocal image stacks. **Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 56, n. 1, p. 23–36, 2003.
- LINHART, O.; OBREJA, O.; KRESS, M. The inflammatory mediators serotonin, prostaglandin e2 and bradykinin evoke calcium influx in rat sensory neurons. **Neuroscience**, v. 118, n. 1, p. 69–74, 2003.
- LITT, B.; D’ALESSANDRO, A.; ESTELLER, R.; ECHAUZ, J.; VACHTSEVANOS, G. Translating seizure detection, prediction and brain stimulation into implantable devices for epilepsy. First International IEEE EMBS Conference on Neural Engineering, 2003. Conference Proceedings. **Anais...** . p.485–488, 2003. IEEE.

LORENSEN, W. E.; CLINE, H. E. Marching cubes: A high resolution 3D surface construction algorithm. **ACM SIGGRAPH Computer Graphics**, v. 21, n. 4, p. 163–169, 1987.

LOTUFO, R. A.; AUDIGIER, R.; SAÚDE, A. V.; MACHADO, R. C. Morphological Image Processing. In: Q. Wu; F. A. Merchant; K. R. Castleman (Eds.); **Microscope Image Processing**. p.113–157, 2008. Burlington: Academic Press.

LOTUFO, R. DE A.; FALCÃO, A. X.; ZAMPIROLI, F. A. Fast Euclidean Distance Transform using a Graph-Search Algorithm. Proceedings of the 13th Brazilian Symposium on Computer Graphics and Image Processing. **Anais...** . p.269–275, 2000.

MAHER, M. P.; PINE, J.; WRIGHT, J.; TAI, Y. C. The neurochip: a new multielectrode device for stimulating and recording from cultured neurons. **Journal of neuroscience methods**, v. 87, n. 1, p. 45–56, 1999.

MALPICA, N.; SOLÓRZANO, C. O. DE; VAQUERO, J. J.; *et al.* Applying watershed algorithms to the segmentation of clustered nuclei. **Cytometry**, v. 28, n. 4, p. 289–97, 1997.

MARCUZZO, M.; QUELHAS, P.; CAMPILHO, A.; MENDONÇA, A. M.; CAMPILHO, A. Automatic cell segmentation from confocal microscopy images of the Arabidopsis root. 2008 5th IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro. **Anais...** . p.712–715, 2008. IEEE.

MARGADANT, F.; LEEMANN, T.; NIEDERER, P. A precise light attenuation correction for confocal scanning microscopy with  $O(n^4/3)$  computing time and  $O(n)$  memory requirements for  $n$  voxels. **Journal of Microscopy**, v. 182, n. 2, p. 121–132, 1996.

MAROM, S.; SHAHAF, G. Development, learning and memory in large random networks of cortical neurons: lessons beyond anatomy. **Quarterly reviews of biophysics**, v. 35, n. 1, p. 63–87, 2002.

MARTÍNEZ-GUTIÉRREZ, M.; CASTELLANOS, J. E. Morphological and biochemical characterisation of sensory neurons infected in vitro with rabies virus. **Acta neuropathologica**, v. 114, n. 3, p. 263–9, 2007.

MARTINOIA, S.; BONZANO, L.; CHIAPPALONE, M.; TEDESCO, M. Electrophysiological activity modulation by chemical stimulation in networks of cortical neurons coupled to microelectrode arrays: A biosensor for neuropharmacological applications. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 108, n. 1-2, p. 589–596, 2005.

MAURER, C. R.; RAGHAVAN, V. A linear time algorithm for computing exact Euclidean distance transforms of binary images in arbitrary dimensions. **IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence**, v. 25, n. 2, p. 265–270, 2003.

MEIJERING, E. Neuron tracing in perspective. **Cytometry Part A**, 2010.

MEIJERING, E.; JACOB, M.; SARRIA, J.-C. F.; *et al.* Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images. **Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 58, n. 2, p. 167–176, 2004.

- MERCHANT, F. A. Three-Dimensional Imaging. In: Q. Wu; F. A. Merchant; K. R. Castleman (Eds.); **Microscope Image Processing**. p.329–399, 2008. Burlington: Academic Press.
- MERCHANT, F. A.; PERIASAMY, A. Fluorescence Imaging. In: Q. Wu; F. A. Merchant; K. R. Castleman (Eds.); **Microscope Image Processing**. p.247–297, 2008. Burlington: Academic Press.
- MORIN, F. O.; TAKAMURA, Y.; TAMIYA, E. Investigating neuronal activity with planar microelectrode arrays: achievements and new perspectives. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 100, n. 2, p. 131–43, 2005.
- NEVES, A. F. **Quantificação da distribuição celular em imagens de culturas primárias de gânglio da raiz dorsal em interface com matrizes multieletrodo**, 2012. Universidade Federal de Uberlândia.
- NILSSON, B.; HEYDEN, A. Segmentation of complex cell clusters in microscopic images: application to bone marrow samples. **Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 66, n. 1, p. 24–31, 2005.
- NOVELLINO, A.; ANGELO, P. D.; COZZI, L.; *et al.* Connecting Neurons to a Mobile Robot: An In Vitro Bidirectional Neural Interface. , v. 2007, 2007.
- NUNEZ, P. L.; SRINIVASAN, R. **Electric Fields of the Brain: The Neurophysics of EEG**. Oxford University Press, USA, 2006.
- O'CONNOR, K.; VOORHEIS, H. P.; SULLIVAN, C. O. 3D Visualisation of Confocal Fluorescence Microscopy Data. Fifth IrishWorkshop on Computer Graphics. **Anais...** . v. vi, 2004.
- OTSU, N. A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. **IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics**, v. 9, n. 1, p. 62–66, 1979.
- PAN, M.-S.; YANG, X.-L.; TANG, J.-T. Research on interpolation methods in medical image processing. **Journal of medical systems**, v. 36, n. 2, p. 777–807, 2012.
- PELT, J. VAN; WOLTERS, P. S.; CORNER, M. A.; RUTTEN, W. L. C.; RAMAKERS, G. J. A. Long-term characterization of firing dynamics of spontaneous bursts in cultured neural networks. **IEEE transactions on bio-medical engineering**, v. 51, n. 11, p. 2051–62, 2004.
- PENG, H.; RUAN, Z.; LONG, F.; SIMPSON, J. H.; MYERS, E. W. V3D enables real-time 3D visualization and quantitative analysis of large-scale biological image data sets. **Nature biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 348–353, 2010.
- PENG, T.; BALIJEPALLI, A.; GUPTA, S. K.; LEBRUN, T. Algorithms for On-Line Monitoring of Micro Spheres in an Optical Tweezers-Based Assembly Cell. **Journal of Computing and Information Science in Engineering**, v. 7, n. 4, p. 330–338, 2007.

- POTTER, S. Two-photon microscopy for 4D imaging of living neurons. **Imaging Neurons: A Laboratory Manual**, 2000. CSHL Press: Cold Spring Harbor.
- POTTER, S. M. Distributed processing in cultured neuronal networks. In: M. A. L. Nicolelis (Ed.); **Progress in brain research**. v. 130, p.49–62, 2001. Elsevier.
- POTTER, S. M.; BOOTH, M. C.; BRUMFIELD, J. R.; *et al.* Combining Time-lapse Optical Microscopy and Multi-electrode Arrays to Study Learning in Vitro. **Microscopy and Microanalysis**, v. 10, n. S02, p. 1238–1239, 2004.
- POTTER, S. M.; DEMARSE, T. B. A new approach to neural cell culture for long-term studies. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 110, n. 1-2, p. 17–24, 2001.
- POTTER, S. M.; WAGENAAR, D. A.; DEMARSE, T. B. Closing the loop: Stimulation feedback systems for embodied MEA cultures. In: M. Taketani; M. Baudry (Eds.); **Advances in Network Electrophysiology Using Multi-Electrode Arrays**. p.215–273, 2005. Springer.
- QUIROGA, R. Q.; NADASDY, Z.; BEN-SHAUL, Y. Unsupervised spike detection and sorting with wavelets and superparamagnetic clustering. **Neural computation**, v. 16, n. 8, p. 1661–87, 2004.
- RASBAND, W. S. ImageJ. Bethesda, Maryland, USA: U. S. National Institutes of Health. Disponível em: <<http://imagej.nih.gov/ij/>>.
- RIPLEY, B. D. **Pattern Recognition and Neural Networks**. Cambridge: Press, Cambridge Uni., 1996.
- ROSENFELD, A.; PFALTZ, J. L. Sequential Operations in Digital Picture Processing. **Journal of the ACM**, v. 13, n. 4, p. 471–494, 1966.
- ROSS, J. **Microstimulation and multicellular analysis: A neural interfacing system for spatiotemporal stimulation**, 2008. Georgia Institute of Technology.
- RUTTEN, W. L. C. Selective electrical interfaces with the nervous system. **Annual review of biomedical engineering**, v. 4, p. 407–52, 2002.
- RUTTEN, W.; MOUVEROUX, J.-M.; BUITENWEG, J.; *et al.* Neuroelectronic interfacing with cultured multielectrode arrays toward a cultured probe. **Proceedings of the IEEE**, v. 89, n. 7, p. 1013–1029, 2001.
- SAITO, J. H.; MARI, J. F.; PEDRINO, E. C.; DESTRO-FILHO, J. B.; NICOLETTI, M. DO C. Simulated Activation Patterns of Biological Neurons Cultured onto a Multi-Electrode Array Based on a Modified Izhikevich's Model. **Fundamenta Informaticae**, v. 124, p. 111 – 132, 2013.
- SCHINDELIN, J.; ARGANDA-CARRERAS, I.; FRISE, E.; *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, 2012.

- SCHMID, B.; SCHINDELIN, J.; CARDONA, A.; LONGAIR, M.; HEISENBERG, M. A high-level 3D visualization API for Java and ImageJ. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 274, 2010.
- SCHROEDER, W.; MARTIN, K.; LORENSEN, B. **The Visualization Toolkit**. 3rd ed. Kitware Inc., 2004.
- SCHWARTZ, A. B. Cortical neural prosthetics. **Annual review of neuroscience**, v. 27, p. 487–507, 2004.
- SERRA, J. **Image Analysis and Mathematical Morphology, Volume 1**. Academic Press, 1984.
- SETHIAN, J. A. **Level Set Methods and Fast Marching Methods: Evolving Interfaces in Computational Geometry, Fluid Mechanics, Computer Vision, and Materials Science ... on Applied and Computational Mathematics**). Cambridge: Cambridge University Press, 1999.
- SOILLE, P. **Morphological Image Analysis**. 2nd ed. Springer, 2003.
- STEGENGA, J.; FEBER, J. LE; MARANI, E.; RUTTEN, W. L. C. Analysis of cultured neuronal networks using intraburst firing characteristics. **IEEE transactions on bio-medical engineering**, v. 55, n. 4, p. 1382–90, 2008.
- STEIN, R. B.; AOYAGI, Y.; WEBER, D. J.; SHOHAM, S.; NORMANN, R. A. Encoding mechanisms for sensory neurons studied with a multielectrode array in the cat dorsal root ganglion. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 82, n. 8-9, p. 757–68, 2004. NRC Research Press Ottawa, Canada.
- STETT, A.; EGERT, U.; GUENTHER, E.; *et al.* Biological application of microelectrode arrays in drug discovery and basic research. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 377, n. 3, p. 486–95, 2003.
- TELEA, A. C. **Data Visualization**. A K Peters, Ltd., 2007.
- THÉVENAZ, P.; BLU, T.; UNSER, M. Interpolation revisited. **IEEE transactions on medical imaging**, v. 19, n. 7, p. 739–58, 2000.
- THOMAS-JR., C.; SPRINGER, P.; LOEB, G.; BERWALDNETTER, Y.; OKUN, L. A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells. **Experimental Cell Research**, v. 74, n. 1, p. 61–66, 1972.
- TRUSK, T. C. 3D Reconstruction of Confocal Image Data. In: R. L. Price; W. G. (Jay) Jerome (Eds.); **Basic Confocal Microscopy**. p.243–272, 2011. New York, NY: Springer New York.
- UNSER, M.; ALDROUBI, A.; EDEN, M. Fast B-spline transforms for continuous image representation and interpolation. **IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence**, v. 13, n. 3, p. 277 – 285, 1991.

- VERRI, W. A.; CUNHA, T. M.; PARADA, C. A.; *et al.* Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacology & therapeutics**, v. 112, n. 1, p. 116–38, 2006.
- VINCENT, L.; SOILLE, P. Watersheds in digital spaces: an efficient algorithm based on immersion simulations. **IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence**, v. 13, n. 6, p. 583–598, 1991.
- WARWICK, K.; GASSON, M.; HUTT, B.; *et al.* The application of implant technology for cybernetic systems. **Archives of neurology**, v. 60, n. 10, p. 1369–73, 2003.
- WEARNE, S. L.; RODRIGUEZ, A.; EHLENBERGER, D. B.; *et al.* New techniques for imaging, digitization and analysis of three-dimensional neural morphology on multiple scales. **Neuroscience**, v. 136, n. 3, p. 661–80, 2005.
- WEBER, D. J.; STEIN, R. B.; EVERAERT, D. G.; PROCHAZKA, A. Limb-state feedback from ensembles of simultaneously recorded dorsal root ganglion neurons. **Journal of neural engineering**, v. 4, n. 3, p. S168–80, 2007.
- WOOD, Z.; HOPPE, H.; DESBRUN, M.; SCHRÖDER, P. Removing excess topology from isosurfaces. **ACM Transactions on Graphics**, v. 23, n. 2, p. 190–208, 2004.
- WRIGHT, S. J.; CENTONZE, V. E.; STRICKER, S. A.; *et al.* Cell Biological Applications of Confocal Microscopy. In: Brian Matsumoto (Ed.); **Methods in Cell Biology**, Methods in Cell Biology. v. 38, p.1 – 45, 1993. Elsevier.
- XIONG, G.; ZHOU, X.; DEGTEREV, A.; JI, L.; WONG, S. T. C. Automated neurite labeling and analysis in fluorescence microscopy images. **Cytometry Part A**, v. 69, n. 6, p. 494–505, 2006.
- YEO, T.; ONG, S.; SINNIHAH, R. Autofocusing for tissue microscopy. **Image and Vision Computing**, v. 11, n. 10, p. 629–639, 1993.
- YU, Y.; PENG, H. Automated high speed stitching of large 3D microscopic images. 2011 IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro. **Anais...** . p.238–241, 2011. IEEE.
- ZHANG, Y.; ZHOU, X.; DEGTEREV, A.; *et al.* Automated neurite extraction using dynamic programming for high-throughput screening of neuron-based assays. **NeuroImage**, v. 35, n. 4, p. 1502–1515, 2007.
- ZHAO, X.-Y.; LIU, M.-G.; YUAN, D.-L.; *et al.* Nociception-induced spatial and temporal plasticity of synaptic connection and function in the hippocampal formation of rats: a multi-electrode array recording. **Molecular pain**, v. 5, n. 1, p. 55, 2009.

# Apêndice A

## RESULTADOS – FIGURAS

Neste apêndice são mostradas as figuras relacionadas aos experimentos realizados com as imagens obtidas das culturas (MEA\_01, MEA\_04, MEA\_05, MEA\_11 e MEA\_13) que não foram apresentadas no Capítulo 4.

As Figuras A.1, A.2, A.3, A.4 e A.5 mostram o resultado da aplicação do método de identificação de microeletrodos nas imagens do canal de luz de transmissão para as imagens das culturas MEA\_01, MEA\_04, MEA\_05, MEA\_11 e MEA\_13, respectivamente.

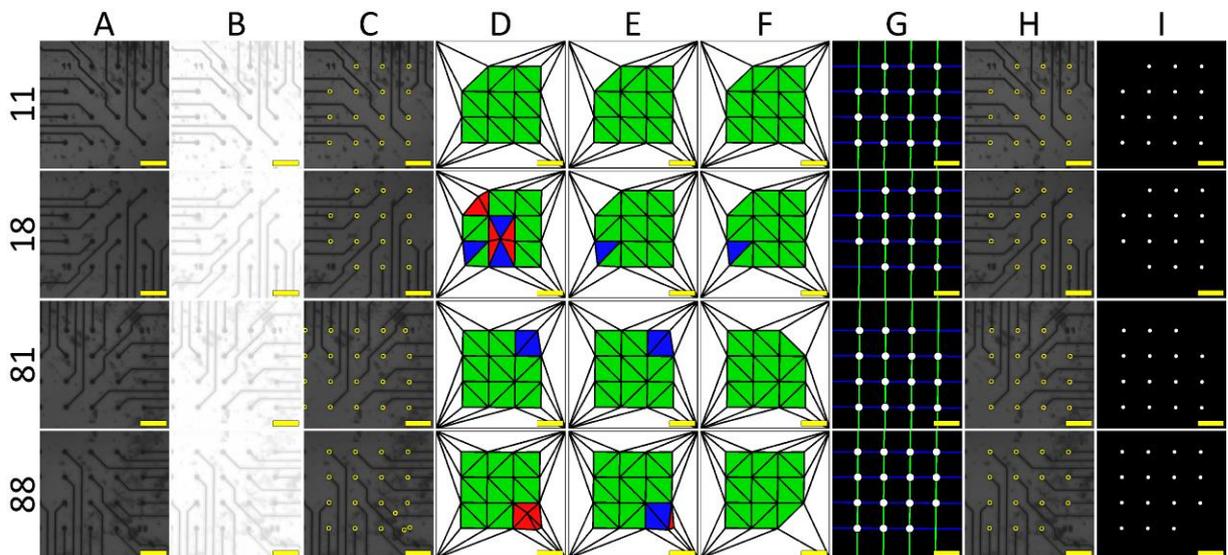


Figura A.1: Resultado das etapas de identificação automática de microeletrodos nas imagens do canal de luz de transmissão. Cada linha mostra os resultados para as imagens de cada um dos quadrantes da cultura MEA\_01. (A) Imagem original (MinIP). (B) Imagem pré-processada. (C) Microeletrodos identificados por meio da transformada de Hough circular. (D) Triangulação de Delaunay dos microeletrodos identificados para detecção automática de erros. (E) Após remover microeletrodos falso-positivos de acordo com o critério de perímetro (vermelho). (F) Após remover microeletrodos falso-positivos que não respeitam o critério de ângulo reto. (G) Grade construída por regressão linear para identificar microeletrodos falso negativos. (H) Resultado da correção automática. (I) Imagem final com os microeletrodos identificados.

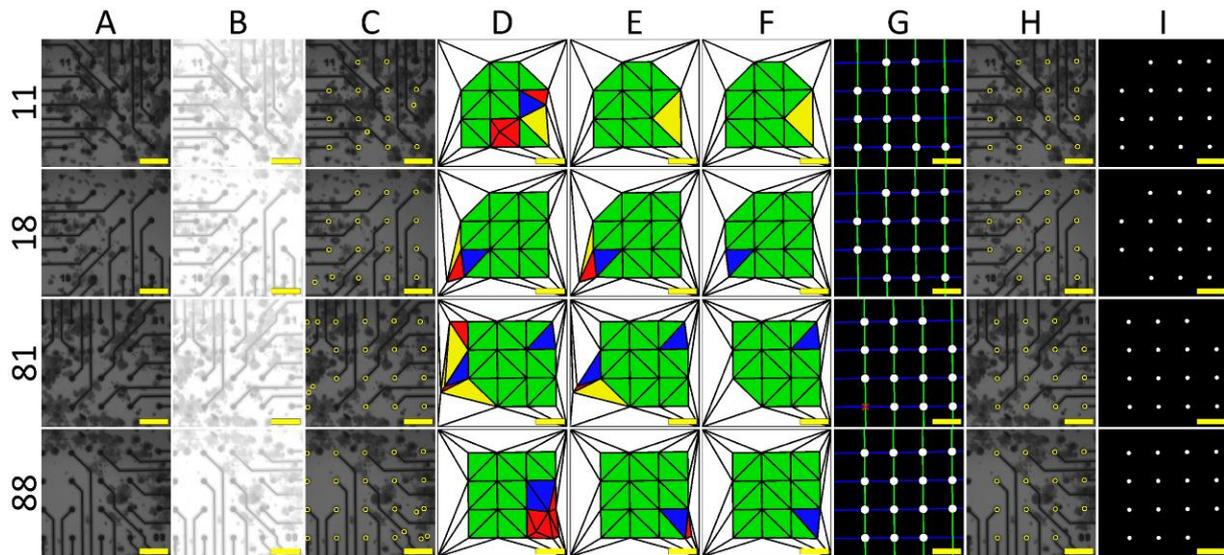


Figura A.2: Resultado das etapas de identificação automática de microeletrodos nas imagens do canal de luz de transmissão. Cada linha mostra os resultados para as imagens de cada um dos quadrantes da cultura MEA\_04. (A) Imagem original (MinIP). (B) Imagem pré-processada. (C) Microeletrodos identificados por meio da transformada de Hough circular. (D) Triangulação de Delaunay dos microeletrodos identificados para detecção automática de erros. (E) Após remover microeletrodos falso-positivos de acordo com o critério de perímetro (vermelho). (F) Após remover microeletrodos falso-positivos que não respeitam o critério de ângulo reto. (G) Grade construída por regressão linear para identificar microeletrodos falso negativos. (H) Resultado da correção automática. (I) Imagem final com os microeletrodos identificados.

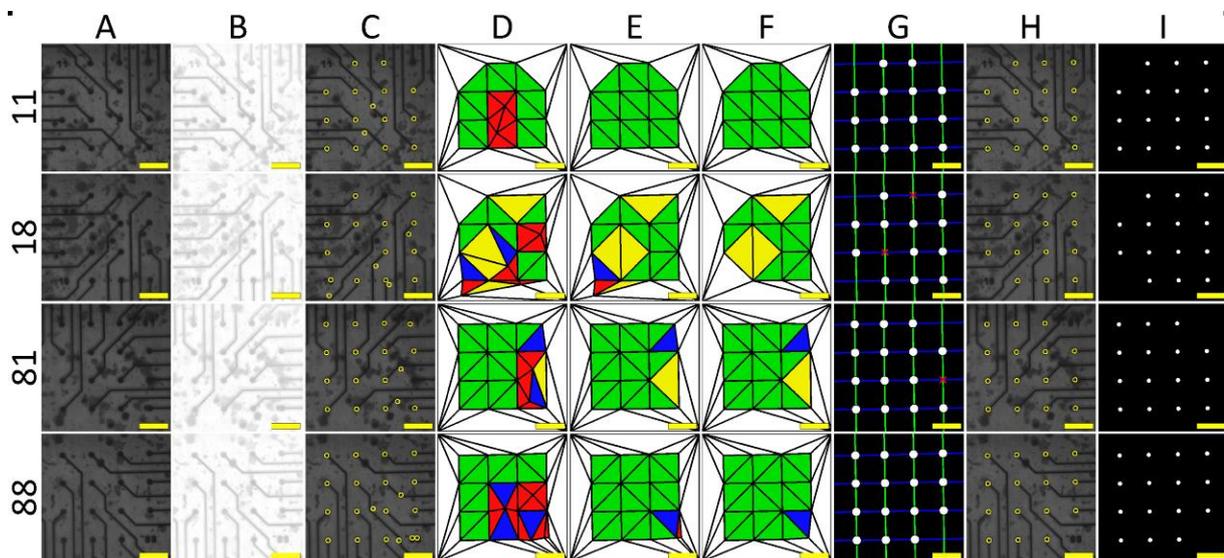


Figura A.3: Resultado das etapas de identificação automática de microeletrodos nas imagens do canal de luz de transmissão. Cada linha mostra os resultados para as imagens de cada um dos quadrantes da cultura MEA\_05. (A) Imagem original (MinIP). (B) Imagem pré-processada. (C) Microeletrodos identificados por meio da transformada de Hough circular. (D) Triangulação de Delaunay dos microeletrodos identificados para detecção automática de erros. (E) Após remover microeletrodos falso-positivos de acordo com o critério de perímetro (vermelho). (F) Após remover microeletrodos falso-positivos que não respeitam o critério de ângulo reto. (G) Grade construída por regressão linear para identificar microeletrodos falso negativos. (H) Resultado da correção automática. (I) Imagem final com os microeletrodos identificados.

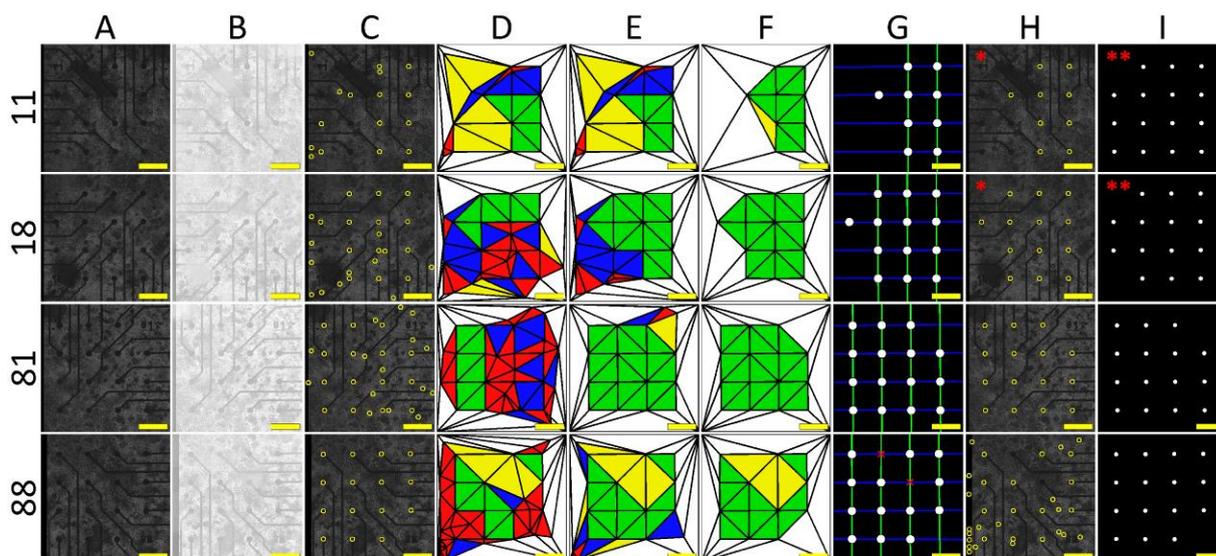


Figura A.4: Resultado das etapas de identificação automática de microeletrodos nas imagens do canal de luz de transmissão. Cada linha mostra os resultados para as imagens de cada um dos quadrantes da cultura MEA\_11. (A) Imagem original (MinIP). (B) Imagem pré-processada. (C) Microeletrodos identificados por meio da transformada de Hough circular. (D) Triangulação de Delaunay dos microeletrodos identificados para detecção automática de erros. (E) Após remover microeletrodos falso-positivos de acordo com o critério de perímetro (vermelho). (F) Após remover microeletrodos falso-positivos que não respeitam o critério de ângulo reto. (G) Grade construída por regressão linear para identificar microeletrodos falso negativos. (H) Resultado da correção automática. (I) Imagem final com os microeletrodos identificados.

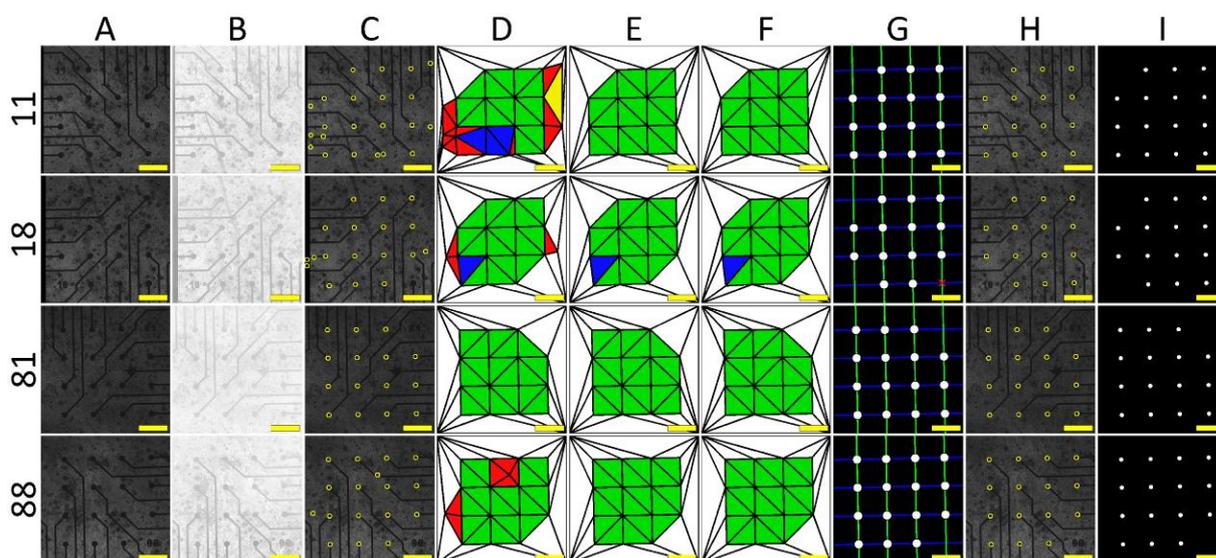


Figura A.5: Resultado das etapas de identificação automática de microeletrodos nas imagens do canal de luz de transmissão. Cada linha mostra os resultados para as imagens de cada um dos quadrantes da cultura MEA\_13. (A) Imagem original (MinIP). (B) Imagem pré-processada. (C) Microeletrodos identificados por meio da transformada de Hough circular. (D) Triangulação de Delaunay dos microeletrodos identificados para detecção automática de erros. (E) Após remover microeletrodos falso-positivos de acordo com o critério de perímetro (vermelho). (F) Após remover microeletrodos falso-positivos que não respeitam o critério de ângulo reto. (G) Grade construída por regressão linear para identificar microeletrodos falso negativos. (H) Resultado da correção automática. (I) Imagem final com os microeletrodos identificados.

A Figuras A.6, A.7, A.8, A.9 e A.10 mostram os resultados do método de segmentação de neurônios 2D para as imagens das culturas MEA\_01, MEA\_04, MEA\_05, MEA\_11 e MEA\_13, respectivamente. São mostradas as etapas até a transformada watershed, enquanto os resultados da etapa de classificação são mostrados nas Figuras, A.11, A.12, A.13, A.14 e A.15.

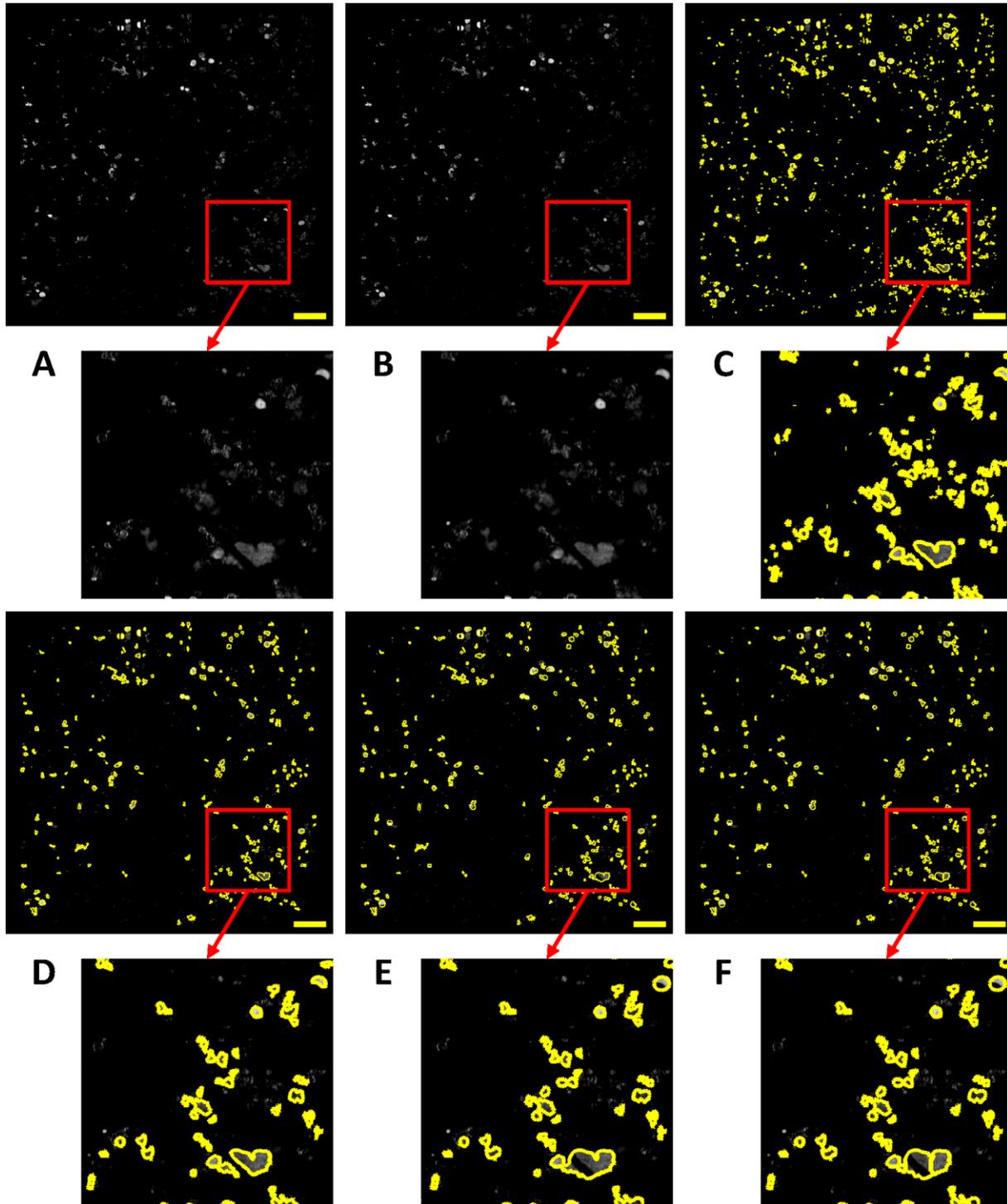


Figura A.6: Resultado das etapas do método proposto para segmentação 2D de neurônios considerando as imagens obtidas a partir da MEA\_01. (A) Imagem 2D obtida por MIP. (B) Imagem pré-processada; (C) Segmentação por limiarização local; (D) Filtragem Morfológica; (E) Correção da oclusão de neurônios; (F) Transformada watershed.

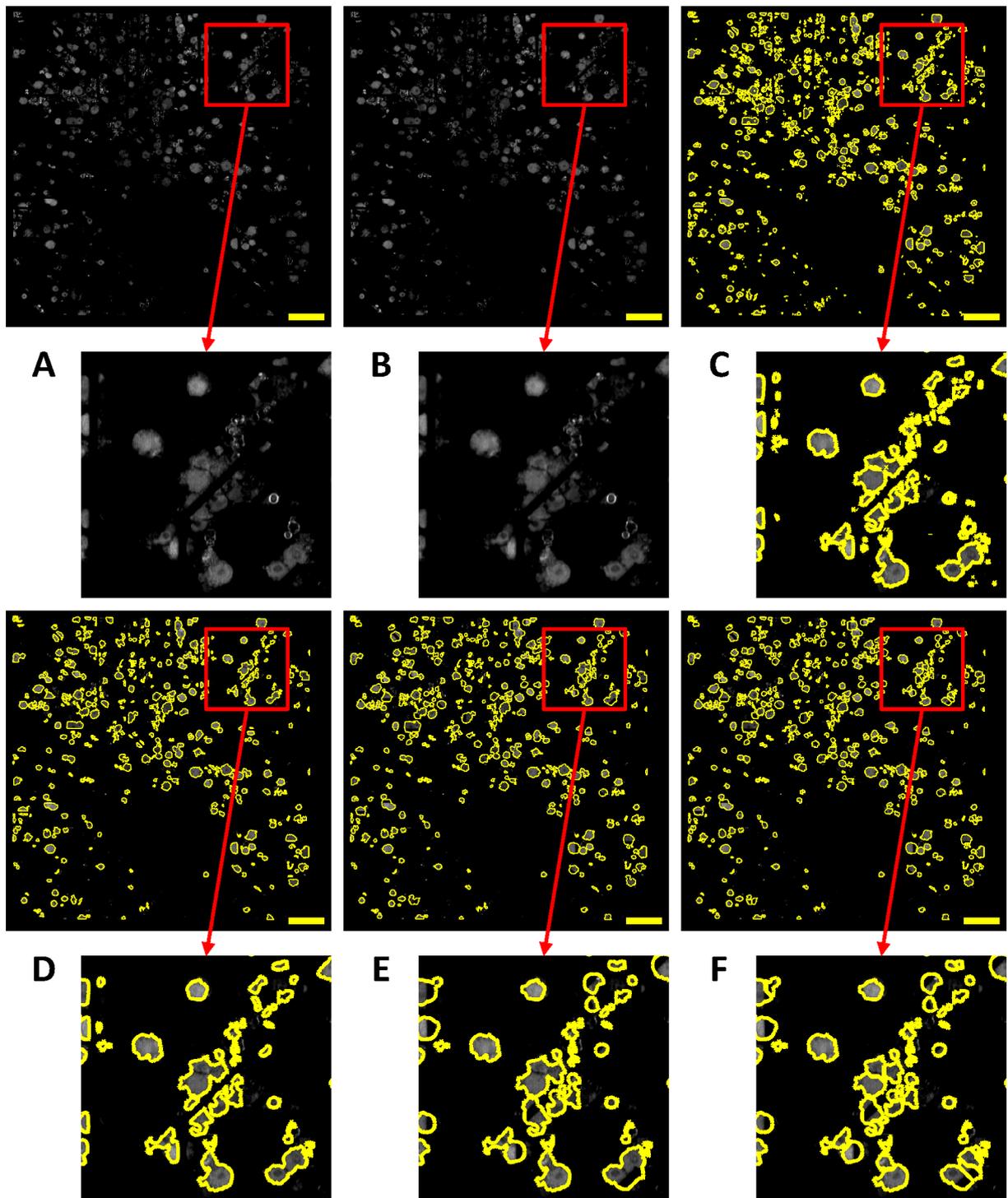


Figura A.7: Resultado das etapas do método proposto para segmentação 2D de neurônios considerando as imagens obtidas a partir da MEA\_04. (A) Imagem 2D obtida por MIP. (B) Imagem pré-processada; (C) Segmentação por limiarização local; (D) Filtragem Morfológica; (E) Correção da oclusão de neurônios; (F) Transformada watershed.

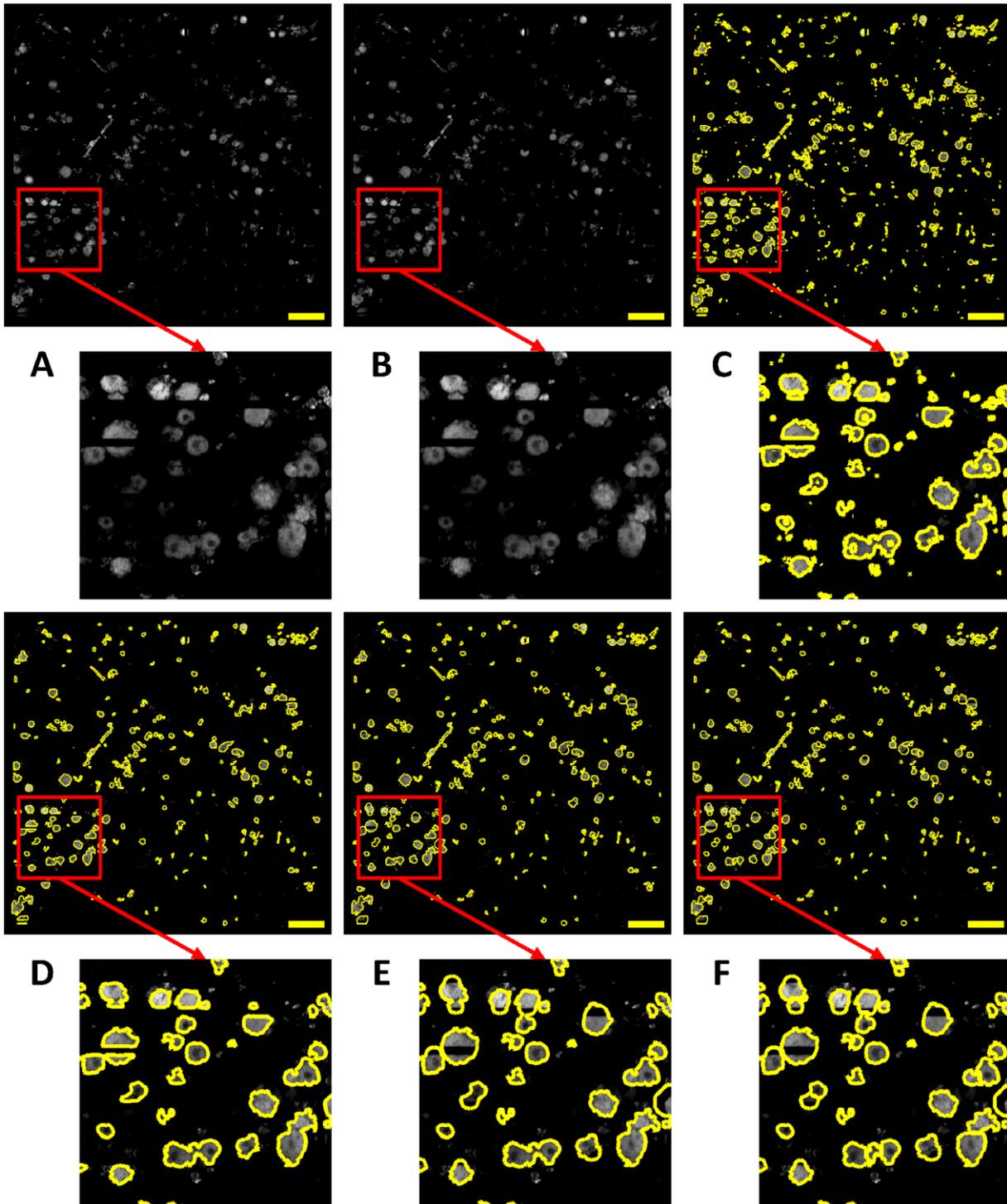


Figura A.8: Resultado das etapas do método proposto para segmentação 2D de neurônios considerando as imagens obtidas a partir da MEA\_05. (A) Imagem 2D obtida por MIP. (B) Imagem pré-processada; (C) Segmentação por limiarização local; (D) Filtragem Morfológica; (E) Correção da oclusão de neurônios; (F) Transformada watershed.

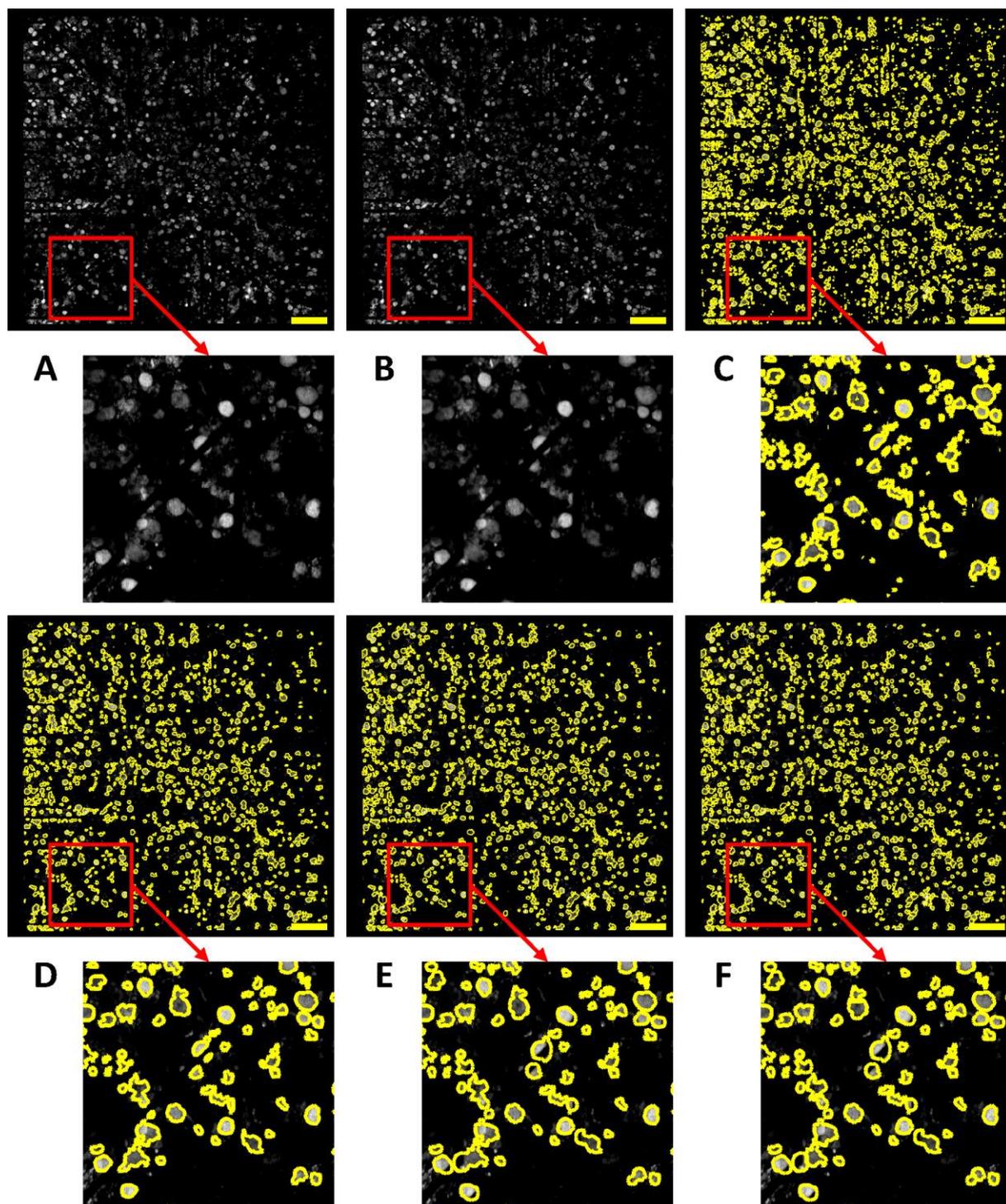


Figura A.9: Resultado das etapas do método proposto para segmentação 2D de neurônios considerando as imagens obtidas a partir da MEA\_11. (A) Imagem 2D obtida por MIP. (B) Imagem pré-processada; (C) Segmentação por limiarização local; (D) Filtragem Morfológica; (E) Correção da oclusão de neurônios; (F) Transformada watershed.

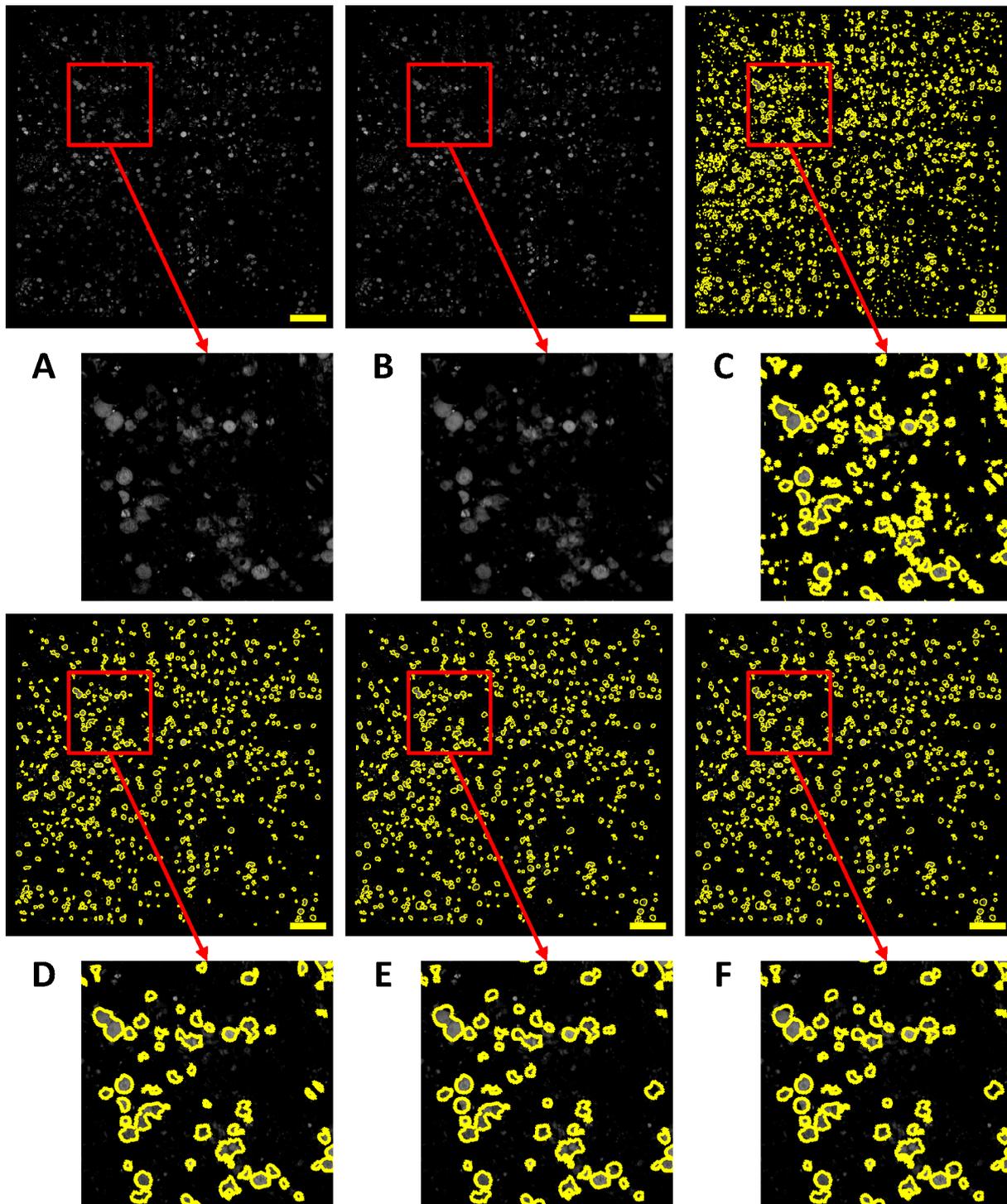


Figura A.10: Resultado das etapas do método proposto para segmentação 2D de neurônios considerando as imagens obtidas a partir da MEA\_13. (A) Imagem 2D obtida por MIP. (B) Imagem pré-processada; (C) Segmentação por limiarização local; (D) Filtragem Morfológica; (E) Correção da oclusão de neurônios; (F) Transformada watershed.

As Figuras A.11, A.12, A.13, A.14 e A.15 mostram os resultados da etapa de classificação de objetos (segmentação de neurônios 2D) para as imagens das culturas MEA\_01, MEA\_04, MEA\_05, MEA\_11 e MEA\_13, respectivamente.

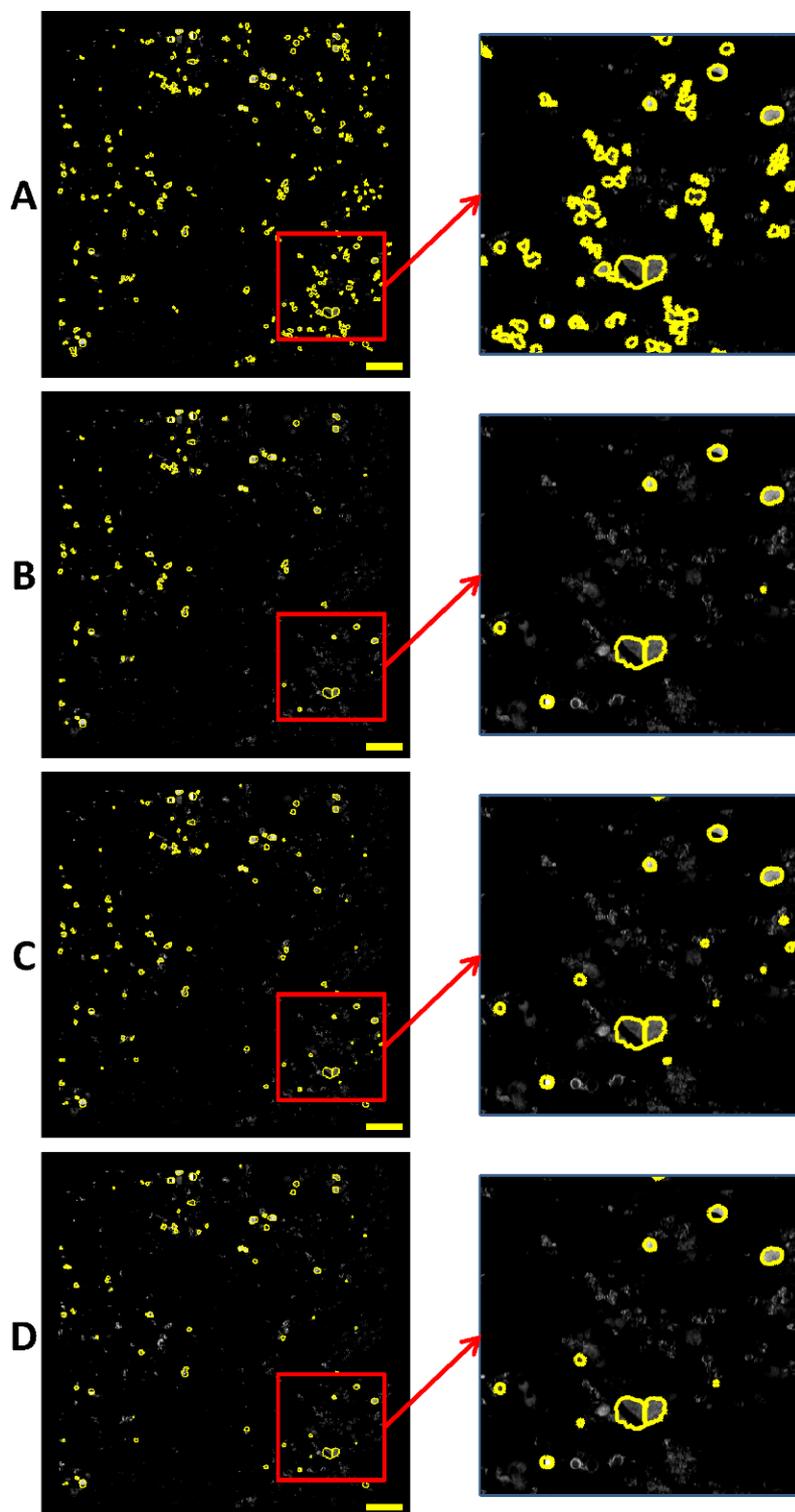


Figura A.11: Resultado da etapa de classificação de objetos considerando as três estratégias propostas para a imagem MEA\_01. (A) Imagem a ser classificada, resultante da transformada watershed (B) Classificação pelo algoritmo k-means. (C) Classificação utilizando o algoritmo SVM treinado com o resultado das classificações por k-means (SVM + k-means). (D) Classificação utilizando o algoritmo SVM treinado com os resultados da classificação manual de 20% de cada uma das imagens do conjunto de dados (SVM + manual).

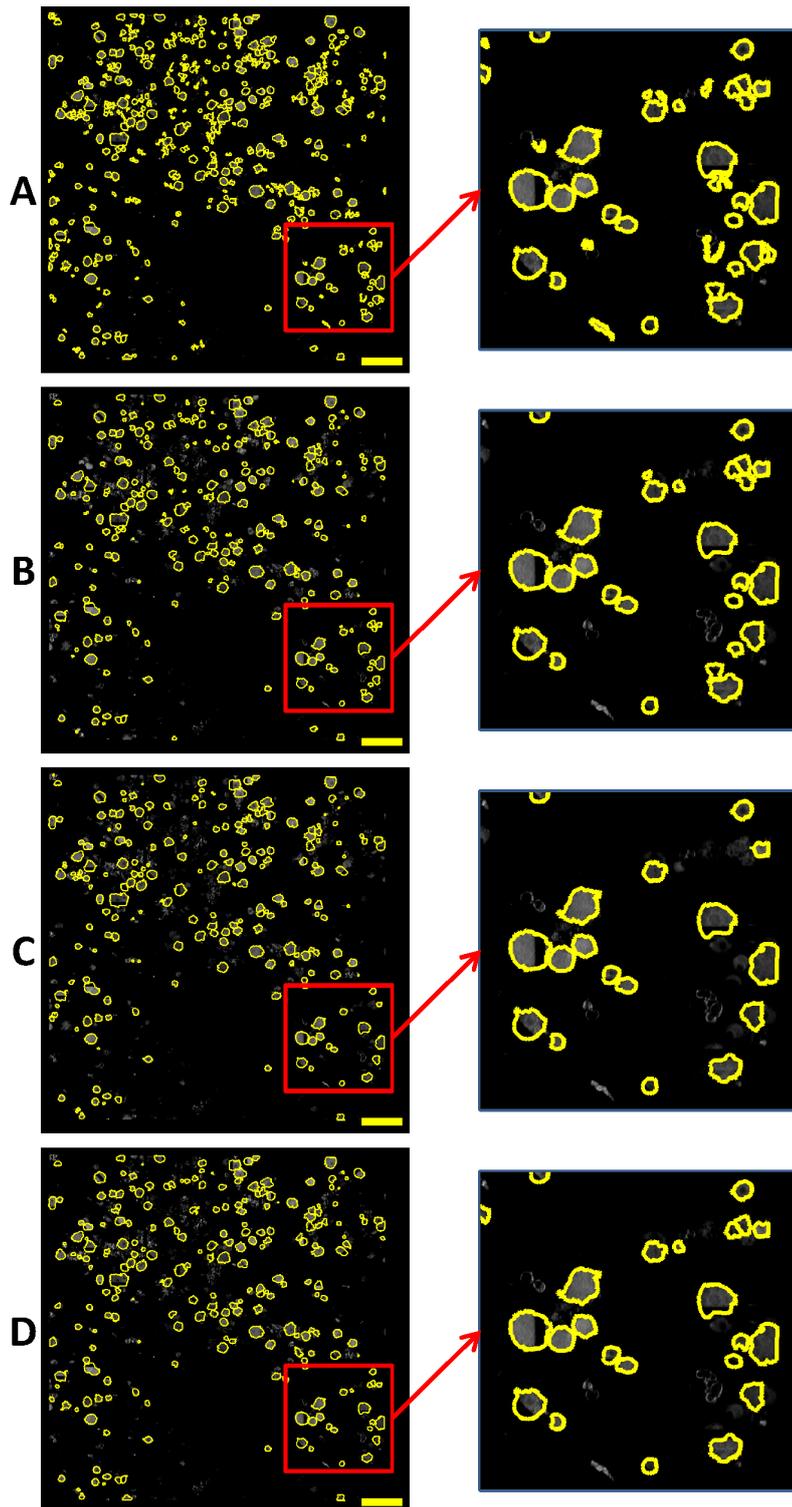


Figura A.12: Resultado da etapa de classificação de objetos considerando as três estratégias propostas para a imagem MEA\_04. (A) Imagem a ser classificada, resultante da transformada watershed (B) Classificação pelo algoritmo k-means. (C) Classificação utilizando o algoritmo SVM treinado com o resultado das classificações por k-means (SVM + k-means). (D) Classificação utilizando o algoritmo SVM treinado com os resultados da classificação manual de 20% de cada uma das imagens do conjunto de dados (SVM + manual).

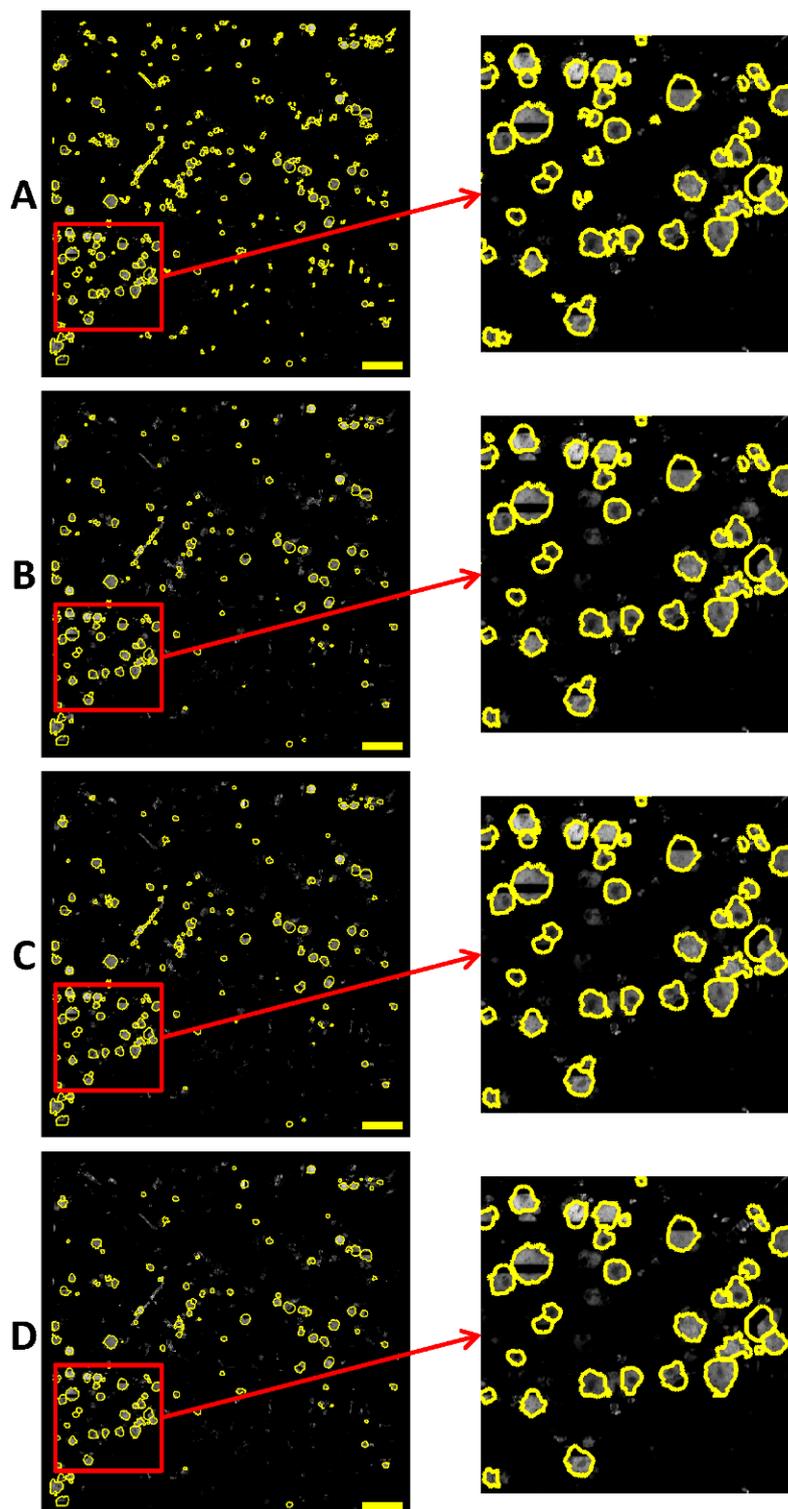
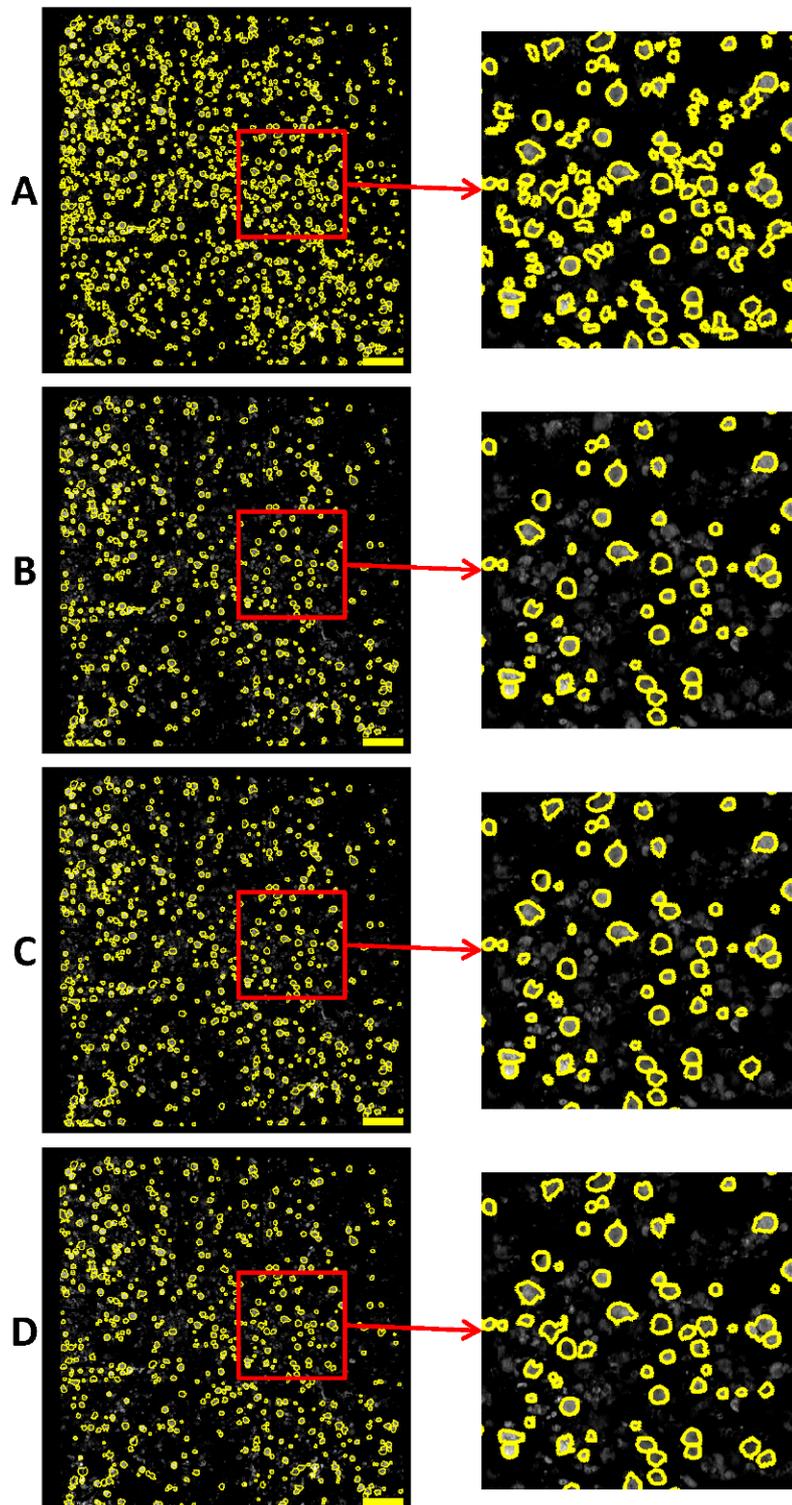


Figura A.13: Resultado da etapa de classificação de objetos considerando as três estratégias propostas para a imagem MEA\_05. (A) Imagem a ser classificada, resultante da transformada watershed (B) Classificação pelo algoritmo k-means. (C) Classificação utilizando o algoritmo SVM treinado com o resultado das classificações por k-means (SVM + k-means). (D) Classificação utilizando o algoritmo SVM treinado com os resultados da classificação manual de 20% de cada uma das imagens do conjunto de dados (SVM + manual).



**Figura A.14:** Resultado da etapa de classificação de objetos considerando as três estratégias propostas para a imagem MEA\_11. (A) Imagem a ser classificada, resultante da transformada watershed (B) Classificação pelo algoritmo k-means. (C) Classificação utilizando o algoritmo SVM treinado com o resultado das classificações por k-means (SVM + k-means). (D) Classificação utilizando o algoritmo SVM treinado com os resultados da classificação manual de 20% de cada uma das imagens do conjunto de dados (SVM + manual).

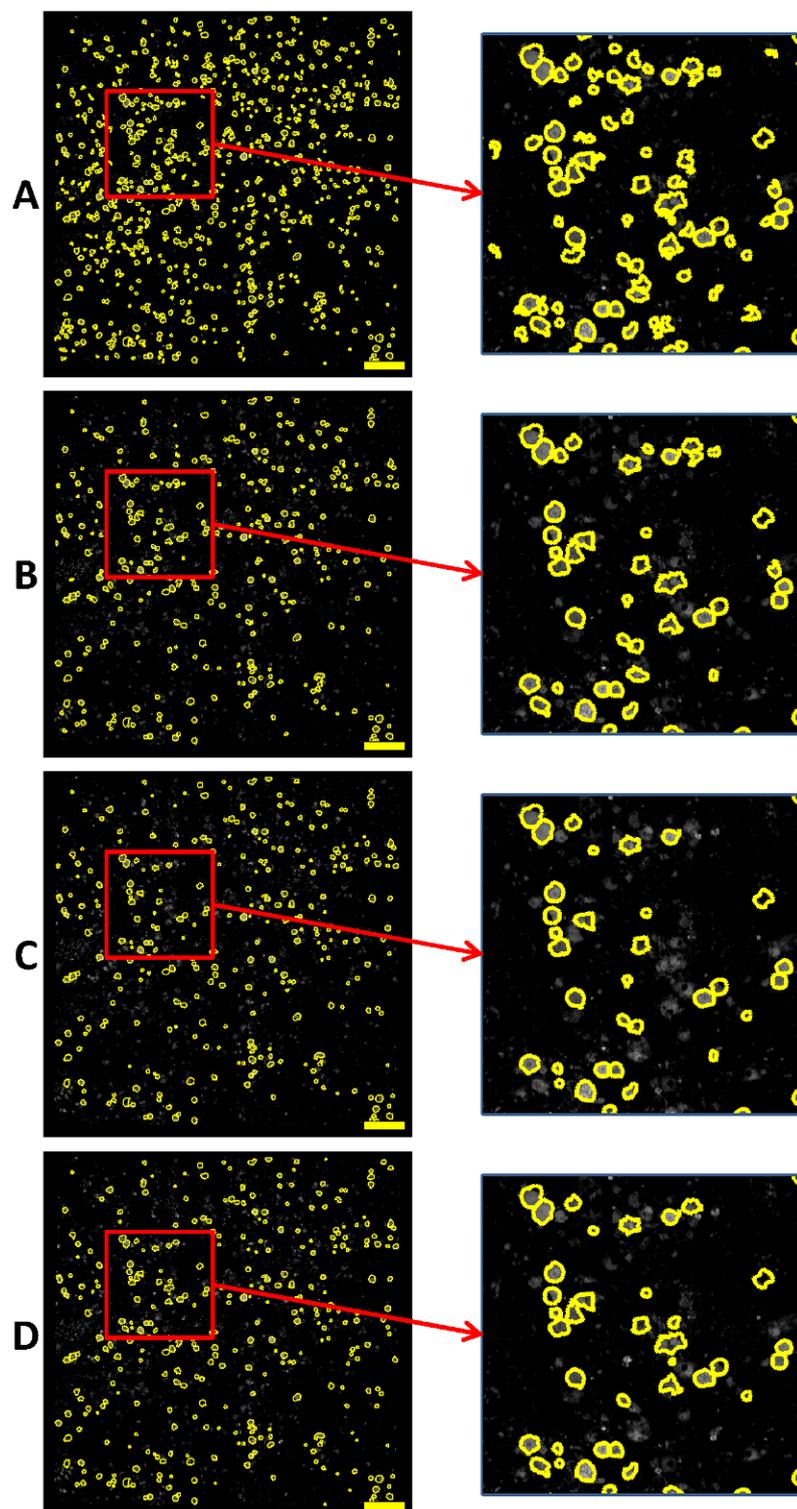


Figura A.15: Resultado da etapa de classificação de objetos considerando as três estratégias propostas para a imagem MEA\_13. (A) Imagem a ser classificada, resultante da transformada watershed (B) Classificação pelo algoritmo k-means. (C) Classificação utilizando o algoritmo SVM treinado com o resultado das classificações por k-means (SVM + k-means). (D) Classificação utilizando o algoritmo SVM treinado com os resultados da classificação manual de 20% de cada uma das imagens do conjunto de dados (SVM + manual).

As Figuras A.16, A.17, A.18, A.19 e A.20 mostram os resultados das análises quantitativas morfológicas obtidas a partir das imagens das culturas MEA\_01, MEA\_04, MEA\_05, MEA\_11 e MEA\_13, respectivamente.

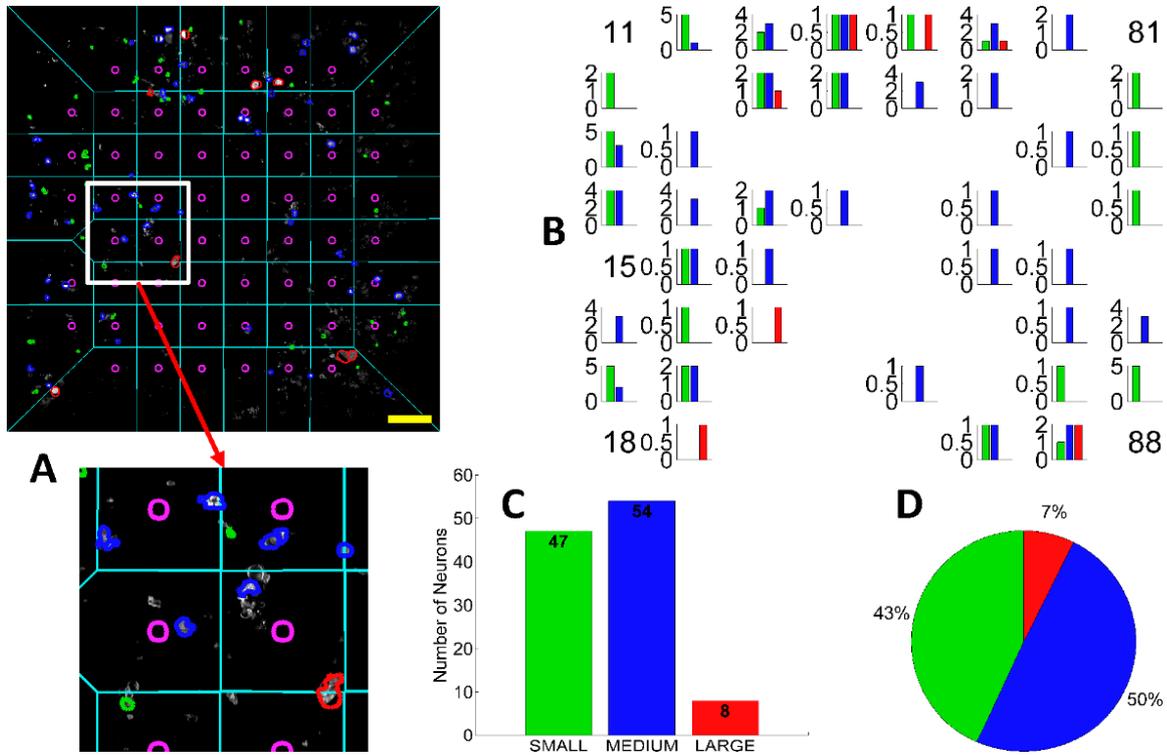


Figura A.16: Resultado da classificação morfológica da cultura MEA\_01. (A) Visualização da classificação morfológica. As linhas retas são o diagrama de Voronoi dos microeletrodos. (B) Histograma da distribuição dos neurônios de acordo com seus diâmetros, considerando cada microeletrodo individualmente. (C) Histograma da distribuição dos neurônios considerando toda a MEA. (D) Porcentagens de neurônios em cada classe, também considerando toda a MEA.

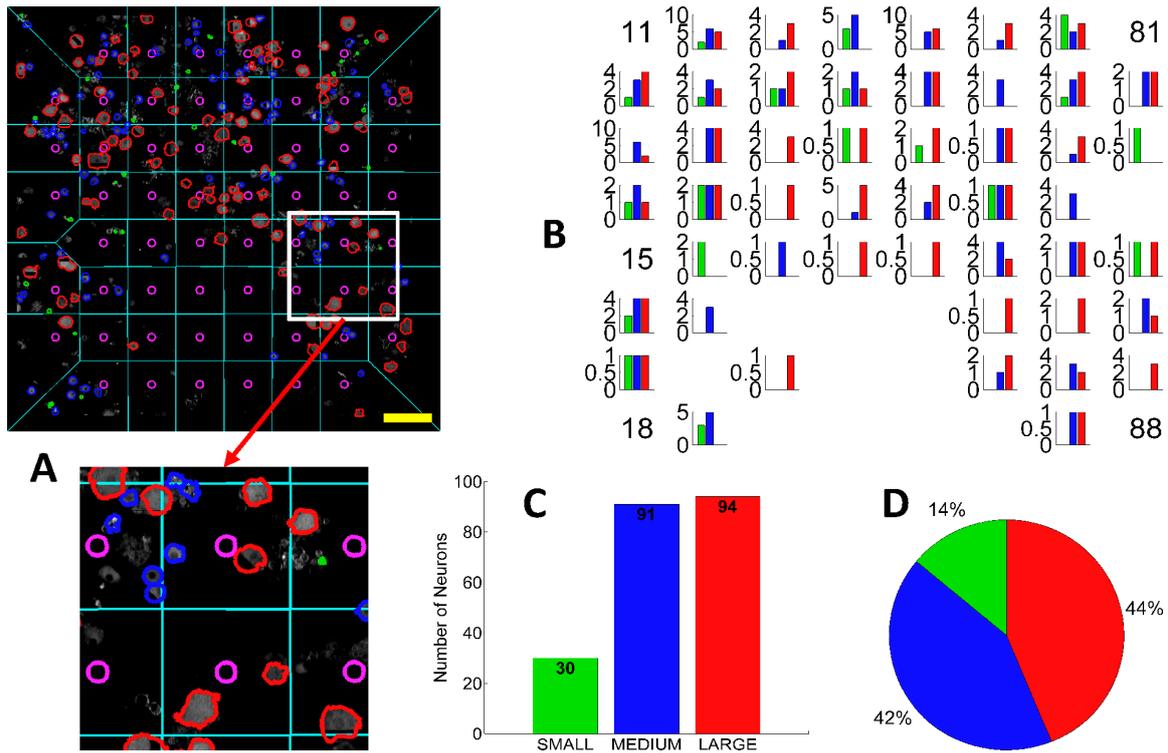


Figura A.17: Resultado da classificação morfológica da cultura MEA\_04. (A) Visualização da classificação morfológica. As linhas retas são o diagrama de Voronoi dos microeletrodos. (B) Histograma da distribuição dos neurônios de acordo com seus diâmetros, considerando cada microeletrodo individualmente. (C) Histograma da distribuição dos neurônios considerando toda a MEA. (D) Porcentagens de neurônios em cada classe, considerando toda a MEA.

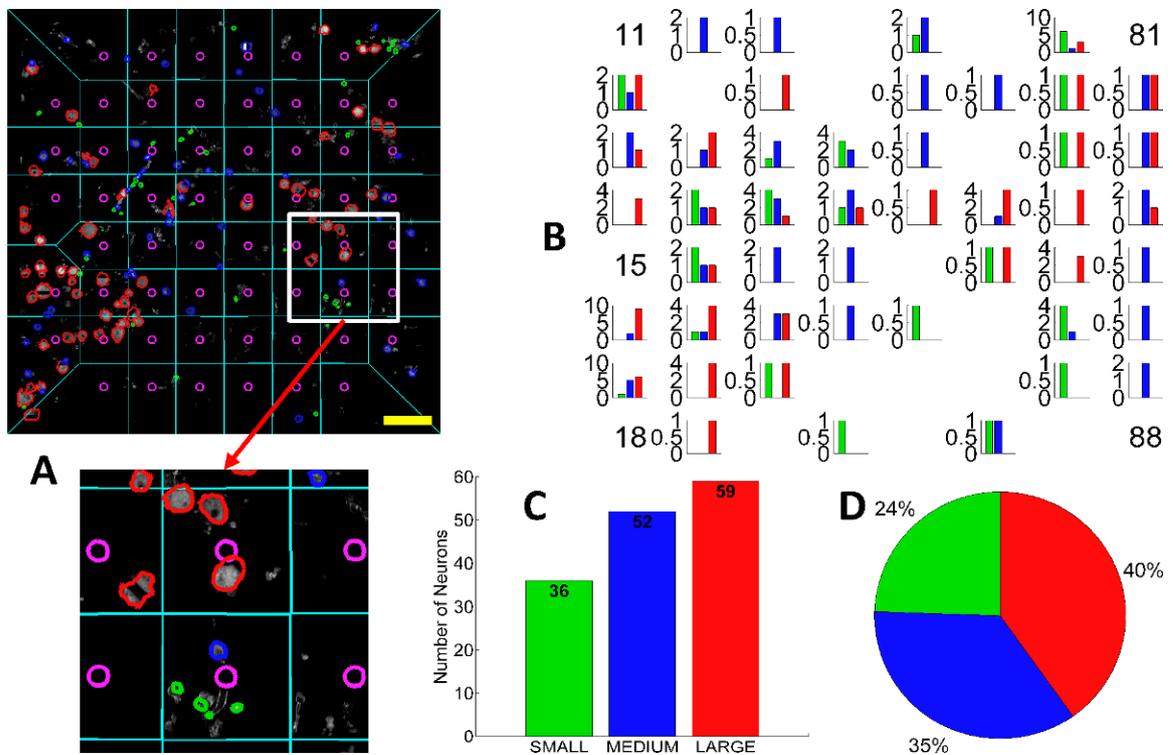


Figura A.18: Resultado da classificação morfológica da cultura MEA\_05. (A) Visualização da classificação morfológica. As linhas retas são o diagrama de Voronoi dos microeletrodos. (B) Histograma da distribuição dos neurônios de acordo com seus diâmetros, considerando cada microeletrodo individualmente. (C) Histograma da distribuição dos neurônios considerando toda a MEA. (D) Porcentagens de neurônios em cada classe, considerando toda a MEA.

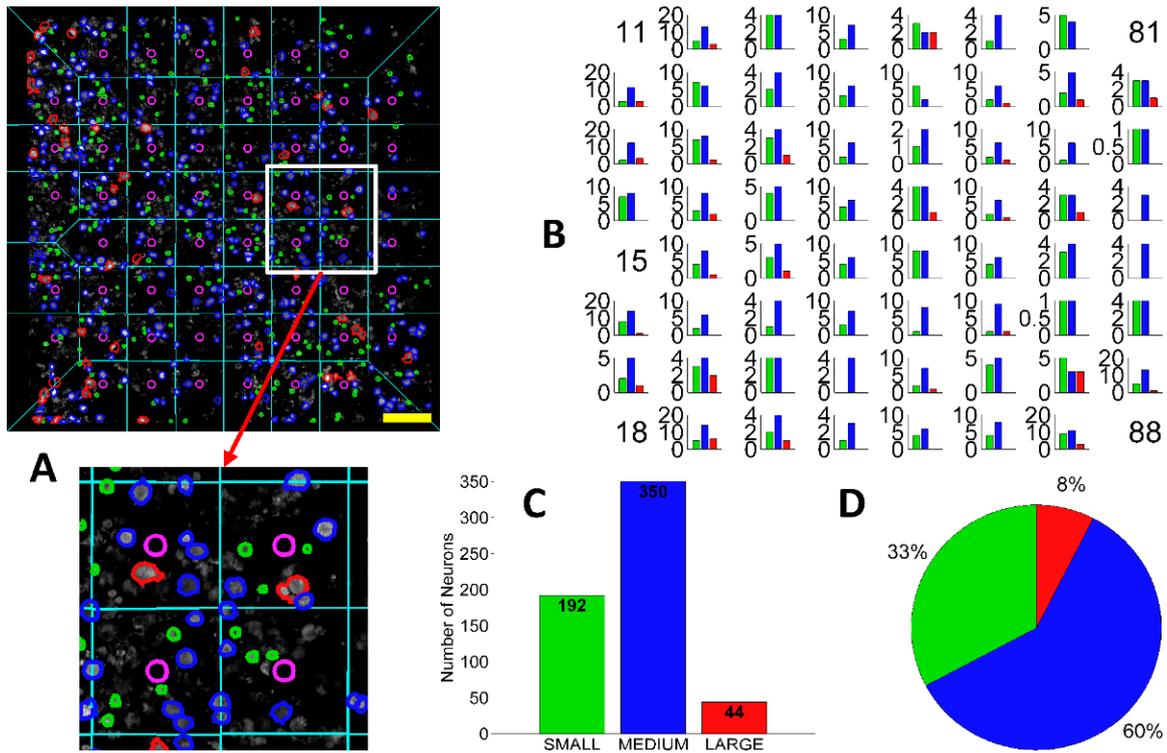


Figura A.19: Resultado da classificação morfológica da cultura MEA\_11. (A) Visualização da classificação morfológica. As linhas retas são o diagrama de Voronoi dos microeletrodos. (B) Histograma da distribuição dos neurônios de acordo com seus diâmetros, considerando cada microeletrodo individualmente. (C) Histograma da distribuição dos neurônios considerando toda a MEA. (D) Porcentagens de neurônios em cada classe, considerando toda a MEA.

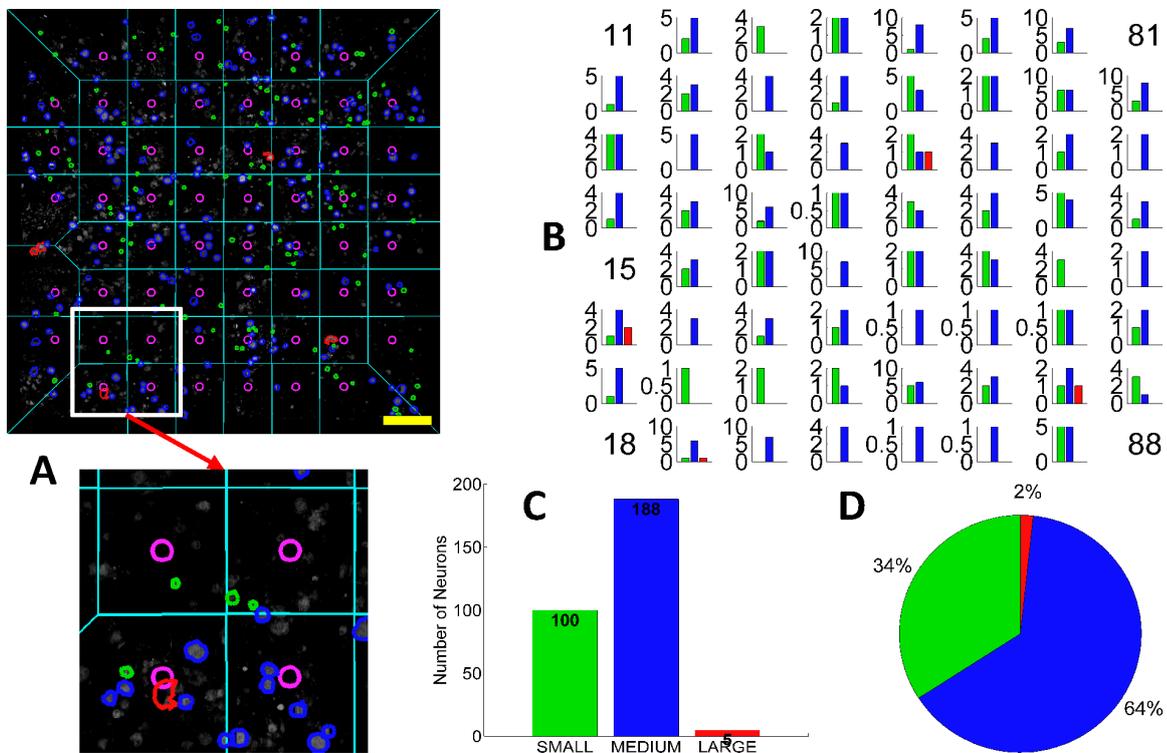


Figura A.20: Resultado da classificação morfológica da cultura MEA\_13. (A) Visualização da classificação morfológica. As linhas retas são o diagrama de Voronoi dos microeletrodos. (B) Histograma da distribuição dos neurônios de acordo com seus diâmetros, considerando cada microeletrodo individualmente. (C) Histograma da distribuição dos neurônios considerando toda a MEA. (D) Porcentagens de neurônios em cada classe, considerando toda a MEA.

As Figuras A.21, A.22, A.23, A.24 e A.25 mostram os resultados das análises quantitativas relacionadas à distância dos neurônios aos microeletrodos obtidas a partir das imagens das culturas MEA\_01, MEA\_04, MEA\_05, MEA\_11 e MEA\_13, respectivamente.

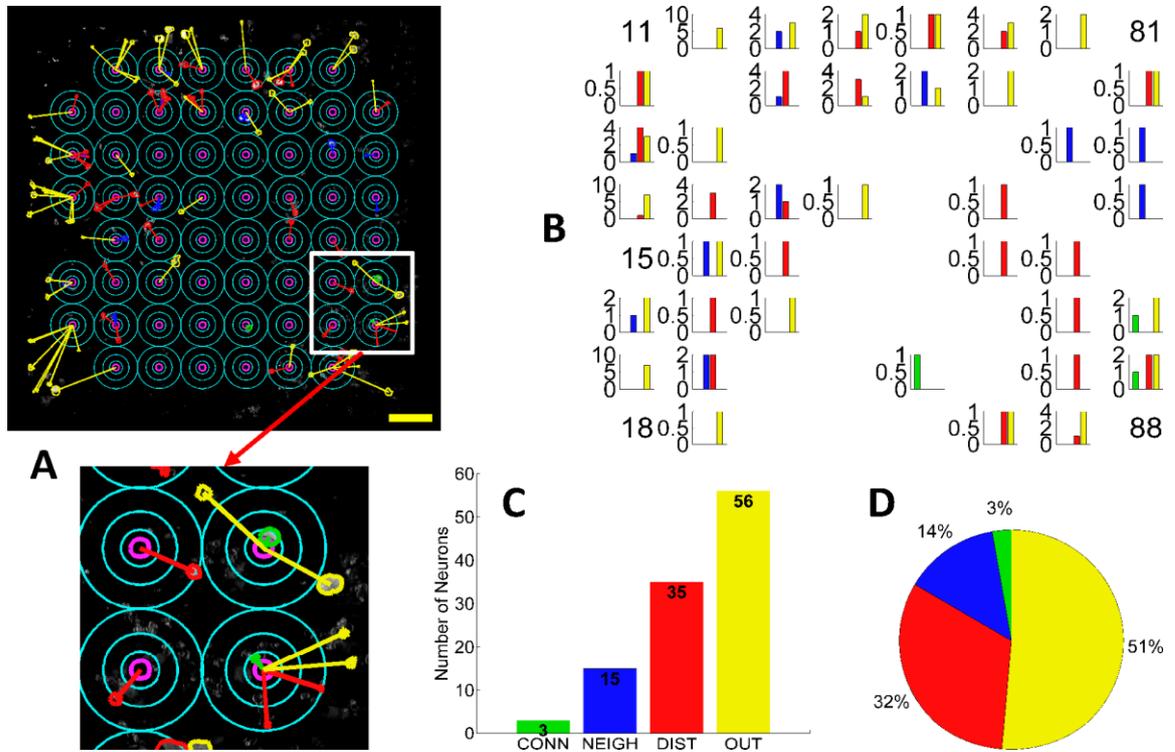
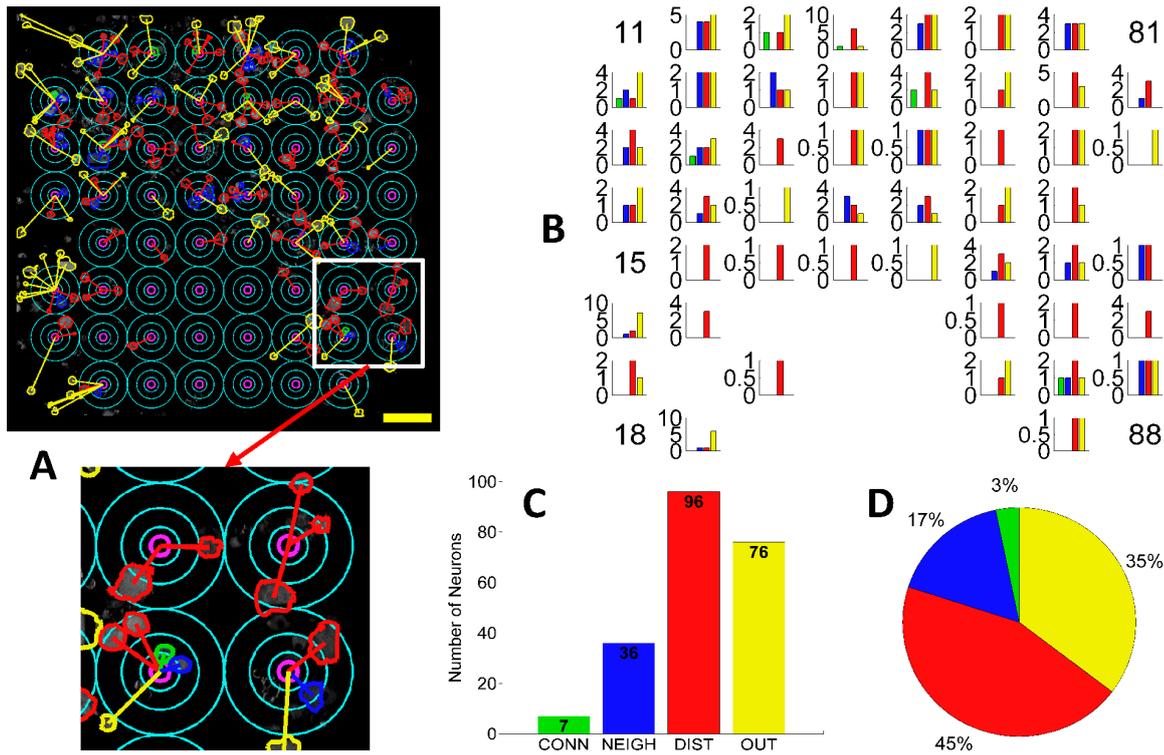
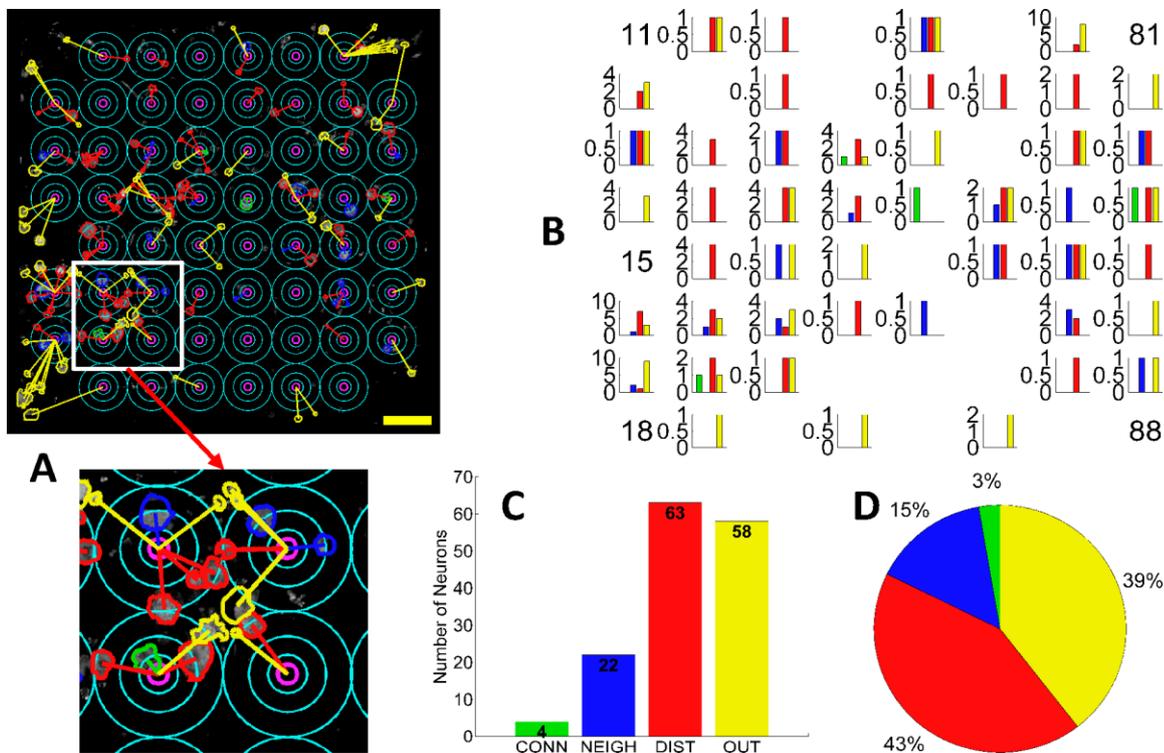


Figura A.21: Resultado da classificação topológica para a cultura MEA\_01. (A) Visualização da classificação topológica. Os círculos concêntricos são os limites entre as classes de neurônios.

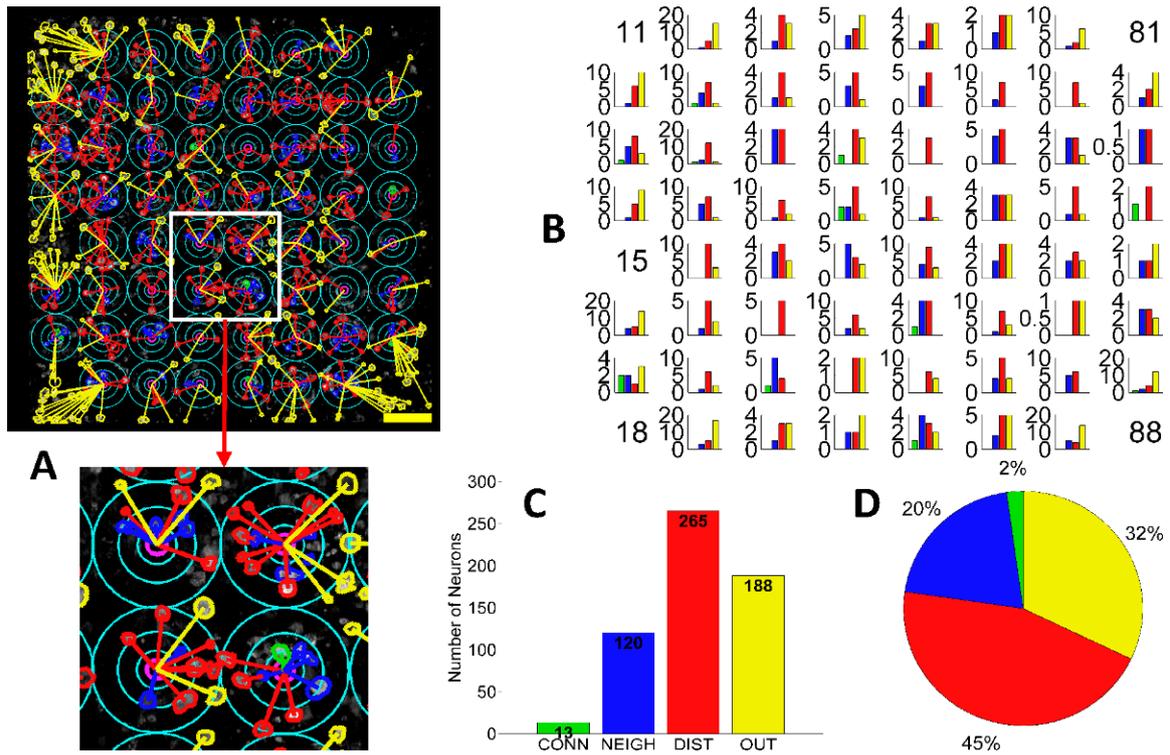
(B) Histograma da distribuição dos neurônios de acordo com a distância em relação ao microeletrodo. (C) Histograma da distribuição dos neurônios considerando toda a MEA. (D) Porcentagens de neurônios em cada classe, também considerando toda a MEA.



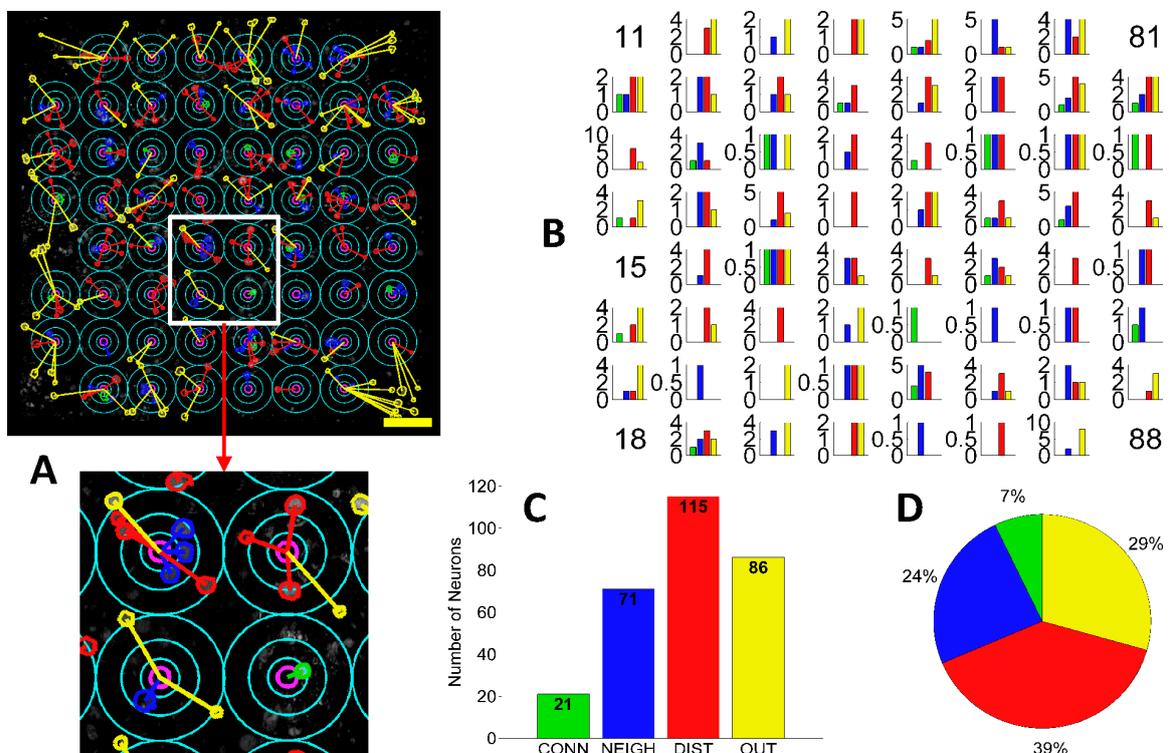
**Figura A.22: Resultado da classificação topológica para a cultura MEA\_04. (A) Visualização da classificação topológica. Os círculos concêntricos são os limites entre as classes de neurônios. (B) Histograma da distribuição dos neurônios de acordo com a distância em relação ao microeletrodo. (C) Histograma da distribuição dos neurônios considerando toda a MEA. (D) Porcentagens de neurônios em cada classe, também considerando toda a MEA.**



**Figura A.23: Resultado da classificação topológica para a cultura MEA\_05. (A) Visualização da classificação topológica. Os círculos concêntricos são os limites entre as classes de neurônios. (B) Histograma da distribuição dos neurônios de acordo com a distância em relação ao microeletrodo. (C) Histograma da distribuição dos neurônios considerando toda a MEA. (D) Porcentagens de neurônios em cada classe, também considerando toda a MEA.**

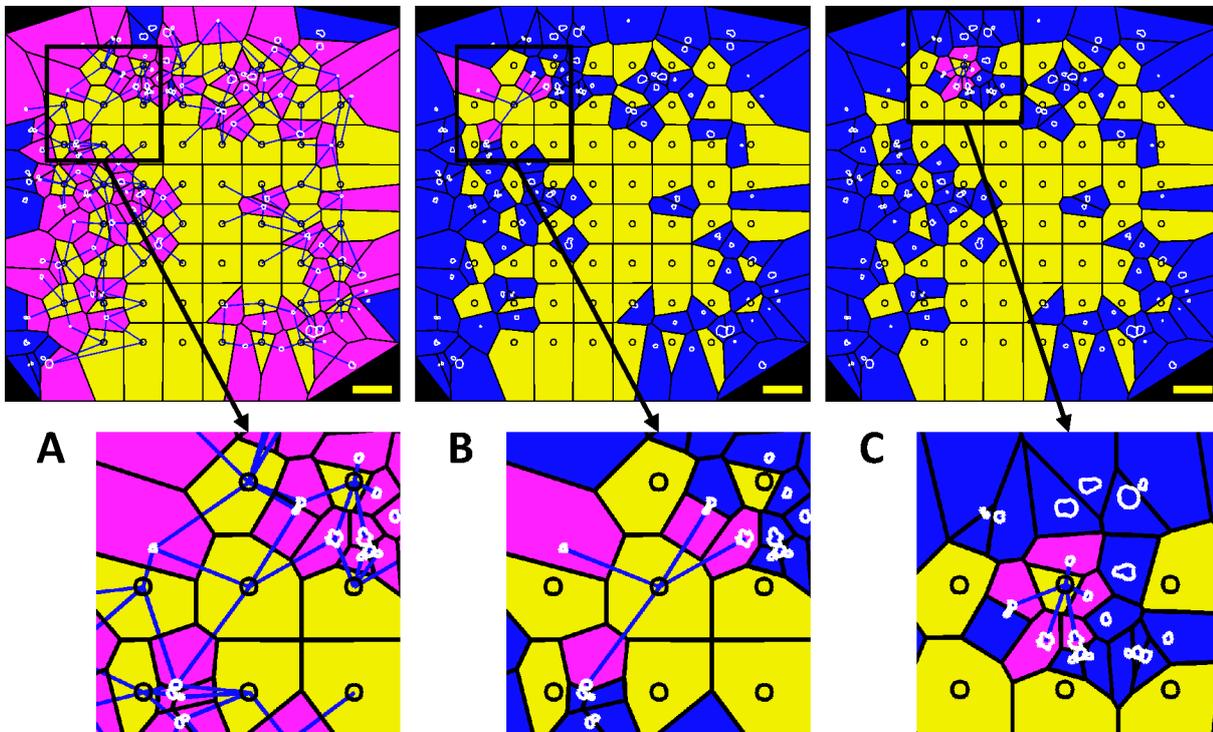


**Figura A.24:** Resultado da classificação topológica para a cultura MEA\_11. (A) Visualização da classificação topológica. Os círculos concêntricos são os limites entre as classes de neurônios. (B) Histograma da distribuição dos neurônios de acordo com a distância em relação ao microeletrodo. (C) Histograma da distribuição dos neurônios considerando toda a MEA. (D) Porcentagens de neurônios em cada classe, também considerando toda a MEA.



**Figura A.25:** Resultado da classificação topológica para a cultura MEA\_13. (A) Visualização da classificação topológica. Os círculos concêntricos são os limites entre as classes de neurônios. (B) Histograma da distribuição dos neurônios de acordo com a distância em relação ao microeletrodo. (C) Histograma da distribuição dos neurônios considerando toda a MEA. (D) Porcentagens de neurônios em cada classe, também considerando toda a MEA.

As Figuras A.26, A.27, A.28, A.29 e A.30 mostram os resultados das análises quantitativas relacionadas à distância dos neurônios aos microeletrodos obtidas a partir das imagens das culturas MEA\_01, MEA\_04, MEA\_05, MEA\_11 e MEA\_13, respectivamente.



**Figura A.26:** Visualização da classificação topológica baseada no diagrama de Voronoi aplicada sobre as imagens da cultura MEA\_01. (A) Classificação realizada considerando todos os microeletrodos. (B) Classificação considerando apenas o microeletrodo 22. (C) Classificação considerando apenas o microeletrodo 31.

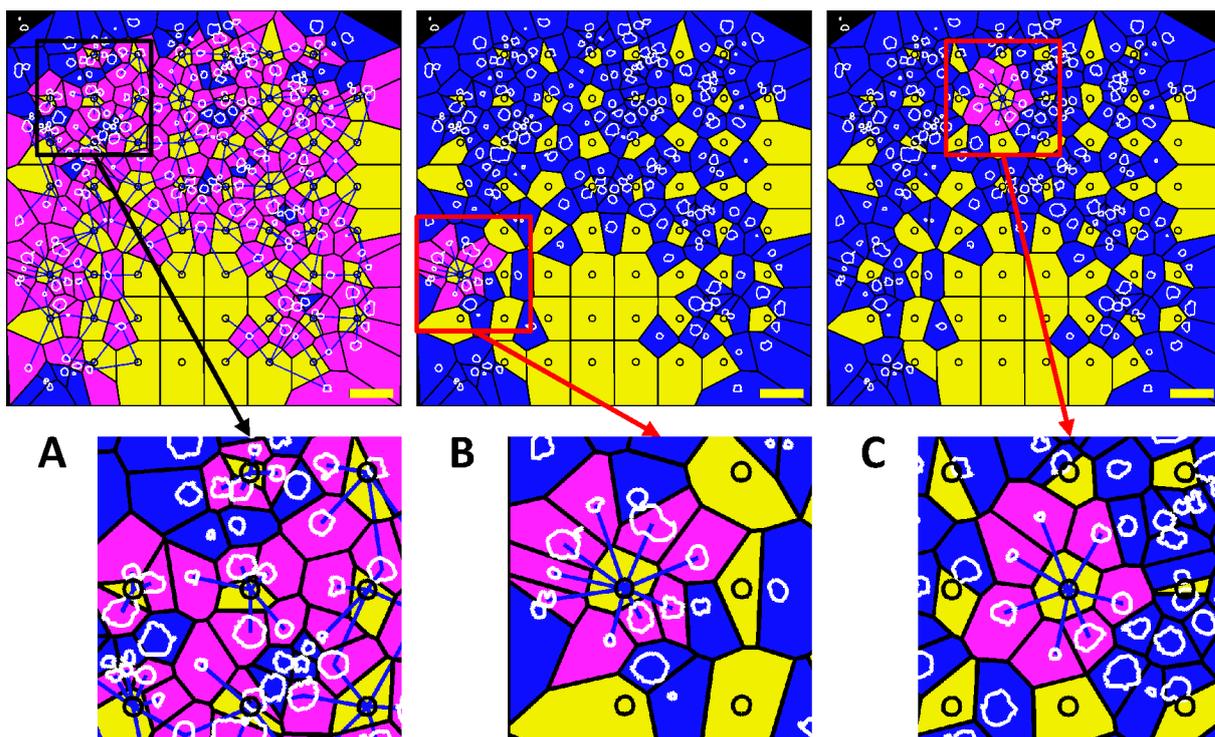


Figura A.27: Visualização da classificação topológica baseada no diagrama de Voronoi aplicada sobre as imagens da cultura MEA\_04. (A) Classificação realizada considerando todos os microeletrodos. (B) Classificação considerando apenas o microeletrodo 16. (C) Classificação considerando apenas o microeletrodo 42.

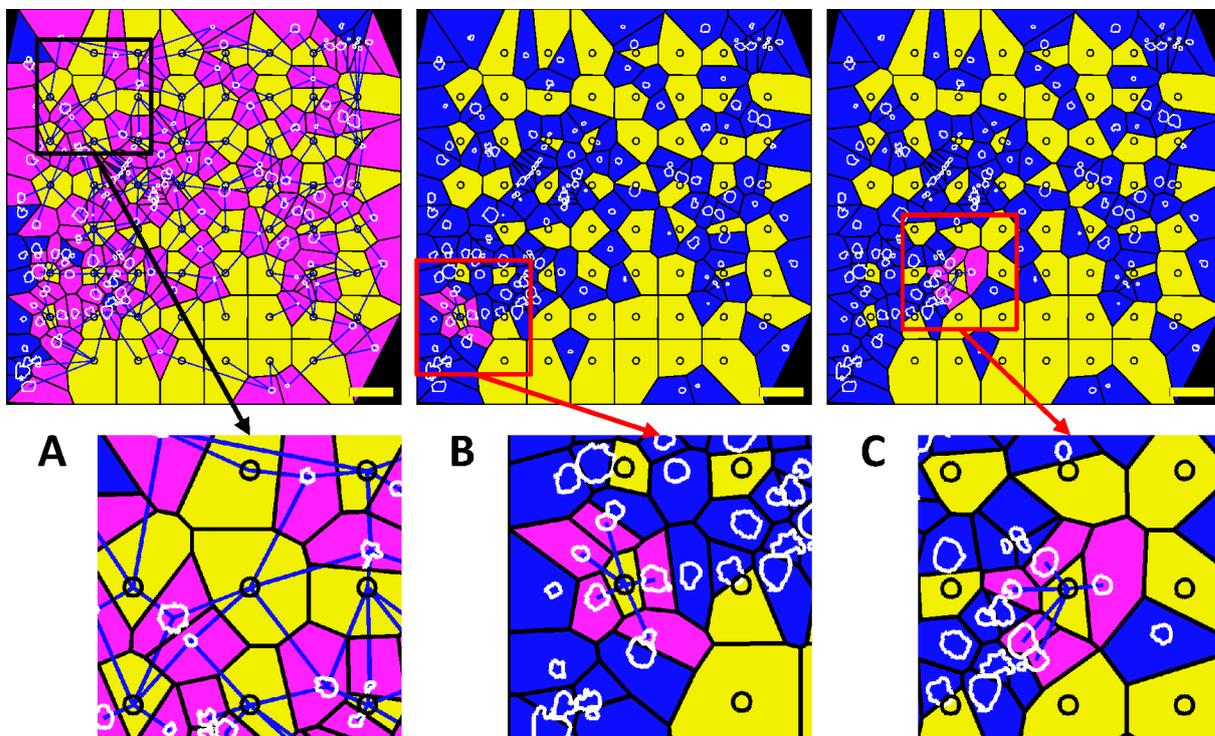


Figura A.28: Visualização da classificação topológica baseada no diagrama de Voronoi aplicada sobre as imagens da cultura MEA\_05. (A) Classificação realizada considerando todos os microeletrodos. (B) Classificação considerando apenas o microeletrodo 17. (C) Classificação considerando apenas o microeletrodo 36.

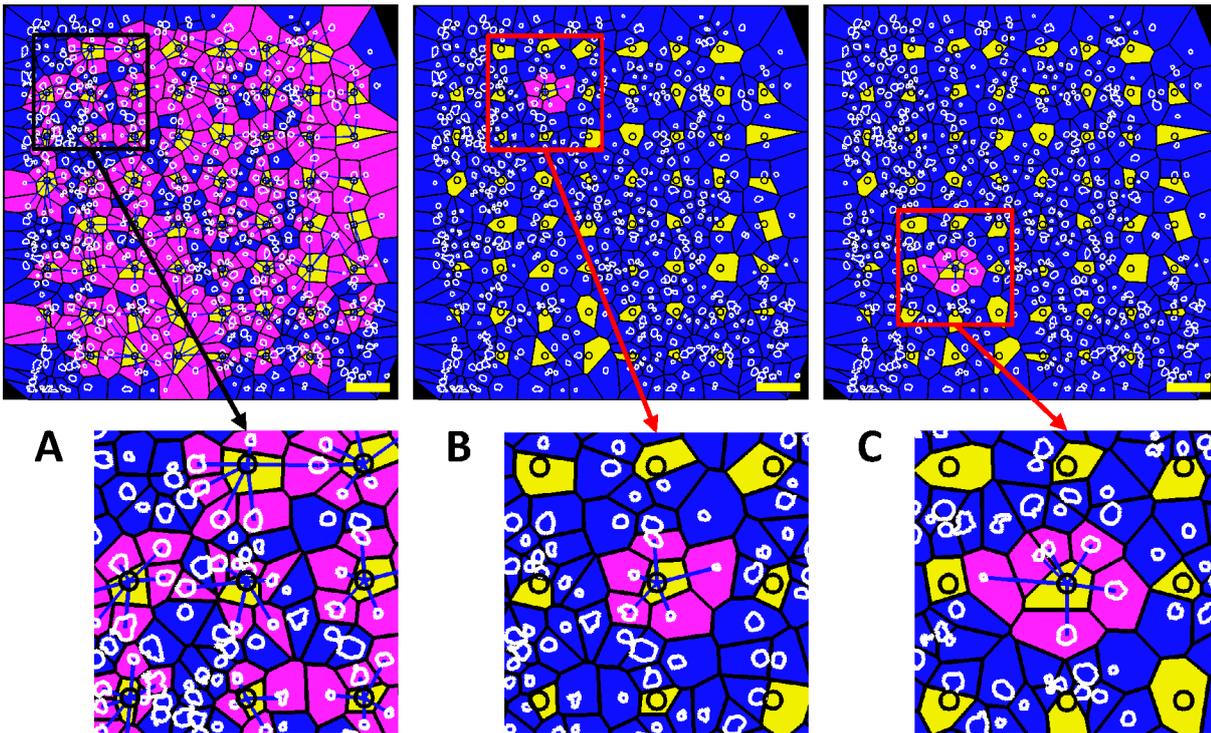


Figura A.29: Visualização da classificação topológica baseada no diagrama de Voronoi aplicada sobre as imagens da cultura MEA\_11. (A) Classificação realizada considerando todos os microeletrodos. (B) Classificação considerando apenas o microeletrodo 32. (C) Classificação considerando apenas o microeletrodo 36.

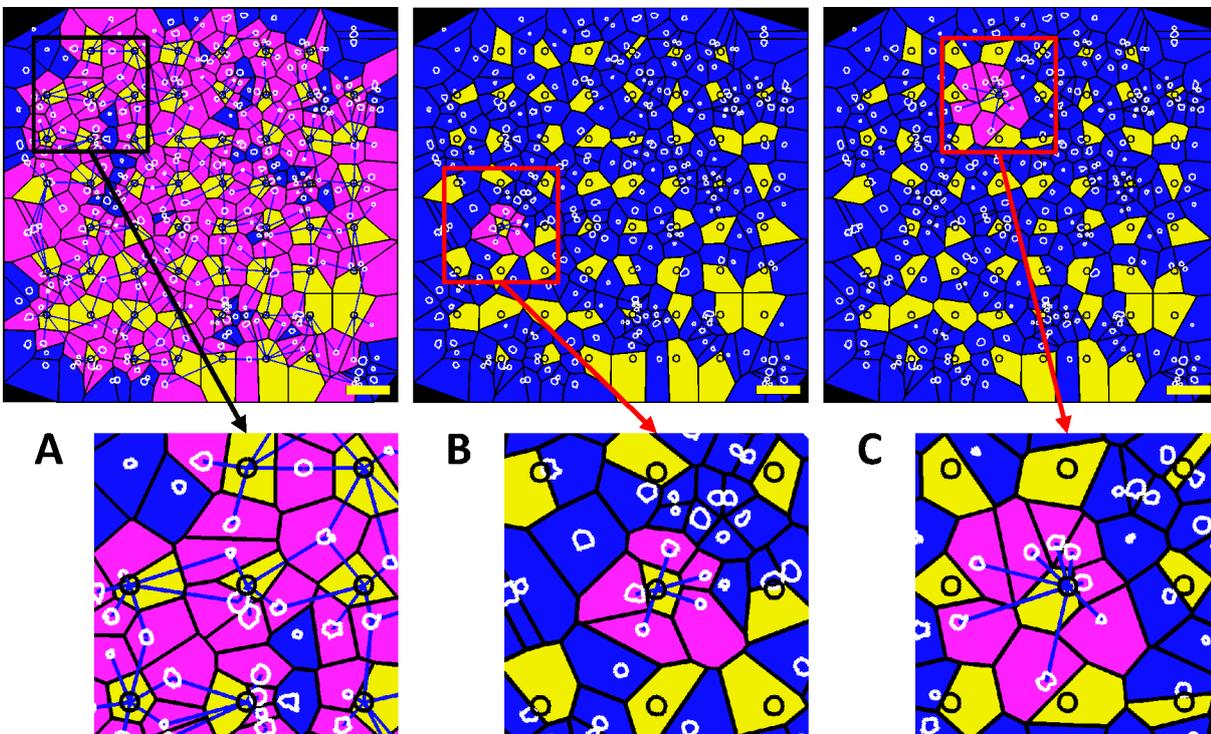


Figura A.30: Visualização da classificação topológica baseada no diagrama de Voronoi aplicada sobre as imagens da cultura MEA\_13. (A) Classificação realizada considerando todos os microeletrodos. (B) Classificação considerando apenas o microeletrodo 26. (C) Classificação considerando apenas o microeletrodo 42.

As Figuras A.31, A.32, A.33, A.34 e A.35 mostram as tabelas que resumem as medidas quantitativas obtidas a partir das imagens das culturas MEA\_01, MEA\_04, MEA\_05, MEA\_11 e MEA\_13, respectivamente. As medidas quantitativas são organizadas de acordo com a disposição dos microeletrodos na MEA.

11	21	5	1	0	31	2	2	1	41	0	0	0	51	0	3	0	61	0	1	0	71	0	1	0	81						
	0	0	0	6	0	1	4	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0							
	7	432945.0	5	82470.6	6	286975.6	4	235322.1	5	214180.3	6	406791.4	55317.5	146.3	14085.2	85.0	40185.3	166.3	43052.7	164.4	36525.4	133.6	58726.3	173.7							
	12	2	0	0	22	0	0	0	32	1	2	0	42	0	1	0	52	0	0	0	62	1	3	1		72	1	2	2	82	1
0	0	1	1	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	3	0	0	1	4	0	1	0	0
4	319204.2	1	109610.6	4	92878.9	4	125173.5	5	135592.0	5	198656.2	3	260917.3	4	427042.0	67189.7	165.8	28223.9	250.4	11024.0	93.7	18809.8	115.7	22183.5	116.3	31037.1	154.1	68630.0	166.4	93456.5	169.5
13	0	3	0	23	1	0	0	33	0	0	1	43	0	0	0	53	1	0	1	63	0	2	0	73	0	2	0	83	1	0	0
0	1	0	2	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0	2	0	1	0	0	0
5	125179.7	4	127698.2	1	108706.8	1	109610.6	3	141084.7	2	152179.5	2	129920.3	2	421051.0	19385.6	97.4	19228.4	130.0	34937.3	155.9	28223.9	250.4	25154.9	153.5	38841.9	189.8	42350.5	103.0	101579.1	148.0
14	5	3	0	24	0	0	0	34	0	0	0	44	0	0	0	54	0	0	0	64	0	0	0	74	0	0	0	84	0	3	0
0	1	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
8	190530.5	8	203065.9	6	157379.4	1	106116.3	1	111758.8	2	113695.4	3	238377.3	2	291046.0	20260.9	133.3	21755.9	134.0	20607.7	98.2	37818.9	119.7	30200.9	239.1	28036.7	97.2	54087.2	216.5	68194.6	130.7
15	25	0	1	0	35	2	3	0	45	0	0	0	55	0	0	0	65	0	1	0	75	0	1	0	85	5	0	0	0	0	
	0	0	0	1	0	2	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	2	2	2	2	
	4	167173.1	5	184584.6	2	145499.9	1	110797.4	2	117050.9	4	232752.7	5	409329.5	35157.2	121.3	28725.7	138.2	39273.9	162.3	30200.9	226.5	29242.4	164.3	44569.0	185.2	56136.0	185.0	185.0		
	16	4	4	0	26	0	3	0	36	0	0	0	46	1	1	1	56	0	0	0	66	0	0	0	76	0	0	0	86	2	0
0	0	1	7	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
5	264251.8	4	184037.4	3	170887.5	1	114400.7	0	81861.0	1	110034.0	3	144351.1	5	246184.0	44736.5	147.6	33416.9	154.2	34030.8	211.6	40728.9	156.5	---	---	28284.0	271.4	30910.4	125.1	45178.4	115.9
17	5	2	0	27	2	2	0	37	0	1	0	47	2	2	0	57	0	1	0	67	0	0	0	77	0	1	0	87	0	0	0
0	0	0	7	0	2	2	0	0	0	1	0	0	0	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
5	265033.2	4	123711.4	2	146364.5	0	82116.0	1	86361.3	3	166772.3	5	180032.3	5	183574.1	42974.4	167.0	26178.6	61.0	34169.5	204.7	---	---	39801.9	19.6	36129.6	151.9	26821.0	150.8	33983.1	105.7
18	28	0	0	1	38	0	0	0	48	0	0	0	58	0	0	0	68	1	1	0	78	1	0	0	88						
	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0							
	3	417359.3	2	470354.5	0	312725.4	2	316823.3	3	290212.1	5	363596.1	73270.3	204.7	77911.5	356.8	---	---	72174.9	152.9	86991.5	97.3	62640.9	148.2							

Figura A.31: Tabela que resume e organiza as principais medidas quantitativas obtidas da cultura de neurônios na MEA\_01. A tabela segue a distribuição espacial dos microeletrodos no modelo de MEA. Cada bloco delimitado por bordas escuras representam um microeletrodo numerado na primeira célula da primeira linha. O restante da primeira linha armazena as medidas morfológicas. A segunda linha armazena as medidas topológicas. A terceira e quarta linhas armazenam valores relacionados ao 1-anel do microeletrodo.

11	21	2	6	5	31	0	1	0	41	1	0	1	51	0	5	6	61	0	4	2	71	4	2	3	81						
	0	4	4	5	0	0	1	0	0	0	1	1	0	3	4	4	0	1	3	2	0	3	3	3							
	4	33212.2	5	121938.8	5	90371.1	6	71493.9	5	176975.0	4	90025.5	7010.6	43.6	21510.1	109.8	15834.7	79.0	10152.7	72.8	28874.2	119.0	20700.8	57.4							
	12	1	3	4	22	1	2	1	32	0	0	0	42	3	5	0	52	0	4	4	62	0	1	3		72	0	3	0	82	1
1	2	1	4	0	0	2	2	0	0	0	0	1	0	6	1	2	0	4	2	0	0	2	2	0	0	2	1	0	0	0	1
3	53654.6	7	187963.2	5	106311.0	7	170371.8	4	50772.5	7	145032.8	7	132331.8	5	207596.8	16234.1	34.9	22465.1	126.1	18601.0	88.5	21084.0	109.9	11722.7	56.4	16919.3	116.1	16863.2	93.2	36880.1	92.6
13	0	6	2	23	1	3	2	33	0	0	1	43	1	2	1	53	1	0	2	63	0	3	0	73	1	3	4	83	0	0	0
0	2	4	2	0	2	2	0	0	1	0	0	2	0	1	1	1	0	0	1	2	0	0	5	3	0	0	0	0	0	0	0
7	153273.9	6	117673.0	6	164174.6	7	187963.2	6	121926.5	7	168665.4	5	156452.4	3	334329.5	17029.6	92.1	18008.1	89.4	24072.0	114.8	22465.1	126.1	16428.2	111.6	19549.5	132.4	25984.4	109.5	45829.9	169.9
14	1	2	1	24	0	4	4	34	0	0	0	44	0	1	5	54	0	0	0	64	0	1	1	74	0	1	3	84	1	0	1
0	1	1	2	1	2	2	3	0	0	0	0	0	3	2	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	2	0	1	1	0
5	254719.8	6	133285.8	6	220902.7	5	101658.5	4	87464.1	8	190848.5	6	161637.9	3	375309.7	39606.6	149.3	19079.9	100.7	29495.6	149.5	19046.8	57.3	19252.1	67.8	19551.2	143.3	21707.7	113.9	31591.8	174.3
15	25	2	2	2	35	0	1	3	45	0	0	0	55	0	0	0	65	1	1	1	75	0	2	2	85	0	2	1	88		
	0	1	3	2	1	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	1	2	1	0	0	3	0		0	0
	8	269946.8	4	211039.8	5	218548.0	5	206619.6	5	136989.1	5	127614.6	4	27395.9	28032.1	154.6	42297.9	149.3	33930.2	152.8	32404.0	143.6	23794.6	96.0	22536.0	91.7	36903.5	105.2			
	16	2	4	4	26	0	3	0	36	1	1	2	46	0	0	0	56	0	0	0	66	0	0	1	76	0	0	2		86	0
0	1	2	7	0	0	3	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	2	0	0	1	1	1	0
9	203546.2	3	121036.4	2	161707.2	2	171233.0	2	164477.7	4	172316.8	4	147670.6	5	253711.5	20145.5	114.4	32628.7	76.8	47786.3	142.5	42457.7	216.1	40694.1	204.7	30339.5	141.1	29432.9	124.8	46308.0	107.0
17	1	1	1	27	0	0	0	37	0	0	0	47	0	0	0	57	0	2	4	67	0	1	2	77	0	3	2	87	0	2	2
0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	1	0	0	1	2	1	1	2	1	1	2	1	0
6	303099.9	5	243810.1	2	163677.0	0	91039.1	1	123872.3	3	134449.9	5	137508.5	6	362441.9	39306.7	156.6	37771.1	172.4	48654.3	162.1	---	---	45272.8	134.7	31302.7	104.3	24364.6	87.5	56073.9	123.9
18	28	3	5	0	38	0	0	1	48	0	0	1	58	0	0	1	68	0	0	1	78	0	1	1	88						
	0	1	1	6	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	1	1	0	0	0
	4	193999.0	2	360564.6	0	299098.8	1	331834.7	4	405714.1	3	241709.3	37251.2	114.0	49271.3	202.7	---	---	45272.8	160.2	55048.6	193.1	64442.1	121.3							
	17974.5	81.5	20320.5	91.1	29370.5	157.4	43288.9	180.8	41575.5	178.8	33184.4	142.9	29961.9	142.0	61110.5	178.9															

Figura A.32: Tabela que resume e organiza as principais medidas quantitativas obtidas da cultura de neurônios na MEA\_04. A tabela segue a distribuição espacial dos microeletrodos no modelo de MEA. Cada bloco delimitado por bordas escuras representam um microeletrodo numerado na primeira célula da primeira linha. O restante da primeira linha armazena as medidas morfológicas. A segunda linha armazena as medidas topológicas. A terceira e quarta linhas armazenam valores relacionados ao 1-anel do microeletrodo.

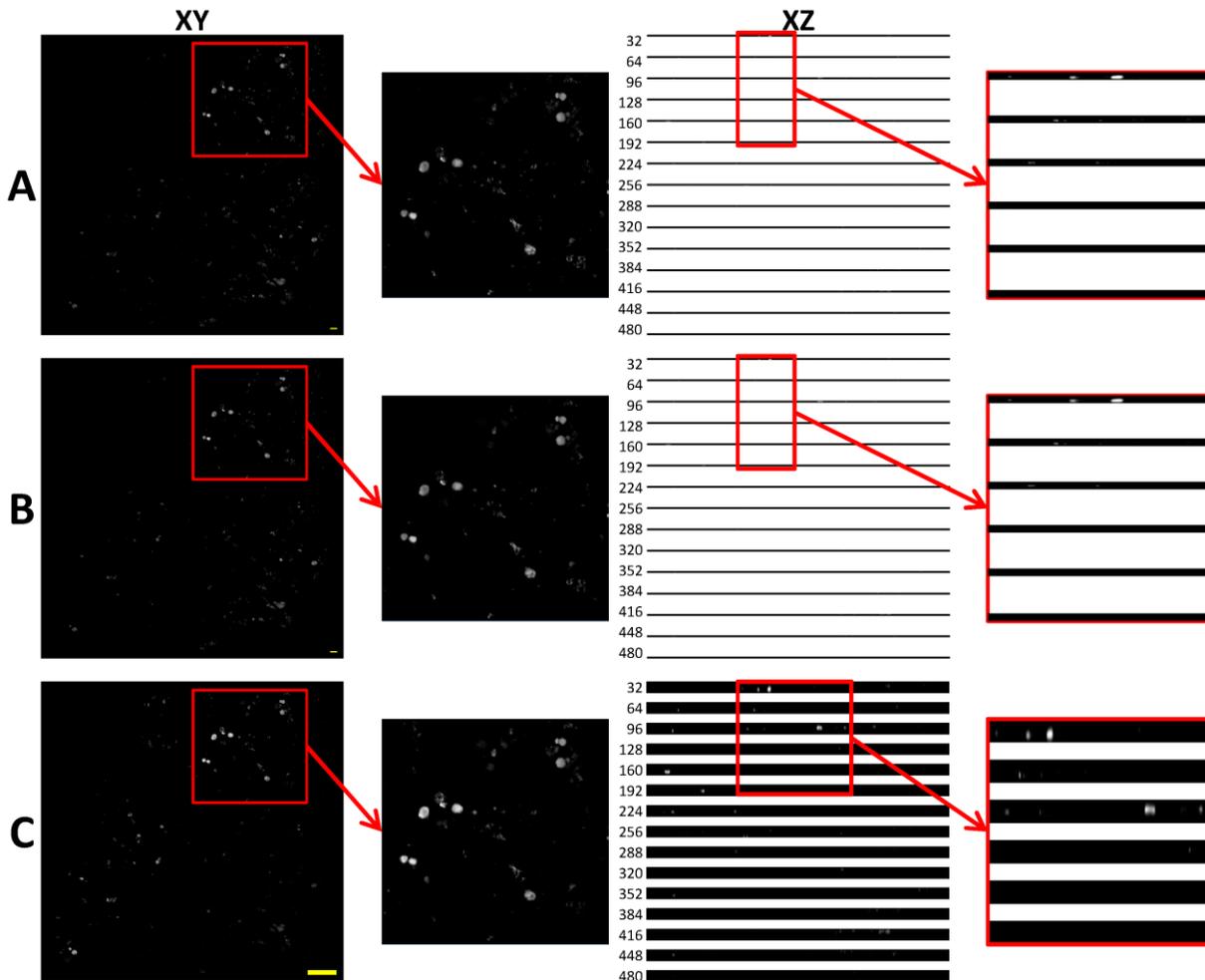
11	21	0	2	0	31	0	1	0	41	1	2	1	51	1	0	0	61	0	1	0	71	1	0	1	81						
	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	3	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0							
	2	278879.3	5	529512.1	4	288687.8	3	142107.6	5	363139.5	4	192486.8	89681.8	132.2	66555.7	204.6	48956.5	176.0	38567.2	90.3	54939.2	220.2	39480.1	104.8							
	12	0	2	9	22	1	0	0	32	0	0	1	42	0	0	0	52	1	2	0	62	0	0	0		72	0	0	1	82	0
0	1	7	3	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1
4	306128.8	5	140749.0	5	197904.4	5	243559.8	4	191523.6	4	225732.8	4	170372.0	9	538899.2	65371.4	153.1	25468.8	81.8	29947.9	162.1	34802.8	194.0	35808.4	149.5	41709.8	164.1	34960.1	111.2	36196.2	195.3
13	2	1	2	23	0	1	2	33	1	3	0	43	1	0	0	53	0	1	0	63	1	0	1	73	4	1	0	83	0	1	1
0	0	2	3	0	0	3	0	0	2	2	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	3	2	0	0	0	0	2
5	208355.6	6	143289.1	5	128183.0	5	140749.0	4	195444.9	5	209314.8	4	182120.9	5	235903.2	36831.4	123.3	18053.9	130.8	23874.4	78.4	25468.8	81.8	32699.5	169.9	31186.4	158.6	33196.6	151.7	41330.8	131.8
14	0	2	1	24	2	1	1	34	4	3	1	44	0	0	0	54	0	0	1	64	0	0	0	74	0	0	0	84	0	2	1
0	1	1	1	0	0	4	0	0	0	4	4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
6	269005.3	7	147215.6	10	166581.0	8	205307.4	4	152868.5	6	206323.0	5	169572.5	4	272998.4	35142.5	172.4	15969.4	117.7	14232.7	119.0	22580.1	114.8	30481.8	125.8	29774.9	121.3	27099.2	119.7	52880.7	118.1
15	25	2	1	1	35	0	2	0	45	3	2	0	55	0	0	0	65	0	0	0	75	6	1	3	85	0	1	0	88		
	0	0	4	0	0	1	0	1	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	8	0	0	0	0		0	1
	9	208032.7	6	168654.8	5	219556.2	4	225603.3	4	157652.7	5	163009.2	4	280099.7	20110.6	125.8	21953.6	134.6	33548.2	164.6	42528.3	153.0	33023.0	106.2	28294.7	110.3	56960.5	154.3			
	16	1	5	6	26	0	0	4	36	0	3	3	46	0	2	0	56	0	0	0	66	0	1	4	76	1	0	1		86	0
0	2	1	9	1	0	2	1	0	2	1	0	3	0	0	2	0	0	0	0	0	1	2	2	0	0	1	1	0	1	1	0
6	95682.4	6	112603.6	5	111158.3	4	207987.6	3	187618.6	4	205868.7	4	103796.5	4	249210.6	13898.8	80.9	15996.1	94.4	18709.7	93.4	41766.2	129.2	44121.0	151.0	35410.5	162.7	22406.5	58.2	44193.3	197.1
17	0	0	3	27	1	1	4	37	1	0	1	47	0	1	0	57	0	1	0	67	0	0	0	77	0	0	3	87	0	1	0
0	0	3	0	0	1	3	2	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	
5	101990.6	4	107704.9	6	233842.7	3	199716.4	1	127912.3	1	113475.6	4	180343.7	4	318646.3	17974.5	81.5	20320.5	91.1	29370.5	157.4	43288.9	180.8	41575.5	178.8	33184.4	142.9	29961.9	142.0	61110.5	178.9

11	21	2	6	0	31	4	4	0	41	3	6	0	51	8	8	0	61	2	6	1	71	1	6	0	81						
	0	1	5	2	0	1	4	3	0	3	5	1	0	4	9	3	0	3	3	3	0	3	3	1							
	6	78489.0	6		5	85209.7	6		5	78933.6	8		5	159835.5	5		5	107495.4	7		5	206883.8	8								
	10566.4	90.5	12258.6	76.0	12971.0	80.1	17873.5	104.7	19151.1	81.9	25547.5	117.3																			
12	3	11	3	22	3	7	0	32	4	5	0	42	2	6	0	52	1	8	0	62	4	8	0	72	3	3	1	82	0	4	0
0	1	6	10	0	2	6	2	0	1	6	2	1	0	4	3	1	4	4	0	0	2	5	5	0	1	5	1	0	1	1	2
6	58744.6	7		7	107282.4	5		5	75026.7	5		6	62166.8	6		6	66662.0	7		7	87369.8	6		6	92935.2	5		5	126700.2	6	
8376.3	69.9	13194.1	93.0	12922.2	70.7	11017.6	56.1	9491.3	79.2	10715.7	82.8	13102.5	80.7	22540.3	81.1																
13	2	12	3	23	7	8	1	33	3	4	1	43	3	7	0	53	3	2	2	63	1	4	0	73	3	4	0	83	3	3	1
1	5	8	3	1	2	12	1	0	4	4	0	0	2	6	2	0	1	3	3	0	1	2	2	0	2	3	2	0	1	2	4
7	43026.6	4		5	33309.1	5		5	54795.6	7		7	107282.4	6		6	124025.2	5		5	54861.6	5		5	89896.8	4		4	181094.5	5	
5351.8	58.3	7114.2	46.9	9832.7	53.1	13194.1	93.0	17100.8	103.5	9667.9	56.2	16877.6	62.5	37883.0	116.3																
14	7	8	0	24	4	8	1	34	3	5	1	44	4	6	0	54	6	2	0	64	2	6	1	74	1	1	0	84	0	3	0
0	1	5	9	0	0	10	3	0	3	4	2	2	2	5	1	0	3	5	0	0	2	7	0	0	0	1	1	1	0	2	0
9	144073.0	5		5	38264.3	6		5	75235.8	5		5	41049.7	6		6	61500.3	6		6	63559.3	6		6	98298.6	4		4	155685.5	5	
14104.3	105.4	6702.3	48.3	10682.7	76.3	7309.2	42.0	8786.2	65.1	9426.1	62.8	14662.7	69.7	35193.0	78.4																
15	25	3	4	2	35	1	4	0	45	4	6	0	55	1	2	0	65	2	6	1	75	5	4	0	85	4	4	0			
0	1	6	2	0	0	5	0	0	5	3	2	0	0	3	0	0	4	5	0	0	1	2	6	0	3	3	2				
8	95527.7	6		6	78069.2	8		8	87920.0	7		7	47951.9	6		6	65157.8	5		5	89755.8	5		5	171995.1	6					
9521.9	98.1	11255.8	70.3	9464.4	84.7	5999.1	57.7	9314.6	77.8	15142.0	76.7	29376.2	119.6																		
16	8	14	1	26	5	14	6	36	4	4	0	46	0	4	0	56	4	4	1	66	4	5	0	76	2	5	1	86	1	1	0
0	4	5	14	0	3	5	17	1	5	2	0	0	0	2	2	0	1	7	1	0	2	5	2	0	7	1	0	0	1	1	0
6	59767.4	5		5	78118.3	6		6	111958.9	6		6	82226.2	6		6	49503.6	7		7	69949.2	8		8	166680.9	5		5	95498.5	6	
9004.2	62.5	13512.3	75.4	15957.5	88.3	12372.7	67.9	7549.3	46.1	8403.3	75.8	16488.5	137.7	17049.1	83.8																
17	2	5	1	27	3	8	2	37	2	4	1	47	1	3	0	57	2	7	1	67	4	6	0	77	5	3	3	87	5	13	1
2	2	1	3	0	5	7	1	0	1	3	3	0	1	1	2	0	0	6	4	0	2	4	4	0	5	6	0	1	2	4	12
4	103354.0	8		7	99234.9	7		7	74744.4	6		6	147527.3	7		7	102594.7	8		8	78140.7	5		5	40186.2	6		6	60562.0	7	
24689.4	54.4	10977.8	88.0	8803.5	76.9	20457.6	114.3	12849.2	79.8	8430.8	79.6	6860.2	51.0	9121.2	63.2																
18	28	5	13	3	38	2	4	0	48	3	7	0	58	4	6	0	68	1	9	1	78	9	11	3							
0	1	5	15	0	1	4	1	0	2	3	5	1	4	3	2	0	1	7	3	0	5	4	14								
5	60455.1	7		7	127733.8	8		8	227690.8	6		6	104102.6	4		4	45305.3	6		6	57243.1										
10622.6	55.9	15481.1	108.8	24697.0	144.9	16034.2	62.9	9931.4	52.9	8613.6	51.3																				

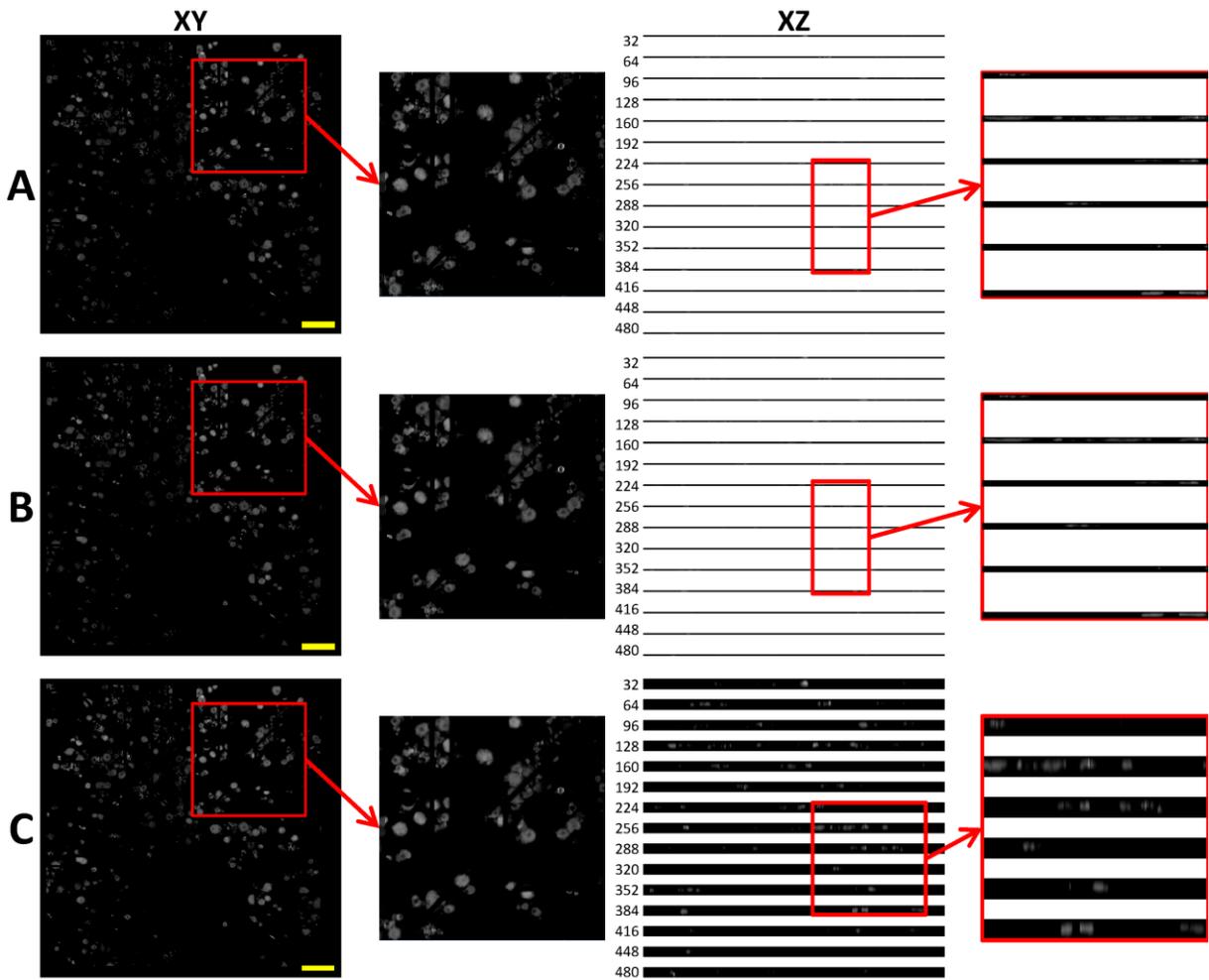
Figura A.34: Tabela que resume e organiza as principais medidas quantitativas obtidas da cultura de neurônios na MEA\_11. A tabela segue a distribuição espacial dos microeletrodos no modelo de MEA. Cada bloco delimitado por bordas escuras representam um microeletrodo numerado na primeira célula da primeira linha. O restante da primeira linha armazena as medidas morfológicas. A segunda linha armazena as medidas topológicas. A terceira e quarta linhas armazenam valores relacionados ao 1-anel do microeletrodo.

11	21	2	3	0	31	0	7	0	41	2	2	0	51	1	8	0	61	2	5	0	71	5	4	0	81						
	0	1	4	0	0	0	3	0	0	0	2	2	1	1	2	5	0	5	1	1	1	3	5	0							
	5	196438.7	6		6	184355.6	7		7	180941.5	5		5	97666.4	5		5	75104.6	4		4	70819.1	5								
	33691.2	119.6	26698.4	127.0	21620.7	131.9	17822.8	92.2	13685.0	51.5	15633.0	55.9																			
12	1	5	0	22	0	3	0	32	2	1	0	42	1	4	0	52	2	2	0	62	2	2	0	72	1	1	0	82	1	3	0
1	1	2	2	0	1	2	0	1	1	1	0	1	1	3	0	0	0	3	1	0	2	2	0	0	1	1	0	0	0	3	1
6	120440.9	5		5	165601.1	5		5	136985.8	8		8	200923.5	6		6	87958.9	5		5	104334.2	6		6	82876.0	5		5	92104.0	6	
17308.2	101.0	27876.1	126.8	24285.4	94.4	22725.0	106.8	12659.8	86.4	18333.3	91.7	11804.9	80.7	17186.9	60.3																
13	4	4	0	23	2	3	0	33	2	6	0	43	0	3	0	53	0	1	0	63	0	3	0	73	1	2	1	83	0	2	0
0	0	6	2	0	2	2	1	0	1	5	2	0	1	2	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	2	1	1	1	0	1	0
6	106866.2	7		6	111851.0	6		6	146246.4	5		5	165601.1	4		4	93569.0	6		6	120663.1	7		7	162317.0	7		7	170717.1	6	
15831.9	81.5	13816.7	83.8	20705.2	112.4	27876.1	126.8	20140.4	79.3	17084.4	109.6	18987.0	130.6	20414.2	130.0																
14	1	5	0	24	0	3	0	34	1	3	0	44	0	7	0	54	5	3	0	64	2	4	0	74	5	5	0	84	0	2	0
0	1	1	4	0	0	2	1	0	0	4	0	0	3	3	1	0	1	4	3	1	1	3	1	0	2	0	8	0	1	1	0
7	278880.3	6		6	130668.8	5		5	80957.4	6		6	151832.8	7		7	168365.2	6		6	119413.3	5		5	52797.4	6		6	183713.5	7	
34764.2	145.8	18270.8	119.5	13125.8	83.7	20945.4	112.4	20396.9	113.2	17346.7	97.2	9907.8	46.0	26362.1	118.7																
15	25	2	5	0	35	2	0	0	45	1	2	0	55	2	1	1	65	2	3	0	75	6	6	0	85	1	2	0			
0	0	3	4	0	0	0	2	0	1	0	2	1	0	3	0	0	1	3	1	1	2	5	4	1	2	0	0				
5	103412.7	6		6	133604.7	5		5	75531.9	6		6	148442.3	7		7	130563.3	6		6	160603.8	5		5	191899.3	6					
18686.7	70.1	19187.8	99.1	13545.7	62.0	22206.0	100.6	16218.9	90.1	21376.7	121.9	30957.6	121.0																		
16	1	4	0	26	2	3	0	36	3	0	0	46	2	1	0	56	5	6	0	66	0	1	0	76	1	2	0	86	3	8	0
1	0	1	3	0	2	2	1	0	1	1	0	2	5	4	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	2	4	4
8	254171.1	6		6	183815.6	6		6	177418.0	5		5	153236.6	5		5	170718.4	4		4	162938.7	4		4	173401.7	5		5	28395.5	6	
28395.5	131.6	26450.4	116.3	24724.5	115.1	23584.6	108.8	25715.2	122.3	27529.5	137.9	30356.7	122.1	36458.3	66.6																
17	1	4	2	27	1	0	0	37	0	4	0	47	0	4	0	57	3	2	0	67	4	3	0	77							

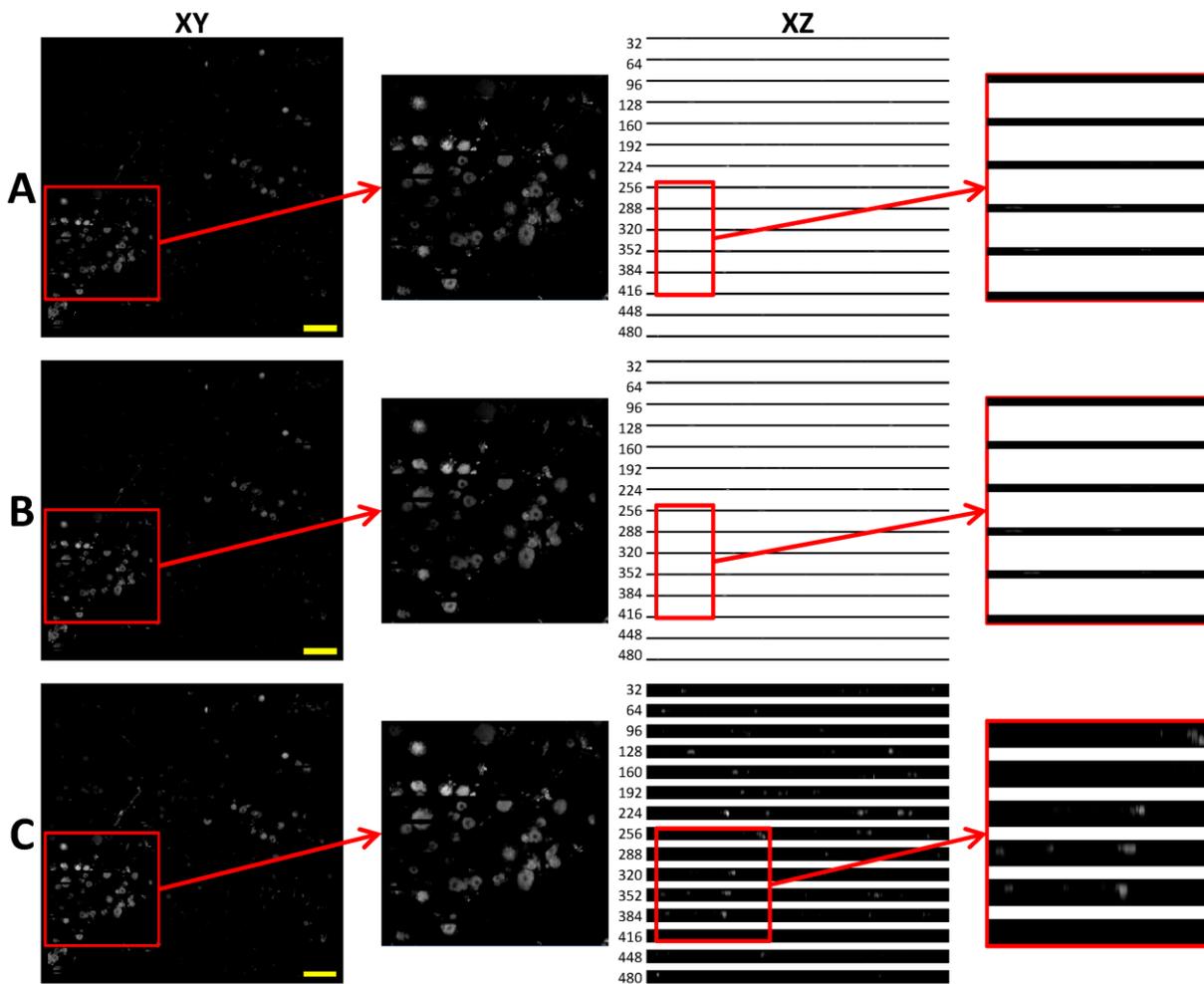
As Figuras A.36, A.37, A.38, A.39 e A.40 mostram os resultados da interpolação das imagens 3D das culturas MEA\_01, MEA\_04, MEA\_05, MEA\_11 e MEA\_13, respectivamente.



**Figura A.36:** Resultado do processo de filtragem do ruído no domínio de Anscombe seguido da reamostragem da imagem por interpolação tri-cúbica aplicados sobre a imagem volumétrica da cultura MEA\_01. (A) Imagem volumétrica original. (B) Resultado da filtragem do ruído utilizando o filtro de médias não locais, no domínio de Anscombe, com pré-filtragem pelo filtro da mediana. (C) Imagem reamostrada utilizando interpolação tri-cúbica. A imagem foi subamostrada por um fator de 4 nos eixos X e Y, e super amostrada no eixo-Z para apresentar aspecto isotrópico. A coluna da esquerda mostra a visão dos eixos X-Y da seção óptica central (4 para A e B e 8 para C). A coluna da direita mostra seções transversais (X-Z) em diferentes valores de Y. Os quadros em vermelho mostram detalhes de cada imagem.



**Figura A.37: Resultado do processo de filtragem do ruído no domínio de Anscombe seguido da reamostragem da imagem por interpolação tri-cúbica aplicados sobre a imagem volumétrica da cultura MEA\_04. (A) Imagem volumétrica original. (B) Resultado da filtragem do ruído utilizando o filtro de médias não locais, no domínio de Anscombe, com pré-filtragem pelo filtro da mediana. (C) Imagem reamostrada utilizando interpolação tri-cúbica. A imagem foi subamostrada por um fator de 4 nos eixos X e Y, e super-amostrada no eixo-Z para apresentar aspecto isotrópico. A coluna da esquerda mostra a visão dos eixos X-Y da seção óptica central (4 para A e B e 8 para C). A coluna da direita mostra seções transversais (X-Z) em diferentes valores de Y. Os quadros em vermelho mostram detalhes de cada imagem.**



**Figura A.38:** Resultado do processo de filtragem do ruído no domínio de Anscombe seguido da reamostragem da imagem por interpolação tri-cúbica aplicados sobre a imagem volumétrica da cultura MEA\_05. (A) Imagem volumétrica original. (B) Resultado da filtragem do ruído utilizando o filtro de médias não locais, no domínio de Anscombe, com pré-filtragem pelo filtro da mediana. (C) Imagem reamostrada utilizando interpolação tri-cúbica. A imagem foi subamostrada por um fator de 4 nos eixos X e Y, e super-amostrada no eixo-Z para apresentar aspecto isotrópico. A coluna da esquerda mostra a visão dos eixos X-Y da seção óptica central (4 para A e B e 8 para C). A coluna da direita mostra seções transversais (X-Z) em diferentes valores de Y. Os quadros em vermelho mostram detalhes de cada imagem.

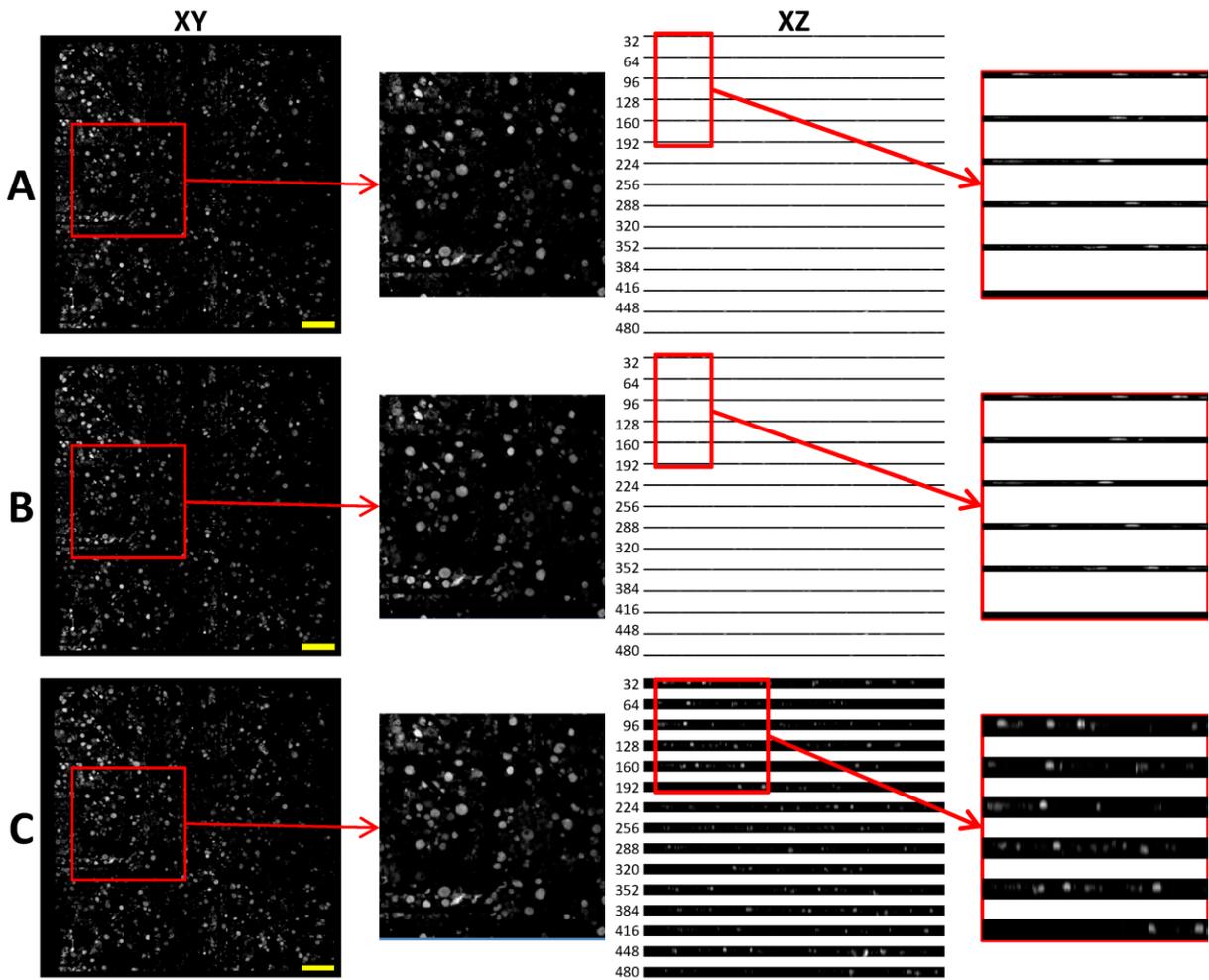
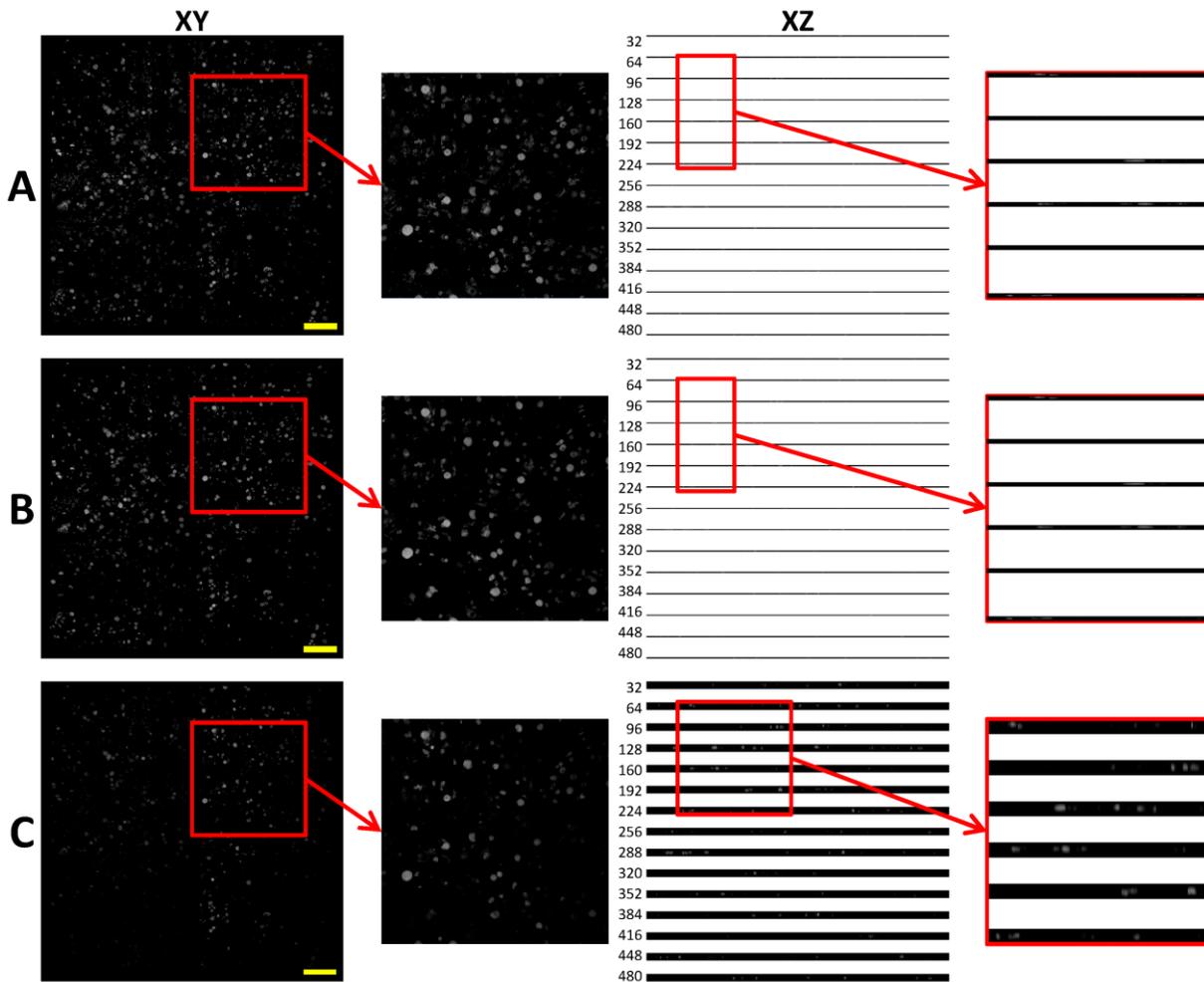
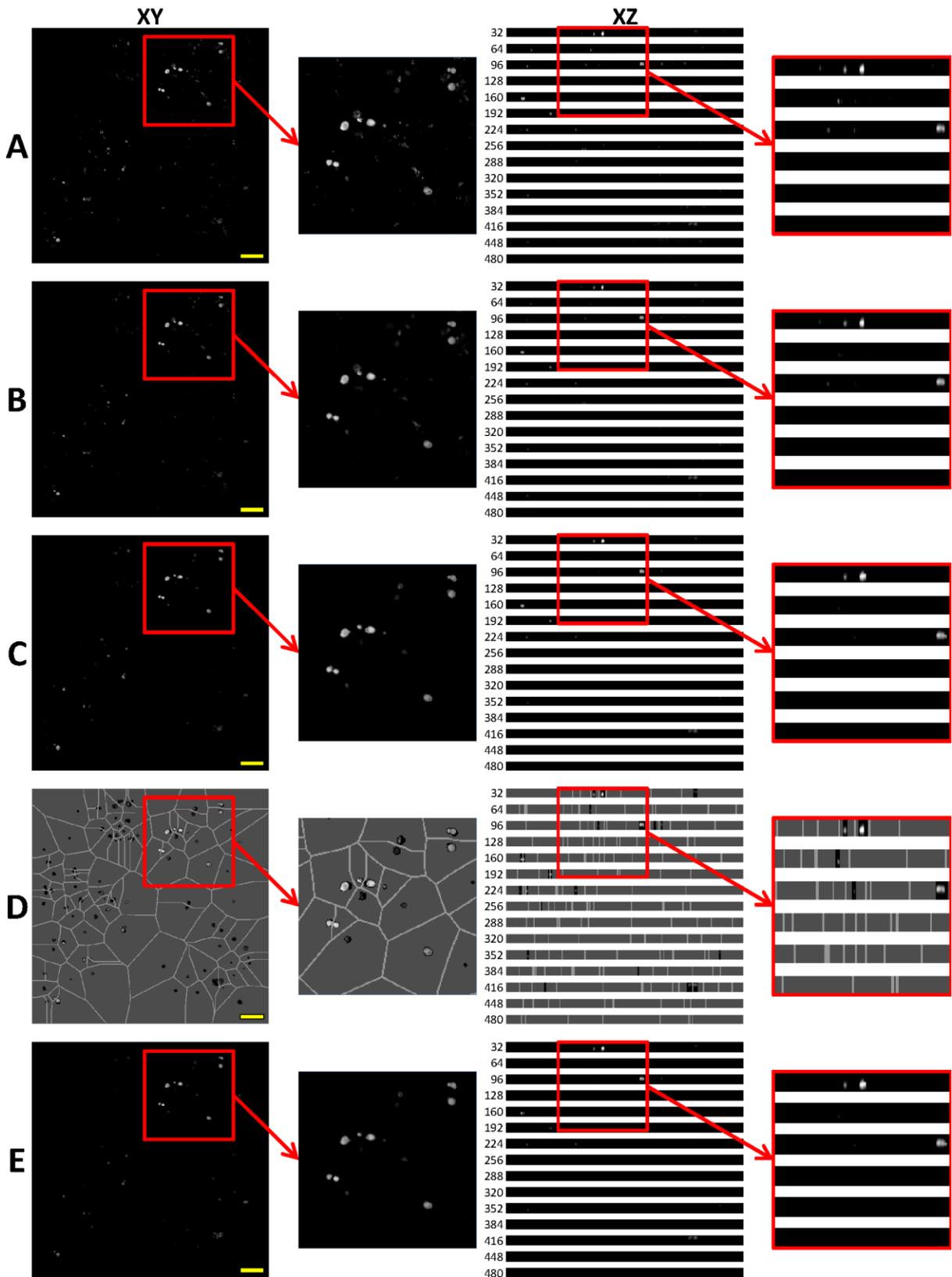


Figura A.39: Resultado do processo de filtragem do ruído no domínio de Anscombe seguido da reamostragem da imagem por interpolação tri-cúbica aplicados sobre a imagem volumétrica da cultura MEA\_11. (A) Imagem volumétrica original. (B) Resultado da filtragem do ruído utilizando o filtro de médias não locais, no domínio de Anscombe, com pré-filtragem pelo filtro da mediana. (C) Imagem reamostrada utilizando interpolação tri-cúbica. A imagem foi subamostrada por um fator de 4 nos eixos X e Y, e super-amostrada no eixo-Z para apresentar aspecto isotrópico. A coluna da esquerda mostra a visão dos eixos X-Y da seção óptica central (4 para A e B e 8 para C). A coluna da direita mostra seções transversais (X-Z) em diferentes valores de Y. Os quadros em vermelho mostram detalhes de cada imagem.

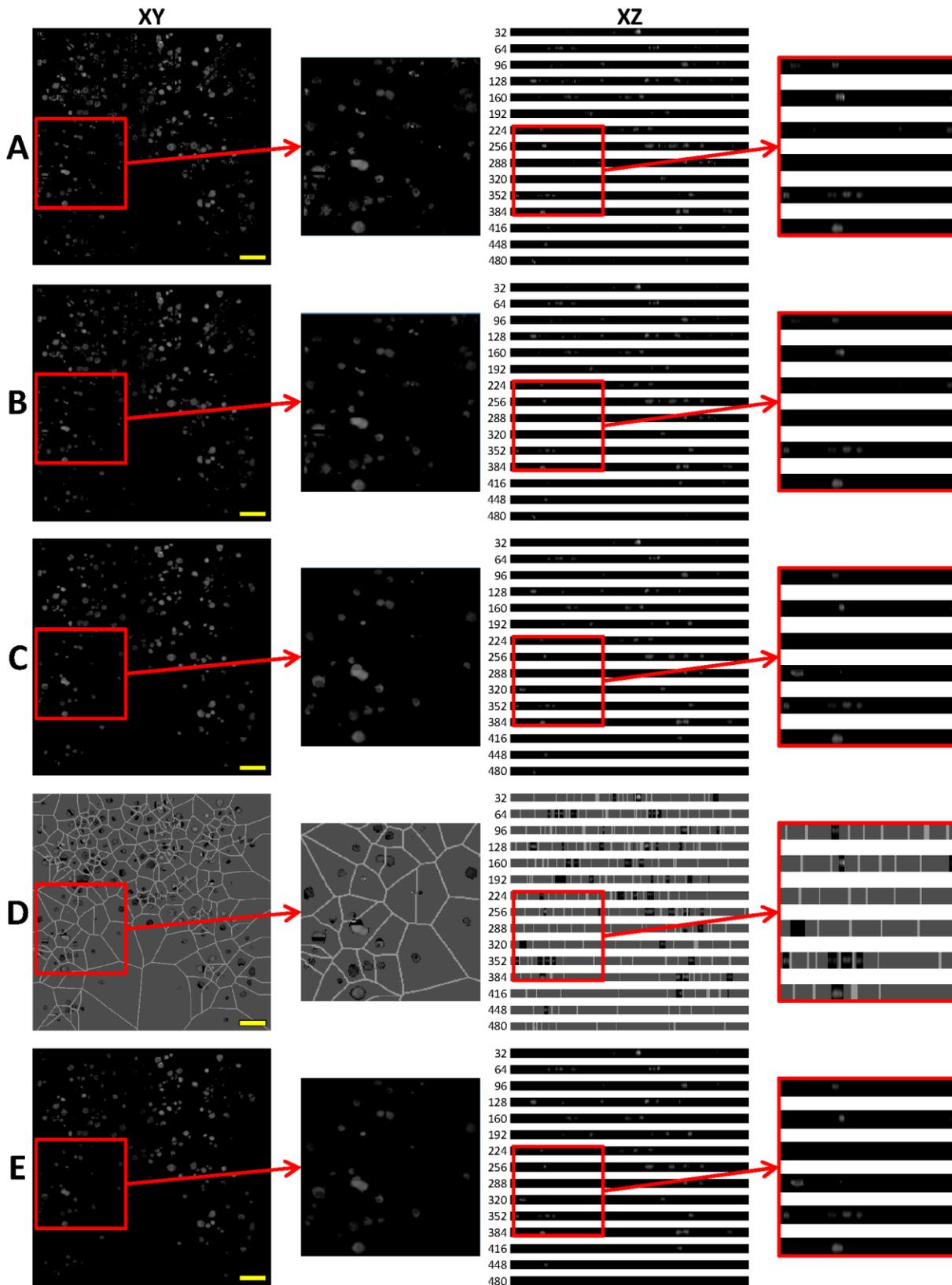


**Figura A.40:** Resultado do processo de filtragem do ruído no domínio de Anscombe seguido da reamostragem da imagem por interpolação tri-cúbica aplicados sobre a imagem volumétrica da cultura MEA\_13. (A) Imagem volumétrica original. (B) Resultado da filtragem do ruído utilizando o filtro de médias não locais, no domínio de Anscombe, com pré-filtragem pelo filtro da mediana. (C) Imagem reamostrada utilizando interpolação tri-cúbica. A imagem foi subamostrada por um fator de 4 nos eixos X e Y, e super-amostrada no eixo-Z para apresentar aspecto isotrópico. A coluna da esquerda mostra a visão dos eixos X-Y da seção óptica central (4 para A e B e 8 para C). A coluna da direita mostra seções transversais (X-Z) em diferentes valores de Y. Os quadros em vermelho mostram detalhes de cada imagem.

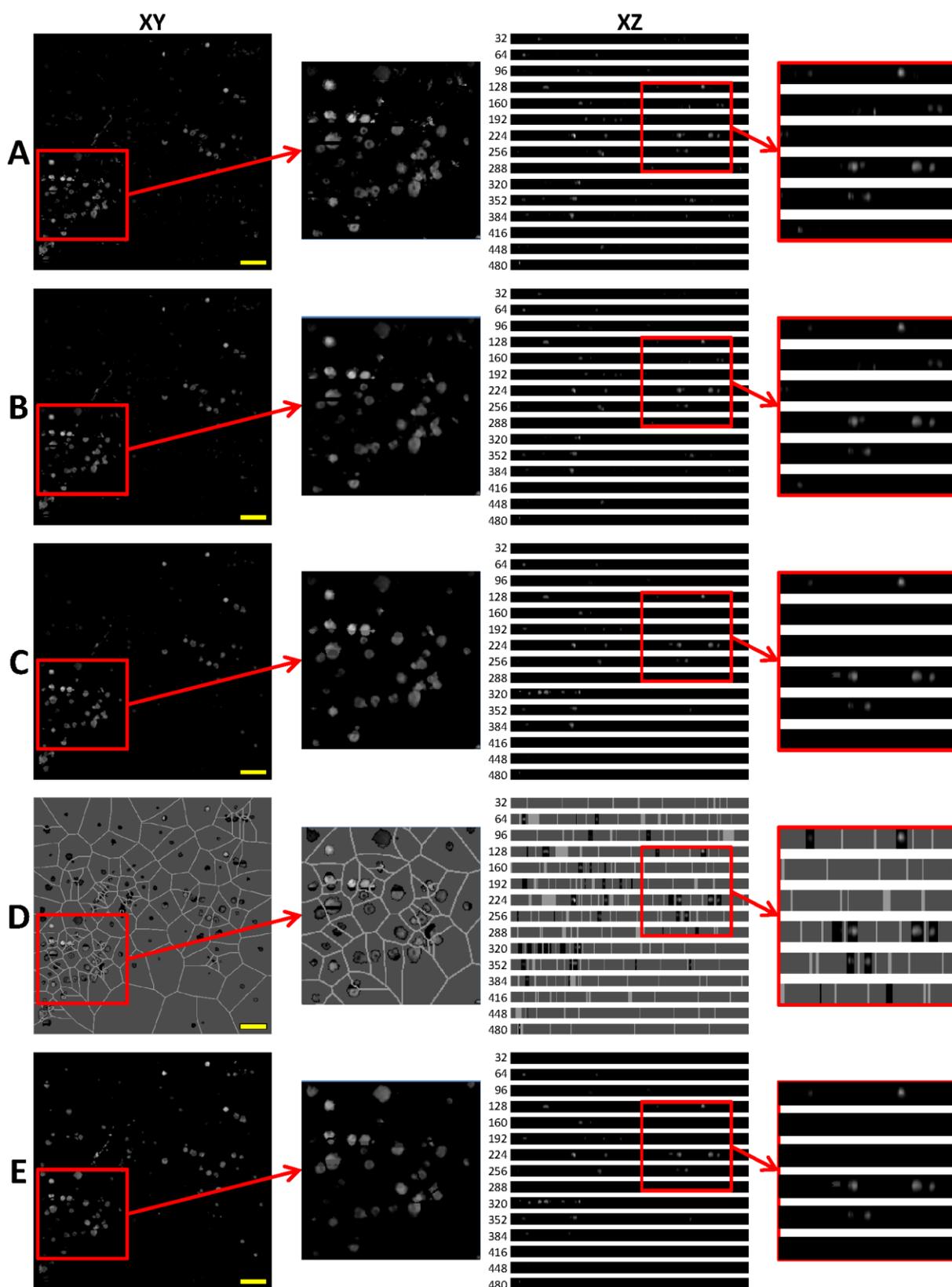
As Figuras A.41, A.42, A.43, A.44 e A.45 mostram os resultados do pré-processamento das imagens 3D das culturas MEA\_01, MEA\_04, MEA\_05, MEA\_11 e MEA\_13, respectivamente.



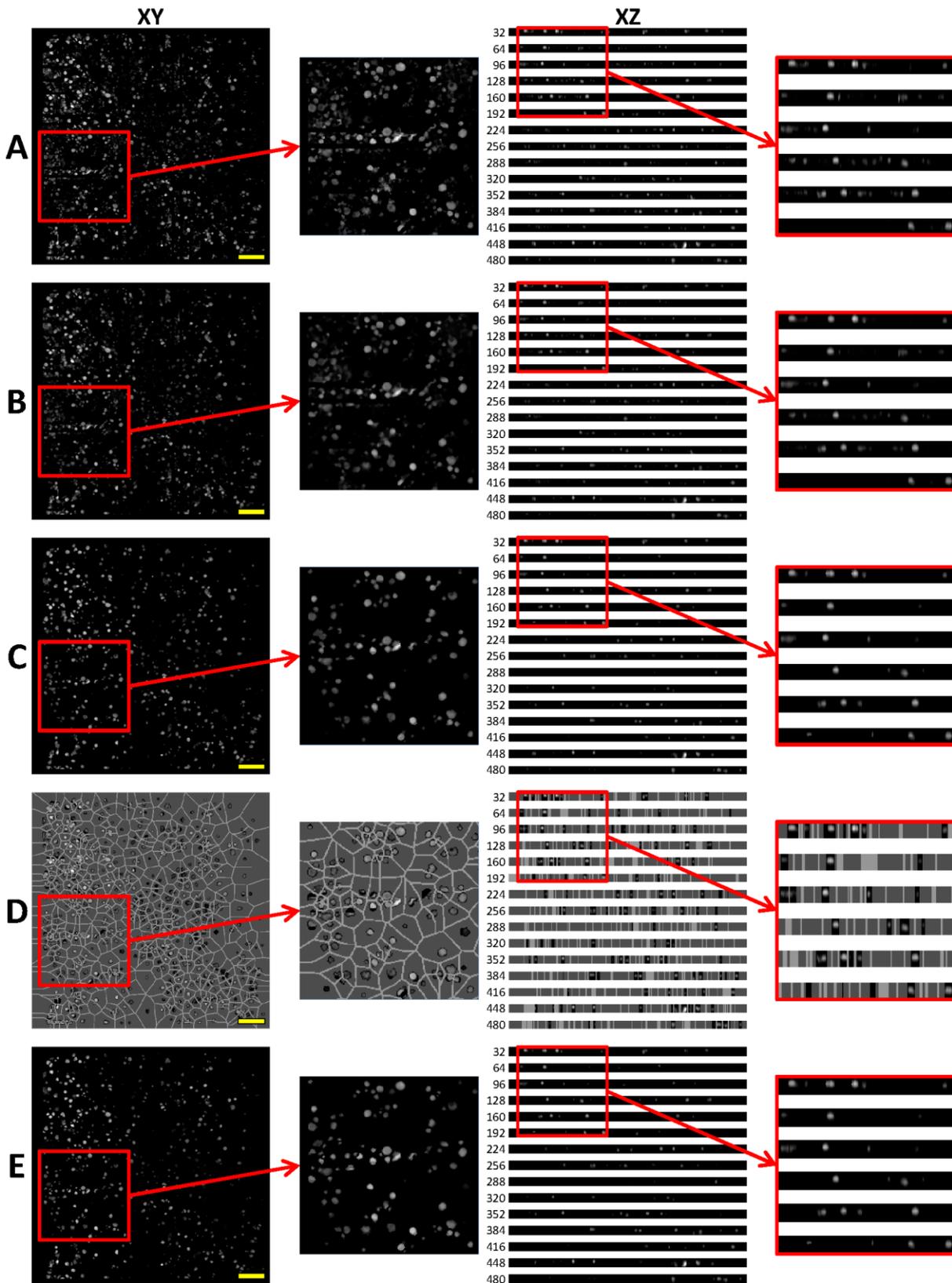
**Figura A.41:** Sequencia de operações da etapa de pré-processamento das imagens da cultura MEA\_01. A coluna da esquerda mostra a visão frontal da seção óptica central (8). A coluna da direita mostra 15 seções obtidas ao longo do eixo Y a partir de X-Z. (A) Imagem original, resultante do processo de interpolação. (B) Resultado da filtragem pela mediana 3D e do preenchimento de buracos. (C) Correção da oclusão dos neurônios. (D) Ilustração do processo de supressão do fundo e separação de agrupamentos de neurônios. (E) Resultado da subtração do fundo e do SKIZ da imagem segmentada.



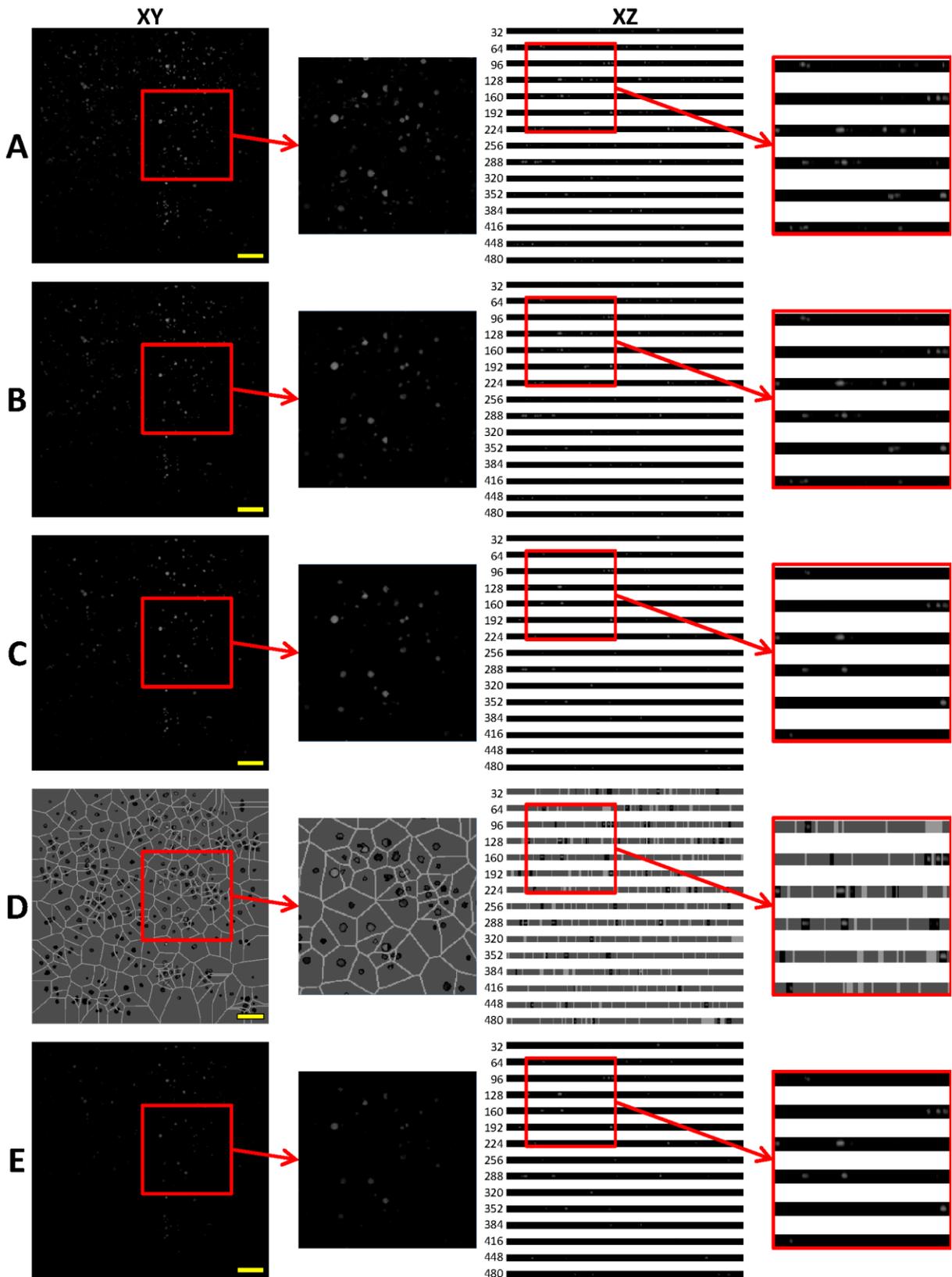
**Figura A.42:** Sequencia de operações da etapa de pré-processamento das imagens da cultura MEA\_04. A coluna da esquerda mostra a visão frontal da seção óptica central (8). A coluna da direita mostra 15 seções obtidas ao longo do eixo Y a partir de X-Z. (A) Imagem original, resultante do processo de interpolação. (B) Resultado da filtragem pela mediana 3D e do preenchimento de buracos. (C) Correção da oclusão dos neurônios. (D) Ilustração do processo de supressão do fundo e separação de agrupamentos de neurônios. (E) Resultado da subtração do fundo e do SKIZ da imagem segmentada.



**Figura A.43:** Sequencia de operações da etapa de pré-processamento das imagens da cultura MEA\_05. A coluna da esquerda mostra a visão frontal da seção óptica central (8). A coluna da direita mostra 15 seções obtidas ao longo do eixo Y a partir de X-Z. (A) Imagem original, resultante do processo de interpolação. (B) Resultado da filtragem pela mediana 3D e do preenchimento de buracos. (C) Correção da oclusão dos neurônios. (D) Ilustração do processo de supressão do fundo e separação de agrupamentos de neurônios. (E) Resultado da subtração do fundo e do SKIZ da imagem segmentada.

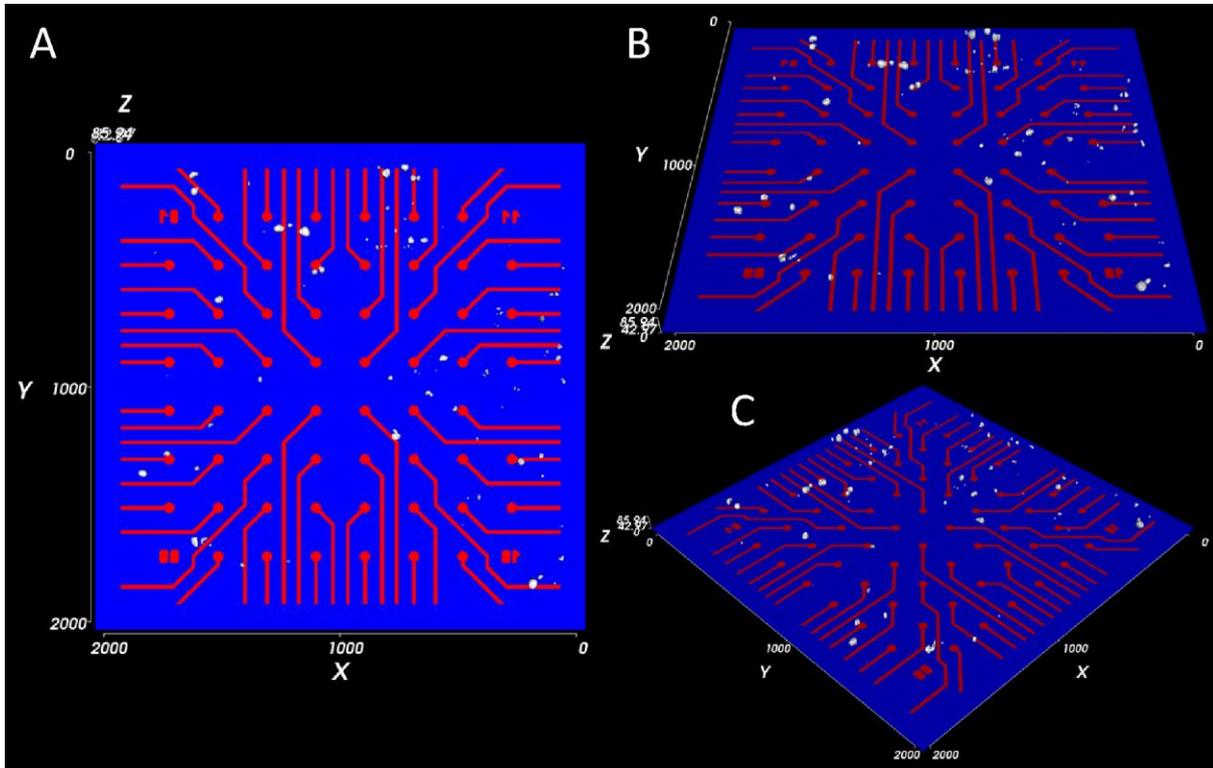


**Figura A.44:** Sequencia de operações da etapa de pré-processamento das imagens da cultura MEA\_11. A coluna da esquerda mostra a visão frontal da seção óptica central (8). A coluna da direita mostra 15 seções obtidas ao longo do eixo Y a partir de X-Z. (A) Imagem original, resultante do processo de interpolação. (B) Resultado da filtragem pela mediana 3D e do preenchimento de buracos. (C) Correção da oclusão dos neurônios. (D) Ilustração do processo de supressão do fundo e separação de agrupamentos de neurônios. (E) Resultado da subtração do fundo e do SKIZ da imagem segmentada.



**Figura A.45:** Sequencia de operações da etapa de pré-processamento das imagens da cultura MEA\_13. A coluna da esquerda mostra a visão frontal da seção óptica central (8). A coluna da direita mostra 15 seções obtidas ao longo do eixo Y a partir de X-Z. (A) Imagem original, resultante do processo de interpolação. (B) Resultado da filtragem pela mediana 3D e do preenchimento de buracos. (C) Correção da oclusão dos neurônios. (D) Ilustração do processo de supressão do fundo e separação de agrupamentos de neurônios. (E) Resultado da subtração do fundo e do SKIZ da imagem segmentada.

As Figuras A.46, A.47, A.48, A.49 e A.50 mostram a visualização das superfícies poligonais reconstruídas a partir das imagens 3D das culturas MEA\_01, MEA\_04, MEA\_05, MEA\_11 e MEA\_13, respectivamente.



**Figura A.46: Visualização da cultura MEA\_01, após reconstrução das superfícies poligonais. (A) Visão frontal das culturas. (B) Visão das culturas por um ponto de vista diagonal. (C) Visão por um ponto de vista diagonal da cultura com a câmera posicionada próxima ao canto inferior esquerdo da MEA. Isovalor = 54.**

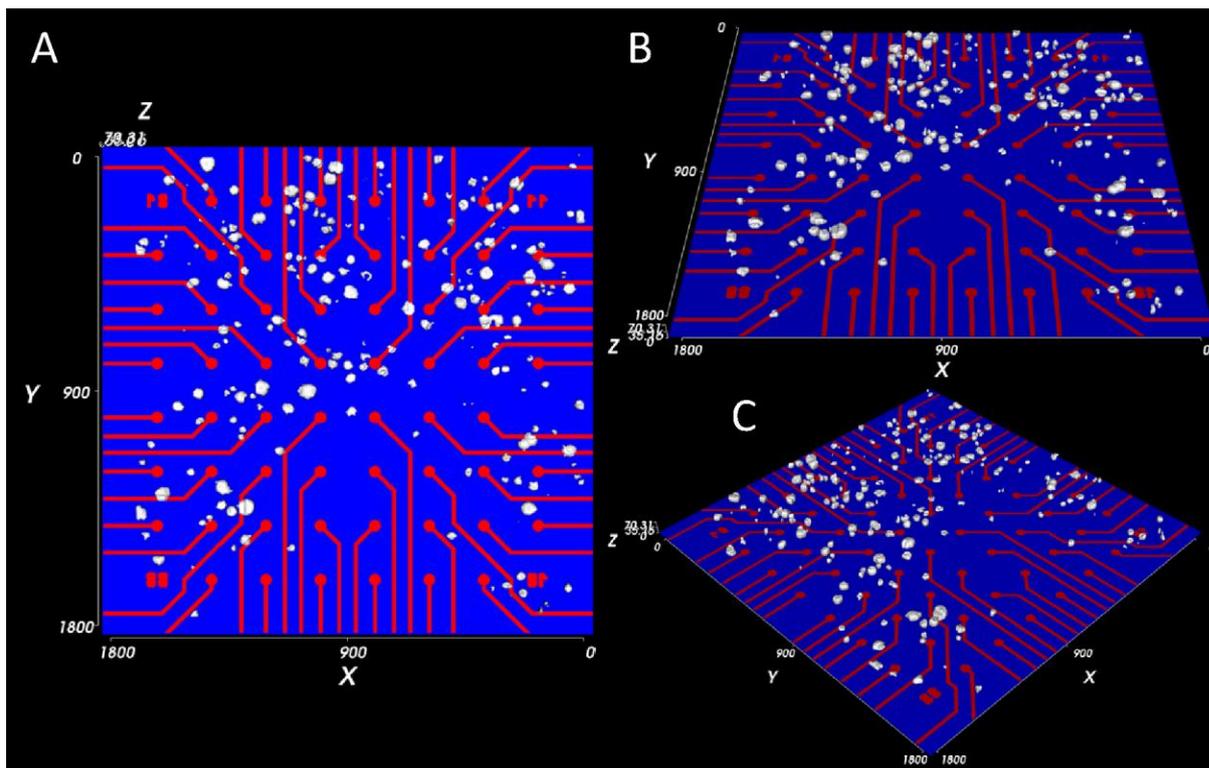


Figura A.47: Visualização da cultura MEA\_04, após reconstrução das superfícies poligonais. (A) Visão frontal das culturas. (B) Visão das culturas por um ponto de vista diagonal. (C) Visão por um ponto de vista diagonal da cultura com a câmera posicionada próxima ao canto inferior esquerdo da MEA. Isovalor = 28.

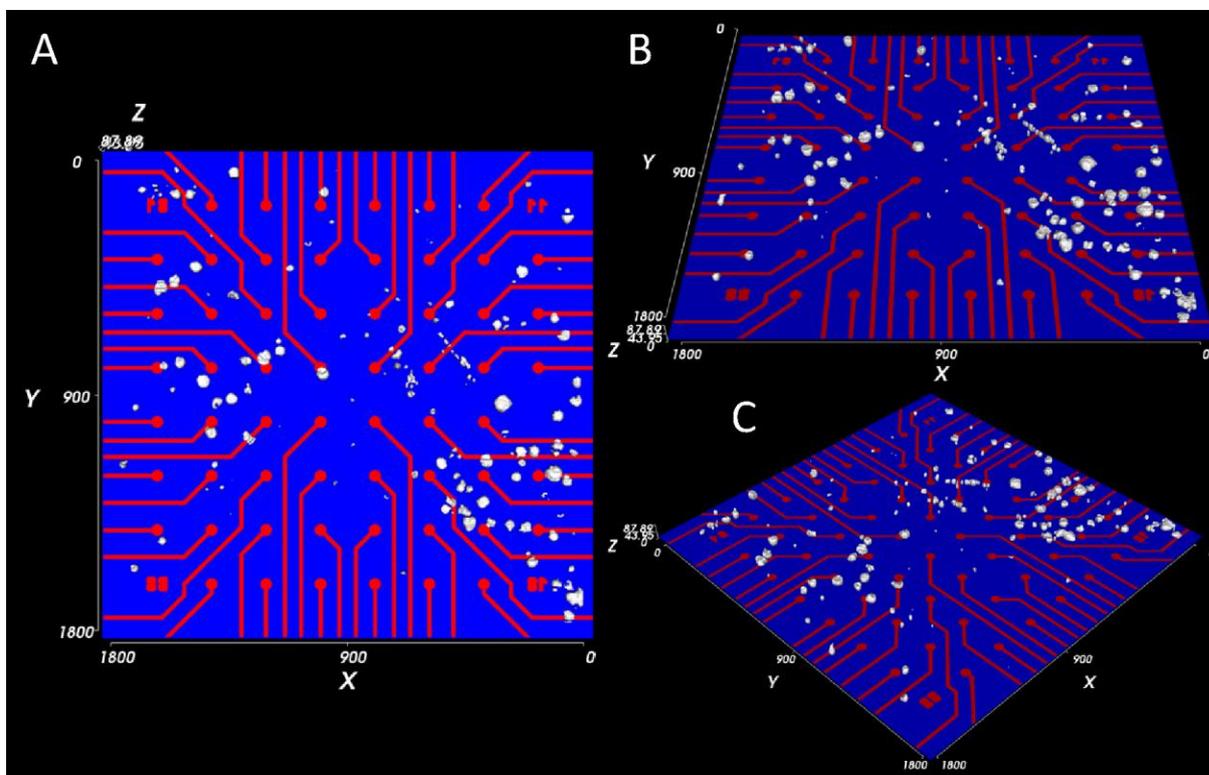


Figura A.48: Visualização da cultura MEA\_05, após reconstrução das superfícies poligonais. (A) Visão frontal das culturas. (B) Visão das culturas por um ponto de vista diagonal. (C) Visão por um ponto de vista diagonal da cultura com a câmera posicionada próxima ao canto inferior esquerdo da MEA. Isovalor = 34.

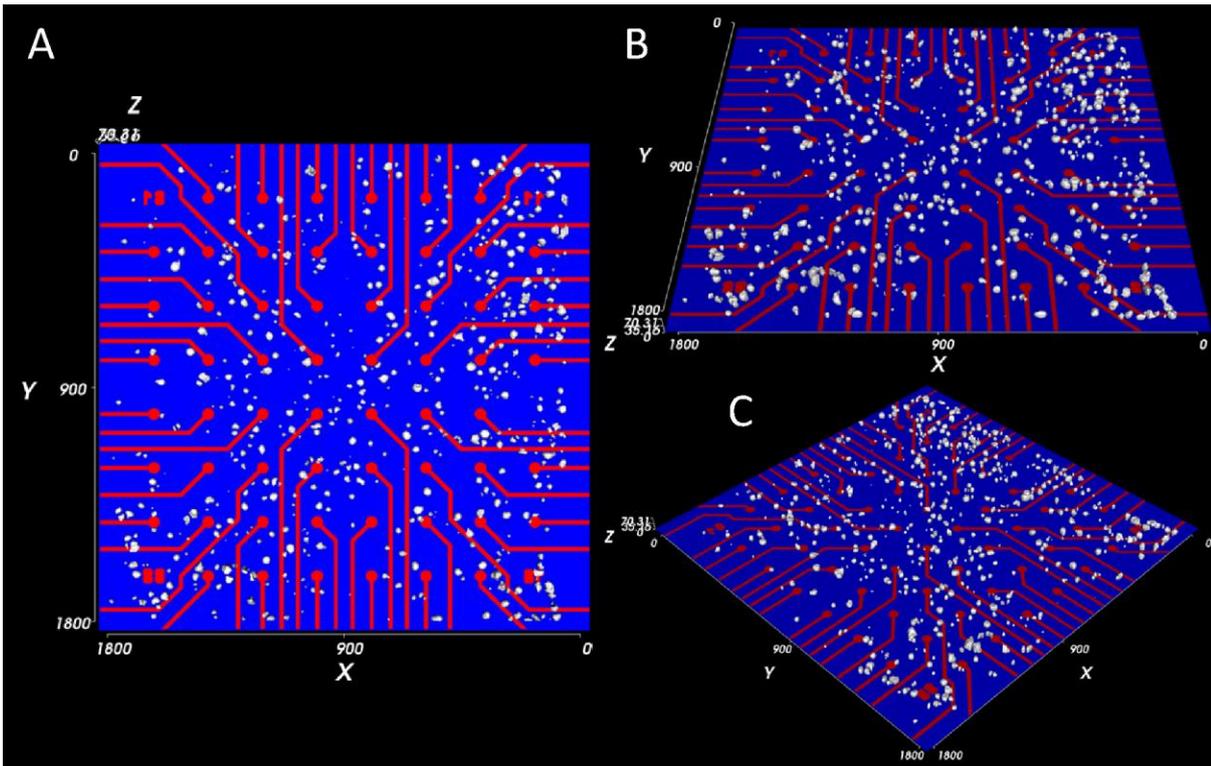


Figura A.49: Visualização da cultura MEA\_11, após reconstrução das superfícies poligonais. (A) Visão frontal das culturas. (B) Visão das culturas por um ponto de vista diagonal. (C) Visão por um ponto de vista diagonal da cultura com a câmera posicionada próxima ao canto inferior esquerdo da MEA. Isovalor = 40.

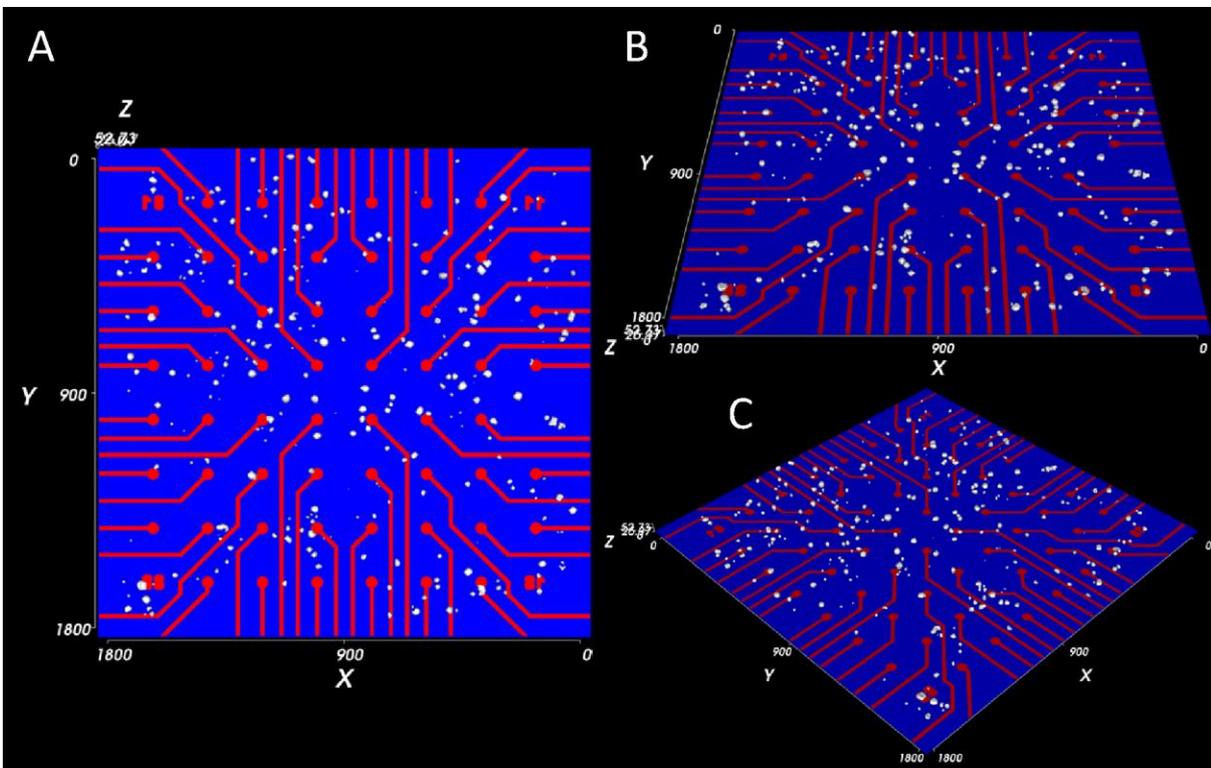
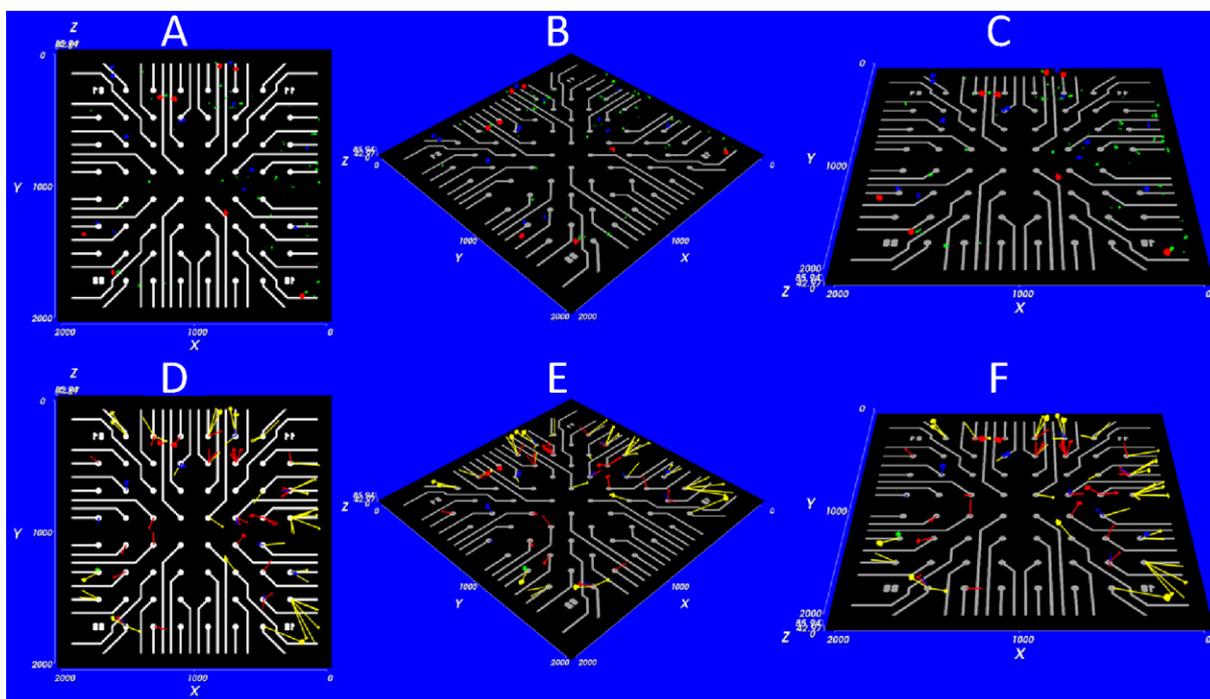


Figura A.50: Visualização da cultura MEA\_13, após reconstrução das superfícies poligonais. (A) Visão frontal das culturas. (B) Visão das culturas por um ponto de vista diagonal. (C) Visão por um ponto de vista diagonal da cultura com a câmera posicionada próxima ao canto inferior esquerdo da MEA. Isovalor = 29.

As Figuras A.51, A.52, A.53, A.54 e A.55 mostram a visualização das superfícies poligonais reconstruídas a partir das imagens 3D das culturas MEA\_01, MEA\_04, MEA\_05, MEA\_11 e MEA\_13, respectivamente.



**Figura A.51:** Visualização das classificações morfológica e topológica dos neurônios para a MEA\_01. Em (A), (B) e (C) são mostradas a classificação morfológica por visualização frontal, diagonal e diagonal a partir da parte inferior da MEA, respectivamente. Em (D), (E) e (F) é mostrada a classificação topológica por visualização frontal, diagonal e diagonal a partir da parte inferior da MEA, respectivamente.

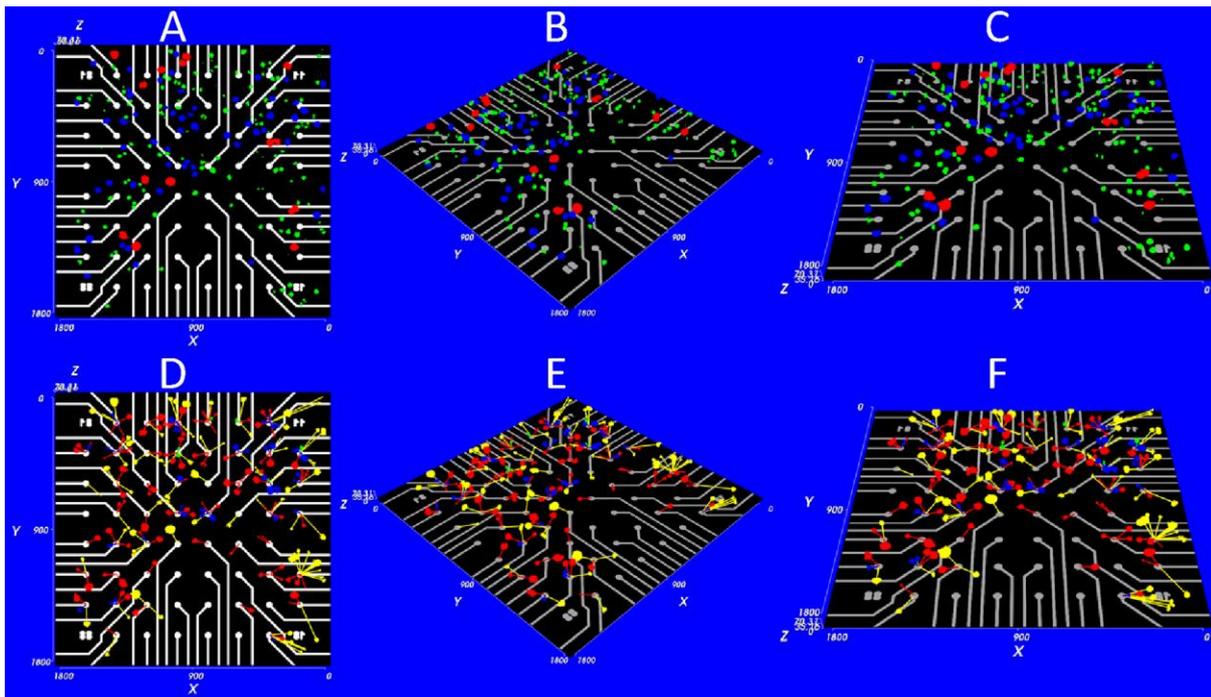


Figura A.52: Visualização das classificações morfológica e topológica dos neurônios para a MEA\_04. Em (A), (B) e (C) são mostradas a classificação morfológica por visualização frontal, diagonal e diagonal a partir da parte inferior da MEA, respectivamente. Em (D), (E) e (F) é mostrada a classificação topológica por visualização frontal, diagonal e diagonal a partir da parte inferior da MEA, respectivamente.

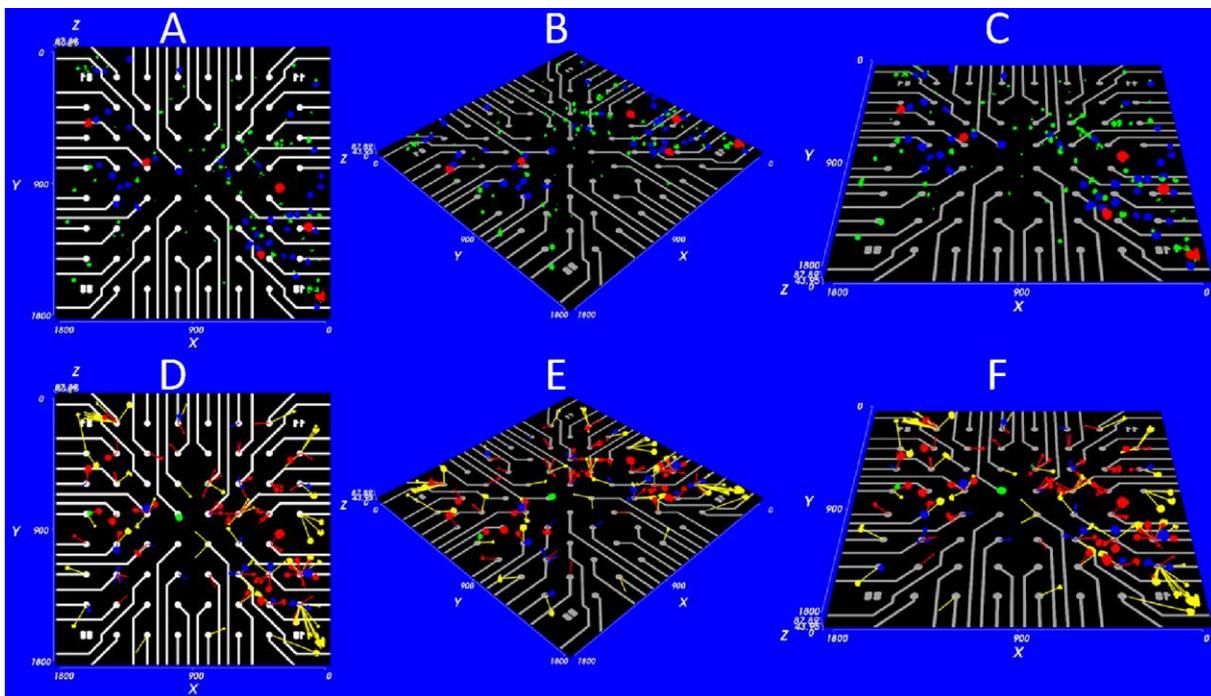


Figura A.53: Visualização das classificações morfológica e topológica dos neurônios para a MEA\_05. Em (A), (B) e (C) são mostradas a classificação morfológica por visualização frontal, diagonal e diagonal a partir da parte inferior da MEA, respectivamente. Em (D), (E) e (F) é mostrada a classificação topológica por visualização frontal, diagonal e diagonal a partir da parte inferior da MEA, respectivamente.

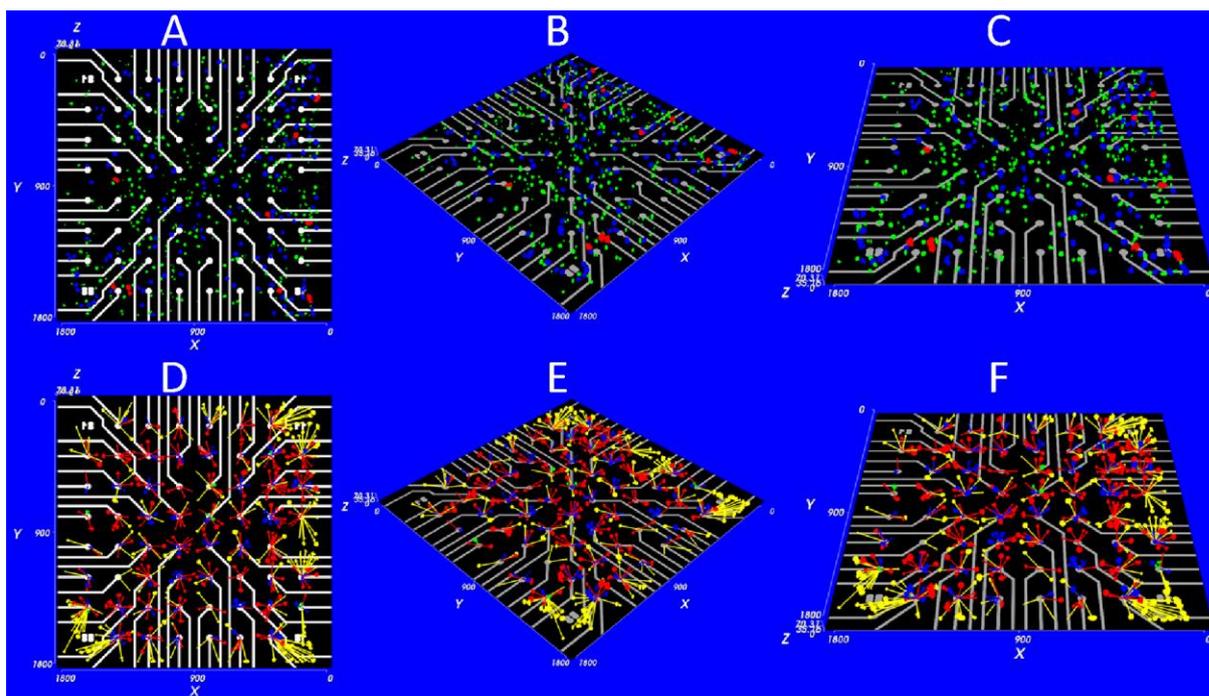


Figura A.54: Visualização das classificações morfológica e topológica dos neurônios para a MEA\_11. Em (A), (B) e (C) são mostradas a classificação morfológica por visualização frontal, diagonal e diagonal a partir da parte inferior da MEA, respectivamente. Em (D), (E) e (F) é mostrada a classificação topológica por visualização frontal, diagonal e diagonal a partir da parte inferior da MEA, respectivamente.

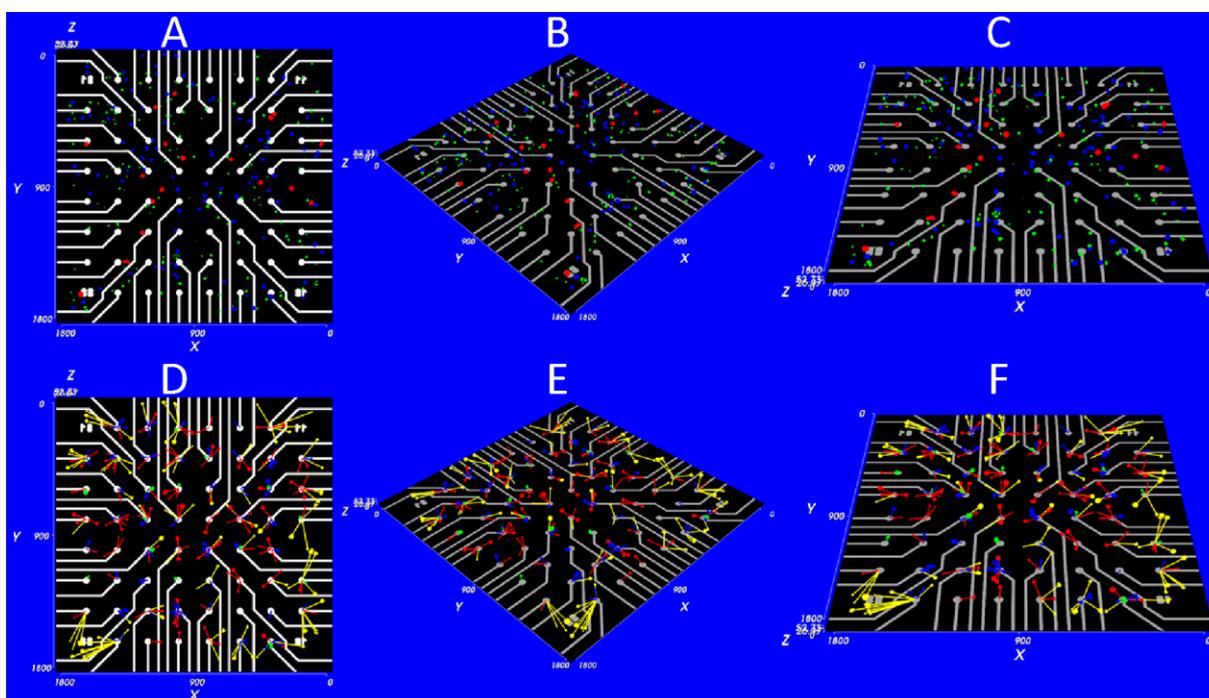


Figura A.55: Visualização das classificações morfológica e topológica dos neurônios para a MEA\_13. Em (A), (B) e (C) são mostradas a classificação morfológica por visualização frontal, diagonal e diagonal a partir da parte inferior da MEA, respectivamente. Em (D), (E) e (F) é mostrada a classificação topológica por visualização frontal, diagonal e diagonal a partir da parte inferior da MEA, respectivamente.



# Apêndice B

## INTERFACES GRÁFICAS

Neste apêndice são apresentadas as interfaces gráficas (GUIs) dos métodos propostos. A Figura B.1 mostra a GUI do método de identificação de microeletrodos. A Figura B.2 mostra a GUI do método de registro de imagens. A Figura B.3 mostra a GUI do método de segmentação de neurônios em imagens 2D. A Figura B.4 mostra a GUI do método de análise quantitativa 2D. A Figura B.5 mostra a GUI do método de pré-processamento das imagens volumétricas 3D. A Figura B.6 mostra a GUI do método de reconstrução de superfícies 3D e análise quantitativa 3D.

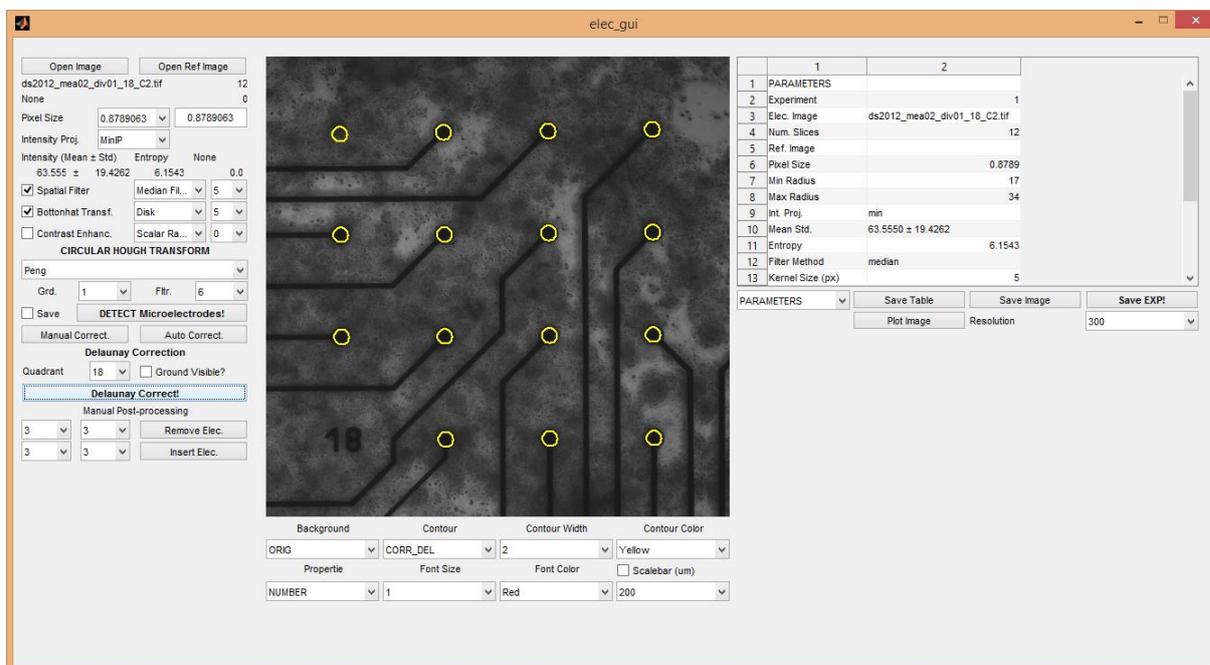


Figura B.1: Interface gráfica do método de identificação automática de microeletrodos.

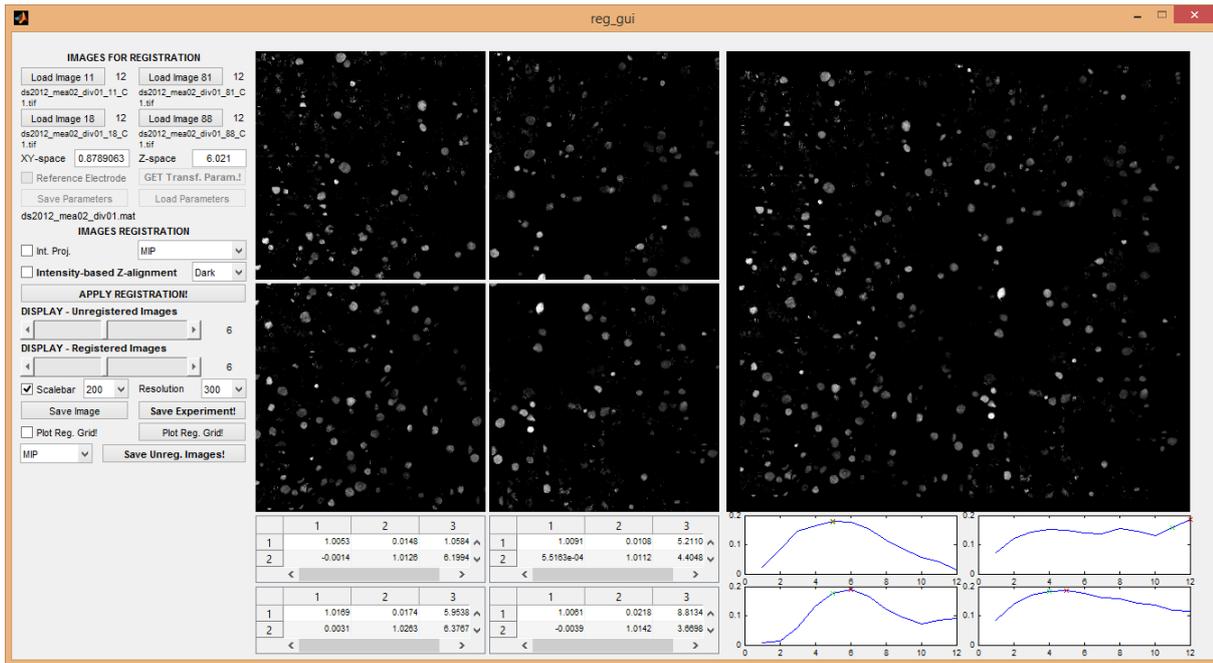


Figura B.2: Interface gráfica do método de registro de imagens.

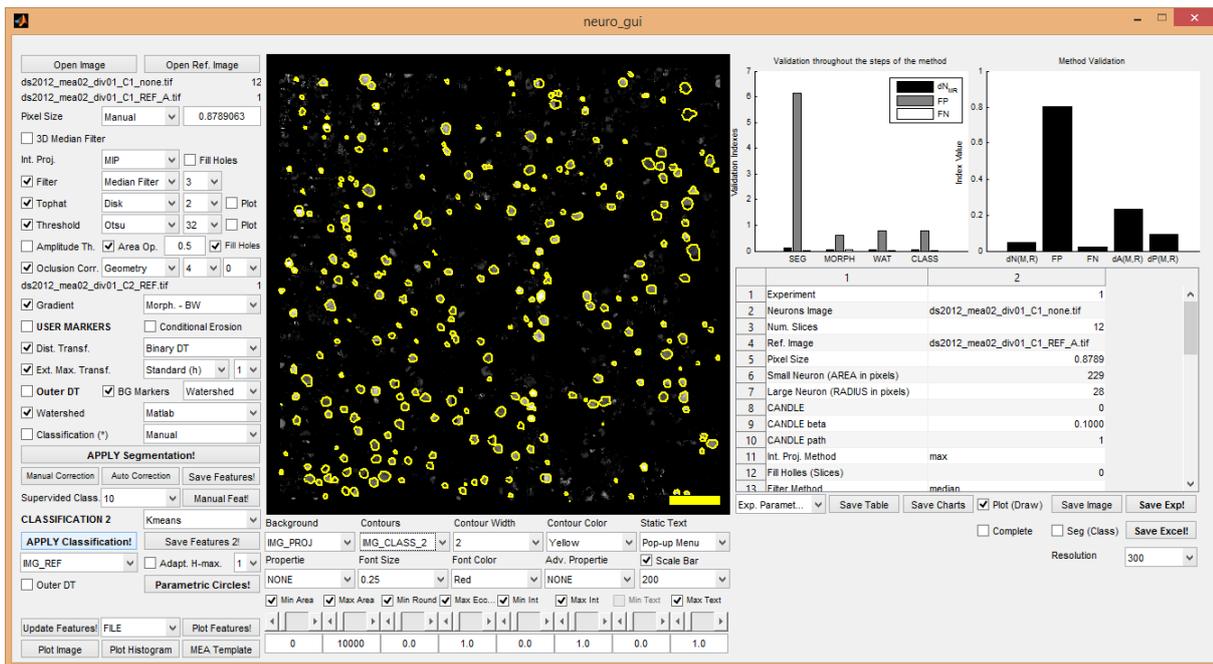


Figura B.3: Interface gráfica do método de segmentação de neurônios em imagens 2D.

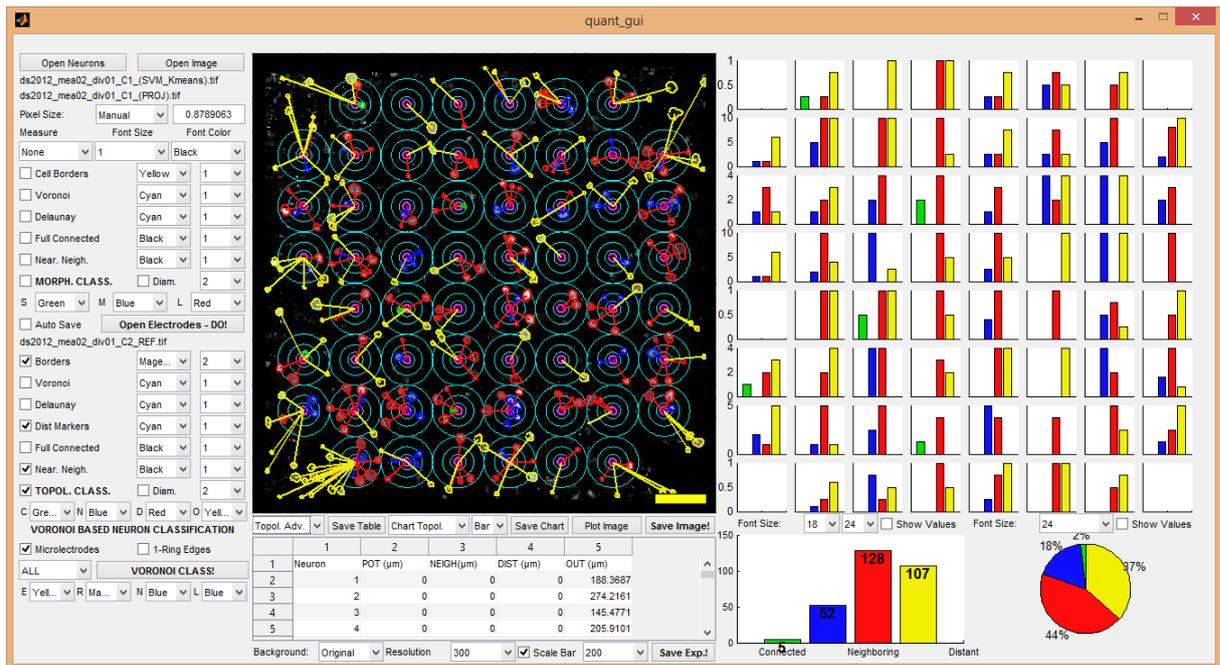


Figura B.4: Interface gráfica do método de análise quantitativa 2D.

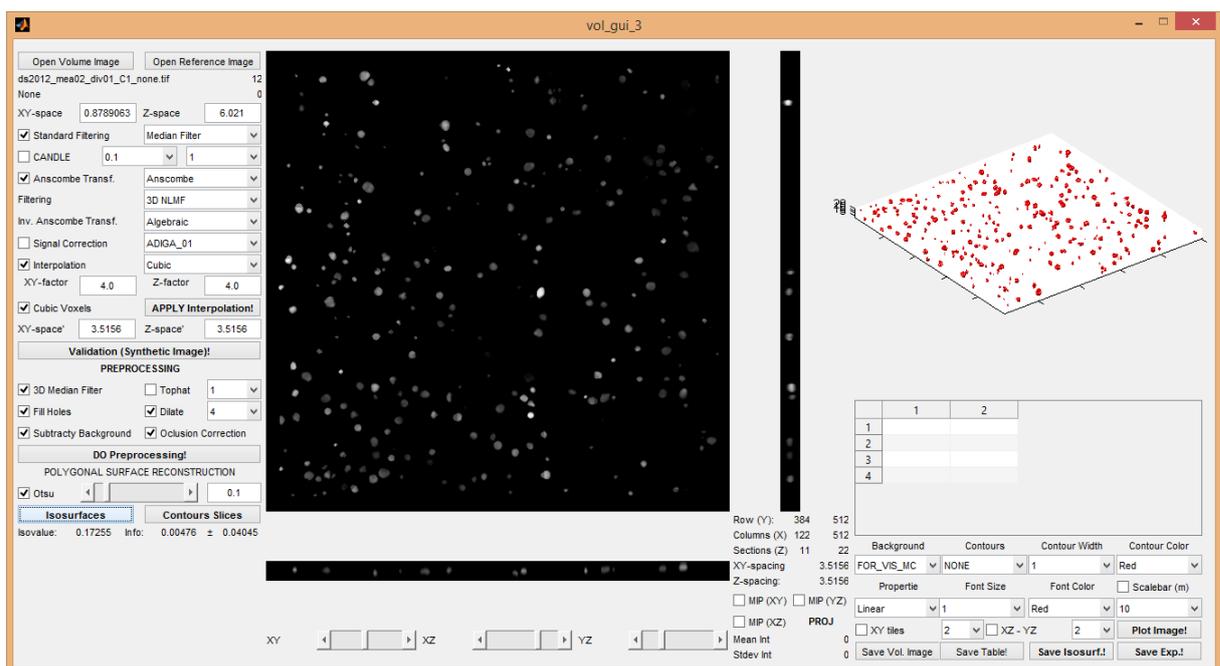
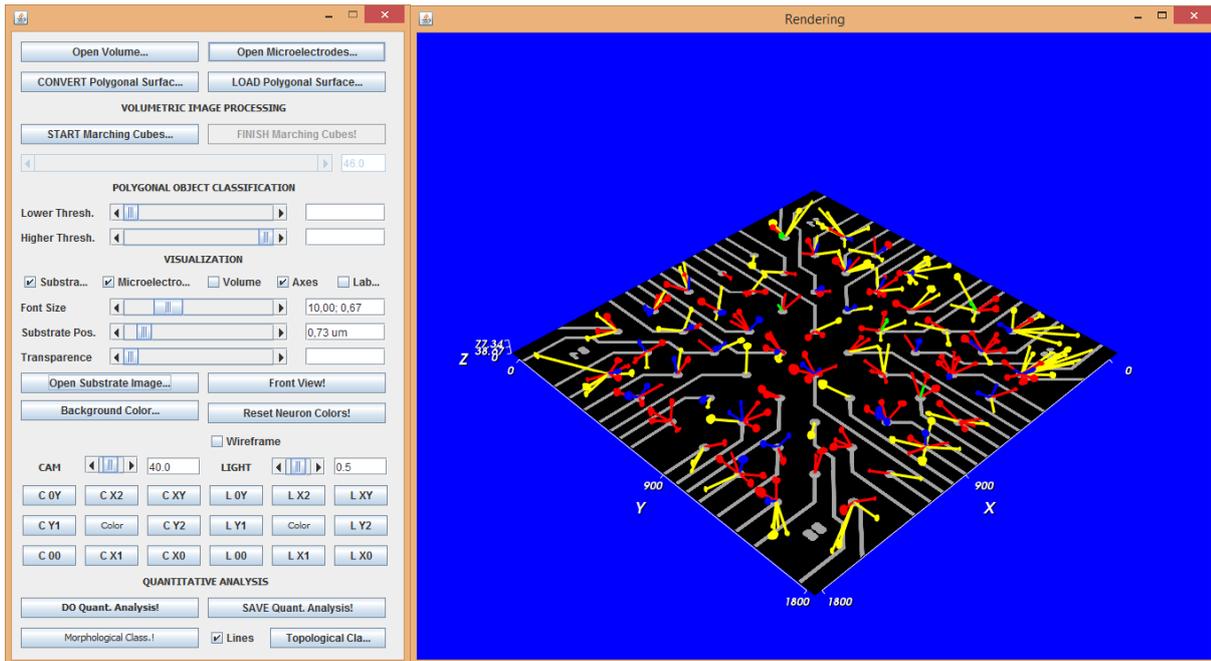


Figura B.5: Interface gráfica do método de pré-processamento das imagens volumétricas 3D.



**Figura B.6:** Interface gráfica do método reconstrução de superfícies 3D e análise quantitativa 3D.

# Apêndice C

## LISTA DE PUBLICAÇÕES

---

---

A seguir são listados artigos publicados e submetidos decorrentes diretamente deste trabalho.

MARI, J. F.; SAITO, J. H.; DESTRO-FILHO, J. B.; MARTINOIA, S. *Three-dimensional visualization of rat hippocampal cultured neurons based on images of multielectrode arrays (MEA)*. In: T. Manninen; C. Wiuf; H. Lähdesmäki; *et al.* (Eds.); Proceedings of the Sixth International Workshop on Computational Systems Biology - WCSB 2009. Anais... p.115–118, 2009. Aarhus, Denmark.

[Esse artigo, apesar de ter sido publicado um ano antes do início do curso de Doutorado, representa o primeiro contato com a tecnologia de MEA. A ideia deste projeto de Doutorado apresentado no final de 2010 para ingresso no PPG-CC, apesar da significativa diferença, foi fortemente influenciada pelos resultados apresentados.]

MARI, J. F.; SAITO, J. H.; NEVES, A. F.; DESTRO-FILHO, J. B.; MONTEIRO, C. *Three-dimensional visualization and automated quantitative analysis of cultured neurons plated on multi-electrode arrays*. Proceedings of The IADIS International Conference Applied Computing 2011. Anais... p.179–186, 2011. Rio de Janeiro, Brazil: IADIS Press.

[Nesse artigo são apresentados os primeiros resultados obtidos pelo método de reconstrução 3D das culturas de neurônios em MEA. O método, assim como os resultados apresentados nesse artigo, sofreram melhorias e são descritos nas Seções 3.6 e 3.7, respectivamente.]

MARI, J. F.; SAITO, J. H.; NEVES, A. F.; DESTRO-FILHO, J. B.; MONTEIRO, C.M.C; NICOLETTI, M.C. *Quantitative Analysis of RAT dorsal root ganglion Neurons Cultured on Microelectrode Arrays Based on Fluorescence Microscopy Image Processing.*

[Artigo submetido à revista “*International Journal of Neural Systems*” em dezembro de 2014 e aguarda parecer. Compreende os métodos de identificação de microeletrodos, registro de imagens, segmentação 2D e análise quantitativa 2D, apresentados nesta tese.]

Artigos que o autor participou indiretamente, como colaborador, e possuem algum tipo de relação com esse trabalho.

LLAPA, E.; GREVE, C. S.; SAITO, J. H. *et al. Texture analysis in synaptic regions of in vitro culture of neurons using multi-electrode array (MEA).* Proceedings of the IADIS International Conference Applied Computing 2012. Anais... p.99 – 106, 2012. Madrid, Spain: IADIS Press.

[Nesse artigo é realizada a segmentação baseado em textura da imagem tomada de uma cultura de neurônios corticais imageadas por microscopia de transmissão. O resultado da segmentação por textura foi utilizado para estimar a conectividade entre os neurônios. A contribuição para este trabalho se restringe ao registro das seis imagens tomadas da cultura para que fosse possível aplicar o método sobre uma imagem da cultura toda (Seção 4.4).]

SAITO, J. H.; MARI, J. F.; PEDRINO, E.; DESTRO-FILHO, J. B.; NICOLETTI, M. C. *Simulated Activation Patterns of Biological Neurons Cultured onto a Multi-Electrode Array Based on a Modified Izhikevich’s Model.* Publicada na revista *Fundamenta Informaticae* (IOS Press) em 2013.

[Nesse artigo é proposto um sistema de simulação de uma cultura de neurônios corticais em MEA baseado no modelo de neurônios corticais proposto por Izhikevich. Os experimentos realizados com o modelo proposto foram realizados utilizando a imagem de uma cultura completa gerada a partir do registro de imagens tomadas a partir de microscopia de transmissão e a segmentação dos neurônios na imagem registrada, assim como, à identificação dos microeletrodos.]