

# Avaliação Morfológica e Morfométrica de Axônios Mielínicos Utilizando Classificador *Fuzzy*

GUILHERME AUGUSTO FARIA DE QUEIROZ<sup>1</sup>

CLÉSIO LUIS TOZZI<sup>1</sup>

FRANCESCO LANGONE<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UNICAMP/FEEC/DCA

Cx. Postal 6101, 13083-970 Campinas, SP, Brasil  
{gqueiroz,clesio}@dca.fee.unicamp.br

<sup>2</sup>UNICAMP/IB/ANATOMIA

Cx. Postal 6109, 13083-970 Campinas, SP, Brasil

**Abstract:** This paper presents a semi-automatic method for morphologic and morphometric evaluation of myelinated axons from images of their cross sections. Digital image processing techniques and a system based on fuzzy rules are applied for classifying axon and non-axon regions. The obtained results show the viability of the method to this application and that the method can also be extended to other similar applications.

**Keywords:** Cross-section images, fuzzy classifier, morphometry.

## 1. Introdução

A avaliação morfológica e morfométrica dos axônios mielínicos, a partir de suas seções transversais, fornece informações relevantes às pesquisas sobre desenvolvimento, envelhecimento, regeneração neural, neurotoxicidade e várias condições patológicas (ZIMMERMAN et al., 1980).

O número e as dimensões das fibras nervosas, tais como o diâmetro axonal e a espessura da bainha de mielina, são parâmetros que fornecem indicações sobre o estado funcional dos neurônios e das células associadas, fisiológica e estruturalmente, aos mesmos (FRIEDE & BISCHHAUSEN, 1982). Estas informações são particularmente importantes para a avaliação dos processos degenerativos e regenerativos, decorrentes de estados patológicos ou traumáticos, que podem se estabelecer no sistema nervoso central ou periférico (FIELDS & ELLISMAN, 1986).

Tradicionalmente, a análise qualitativa e quantitativa dos axônios mielínicos tem sido realizada em fotografias ou imagens de cortes transversais de feixes de fibras nervosas, nas quais o número e demais parâmetros morfométricos dos axônios são obtidos manualmente (FRYKMAN et al., 1988). Porém, visto que o número de axônios em cada imagem é grande e que muitas imagens são necessárias para o estabelecimento da relação procurada, esta abordagem se torna extremamente ineficiente.

O desenvolvimento de arranjos eletro-mecânicos (ESPIR & HARDING, 1961) e o de técnicas estatísticas

(BLIGHT, 1983) têm se apresentado como alternativas viáveis para a obtenção de métodos semi-automáticos na contagem e avaliação da distribuição de axônios. Observa-se, entretanto, que a disponibilidade de tecnologias mais avançadas tem possibilitado aperfeiçoamentos metodológicos. HARMAN et al. (1991), por exemplo, aperfeiçoam a técnica apresentada por BLIGHT (1983) com o acoplamento de uma câmera de vídeo ao microscópio e a utilização de um microcomputador para a resolução dos cálculos estatísticos. Ainda assim, muito trabalho manual é empregado, o que torna a metodologia entediante e custosa.

As soluções que apresentam um maior grau de automação têm, como elemento comum, a utilização de técnicas de processamento e análise de imagens digitais. ZIMMERMAN et al. (1980) utilizam um limiar (*threshold*) global, previamente definido, para binarizar a imagem e, em seguida, aplicam um algoritmo para determinar os centros dos axônios. A partir destes centros, são enviados vetores nas direções 0°, 90°, 180° e 270° para determinar possíveis pontos de transição entre o axônio e a bainha de mielina. Os pontos obtidos são confirmados após um processo de detecção de bordas, que também é válido para traçar os contornos das fibras. A intervenção do operador é necessária para a extração das fibras para as quais o processo de identificação falha. No sistema proposto por VITA et al. (1992), uma binarização global é realizada para segmentar as bainhas de mielina e, na seqüência, um

algoritmo de fechamento de buracos é utilizado para o preenchimento das áreas definidas pelas fibras. O operador interage com o sistema na definição do limiar, na separação de fibras unidas, na eliminação de estruturas estranhas e no fechamento das bainhas de mielina que resultem abertas após a binarização. AUER (1994) utiliza um *software* disponível comercialmente para apresentar um método semi-automático para a quantificação de fibras mielínicas. Este método realiza uma limiarização (*thresholding*) global, com o valor de limiar definido interativamente pelo operador. As estruturas estranhas são eliminadas, ou pelo sistema através da imposição de um limiar aos tamanhos dos perímetros das regiões segmentadas, ou pelo operador quando essa condição falha. VOGT (1996) descreve um algoritmo para a extração de fibras mielínicas a partir de transformações definidas na morfologia matemática, aplicadas a imagens não-binárias, como também de um processo de limiarização adaptativo.

Embora se observe uma tendência pela busca de métodos completamente automáticos para a obtenção da densidade de axônios, estudos realizados por ZIMMERMAN et al. (1980) e AUER (1994) indicam que, dada a complexidade da tarefa, faz-se necessária a intervenção de um operador no processo, uma vez que a completa automação, ou excluirá uma percentagem variável de pequenas fibras, ou incluirá componentes estranhos, podendo resultar em taxas de erro inaceitáveis.

Dentro da tendência observada na literatura, é proposto, neste trabalho, um sistema semi-automático para a quantificação e qualificação de axônios mielínicos que inclui, além das técnicas de processamento e análise de imagens usuais para este tipo de aplicação, a utilização de um sistema classificador baseado em regras *fuzzy* e a reclassificação das regiões duvidosas por um processo manual supervisionado pelo usuário.

O trabalho está organizado em 4 seções, incluindo esta introdução. Na seção 2, cada uma das etapas do processo é descrita; na seção 3, os resultados são apresentados e discutidos; e, finalmente, na seção 4, as conclusões são apresentadas.

## 2. Etapas do Processo de Classificação e Quantificação de Axônios

As partes do processo de classificação e quantificação de axônios mielínicos são descritas nesta seção.

A idéia empregada no sistema é realizar sucessivas transformações que possibilitem a obtenção de uma imagem composta apenas por regiões classificadas como axônios, tornando a etapa de contagem e qualificação fácil e direta.

### 2.1. Binarização da Imagem

A limiarização geralmente representa uma primeira fase no processo de segmentação de imagens (CHANG et al., 1994) e torna-se uma das fases mais críticas do processo quando a segmentação é feita de forma completamente automática (ZHANG, 1996).

Muitos métodos têm sido desenvolvidos para a determinação do limiar ótimo (LEE et al., 1990). Estes métodos, baseados no histograma ou em alguma propriedade local da imagem, geralmente envolvem a otimização de uma função critério e podem ser classificados como global e local.

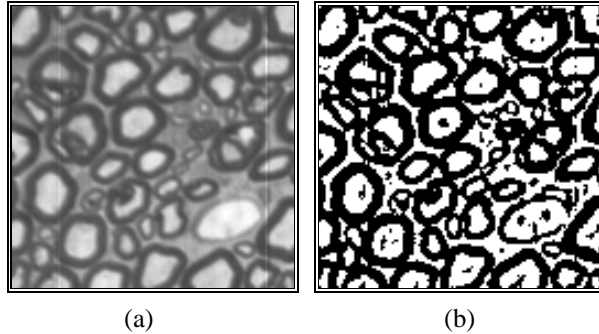
A maioria dos métodos encontrados na literatura é do tipo global e, de modo geral, utiliza uma das três abordagens listadas a seguir para a determinação do limiar ótimo: 1) considera apenas o histograma da imagem através de uma função entropia de primeira ordem (KAPUR et al. (1985, *apud* SAHOO et al., 1988); SHANBHAG, 1994; HUANG & WANG, 1995), ou 2) utiliza a informação da distribuição espacial dos pixels no cálculo de entropias de segunda ordem (ABUTALEB, 1989; BRINK, 1995), ou 3) determina o limiar pela entropia relativa, ou cruzada (LI & LEE, 1993; CHANG et al., 1994; BRINK & PENDOCK, 1996; PAL, 1996).

Para certas imagens, contudo, os métodos globais se demonstram ineficazes na segmentação de pequenos detalhes e sugerem a necessidade de métodos locais. Uma análise comparativa entre onze métodos de binarização localmente adaptativos é apresentada por TRIER & TAXT (1995).

Para a aplicação em pauta, alguns métodos globais foram testados (KAPUR et al. (1985, *apud* SAHOO et al., 1988); ABUTALEB, 1989; SHANBHAG, 1994). Os resultados obtidos não foram satisfatórios, visto que os métodos não conseguiram a separação de todos os axônios com relação ao espaço endoneural, principalmente para as pequenas fibras. Desta forma, considerando que o processo seria inviabilizado por um excessivo erro, optou-se pela utilização de métodos locais de limiarização, apesar do maior custo computacional envolvido.

Neste caso, faz-se percorrer uma janela pela imagem, pixel a pixel. A cada deslocamento, obtém-se o histograma da imagem sob a janela e, através do método proposto por SHANBHAG (1994), determina-se o limiar ótimo, que é aplicado apenas ao pixel da imagem correspondente ao centro da janela. Vários tamanhos de janelas foram testados, sendo que os melhores resultados foram obtidos por uma janela de 7x7 pixels. Esse método foi utilizado por ter apresentado resultados superiores aos outros já referenciados. Esta superioridade pode ser atribuída ao

fato do método considerar a imagem como um conjunto *fuzzy*, e utilizar uma função critério que pondera mais os níveis de cinza próximos ao ponto de limiar. A Figura 1-a mostra uma imagem de entrada do sistema e a Figura 1-b, o resultado de sua binarização.



**Figura 1:** Processo de binarização: (a) Imagem de entrada; (b) Resultado da binarização.

## 2.2. Fechamento de Regiões e Eliminação de Pequenos Artefatos

Em decorrência do processo de binarização, pode-se observar, eventualmente, o aparecimento de buracos em regiões conexas, ou ainda, o aparecimento de pequenos artefatos, resultantes da fragmentação do espaço endoneural ou da segmentação de estruturas citológicas.

A eliminação dos buracos é feita pela transformação fechamento de buracos, fundamentada na morfologia matemática e definida pela seguinte expressão (BARRERA et al., 1994) :

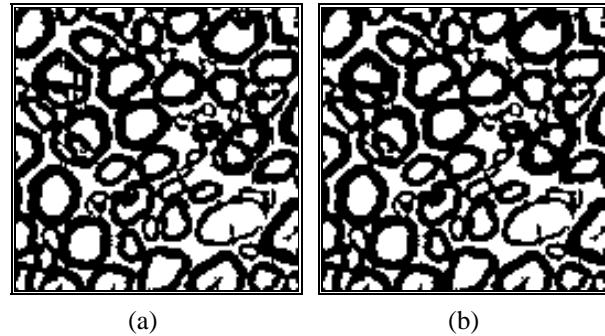
$$\Phi_B(g) = \sim \gamma_{B,f}(\sim g)$$

onde  $\gamma_{B,f}(\sim g)$  representa a abertura por reconstrução do complemento da imagem  $g$  utilizando o elemento estruturante  $B$ , a partir de um *frame*  $f$ . O símbolo  $\sim$  indica o complemento da imagem, ou a negação no caso de imagens binárias.

Foram testados diferentes tipos e tamanhos para o elemento estruturante  $B$ . Os melhores resultados foram observados para um disco euclidiano de diâmetro 4.

A eliminação dos pequenos artefatos é feita através da operação morfológica erosão, considerando um elemento estruturante linear de tamanho  $1 \times 3$ , seguida de uma reconstrução. Esta seqüência de operações é suficiente para a eliminação deste tipo de falha.

A Figura 2-a apresenta o resultado da transformação de fechamento de buracos, aplicada à imagem da Figura 1-b, enquanto a Figura 2-b apresenta a imagem resultante das transformações aplicadas à imagem da Figura 2-a para a eliminação de pequenos artefatos.



**Figura 2:** Pós-Processamento da imagem binarizada: (a) Fechamento de buracos da imagem da Figura 1-b; (b) Eliminação de pequenos artefatos da imagem da Figura 2-a.

## 2.3. Extração do Espaço Endoneural

A extração do espaço endoneural é feita através da esqueletização da imagem. O conceito de esqueleto de formas geométricas foi inicialmente proposto por BLUM (1967, *apud* GONZALES & WOODS, 1993), quando apresentou a transformada do eixo mediano. Observa-se, das definições de esqueleto apresentadas por MONTANARI (1968, *apud* KIMMEL et al., 1995), que quanto mais circular for a região menor será o seu esqueleto.

Uma grande variedade de métodos para a determinação de esqueletos é descrita na literatura, sendo a maioria deles restrita a imagens binárias. MAHMOUD et al. (1991) utilizam um processo de agrupamento (*clustering*) para a determinação do esqueleto, que é definido pela união dos centros de grupos (*clusters*) adjacentes; TRAHANIAS (1992) realiza a esqueletização através de operações definidas na morfologia matemática, obtendo o esqueleto morfológico; SHIH & PU (1995) determinam o esqueleto pela união dos pontos de máximo valor da transformada da distância Euclidiana; e KIMMEL et al. (1995) determinam o esqueleto a partir de mapas de distância.

De modo geral, o processo de esqueletização envolve um alto custo computacional.

Para a aplicação em pauta, observa-se que as regiões correspondentes às seções transversais dos axônios aproximam-se de formas circulares e, portanto, possuem pequenos esqueletos. Por outro lado, o espaço endoneural apresenta um esqueleto grande devido à sua forma alongada. Portanto, a separação entre axônios e espaço endoneural pode ser feita a partir do tamanho do esqueleto.

Neste sistema, o esqueleto é obtido através da esqueletização morfológica homotópica, que é definida com base na transformação *hit-miss* (SERRA, 1986) com os elementos estruturantes apresentados na

Figura 3. A opção por este processo de esqueletização se deu pelo fato do mesmo manter a conectividade das regiões e apresentar um custo computacional relativamente baixo em comparação a outras abordagens. Ainda, segundo MARAGOS & SCHAFER (1986, *apud* TRAHANIAS, 1992), a esqueletização morfológica unifica e generaliza as técnicas anteriormente desenvolvidas.

1	1	1	0	0	0
0	1	0	0	0	0
0	0	0	1	1	1

**Figura 3:** Elementos estruturantes para a esqueletização morfológica homotópica.

A Figura 4-a mostra o resultado da esqueletização morfológica homotópica aplicada à imagem da Figura 2-b, enquanto a Figura 4-b mostra um gráfico relacionando o tamanho do esqueleto e sua região correspondente. Em uma abordagem similar à apresentada por AUER (1994), que utiliza o perímetro da maior fibra como limiar para exclusão de regiões não-axônios, utiliza-se, aqui, o tamanho do esqueleto de um axônio grande e de alto fator de forma ( $fator\ de\ forma = \frac{perímetro^2}{4\pi \times área}$ ) como limiar de corte para extração do espaço endoneural. O axônio, na imagem, que atende às condições exigidas é indicado pelo usuário. Observa-se, entretanto, que para uma seqüência de imagens similares, o valor estabelecido para uma das imagens pode ser estendido para as demais, reduzindo a necessidade de intervenção do usuário.

Uma vez extraídas as regiões correspondentes aos esqueletos que excedem o limiar, a imagem é reconstruída pelo processo morfológico de abertura por reconstrução, utilizando os esqueletos remanescentes como marcadores. O elemento estruturante utilizado neste processo deve ter um tamanho pequeno para que não seja reconstruída nenhuma região já eliminada. Nesta aplicação, em particular, um elemento estruturante do tipo disco de diâmetro 2 é utilizado.

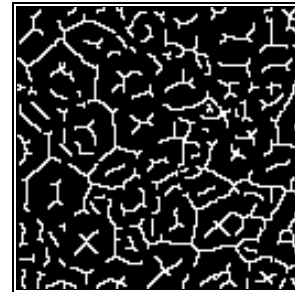
A Figura 5-a mostra a imagem resultante do processo de eliminação do espaço endoneural aplicado à imagem da Figura 2-b e considerando o limiar indicado na Figura 4-b.

#### 2.4. Extração dos Elementos que Tocam as Bordas

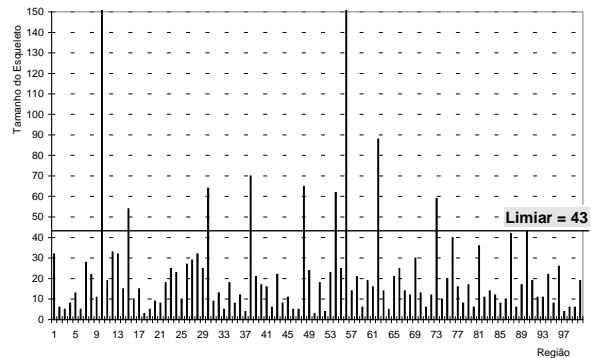
A fim de evitar imprecisões nas medidas ou mesmo a classificação incorreta de regiões, é comum, nos estudos morfométricos, extrair os elementos que interceptam os limites da região de observação (ZIMMERMAN et al., 1980; VITA et al., 1992; AUER, 1994).

Na abordagem proposta neste trabalho, esta etapa é realizada através da operação de interseção da imagem

por um *frame*. A imagem resultante é reconstruída, usando o processo morfológico de abertura por reconstrução com um elemento estruturante do tipo disco de diâmetro 2, e subtraída da imagem inicial (Figura 5-a). A Figura 5-b mostra a imagem resultante desta extração.

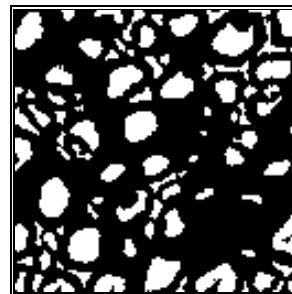


(a)

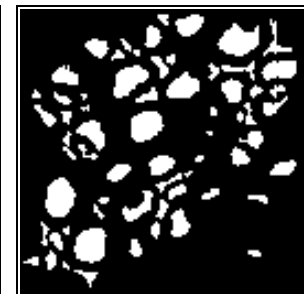


(b)

**Figura 4:** Esqueletização para a imagem da Figura 2-b: (a) Esqueletos das regiões; (b) Tamanho do esqueleto  $\times$  região.



(a)



(b)

**Figura 5:** (a) Extração do espaço endoneural da imagem da Figura 2-b; (b) Extração dos elementos de borda da imagem da Figura 5-a.

#### 2.5. Classificação Fuzzy das Regiões

É facilmente observado, pela análise do procedimento e dos resultados que, após a etapa de extração do espaço endoneural, algumas regiões não-axônios ainda permanecem na imagem, devido ao fato de

apresentarem tamanhos de esqueleto menores que o limiar de corte estabelecido. Observa-se, entretanto, que um operador humano ao analisar a imagem original pode eliminar essas regiões através de uma análise subjetiva da forma, tamanho, cor, textura ou posição, num processo natural, porém de difícil formalização. Como a lógica *fuzzy* está mais próxima da forma do pensamento e da linguagem natural humana do que a lógica tradicional (LEE, 1990) e um sistema baseado nessa lógica dispõe de ferramental mais apropriado para a descrição dos critérios de decisão humana, sugerindo a possibilidade de obtenção de menores erros num processo classificatório, propõe-se, neste trabalho, a utilização de um sistema *fuzzy* para a separação das regiões remanescentes na imagem, através de suas formas.

Uma maneira usualmente considerada para a definição da forma é o estabelecimento de relações entre grandezas físicas medidas diretamente e para as quais a relação estabelecida não se modifica com a alteração da escala física (BOOKSTEIN, 1989). Para a aplicação em pauta, observando que quanto maior a seção transversal do axônio mais espessa é sua bainha de mielina e vice-versa, utiliza-se a relação entre essas grandezas para a caracterização da forma da seção transversal de um axônio.

Para a abordagem *fuzzy* adotada, é necessária a *fuzzificação* das variáveis de entrada e saída e a definição da base de regras *fuzzy* para a classificação das regiões.

As variáveis linguísticas consideradas no sistema são:

- distância ( $d$ ): variável de entrada;
- área ( $a$ ): variável de entrada;
- forma ( $form$ ): variável de saída.

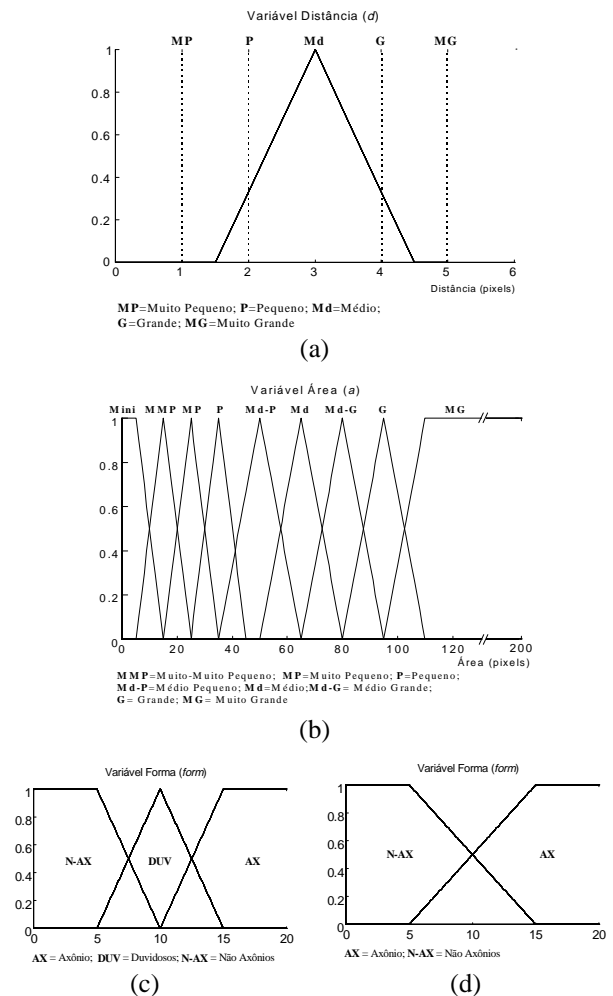
A variável  $d$ , definida no universo de discurso  $\{1,2,3,4,5\}$ , está associada com a medida da espessura da bainha de mielina. Para cada região da imagem resultante da fase imediatamente anterior, as distâncias entre a região correspondente na imagem resultante do pós-processamento (ver seção 2.2. - Figura 2-b) e suas vizinhas são medidas. O valor mínimo do conjunto de medidas é atribuído à variável  $d$  da região. A esta variável são associados cinco termos linguísticos e a *fuzzificação* adotada para a medida é apresentada na Figura 6-a.

A variável  $a$ , definida no universo  $\{0,1,\dots,200\}$ , está associada com a área de cada região da imagem. A esta variável são associados nove termos linguísticos e a *fuzzificação* adotada para a medida é apresentada na Figura 6-b

A variável de saída  $form$  é definida no universo de discurso  $[0,20]$ . A esta variável são associados três

termos linguísticos, como apresentado na Figura 6-c. A inclusão do termo linguístico DUV (duvidoso) tem como objetivo permitir uma decisão posterior, supervisionada pelo usuário, quanto à classificação das regiões.

A escolha das funções de pertinência para os termos linguísticos desempenha um papel importante no sucesso da aplicação, porém são definidas subjetivamente, baseando-se na experiência e senso prático (LEE, 1990). Para esta aplicação foram analisadas diferentes funções de pertinência, sendo os melhores resultados obtidos para as funções apresentadas na Figura 6. Para o processo de *fuzzificação* é adotado o método baseado em *singletons*.



**Figura 6:** Variáveis *fuzzy*: (a) Distância; (b) Área; (c) Forma (para as Abordagens 2 e 3); (d) Forma (para a Abordagem 1).

Para a avaliação do método, foram consideradas três abordagens, cada uma utilizando uma base de regras diferente. Na primeira abordagem, a base de regras (TABELA I) permite classificar as regiões

apenas como axônios e não-axônios, tornando a classificação totalmente automática. Nesta abordagem, deve-se considerar apenas dois termos lingüísticos para a variável *form*, como apresentado na Figura 6-d. Nas abordagens 2 e 3, as bases de regras (TABELAS II e III, respectivamente) incluem a classificação em regiões duvidosas. Na abordagem 3, as regras de decisão estabelecidas para as regiões duvidosas são mais amplas, o que implica em maior interação com o usuário e taxas de erros menores, numa relação custo-benefício a ser determinada pelo usuário.

**TABELA I:** Base de Regras *Fuzzy* para a Abordagem 1

		Distância ( <i>d</i> )				
		MP	P	Md	G	MG
Á r e a (a)	Mini	AX	N-AX	N-AX	N-AX	N-AX
	MMP	N-AX	AX	N-AX	N-AX	N-AX
	MP	N-AX	AX	AX	N-AX	N-AX
	P	N-AX	AX	AX	N-AX	N-AX
	Md-P	N-AX	AX	AX	N-AX	N-AX
	Md	N-AX	AX	AX	AX	N-AX
	Md-G	N-AX	N-AX	AX	AX	N-AX
	G	N-AX	N-AX	AX	AX	AX
	MG	N-AX	N-AX	AX	AX	AX

**TABELA II:** Base de Regras *Fuzzy* para a Abordagem 2

		Distância ( <i>d</i> )				
		MP	P	Md	G	MG
Á r e a (a)	Mini	DUV	N-AX	N-AX	N-AX	N-AX
	MMP	DUV	DUV	N-AX	N-AX	N-AX
	MP	N-AX	DUV	DUV	N-AX	N-AX
	P	N-AX	AX	AX	N-AX	N-AX
	Md-P	N-AX	AX	AX	N-AX	N-AX
	Md	N-AX	AX	AX	AX	N-AX
	Md-G	N-AX	N-AX	AX	AX	N-AX
	G	N-AX	N-AX	AX	AX	AX
	MG	N-AX	N-AX	AX	AX	AX

**TABELA III:** Base de Regras *Fuzzy* para a Abordagem 3

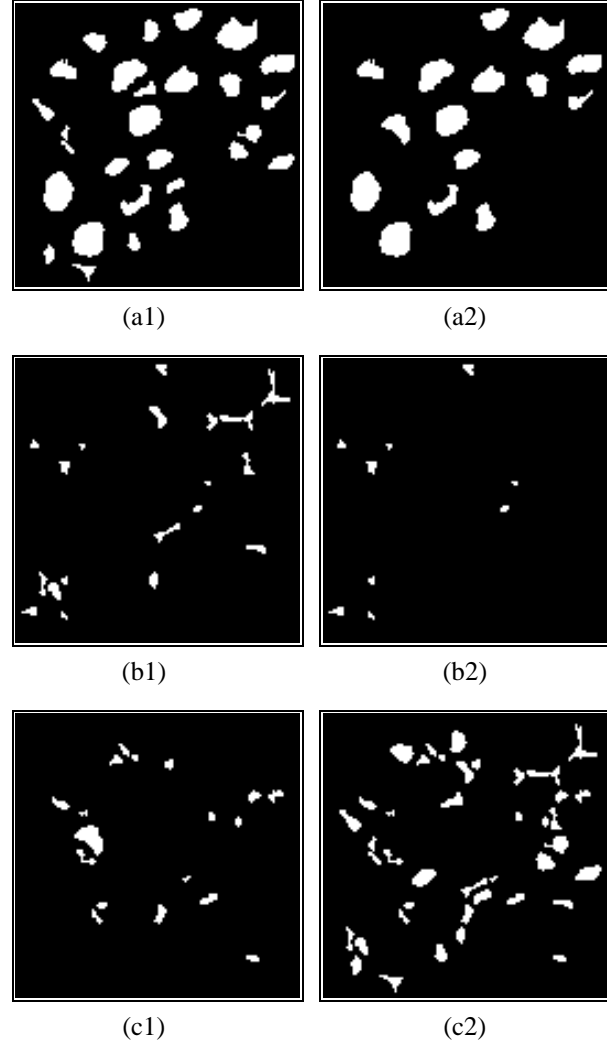
		Distância ( <i>d</i> )				
		MP	P	Md	G	MG
Á r e a (a)	Mini	DUV	N-AX	N-AX	N-AX	N-AX
	MMP	DUV	DUV	N-AX	N-AX	N-AX
	MP	DUV	DUV	DUV	N-AX	N-AX
	P	DUV	DUV	DUV	N-AX	N-AX
	Md-P	DUV	AX	DUV	N-AX	N-AX
	Md	DUV	AX	DUV	DUV	N-AX
	Md-G	DUV	AX	AX	AX	DUV
	G	N-AX	AX	AX	AX	AX
	MG	N-AX	DUV	AX	AX	AX

O *modus ponens generalizado* é adotado como o mecanismo de inferência. A relação *fuzzy* é determinada pela utilização do mínimo na definição do operador de implicação *fuzzy* (Relação de Mamdani).

Como não há um procedimento sistemático para escolher uma estratégia de *defuzzificação* (LEE, 1990), o método do centro de área é adotado neste sistema,

dado que o mesmo considera todo o universo de saída ponderado pelos graus de pertinência.

A Figura 7 mostra as imagens resultantes para a classificação das regiões da imagem apresentada na Figura 5-b, segundo as abordagens 2 e 3.

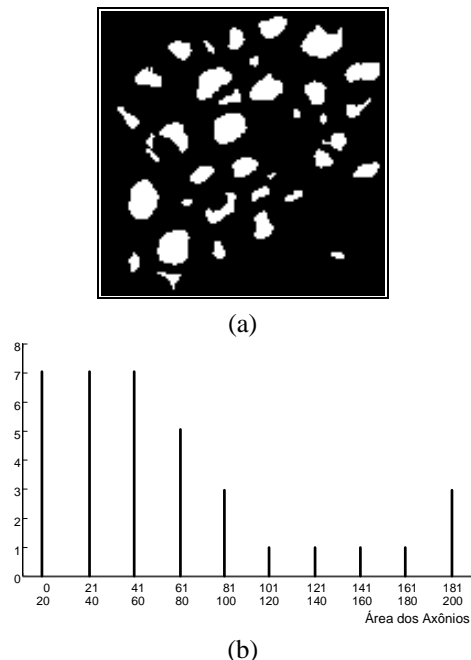


**Figura 7:** Classificação *fuzzy* segundo a abordagem 2: (a1) Axônios; (b1) Não-axônios; (c1) Duvidosos. Classificação *fuzzy* segundo a abordagem 3: (a2) Axônios; (b2) Não-axônios; (c2) Duvidosos.

## 2.6. Quantificação e Qualificação de Axônios

Ao final do processo, todas as regiões classificadas como axônios nas etapas de classificação *fuzzy* e reclassificação manual são agrupadas para que se possa realizar a contagem do número de axônios, bem como qualificar os axônios quanto à sua área e forma. A Figura 8-a mostra a imagem resultante deste agrupamento, quando considerada a abordagem 2. Como exemplo de uma possível quantificação, a Figura 8-b mostra o histograma para a área dos axônios

classificados. Outras medidas quantitativas podem ser obtidas a partir das seções classificadas.



**Figura 8:** Resultado final para a abordagem 2: (a) Imagem dos axônios classificados pelo sistema; (b) Histograma do tamanho dos axônios da imagem da Figura 8-a.

### 3. Resultados e Discussões

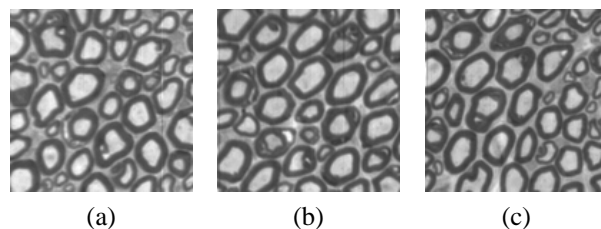
O processo, em suas três abordagens, foi aplicado às imagens da Figura 9. A TABELA IV apresenta os erros percentuais de contagem, determinados em relação a um processo manual, para as abordagens consideradas. Observa-se uma superioridade da proposta baseada no classificador *fuzzy* em comparação com o método proposto por BLIGHT (1983), mesmo para a abordagem totalmente automática (Abordagem 1). A TABELA V apresenta os erros percentuais de classificação dos axônios, determinados em relação a um processo manual, para as três abordagens consideradas. Quanto à classificação correta dos axônios, a abordagem 3 apresenta superioridade sobre as outras duas. Este fato era esperado visto que tal abordagem classifica como axônios e não-axônios apenas as regiões com alto grau de certeza e deixa uma maior quantidade de regiões duvidosas para reclassificação manual.

### 4. Conclusões

Os resultados obtidos demonstram a adequabilidade do método proposto para a quantificação e qualificação de axônios mielínicos, já que os erros obtidos estão dentro de faixas admissíveis. Todavia, é necessária uma

avaliação estatística do erro para assegurar a aplicabilidade do método.

Também se observa, como já mencionado na introdução, que sistemas completamente automáticos para a quantificação e qualificação de axônios apresentam erros maiores, confirmando a tendência da necessidade de métodos semi-automáticos.



**Figura 9:** Imagens processadas pelo sistema: (a) Imagem 1; (b) Imagem 2; (c) Imagem 3.

**TABELA IV:** Erros percentuais de contagem determinados em relação à contagem manual

Imagens	Abordagens			Método de Blight (1983)
	1	2	3	
1	- 6,4 %	0 %	0 %	- 3,2 %
2	+ 8,7 %	+ 4,3 %	0 %	+ 13,0 %
3	0 %	- 3,1 %	- 3,1 %	+ 21,8 %

**TABELA V:** Erros percentuais de classificação de axônios determinados em relação à classificação manual

Imagens	Abordagens		
	1	2	3
1	- 19,3 %	- 6,4%	0%
2	- 21,7 %	- 8,7%	- 4,3%
3	- 12,5 %	- 3,1%	- 3,1%

### Referências

- ABUTALEB, A. S. Automatic thresholding of gray level pictures using two-dimensional entropy. *Computer Vision, Graphics, and Image Processing*, v. 47, p. 22-32, 1989.
- AUER, R. N. Automated nerve fibre size and myelin sheath measurement using microcomputer-based digital image analysis: theory, method and results. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 51, p. 229-238, 1994.
- BARRERA, J.; BANON, J. F.; LOTUFO R. A. Mathematical morphology toolbox for the Khoros system. *Conf. on Image Algebra and Morphological Image Processing V, International Symposium on Optics, Imaging and Instrumentation, SPIE's Annual Meeting, 24-29 July, San Diego, USA, 1994.*
- BLIGHT, A. R. Cellular morphology of chronic spinal cord injury in the cat: analysis of myelinated axons by line-sampling. *Neuroscience*, v. 10, n. 2, p. 521-543, 1983.

- BOOKSTEIN, F. L. "Size and shape": a comment on semantics. *Systematic Zoology*, v. 38, n. 2, p. 173-180, 1989.
- BRINK, A. D. Minimum spatial entropy threshold selection. *IEE Proceedings-Vision Image and Signal Processing*, v. 142, n. 3, p. 128-132, 1995.
- BRINK, A. D. & PENDOCK, N. E. Minimum cross-entropy threshold selection. *Pattern Recognition*, v. 29, n. 1, p. 179-188, 1996.
- CHANG, C-I C.; CHEN, K.; WANG, J.; ALTHOUSE, M. L. G. A relative entropy-based approach to image thresholding. *Pattern Recognition*, v. 27, n. 9, p. 1275-1289, 1994.
- ESPIR, M. L. E. & HARDING, D. T. C. Apparatus for measuring and counting myelinated nerve fibres. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, v. 24, p. 287-290, 1961.
- FIELDS, R. D. & ELLISMAN, M. H. Axons regenerated through silicone tubes splices. II. Functional morphology. *Experimental Neurology*, v. 92, p. 61-74, 1986.
- FRIEDE, R. L. & BISCHHAUSEN, R. How are sheath dimensions affected by axon caliber and internodal length? *Brain Research*, v. 235, p. 335-350, 1982.
- FRYKMAN, G. K.; MCMILLAN, P. J.; YEGGE, S. A review of experimental methods measuring peripheral nerve regeneration in animals. *Orthop. Clin. North Am.*, v. 19, p. 209-219, 1988.
- GONZALES, R.C. & WOODS, R. E. *Digital Image Processing*. Reading: Addison-Wesley, 1993.
- HARMAN, K.; KATNICK, J.; DE LA TORRE, J. C. A quick and accurate line-sampling technique to quantify myelinated axons in peripheral nerve cross-sections. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 38, p. 107-110, 1991.
- HUANG, L-K & WANG, M-J, J. Image thresholding by minimizing the measures of fuzzyness. *Pattern Recognition*, v. 28, n. 1, p. 41-51, 1995.
- KIMMEL, R.; SHAKED, D.; KIRYATI, N.; BRUCKSTEIN, A. M. Skeletonization via distance maps and level sets. *Computer Vision and Image Understanding*, v. 62, n. 3, p. 382-391, 1995.
- LI, C. H. & LEE, C. K. Minimum cross entropy thresholding. *Pattern Recognition*, v. 26, n. 4, p. 617-625, 1993.
- LEE, C. C. Fuzzy logic in control systems: fuzzy logic controller - part I & part II. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, v. 20, n.2, p. 404-434, 1990.
- LEE, S. U.; CHUNG, S. Y.; PARK, R. H. A comparative performance study of several global thresholding techniques for segmentation. *Computer Vision, Graphics, and Image Processing*, v. 52, p. 171-190, 1990.
- MAHMOUD, S. A.; ABUHAIBA, I.; GREEN, R. J. Skeletonization of arabic characters using clustering based skeletonization algorithm. *Pattern Recognition*, v. 24, n. 5, p. 453-464, 1991.
- PAL, N. R. On minimum cross-entropy thresholding. *Pattern Recognition*, v. 29, n. 4, p. 575-580, 1996.
- SAHOO, P. K.; SOLTANI, S.; WONG, A. K. C.; CHEN, Y. C. A survey of thresholding techniques. *Computer Vision, Graphics, and Image Processing*, v. 41, p. 233-260, 1988.
- SERRA, J. Introduction to mathematical morphology. *Computer Vision, Graphics, and Image Processing*, v. 35, p. 283-305, 1986.
- SHANBHAG, A. G. Utilization of information measure as a means of image thresholding. *CVGIP: Graphical Models and Image Processing*, v. 56, n. 5, p. 414-419, 1994.
- SHIH, F. Y & PU, C. C. A skeletonization algorithm by maxima tracking on Euclidean distance transform. *Pattern Recognition*, v. 28, n. 3, p. 331-341, 1995.
- TRAHANIAS, P. E. Binary shape recognition using the morphological skeleton transform. *Pattern Recognition*, v. 25, n. 11, p. 1277-1288, 1992.
- TRIER, F. D. & TAXT, T. Evaluation of binarization methods for document images. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, v. 17, n. 3, p. 312-315, 1995.
- VITA, G.; SANTORO, M.; TROMBETTA, G.; LEONARDI, L.; MESSINA, C. A computer-assisted automatic method for myelinated nerve fiber morphometry. *Acta Neurologica Scandinavica*, v. 85, p. 18-22, 1992.
- VOGT, R. C. Robust extraction of axon fibers from large-scale electron micrograph mosaics. *Mathematical Morphology and its Application to Image and Signal Processing*, p. 433-441, Atlanta:Kluwer Academic Publishers, 1996.
- ZHANG, Y. J. A survey on evaluation methods for image segmentation. *Pattern Recognition*, v. 29, n. 8, p. 1335-1346, 1996.
- ZIMMERMAN, I. R.; KARNES, J. L.; O'BRIEN, P. C.; DYCK, P. J. Imaging system for nerve and fiber tract morphometry: components, approaches, performance, and results. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, v. 39, p. 409-419, 1980.