

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
CAMPUS DE RIO PARANAÍBA
SISTEMAS DE INFORMAÇÃO

LARISSA FERREIRA RODRIGUES

**SEGMENTAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE ERITRÓCITOS
EM IMAGENS DE MICROSCOPIA**

RIO PARANAÍBA
2015

LARISSA FERREIRA RODRIGUES

SEGMENTAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE ERITRÓCITOS
EM IMAGENS DE MICROSCOPIA

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

Orientador: Prof. Dr. João Fernando Mari

RIO PARANAÍBA

2015

Resumo

A computação aplicada à medicina tem proporcionado consideráveis avanços no que diz respeito a obtenção de melhores diagnósticos e tratamentos. Permite-se assim o aprimoramento de pesquisas e o desenvolvimento de ferramentas capazes de gerar soluções para diversos contextos. Diante disso, verifica-se que o estudo da morfologia celular traz importantes contribuições para o diagnóstico de várias doenças. As anemias hereditárias, por exemplo, caracterizam-se como doenças incuráveis, definidas por fatores genéticos e que afetam a produção de hemoglobina. Podem ser determinadas a partir da análise morfológica dos eritrócitos em imagens de microscopia, por meio da observação de fatores baseados em forma, tamanho e cor. Nos dias atuais esse diagnóstico efetiva-se por meio de inspeção visual de microscopia e requer um especialista humano. O objetivo deste trabalho é aplicar técnicas de Processamento Digital de Imagens e Visão Computacional a fim de analisar a forma de eritrócitos em amostras de esfregaços sanguíneos e verificar a presença de anomalias. Propõem-se um método que permite segmentar e classificar os eritrócitos em imagens de microscopia por meio das etapas de pré-processamento, segmentação, filtragem morfológica, transformada *watershed* e testar a classificação usando Máquinas de Vetor e Suporte (*Support Vector Machines - SVM*) e K-Vizinhos mais Próximos (*Nearest Neighbor - KNN*). Por fim, avaliar a eficiência da segmentação e classificação.

Palavras-chaves: eritrócitos, glóbulos vermelhos, segmentação, classificação, svm, knn.

Abstract

Computing applied to the medicine field has supplied us with countless advancement in obtaining of better diagnosis and treatments. Thus, it allows the upgrading of researches and the development of tools capable of creating solutions for many contexts. In this way, it is verified that the study of the morphology of the cell brings important contributions to the diagnosis of several diseases. Hereditary anemia, for example, characterizes itself as an incurable disease, defined by genetic factors that affect the production of hemoglobin. It can be determined after the morphological analysis of erythrocytes in microscopy images, though the observation of factors based on shape, size and color. Nowadays, this diagnosis is made by microscopy visual inspection and requires a human expert. The intent of this study is to apply Digital Processing of Images and Computational Vision techniques to analyze erythrocytes shapes in sanguine smears samples and verify the presence of anomalies. It is proposed a method that allows the segmentation and classification of the erythrocytes in microscopy images through the steps of pre-processing, segmentation, morphological filtering, watershed transform and the testing of classification using Support Vector Machines (SVM) and K-Nearest Neighbors (KNN). Finally evaluate the efficiency of segmentation and classification.

Key-words: erythrocytes, red blood cells, segmentation, classification, svm, knn.

Listas de ilustrações

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Micrografia eletrônica de varredura de eritrócitos humanos normais com ampliação de 6.500 vezes. Destaque para a forma bicôncava. Adaptado de Junqueira e Carneiro (1985). | 13 |
| Figura 2 – Sangue periférico de um portador de anemia falciforme. Adaptado de Bunn e Aster (2011). | 14 |
| Figura 3 – Sangue periférico de um portador de talassemia. Adaptado do <i>dataset</i> da Hematology (2015). | 16 |
| Figura 4 – Representação de uma imagem digital. | 16 |
| Figura 5 – Máscaras de vizinhança consideradas para a aplicação de filtros espaciais. (A) Máscara de tamanho 3x3. (B) Máscara de tamanho 5x5. (C) Máscara de tamanho 7x7. O elemento central da máscara localiza-se sobre o <i>pixel</i> p | 18 |
| Figura 6 – Máscara 3x3 com todos os coeficientes do filtro com valor 1 e, após a filtragem, divide toda a imagem por 9. | 19 |
| Figura 7 – Quatro tipos básicos de imagens e seus histogramas correspondentes. (A) imagem escura, (B) imagem clara, (C) imagem com baixo contraste e (D) imagem com alto contraste. Adaptado de Gonzalez e Woods (2007). | 20 |
| Figura 8 – Exemplos de elementos estruturantes. (A) Em forma de cruz. (B) Quadrado. (C) Segmento de linha. (D) Losango. | 23 |
| Figura 9 – Dilatação de uma imagem por um elemento estruturante. (A) Imagem binária A . (B) Elemento estruturante B . (C) Dilatação de A por B . (D) Imagem resultante da dilatação. | 24 |
| Figura 10 – Erosão de uma imagem por um elemento estruturante. (A) Imagem binária A . (B) Elemento estruturante B . (C) Erosão de A por B . (D) Imagem resultante da erosão. | 25 |
| Figura 11 – Abertura de uma imagem por um elemento estruturante em forma de cruz. (A) Imagem binária A . (B) Elemento estruturante B . (C) Abertura de A por B . (D) Imagem resultante da abertura. | 26 |
| Figura 12 – Fechamento de uma imagem por um elemento estruturante em forma de cruz. (A) Imagem binária A . (B) Elemento estruturante B . (C) Fechamento de A por B . (D) Imagem resultante do fechamento. | 26 |

| | |
|--|----|
| Figura 13 – Simulação de inundação da transformada <i>watershed</i> (A) O sinal de entrada. (B) Início do processo de inundação e criação dos pontos de inundação em todos os mínimos regionais do sinal, permite-se assim a emersão uniforme a partir desses pontos. (C) A barragem (<i>watershed lines</i>) é criada a partir do momento que as águas de mínimos diferentes estão prestes a se encontrar. (D) Ao final do processo de inundação, as barragens representam os objetos segmentados presentes na imagem. Adaptado de Lotufo, Audigier et al. (2008) | 27 |
| Figura 14 – Simulação de inundação da transformada <i>watershed</i> com marcadores. (A) Pontos de inundação são criados apenas sobre os marcadores (B) A água que se origina de um ponto de inundação (representado pela cor verde) encontra um mínimo regional sem marcador (cor branca) ocorre o transbordamento para dentro deste. (C) No caso das águas de marcadores distintos (representados pelas cores verde e azul) estão prestes a se encontrar uma barragem (<i>watershed line</i>) é criada (D) A inundação é concluída quando a superfície da água cobre todos os máximos regionais. Adaptado de Lotufo, Audigier et al. (2008) | 28 |
| Figura 15 – Etapas de um sistema de classificação de formas: primeiramente realiza-se a extração das características a partir das formas dos objetos, as características são normalizadas e tem-se a classificação. Adaptado de Costa e Cesar-Jr. (2009) | 30 |
| Figura 16 – Algumas das variações mais frequentes no tamanho e forma que podem ser observadas em diferentes anemias. Adaptado de Hoffbrand e Moss (2013). | 31 |
| Figura 17 – Diferentes tipos de anemias de acordo com a morfologia. (A) Anemia microcítica. (B) Anemia normocítica. (C) Anemia macrocítica. Imagens disponíveis no <i>dataset</i> da Hematology (2015) | 32 |
| Figura 18 – Funcionamento do <i>KNN</i> . (A) K assume valor 1 e o novo elemento é classificado como quadrado. (B) K assume valor 3 e o novo elemento é classificado como triângulo. (C) K assume valor 7 e o novo elemento é classificado como quadrado. A escolha da classe pertencente deu-se a partir da distância do novo elemento em relação as demais classes. | 34 |

| | |
|--|----|
| Figura 19 – Ilustração do processo de treinamento de um classificador <i>SVM</i> , 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) | 36 |
| 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 <i>SVM</i> busca maximizar a margem que separa os vetores de suporte (em vermelho) do hiperplano. | |
| Adaptado de Mari e Saito (2015). | 41 |
| Figura 20 – Ilustração geral das etapas do métodos propostos. | |

Lista de tabelas

Tabela 1 – Cronograma Normal 46

Sumário

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Introdução | 10 |
| 1.1 | Objetivos | 11 |
| 1.2 | Organização do Trabalho | 11 |
| 2 | Fundamentação Teórica | 12 |
| 2.1 | Distúrbios em Eritrócitos | 12 |
| 2.1.1 | Anemia Falciforme | 13 |
| 2.1.2 | Talassemia | 14 |
| 2.2 | Processamento e Análise de Imagens de Microscopia | 16 |
| 2.2.1 | Pré-processamento e Correção de Imagens | 17 |
| 2.2.1.1 | Filtragem Espacial | 17 |
| 2.2.1.2 | Melhoria do Contraste | 19 |
| 2.2.2 | Conversão RGB para imagens de Intensidade | 21 |
| 2.2.3 | Segmentação por Limiarização | 21 |
| 2.2.4 | Filtragem Morfológica | 22 |
| 2.2.4.1 | Dilatação e Erosão | 23 |
| 2.2.4.2 | Abertura e Fechamento | 25 |
| 2.2.5 | Transformada <i>Watershed</i> | 27 |
| 2.2.5.1 | Transformada <i>Watershed</i> com Marcadores | 28 |
| 2.2.6 | Extração de Características e Classificação | 29 |
| 2.2.6.1 | Características de Formas para Classificação de Eritrócitos | 30 |
| 2.2.6.2 | Normalização das Características | 33 |
| 2.2.6.3 | K-Vizinhos mais Próximos (<i>K-Nearest Neighbors - KNN</i>) | 33 |
| 2.2.6.4 | Máquinas de Vetor de Suporte (<i>Support Vector Machines - SVM</i>) | 35 |
| 2.3 | Considerações Finais | 37 |
| 3 | Trabalhos Relacionados | 38 |
| 3.1 | Considerações Finais | 39 |
| 4 | Material e Métodos | 40 |
| 4.1 | Ferramentas Computacionais | 40 |
| 4.2 | Aquisição das Imagens | 42 |
| 4.3 | Conversão RGB para imagens de intensidade | 42 |
| 4.4 | Pré-processamento | 42 |
| 4.5 | Segmentação | 42 |
| 4.6 | Transformada <i>Watershed</i> e Transformada <i>Watershed</i> com marcadores | 43 |
| 4.7 | Extração de Características | 43 |
| 4.8 | Classificação | 43 |

| | | |
|--------------------|-----------------------------|-----------|
| 4.9 | Considerações Finais | 44 |
| 5 | Resultados Esperados | 45 |
| 6 | Cronograma | 46 |
| Referências | | 47 |

1 Introdução

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 95% da população mundial é afetada por anemia, um problema de saúde pública que acarreta morbidade e mortalidade infantil, de modo notável nos países em desenvolvimento. Tem-se como principais causas: deficiência nutricional, doenças tropicais, infecções por parasitas e herança genética (MCLEAN et al., 2009). Sendo esta última, de forma geral, com diagnóstico clínico e laboratorial ineficiente.

No Brasil há um considerável número de casos de anemias hereditárias, devido ao fato de que o país passou por um processo de miscigenação desde os tempos de colonização, o que gerou uma grande dispersão de genes anormais (MELO-REIS et al., 2006). Dentre os vários tipos de anemias hereditárias, destacam-se a falciforme e a talassemia. Ambas definem-se como hemoglobinopatias, pois afetam a produção de hemoglobina e faz com que uma ou mais cadeias de globina sejam total ou parcialmente suprimidas e assim acarreta um problema quantitativo de globinas pouco sintetizadas (KAUSHANSKY et al., 2010).

A anemia falciforme é a doença hereditária mais prevalente no Brasil, causada por uma mutação genética da hemoglobina, tornando-a anormal e dando aos glóbulos vermelhos o formato de uma foice (HOFFMAN et al., 2012). O Ministério da Saúde afirma que há aproximadamente 30 mil casos estimados e anualmente cerca de 3500 crianças nascem com a doença e 200 mil apresentam o traço falciforme que pode ser transmitido para gerações futuras (SAÚDE, 2015). A talassemia também se faz presente no Brasil em considerável proporção. Dados da Associação Brasileira de Talassemia (ABRASTA) demonstram que a região Sudeste abrange 57% dos casos, sendo que em todo o país há milhões de pessoas que apresentam o gene da doença (ABRASTA, 2015).

Diante desse contexto, vale a pena ressaltar que as últimas três décadas trouxeram avanços consideráveis para a medicina, principalmente no que diz respeito a análise de imagens médicas, permitindo assim a obtenção de melhores diagnósticos e tratamentos. Evidencia-se que as técnicas de Processamento Digital de Imagens exercem um importante papel e são úteis para inúmeros propósitos, tornando-se responsável pelo aprimoramento de pesquisas, surgimento de novos equipamentos, bem como, desenvolvimento de novas tecnologias e soluções para os mais variados contextos (DOUGHERTY, 2009).

A aplicação das técnicas de Processamento Digital de Imagens no diagnóstico de doenças sanguíneas, especificamente de anemias, apresenta-se como uma ferramenta muito versátil e promissora, pois atualmente esse diagnóstico efetiva-se por meio de inspeção visual de microscopia e esse processo, além de requerer um especialista humano, demanda

grande tempo de análise, inconsistência ao obter os resultados e, consequentemente, está suscetível a erros (RITTER; COOPER, 2007).

Nesta perspectiva, a proposta de diagnóstico de anemias hereditárias por meio de processamento de imagem, é uma alternativa que facilita a obtenção de resultados consistentes e que também mostra-se capaz de ser uma ferramenta que contribui para pesquisas relacionadas ao aprimoramento de diagnóstico médico auxiliado por imagens.

1.1 Objetivos

Aplicar técnicas de Processamento Digital de Imagens e Visão Computacional para segmentação e classificação de eritrócitos em imagens de microscopia. Avaliar a performance dos algoritmos utilizados e proporcionar contribuições na área de Processamento Digital de Imagens aplicada à medicina.

1.2 Organização do Trabalho

O presente trabalho organiza-se da seguinte forma: O Capítulo 1 apresenta a introdução ao tema, motivação, justificativa e os objetivos do trabalho. O Capítulo 2 apresenta a fundamentação teórica para subsidiar o desenvolvimento do trabalho. O Capítulo 3 traz um levantamento de trabalhos relacionados com o proposto. O Capítulo 4 descreve o material e métodos propostos. O Capítulo 5 discute os resultados esperados e o cronograma de atividades é apresentado no Capítulo 6. As referências bibliográficas são apresentadas na sequência.

2 Fundamentação Teórica

Neste capítulo são abordados conceitos que embasam o desenvolvimento deste trabalho. Inicialmente realiza-se a conceituação das anomalias em eritrócitos e, após, são apresentadas as principais anomalias de caráter hereditário, com abordagem histórica, descrição da forma de manifestação e informações sobre diagnóstico e tratamento. Realiza-se uma revisão das principais técnicas e algoritmos de processamento e visualização de imagens. Destaca-se os conceitos relacionados à Visão Computacional e suas respectivas técnicas, ferramenta chave para o diagnóstico médico auxiliado por imagens digitais. Efetiva-se o detalhamento dos conceitos abordados para que estes possam ser usados como subsídio para o trabalho proposto.

2.1 Distúrbios em Eritrócitos

Apesar de seu aspecto líquido, o sangue é um tecido fundamental para manutenção de todos os demais órgãos do corpo humano. É composto por duas partes: plasma e glóbulos sanguíneos, sendo que o plasma corresponde por cerca de 55% do volume do sangue e os glóbulos sanguíneos correspondem aos eritrócitos, plaquetas e glóbulos brancos. Manter um equilíbrio entre o ritmo de produção e de destruição das células do sangue, assim como a manutenção da composição do plasma, são vitais aos processos de oxigenação e nutrição dos tecidos, bem como de defesa do organismo (BUNN; ASTER, 2011).

Os eritrócitos, também chamados de hemácias ou glóbulos vermelhos, são as células em maior quantidade no sangue humano. Caracterizam-se por ser anucleados e conter uma grande quantidade de hemoglobina, uma proteína transportadora de oxigênio (O_2) e gás carbônico (CO_2). Apresentam a forma de um disco bicôncavo, conforme ilustra a Figura 1, o que proporciona grande superfície em relação ao volume e facilita as trocas de gases (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1985).

Segundo Junqueira e Carneiro (1985), há diversos tipos de distúrbios que afetam a produção ou a função dos glóbulos vermelhos. Dentre eles destaca-se as anemias, doenças caracterizadas pela baixa concentração de hemoglobina no sangue, ou pela presença de hemoglobina não funcional, o que resulta em oxigenação reduzida para os tecidos. Na maioria das vezes a anemia é consequência da diminuição do número de eritrócitos, no entanto, há situações em que o número de eritrócitos está normal, mas cada um deles contém pouca hemoglobina.

As anemias podem ser causadas por: deficiência nutricional, doenças tropicais, infecções por parasitas e herança genética (MCLEAN et al., 2009). Em cada uma dessas condições podem existir variadas causas e, por esse motivo, muitas vezes as anemias são

manifestações de outras doenças subjacentes.

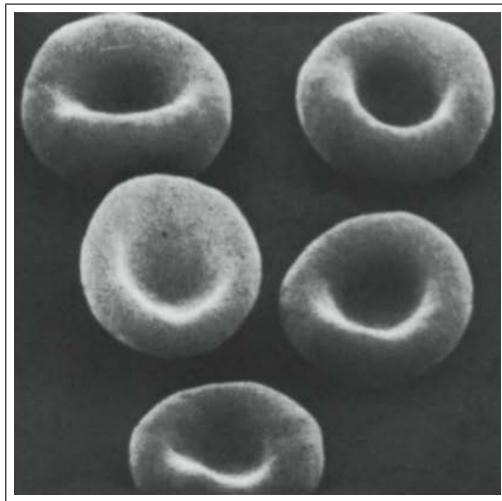


Figura 1 – Micrografia eletrônica de varredura de eritrócitos humanos normais com ampliação de 6.500 vezes. Destaque para a forma bicôncava. Adaptado de Junqueira e Carneiro (1985).

Milhões de pessoas apresentam uma herança genética de hemoglobinas anormais em suas diferentes combinações e isso pode ocasionar uma doença quase imperceptível à letal (LEONELI et al., 2000). Vale a pena ressaltar que ainda não há cura para as anemias hereditárias e uma boa alternativa consiste em realizar o diagnóstico precoce e tratamento adequado, o que permite uma significativa redução da morbidade e mortalidade (MELO-REIS et al., 2006)

A seguir são apresentadas as principais anemias hereditárias que serão objeto de estudo para o presente trabalho.

2.1.1 Anemia Falciforme

O primeiro relato científico da anemia falciforme foi feito pelo médico norte-americano Herrick (1910), enquanto por meio de microscopia verificou o aspecto anômalo e alongado dos eritrócitos em um estudante de medicina. Essa alteração genética é a mais comum em todo o mundo e teve sua origem no continente Africano, aparece com maior incidência na África, Arábia Saudita e Índia. No Brasil, a anemia falciforme constitui um grupo de doenças e agravo relevantes, ocorrendo predominantemente em afrodescendentes (CANÇADO; JESUS, 2007).

A anemia falciforme é caracterizada por um tipo de hemoglobinopatia designada como hemoglobina S (ou Hb S), que provoca a distorção dos eritrócitos, fazendo-os tomar a forma morfológica de “foice” ou “meia-lua”, conforme a Figura 2. Por isso, tem-se como resultado glóbulos vermelhos pouco duráveis e que, em razão da morfologia que apresentam, dificultam a passagem do sangue por alguns vasos sanguíneos de menor calibre, prejudicando também a oxigenação dos tecidos (KAUSHANSKY et al., 2010).

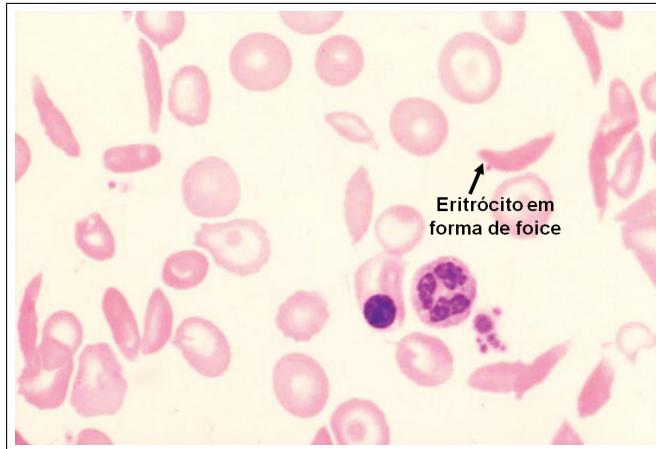


Figura 2 – Sangue periférico de um portador de anemia falciforme. Adaptado de Bunn e Aster (2011).

Para um indivíduo ser portador da doença, o gene alterado é transferido pelo pai e pela mãe. Se for transmitido apenas por um dos pais, o filho terá o traço falciforme, que poderá passar para seus descendentes, mas não a doença manifesta (STUART; NAGEL, 2004). O indivíduo com traço falciforme, não é anêmico e não requer tratamento. Já o indivíduo portador da doença pode apresentar sintomatologia considerável e graves complicações.

De acordo com Hoffman et al. (2012), os principais sintomas da anemia falciforme consistem em: dores intensas nos ossos e nas articulações; palidez e icterícia; fadiga intensa; tendência a infecções; atraso no crescimento; cálculos biliares e outros eventuais sintomas.

O diagnóstico é estabelecido por meio do exame de eletroforese de hemoglobina, sendo esta a técnica mais específica para identificar a anemia falciforme. Ressalta-se também que a presença da hemoglobina S pode ser detectada pelo teste do pezinho quando a criança nasce e por análise morfológica. Nota-se que o diagnóstico precoce, sobretudo ao nascimento, e o tratamento adequado proporcionam melhorias significativas para os portadores da doença (PAIVA et al., 1993).

Ainda não há cura para a anemia falciforme ou um tratamento específico. Os portadores precisam de acompanhamento médico constante para manter a oxigenação adequada nos tecidos e a hidratação, prevenir infecções e controlar as crises de dor.

2.1.2 Talassemia

Foi descrita pela primeira vez por Cooley e Lee (1925), sendo caracterizada como um tipo grave de anemia manifesto nos primeiros anos de vida, que ocasiona aumento do volume do baço e alterações ósseas em seus portadores, também passou a ser conhecida como Síndrome de Cooley. Alguns anos depois, Whipple e Bradford (1932) fizeram uma série de descobertas patológicas relacionadas a essa doença e a chamaram de Talas-

semia, sendo etimologicamente constituída das palavras gregas *thalassa* (mar) e *haema* (sangue), pois verificou-se que a doença era prevalente entre as populações europeias do Mediterrâneo.

De acordo com Weatherall e Clegg (2008), a talassemia é resultante de uma anomalia herdada e afeta a produção de hemoglobina, pigmento existente nos glóbulos vermelhos que responde pelo transporte de oxigênio para todos os tecidos e órgãos do corpo. Caracteriza-se como uma doença que ocasiona deficiência total ou parcial da síntese de globina gerando uma produção de hemoglobina defeituosa e danos às células vermelhas. Existem dois tipos de talassemias: *alpha* (α) e *beta* (β), sendo que cada tipo tem em comum um quadro da redução da síntese da cadeia α ou β da hemoglobina. A talassemia- α é mais comum em populações do sudoeste da Ásia, Oriente Médio e de origem Africana. Já a talassemia- β é comum em descendentes de regiões europeias do Mediterrâneo. Ambos os tipos de talassemia incluem as seguintes formas de manifestação: *minor* (assintomática), intermediária e *major* (mais grave) (KAUSHANSKY et al., 2010).

A forma *minor*, também chamada de traço talassêmico, produz um grau de anemia leve, assintomático e que pode passar despercebido, nesse caso, o tratamento efetiva-se por suplementação com ácido fólico. A intermediária caracteriza-se como uma deficiência na síntese de hemoglobina moderada e com consequências menos graves, o tratamento requer transfusões sanguíneas para que seja possível aumentar a oferta de glóbulos vermelhos no organismo. Os indivíduos portadores da forma *minor* ou intermediária, apresentam uma mutação herdada apenas do pai ou somente da mãe. Já a forma *major* é grave, causada pela transmissão de dois genes defeituosos, um do pai e outro da mãe. Ocasiona uma anemia profunda e aspectos como: cansaço, palidez, atraso no crescimento, aumento do baço e problemas ósseos. Nesse caso, o tratamento requer regulares transfusões de sangue e uso de medicamentos para retirar o excesso de ferro do organismo, bem como, transplante de medula óssea (HOFFMAN et al., 2012).

O diagnóstico é estabelecido após o levantamento histórico feito para obter informações sobre a origem étnica do paciente. Também conta com a realização de hemograma com estudo morfológico das hemácias e eletroforese de hemoglobina qualitativa e quantitativa. O esfregaço de sangue periférico de pacientes com talassemia permite observar características como hipocromia e microcitose, que consiste na diminuição da coloração e no diâmetro dos eritrócitos devido à deficiência de hemoglobina, conforme a Figura 3. A análise laboratorial, tem sido um dos grandes esforços da investigação biomédica, pois permite uma maior compreensão da doença e seus distúrbios.

Ainda não existe a cura para talassemia, mas há opções de tratamento que permitem controlar a doença. Nos dias atuais, tem-se como principal forma de prevenção o aconselhamento genético, pois é a única forma dos pais estimarem o risco de gerar um filho com a doença. Ressalta-se que o diagnóstico precoce acompanhado de tratamento

proporciona maiores chances de sobrevivência para o paciente.

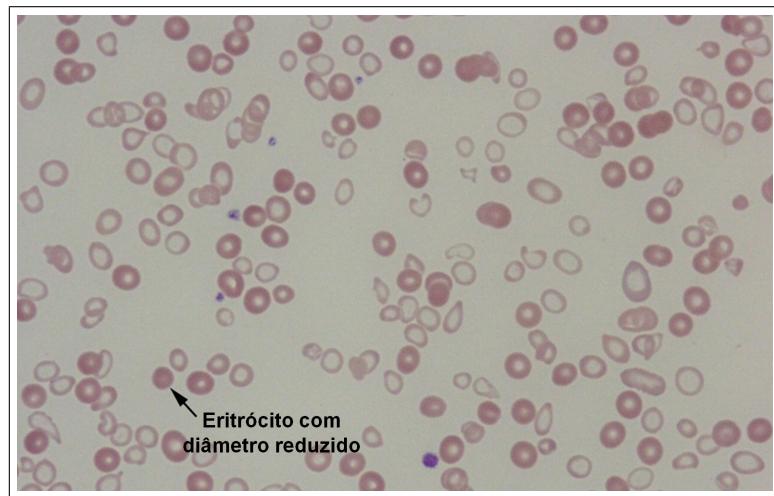


Figura 3 – Sangue periférico de um portador de talassemia. Adaptado do *dataset* da Hematology (2015).

2.2 Processamento e Análise de Imagens de Microscopia

Os métodos de Processamento Digital de Imagens decorrem de duas áreas principais de aplicação: melhoria de informação visual para a interpretação humana e o processamento de dados de cenas para percepção automática através de máquinas. Gonzalez e Woods (2007) definem uma imagem digital como uma função bidimensional (x, y) em que x e y são coordenadas espaciais e o valor de f para qualquer par de coordenadas (x, y) representa a intensidade ou nível de cinza da imagem. Dessa forma, uma imagem digital composta por um número finito de elementos, denominados *pixels*, conforme ilustrado na Figura 4.

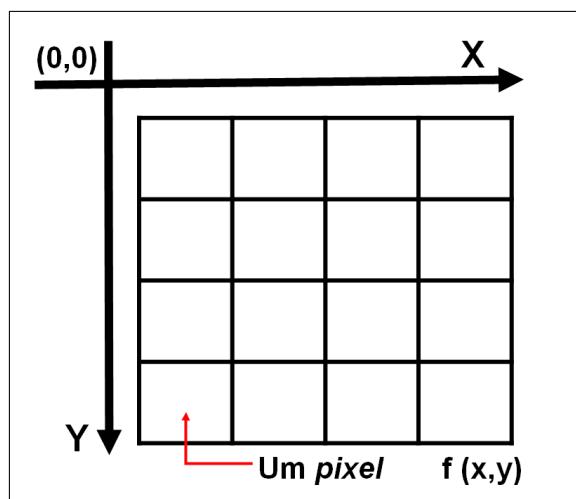


Figura 4 – Representação de uma imagem digital.

Observa-se que houve um advento no uso de microscópios para diversas pesquisas e o processamento digital de imagens não tornou-se apenas uma extensão natural, mas sim essencial para o sucesso subsequente da análise e interpretação de dados, sendo que há modalidades de imagens de microscopia que estão disponíveis para visualização apenas depois de passar por um processamento digital. Dessa forma, percebe-se que o uso de técnicas de processamento digital de imagens proporcionam avanços na medicina e a possibilidade de diagnóstico clínico avançado (WU; MERCHANT; CASTLEMAN, 2008).

2.2.1 Pré-processamento e Correção de Imagens

As imagens de microscopia podem exigir a aplicação de uma etapa de pré-processamento a fim de reduzir ruídos e imperfeições que posteriormente influenciarão o processamento de imagens. Essa etapa faz-se necessária, porque durante a aquisição de imagem o microscópio, mesmo que este encontra-se perfeitamente estável, pode ocorrer movimentos indesejáveis e gerar imagens com ruídos ou imperfeições (WU; MERCHANT; CASTLEMAN, 2008). Logo, a ausência dessa etapa acarreta um processamento de imagens difícil ou impossível, bem como resultados imprecisos.

O pré-processamento tem como principal objetivo melhorar a qualidade da imagem para a execução das etapas subsequentes. Operações realizadas nessa etapa são consideradas de baixo nível, pois trabalham diretamente sobre os valores de intensidade dos *pixels*. Portanto, nessa etapa obtém-se uma imagem digitalizada com melhor qualidade que a original de forma que permite-se aumentar o sucesso dos processos seguintes.

Nesta seção são descritos alguns métodos de pré-processamento de imagens, aplicados a fim de reduzir o ruído, realçar o contraste e corrigir as imperfeições decorrentes da aquisição das imagens.

2.2.1.1 Filtragem Espacial

Consiste em usar máscaras espaciais para processamento de imagens e realçar áreas de interesse. Gonzalez e Woods (2007) ressaltam que a filtragem espacial é muito versátil, pois permite construir filtros lineares por meio de máscaras de correlação e convolução, respectivamente. Esses filtros divergem-se pelo fato de que o processo de correlação consiste em mover uma máscara pela imagem e calcular a soma dos produtos em cada posição, enquanto a correlação trabalha de forma semelhante, mas rotacionando o filtro em 180°. O tamanho da máscara define o nível de suavização e borramento impostos sobre a imagem, no caso dos filtros passa-baixas, quanto maior a máscara, maior será a atenuação do ruído e borramento. A Figura 5 mostra a relação entre máscaras com tamanhos: 3x3, 5x5 e 7x7 em uma imagem 2D.

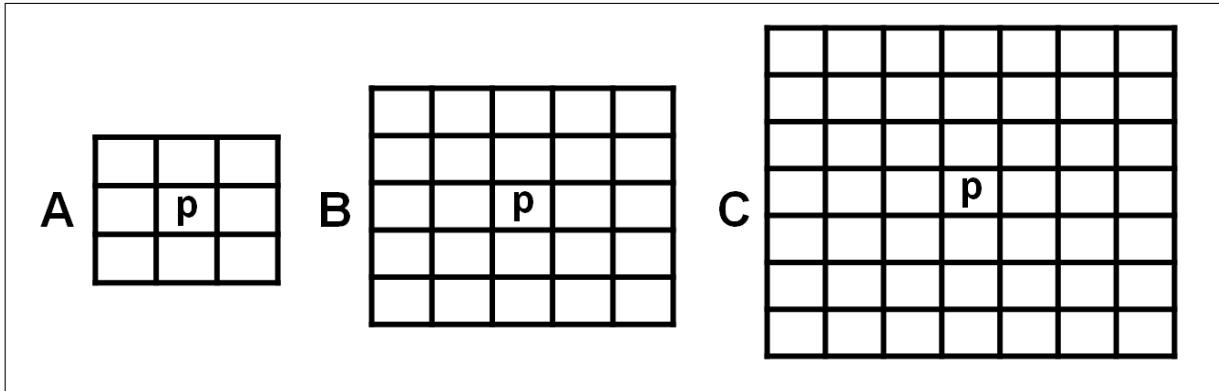


Figura 5 – Máscaras de vizinhança consideradas para a aplicação de filtros espaciais. (A) Máscara de tamanho 3x3. (B) Máscara de tamanho 5x5. (C) Máscara de tamanho 7x7. O elemento central da máscara localiza-se sobre o *pixel p*.

Filtros de suavização são usados para borrar e reduzir ruídos em uma imagem, sendo importantes para a remoção de ruídos visuais, que surgem normalmente como pontos de alto brilho na imagem e estruturas finas e podem provocar uma perda de precisão. Os filtros passa-baixas tem por objetivo atenuar os elementos de alta frequência, como bordas e detalhes finos na imagem. Já os filtros denominados passa-altas caracterizam-se por atenuar os componentes de baixa frequência e aguçam bordas e outros detalhes finos. Há também os filtros passa-faixas que combinam características dos filtros passa-altas e passa-baixas selecionando regiões de frequência específicas na imagem. A seguir são apresentados alguns filtros passa-baixas, também denominados de suavização, utilizados para reduzir o ruído em imagens.

- **Filtragem pela média:** caracteriza-se por ser um filtro que possui todos os coeficientes positivos. Equivale a somar os valores dos *pixels* localizados dentro da máscara e dividir o resultado pela quantidade de *pixels* englobados pela máscara. Assim, o novo valor atribuído ao *pixel* central corresponde à média dos *pixels* dentro da máscara, sendo esse um fator de normalização (GONZALEZ; WOODS, 2007).

A filtragem pela média tem como resposta da máscara linear é a Equação 2.1 :

$$R = w_1 z_1 + w_2 z_2 + \dots + w_m z_m \quad (2.1)$$

em que w_i é o valor da máscara e z_j é o valor do *pixel* sobre ela. O valor médio dos níveis de cinza na vizinhança em que o filtro está posicionado é computado de forma mais eficiente, conforme a Figura 6.

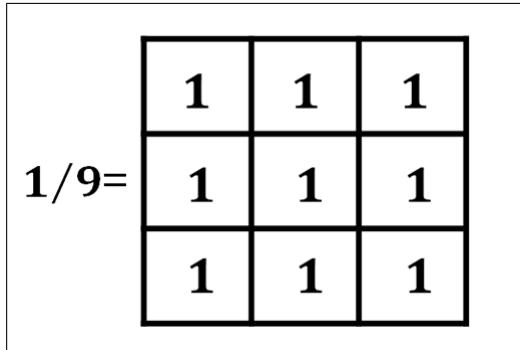


Figura 6 – Máscara 3x3 com todos os coeficientes do filtro com valor 1 e, após a filtragem, divide toda a imagem por 9.

- **Filtragem pela mediana:** é capaz de reduzir o ruído e ao mesmo tempo preservar a forma original dos objetos, define-se por pesos em função da distância do *pixel* central, ou seja, de acordo com Burger e Burge (2009) esse filtro atribui pesos individuais para as posições na região do filtro, *pixels* no centro da máscara possuem um peso maior do que os demais. Os demais pesos do filtro são ponderados de acordo com a função de distância que estão do *pixel* central. Esse filtro é recomendável para aplicações que tem por objetivo atenuar as altas frequências com menor borramento nas arestas. Como é baseado em uma operação de ordenação é considerado um filtro não-linear.

2.2.1.2 Melhoria do Contraste

O histograma de uma imagem digital em níveis de cinza é computado como uma função $p(r_k)$, definida pela Equação 2.2,

$$p(r_k) = \frac{n_k}{n}. \quad (2.2)$$

Em que r_k é o k -ésimo nível de cinza, n_k é o número de *pixels* na imagem com r_k e n é o número total de *pixels* na imagem (GONZALEZ; WOODS, 2007). A forma do histograma de uma imagem concede informação útil sobre a possibilidade de realce para contraste. Primeiramente, o histograma fornece a descrição global da imagem. Se o histograma da imagem é estreito, significa que a imagem é pouco visível, pois a diferença nos níveis de cinza presente na imagem é baixa. Quando os níveis de cinza encontram-se distribuídos uniformemente significa que há um maior contraste resultando em uma melhor visibilidade (ACHARYA; RAY, 2005).

A Figura 7 exemplifica os quatro tipos básicos de imagens e seus respectivos histogramas.

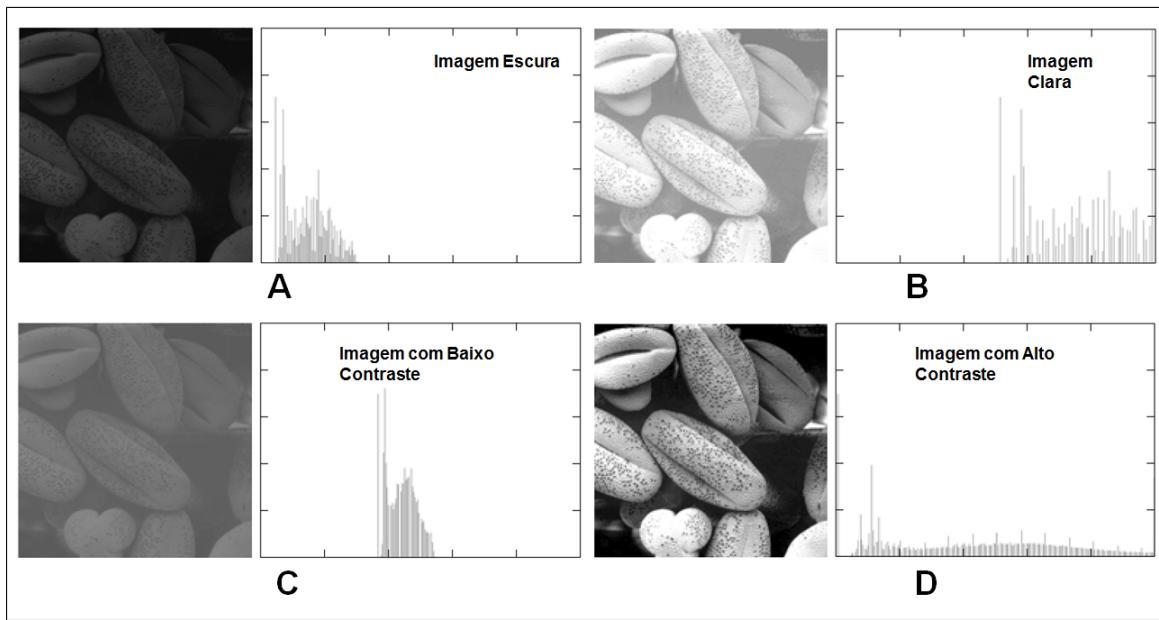


Figura 7 – Quatro tipos básicos de imagens e seus histogramas correspondentes. (A) imagem escura, (B) imagem clara, (C) imagem com baixo contraste e (D) imagem com alto contraste. Adaptado de Gonzalez e Woods (2007).

- **Normalização de Histograma:** a forma mais simples para melhorar o contraste das imagens é por meio da normalização do seu histograma. A normalização permite a distribuição de intensidade dos *pixels* ao longo de toda a faixa de valores válidas para a imagem. Isso é definido por meio da Equação 2.3

$$f(x) = \frac{x - I_{min}}{I_{max} - I_{min}}. \quad (2.3)$$

Em que $f(x)$ é a função de transferência que normaliza as intensidades da imagem e I_{min} e I_{max} representam a amplitude da luminosidade na imagem, sendo as intensidades mínima e máxima, respectivamente (TELEA, 2007).

- **Equalização de Histograma:** técnica que consiste em ajustar a escala de tons de cinza de uma imagem para que o histograma de níveis de cinza da imagem de entrada seja mapeado em um histograma uniforme, ou seja, o contraste é melhorado por meio da transformação de uma imagem original I em uma I' (ACHARYA; RAY, 2005)

Gonzalez e Woods (2007) afirmam que a equalização é um método útil para obtenção de um melhoramento automático na imagem, pois permite resultados previsíveis e de fácil implementação. Ressalta-se também que a equalização é capaz de gerar uma aproximação de um histograma uniforme, mas não permite realçar certas escalas de cinza numa imagem.

2.2.2 Conversão RGB para imagens de Intensidade

A conversão de uma imagem RGB, sistema de cores aditivas formadas por Vermelho (*Red*), Verde (*Green*) e Azul (*Blue*), para imagens de intensidade consiste em computar o valor de cinza Y equivalente para cada *pixel* RGB (BURGER; BURGE, 2009). De forma simples, Y é computado pelo cálculo da média dos três componentes de cor R, G e B, conforme a Equação 2.4:

$$Y = \text{Média}(RGB) = \frac{R + G + B}{3} \quad (2.4)$$

A Equação 2.5 consiste na soma ponderada dos componentes de cor, utilizada para calcular o valor da luminância equivalente e dessa forma a imagem resultante não aparecerá muito escura nas áreas vermelhas e verdes e muito brilhante nas áreas azuis.

$$Y = Lum(RGB) = W_R.R + W_G.G + W_B.B \quad (2.5)$$

em que os pesos correspondem a:

$$W_R = 0.299 \quad W_G = 0.587 \quad W_B = 0.114$$

2.2.3 Segmentação por Limiarização

O processo de segmentação de imagens faz parte de um amplo e ativo campo e consiste em subdividir uma imagem em suas partes ou objetos constituintes, ou seja, ocorre a divisão dos *pixels* de objetos (*foreground*) e *pixels* de fundo (*background*). Essa é uma das tarefas mais difíceis em processamento de imagens e não resulta de um processo trivial (GONZALEZ; WOODS, 2007).

Vários métodos e abordagens são utilizados e a escolha de um método em particular depende das características do problema a ser resolvido. A segmentação é um passo essencial antes da descrição, reconhecimento ou classificação de uma imagem, pode ser feita: baseada em formatos e assim efetivar a detecção de descontinuidades, pontos, linhas ou bordas; baseada em características dos *pixels* e contar com a segmentação de cores ou de intensidades; e, também, pode ser baseada em histograma (DOUGHERTY, 2009).

Dentre os métodos de segmentação já desenvolvidos destaca-se o de Otsu (OTSU, 1979), que tem por objetivo encontrar um limiar ótimo no sentido de maximizar a variância entre as classes e assim propiciar a separação de objetos e fundo de uma imagem. Este limiar é aplicado sobre o histograma da imagem de modo que este se torna bimodal e assim a imagem passa a ter duas classes de *pixels*.

Tem-se que L é o número total de valores que os *pixels* podem assumir e assim o algoritmo de Otsu define um limiar k que determina duas classes, sendo C_0 o conjunto de

pixels que possuem intensidades e C_1 o conjunto de *pixels* com **níveis de cinza**. Ressalta-se que o limiar k é escolhido a fim de maximizar a variância entre as classes, σ_B^2 , por meio da Equação 2.6,

$$\sigma_B^2 = \omega_0(\mu_0 - \mu_T)^2 + \omega_1(\mu_1 - \mu_T)^2 \quad (2.6)$$

em que:

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

Sendo que os pesos ω_0 e ω_1 representam a probabilidade de cada classe, separada por um limiar T , de pertencer às classes C_0 e C_1 , respectivamente; $p_q(r_q)$ é o histograma normalizado da imagem considerando os *pixels* com intensidade (r_q) ; μ_0 e μ_1 são os valores médios da intensidade dos *pixels* atribuídos as classes C_0 e C_1 ; e μ_T é o valor médio global dos *pixels* de toda a imagem (GONZALEZ; WOODS, 2007).

2.2.4 Filtragem Morfológica

A morfologia matemática é uma teoria para análise das estruturas espaciais e fornece um conjunto de técnicas para extração de componentes úteis na representação e descrição de uma imagem. Embora seja particularmente útil para análise de imagens binárias também pode ser estendida para imagens em tons de cinza (SOILLE, 2003).

Baseia-se na teoria de conjuntos e assim oferece uma abordagem unificada e poderosa para numerosos problemas de processamento digital de imagens. O conjunto dos *pixels* do objeto definem a sua descrição completa, os conjuntos são membros do espaço bidimensional de números inteiros Z^2 , em que cada elemento é um vetor cujas coordenadas são (x, y) e assim as imagens podem ser representadas em um conjunto Z^3 , em que dois componentes de cada elemento são as coordenadas do *pixel* e o terceiro corresponde ao valor de intensidade (GONZALEZ; WOODS, 2007).

Semelhante à matriz de coeficientes de um filtro linear, as propriedades de um filtro morfológico são especificadas por meio de elementos estruturantes contidos em uma matriz de estruturação, os quais são usados para examinar uma imagem em busca de propriedades de interesse (BURGER; BURGE, 2009).

A Figura 8 ilustra, por meio de morfologia binária, exemplos de elementos estruturantes, sendo que cada quadrado sombreado indica um membro do elemento estruturante. Nota-se que é comum colocar o centro do elemento estruturante em seu centro de gravidade, entretanto, ele pode ser colocado arbitrariamente em outra localização e ser

representando por um ponto preto. Assim, as operações de morfologia matemática, de forma geral, realizam a comparação entre o elemento estruturante e os objetos contidos na imagem (LOTUFO; AUDIGIER et al., 2008).

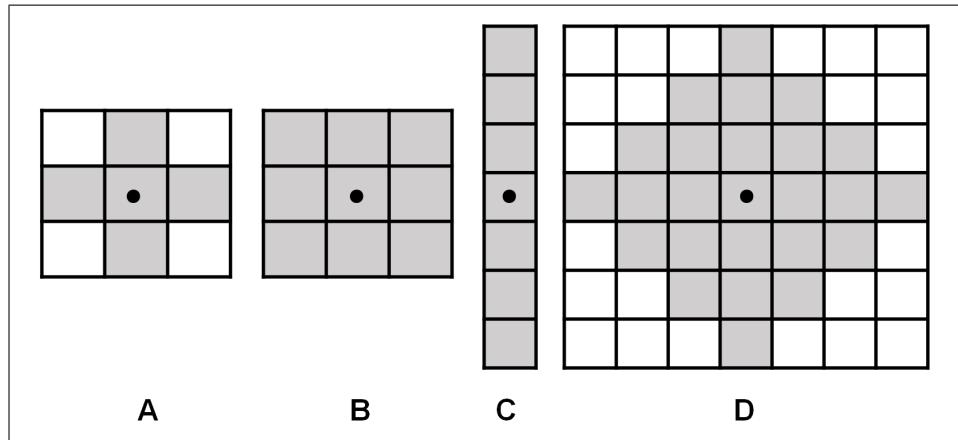


Figura 8 – Exemplos de elementos estruturantes. (A) Em forma de cruz. (B) Quadrado. (C) Segmento de linha. (D) Losango.

Há vários tipos de operações morfológicas, a seguir são detalhadas as mais importantes, além de ressaltar que a transformada *Watershed* (Seção 2.2.5) também pertence ao campo da morfologia matemática (SERRA, 1983).

2.2.4.1 Dilatação e Erosão

As operações de dilatação e erosão constituem a base para a maioria das operações morfológicas, pois grande parte das operações morfológicas são construídas a partir destas duas operações. A dilatação aumenta o tamanho dos objetos em relação ao fundo e é denotada por $A \oplus B$, em termos da teoria dos conjuntos define-se pela Equação 2.7

$$A \oplus B = \{x | \hat{B}_x \cap A \neq \emptyset\}, \quad (2.7)$$

em que A e B são conjuntos de Z^2 e \emptyset é o conjunto vazio, assim tem-se a reflexão de B em torno de sua origem e a translação dessa reflexão sobre x (GONZALEZ; WOODS, 2007)

A Figura 9 ilustra a operação morfológica de dilatação em uma imagem binária: (A) é a imagem binária original, em que os *pixels* brancos representam os objetos; (B) é o elemento estruturante; (C) é a operação de diliação da imagem A pelo elemento estruturante B, em que os *pixels* em verde são acrescentados no objeto A e (D) é a imagem resultante após a dilatação.

A erosão é uma operação que reduz de acordo com o elemento estruturante o tamanho dos objetos em relação ao fundo. Consiste em realizar a erosão de uma imagem binária A por um elemento estruturante B, em que A e B são conjuntos de Z^2 e a erosão é denotada por $A \ominus B$ e define-se pela Equação 2.8:

$$A \ominus B = \{x | (B)_x \subseteq A\}, \quad (2.8)$$

em que $A \ominus B$ é o conjunto de todos os pontos x tais que B , quando transladado por x , fique contido em A (GONZALEZ; WOODS, 2007).

A Figura 10 ilustra a operação morfológica de erosão em uma imagem binária: (A) é a imagem binária original, em que os *pixels* brancos representam os objetos; (B) é o elemento estruturante; (C) é a operação de erosão da imagem A pelo elemento estruturante B, em que os *pixels* em vermelho são removidos dos objetos em A e (D) é a imagem resultante, após a erosão.

Observa-se que as operações de dilatação e erosão são transformações duais em relação à complementação, ou seja, a erosão de A por B é o complemento da dilatação de A^C por \hat{B} e a dilatação de A por B é o complemento da erosão de A^C por \hat{B} , conforme representado a seguir:

$$A \ominus B = A^C \oplus \hat{B}$$

$$A \oplus B = A^C \ominus \hat{B}$$

No caso do elemento estruturante ser simétrico pode-se obter a dilatação por meio da erosão do fundo da imagem, bem como, obter a erosão por meio da dilatação do fundo da imagem (SOILLE, 2003).

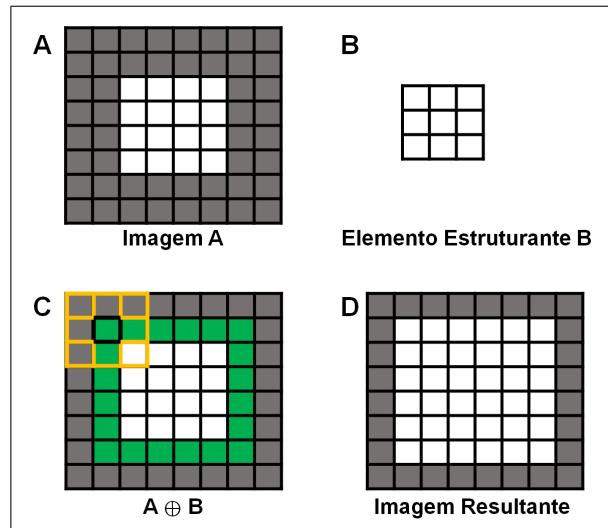


Figura 9 – Dilatação de uma imagem por um elemento estruturante. (A) Imagem binária A . (B) Elemento estruturante B . (C) Dilatação de A por B . (D) Imagem resultante da dilatação.

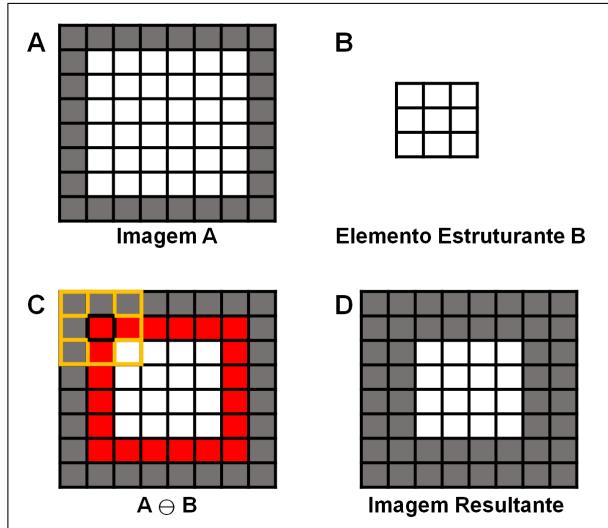


Figura 10 – Erosão de uma imagem por um elemento estruturante. (A) Imagem binária A . (B) Elemento estruturante B . (C) Erosão de A por B . (D) Imagem resultante da erosão.

2.2.4.2 Abertura e Fechamento

A operação de abertura consiste em uma erosão seguida de uma dilatação. Em geral, suaviza o contorno de uma imagem, quebra istmos estreitos e elimina saliências. A abertura de um conjunto A por um elemento estruturante B é denotada por $A \circ B$ e define-se pela Equação 2.9:

$$A \circ B = (A \ominus B) \oplus B, \quad (2.9)$$

em que a abertura de A por B consiste em realizar a operação de erosão de A por B seguido da dilatação do resultado obtido por B (GONZALEZ; WOODS, 2007)

O efeito da abertura em uma imagem binária depende da forma do elemento estruturante, sendo que a abertura é a preservação das regiões do objeto que assemelham-se com o elemento estruturante e tende a eliminar regiões diferentes (DOUGHERTY, 2009).

A Figura 11 ilustra a operação de abertura em uma imagem binária: (A) é a imagem binária original, em que os *pixels* brancos representam os objetos; (B) é o elemento estruturante em forma de cruz; (C) é a operação de abertura da imagem A pelo elemento estruturante B, em que os *pixels* em vermelho são retirados do objeto A e (D) mostra o resultado da operação de abertura. A operação de fechamento consiste em uma dilatação seguida de uma erosão. Dessa forma, funde pequenas quebras e alarga golfos estreitos, elimina pequenos buracos e preenche fendas e aberturas estreitas em um contorno e, também, tende a suavizar os contornos. O fechamento de A por um elemento estruturante B , é denotada por $A \bullet B$ e define-se pela Equação 2.10:

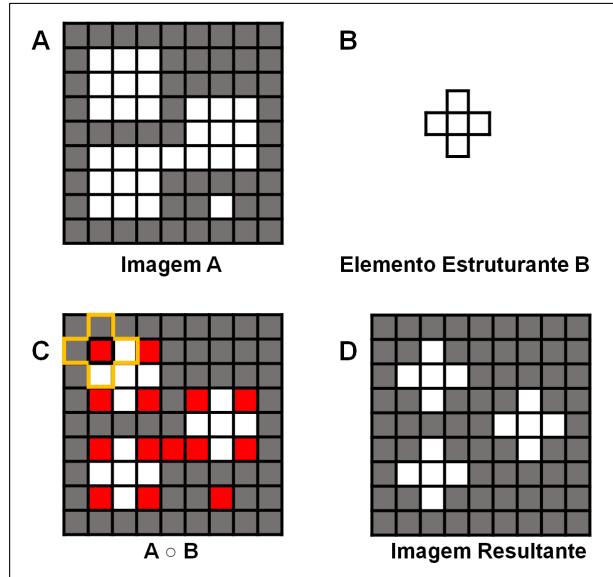


Figura 11 – Abertura de uma imagem por um elemento estruturante em forma de cruz.
 (A) Imagem binária A . (B) Elemento estruturante B . (C) Abertura de A por B . (D) Imagem resultante da abertura.

$$A \bullet B = (A \oplus B) \ominus B \quad (2.10)$$

Conforme ilustra a Figura 12, a imagem original está representada em (A) e o elemento estruturante em forma de cruz em (B); (C) mostra a operação de fechamento da imagem A pelo elemento estruturante B em que os *pixels* em verde são inseridos no objeto A e (D) é a imagem resultante, após o fechamento.

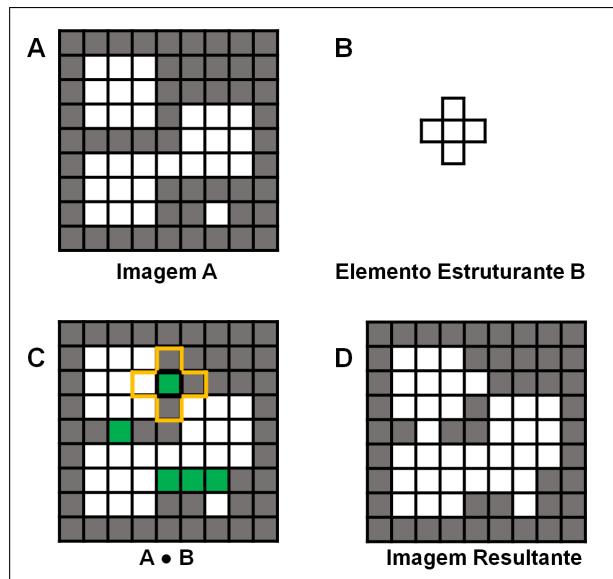


Figura 12 – Fechamento de uma imagem por um elemento estruturante em forma de cruz.
 (A) Imagem binária A . (B) Elemento estruturante B . (C) Fechamento de A por B . (D) Imagem resultante do fechamento.

2.2.5 Transformada Watershed

A transformada *watershed* foi proposta por Lantuéjoul (1978) e, posteriormente, melhorada em conjunto com Beucher (BEUCHER; LANTUÉJOUL, 1979). Tem como ideia principal considerar a imagem de entrada como uma superfície topográfica e simular sua inundação a partir dos seus mínimos regionais. Consequentemente, barragens (*watersheds lines*) são construídas a fim de impedir que as águas provenientes de mínimos regionais distintos se encontrem. As regiões finais decorrentes dos diversos mínimos regionais denominam-se *catchment basins* e representam as regiões segmentadas da imagem (DOUGHERTY; LOTUFO; SPIE, 2003). O processo de inundação finaliza-se quando toda superfície topográfica encontra-se submersa e apenas o *catchment basins* e *watersheds lines* permanecem visíveis, conforme ilustrado na Figura 13 (LOTUFO; AUDIGIER et al., 2008)

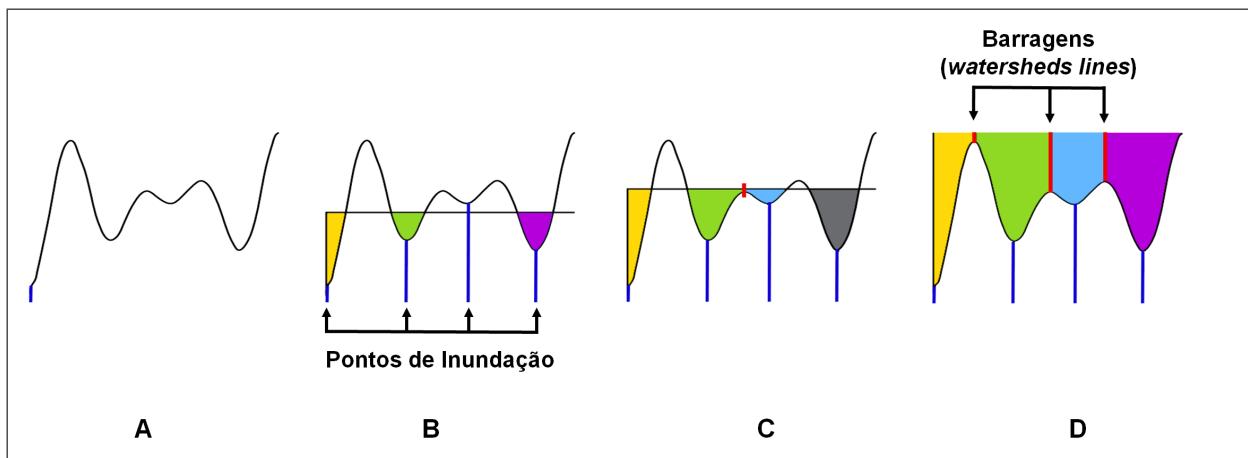


Figura 13 – Simulação de inundação da transformada *watershed* (A) O sinal de entrada. (B) Início do processo de inundação e criação dos pontos de inundação em todos os mínimos regionais do sinal, permite-se assim a emersão uniforme a partir desses pontos. (C) A barragem (*watershed lines*) é criada a partir do momento que as águas de mínimos diferentes estão prestes a se encontrar. (D) Ao final do processo de inundação, as barragens representam os objetos segmentados presentes na imagem. Adaptado de Lotufo, Audigier et al. (2008)

Sendo essa forma de aplicação baseada em morfologia matemática, tem-se uma metodologia geral de segmentação que pode ser aplicada com sucesso em distintas situações (BEUCHER; MEYER, 1992).

No entanto, a aplicação direta da transformada *watershed* sobre o gradiente de uma imagem, em geral, resulta em uma imagem super segmentada, devido ao fato de que o gradiente apresenta um número excessivo de mínimos regionais (ACHARYA; RAY, 2005). Para solucionar este inconveniente tem-se abordagens presentes em basicamente três categorias: (1) filtragem dos mínimos regionais do gradiente da imagem (LOTUFO; AUDIGIER et al., 2008); (2) definição de marcadores no interior do objeto para se ter a

imposição dos mínimos regionais (ACHARYA; RAY, 2005); (3) identificação e fusão dos objetos super segmentados (ADIGA; CHAUDHURI, 2001).

2.2.5.1 Transformada *Watershed* com Marcadores

O uso de marcadores para os mínimos regionais é uma técnica muito eficaz para reduzir a super segmentação da transformada *watershed*. Os marcadores são colocados no interior dos objetos que serão segmentados e dessa forma a inundação partirá apenas dos mínimos regionais impostos nitidamente nos marcadores, conforme ilustrado na Figura 14.

Vale a pena ressaltar que a determinação do número correto de marcadores para todos os objetos de uma imagem caracteriza-se como uma tarefa difícil (LIN et al., 2003). No caso de um objeto ficar sem receber o marcador tem-se a inundação pela *catchment basins* do fundo e a identificação do objeto torna-se impossível. A atribuição de mais de um marcador por objeto gera o problema da super segmentação e se houver marcações fora do interior do objeto isso resultará na criação de artefatos (GONZALEZ; WOODS, 2007).

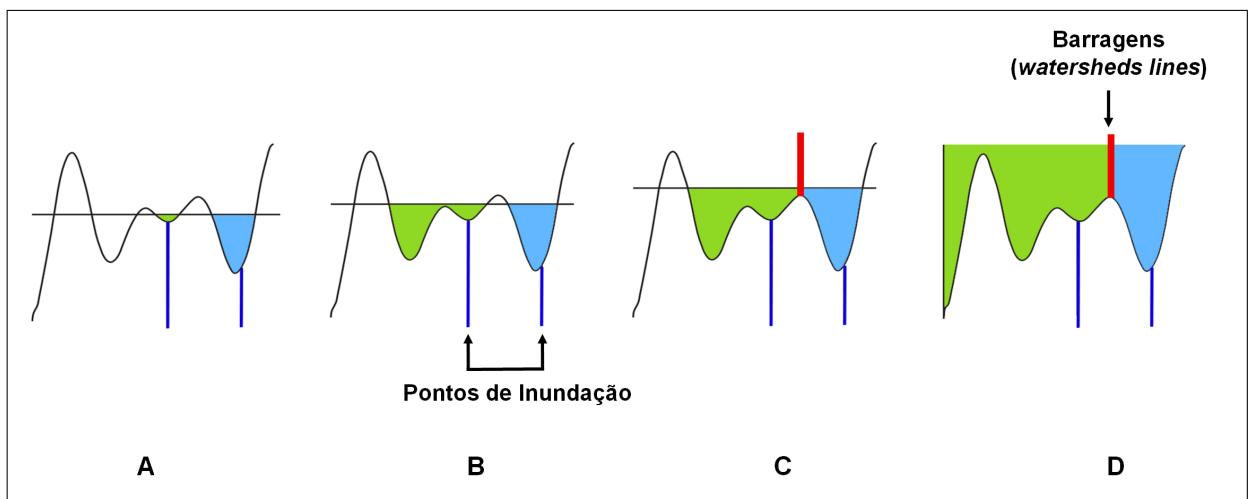


Figura 14 – Simulação de inundação da transformada *watershed* com marcadores. (A) Pontos de inundação são criados apenas sobre os marcadores (B) A água que se origina de um ponto de inundação (representado pela cor verde) encontra um mínimo regional sem marcador (cor branca) ocorre o transbordamento para dentro deste. (C) No caso das águas de marcadores distintos (representados pelas cores verde e azul) estão prestes a se encontrar uma barragem (*watershed line*) é criada (D) A inundação é concluída quando a superfície da água cobre todos os máximos regionais. Adaptado de Lotufo, Audigier et al. (2008)

2.2.6 Extração de Características e Classificação

Define-se como a captura das informações mais relevantes para que posteriormente possa se efetivar a classificação de um dado fornecido como entrada, ou seja, a característica de um objeto é algo que pode ser medido e que pode auxiliar na classificação do objeto. É, também, um importante passo no processo de reconhecimento de padrões e realiza o cálculo das medidas dos objetos (WU; MERCHANT; CASTLEMAN, 2008).

Após a extração de características pode-se realizar o processo de classificação, que consiste em encontrar um modelo que permite construir um classificador a fim de descrever e distinguir classes de dados ou conceitos de modo que esse possa prever e classificar as classes de objetos (HAN; KAMBER; PEI, 2011). Dessa forma, o conjunto de características (medidas, atributos, propriedades) são selecionados dos objetos e o classificador reúne, em uma mesma classe, objetos que compartilham características semelhantes e os objetos com características diferentes são atribuídos a classes distintas e, assim, gera-se uma particionamento do espaço de características (COSTA; CESAR-JR., 2009).

A classificação dos objetos é realizada por algoritmos que precisam construir modelos adequados das classes, que de um modo geral, encontram-se duas situações principais:

- Classificação supervisionada: considera a existência de um conjunto de treinamento contendo objetos previamente classificados e que serão utilizados como protótipos para classificar os demais objetos (DUDA; HART; STORK, 2012);
- Classificação não supervisionada: também pode ser chamada de agrupamento (*clustering*). Caracteriza-se por não conta com um conjunto de treinamento e a classificação decorre da criação de agrupamentos de objetos tendo como base apenas as características individuais, busca maximizar a similaridade entre os objetos que compartilham de características semelhantes e minimiza a similaridade entre os objetos distintos (COSTA; CESAR-JR., 2009).

As etapas básicas de um sistema de classificação de padrões são: extração ou seleção de características; normalização das características e a classificação, conforme ilustra a Figura 15.

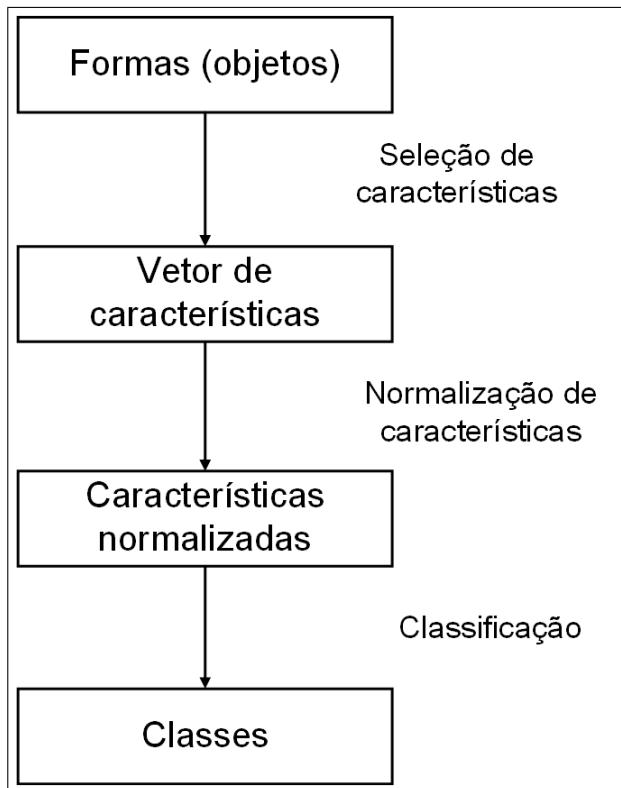


Figura 15 – Etapas de um sistema de classificação de formas: primeiramente realiza-se a extração das características a partir das formas dos objetos, as características são normalizadas e tem-se a classificação. Adaptado de Costa e Cesar-Jr. (2009)

De acordo com Han, Kamber e Pei (2011), um conjunto de testes é composto por tuplas e seus rótulos de classe associados e diante de uma seleção aleatória, a partir do conjunto de dados original, obtêm-se a precisão de um classificador por meio da análise da porcentagem do conjunto de teste de tuplas que são corretamente classificados.

2.2.6.1 Características de Formas para Classificação de Eritrócitos

Eritrócitos, células em formato arredondado semelhante à um disco bicôncavo, apresentam centros mais finos e bordas mais espessas. As anemias estão intimamente ligadas a problemas nos eritrócitos, pois ocorrem em virtude da diminuição da quantidade de hemoglobina no sangue. Na maioria dos casos, tem-se como consequência a destruição dos eritrócitos, baixa produção ou ausência de substâncias necessárias para a síntese de hemoglobina.

A análise morfológica é um importante aspecto de muitos processos biológicos, em particular, a análise de células sanguíneas pode ajudar a fornecer informações relevantes que facilitam o diagnóstico de diversas doenças (GONZALEZ-HIDALGO et al., 2014). No caso dos eritrócitos, nota-se que sua análise morfológica permite verificar diferentes tipos de anemias (FORD, 2013). De acordo com Constantino (2015), as alterações morfológicas dos eritrócitos podem ser agrupadas segundo variações de tamanho, forma e cor ao analisar

imagens de microscopia, servindo como auxílio no diagnóstico de anemias, conforme ilustra a Figura 16.

| Anomalias eritrocitárias | Causas | Anomalias eritrocitárias | Causas |
|--------------------------|--|--------------------------|--|
| Normal | - | Microesferócito | Esferocitose hereditária, anemia hemolítica autoimune, septicemia |
| Macrócito | Hepatopatia, alcoolismo Oval na anemia megaloblástica | Fragmentos | CIVD*, microangiopatia, síndrome hemolítico -urêmica, PTT**, queimaduras, válvulas cardíacas |
| Células em alvo | Deficiência de ferro, hepatopatia, hemoglobinopatia, pós-esplenectomia | Eliptócito | Eliptocitose hereditária |
| Estomatócito | Hepatopatia, alcoolismo | Pecilócito em lágrima | Mielofibrose, hematopoese extramedular |
| Célula em lâpis | Deficiência de ferro | Célula em cesto | Dano oxidante (p. ex., deficiência de G6PD***, hemoglobina instável) |
| Equinócito | Hepatopatia, pós-esplenectomia Artefato de conservação | Célula falciforme | Anemia de células falciformes |
| Acantócito | Hepatopatia, abetalipoproteinemia, insuficiência renal | Micrócito | Deficiência de ferro, hemoglobinopatia |

* CIVD: Coagulação Intravascular Disseminada;
** PTT: Púrpura Trombocitopênica Trombótica;
***G6PD: Glicose-6-Fosfato-Desidrogenase.

Figura 16 – Algumas das variações mais frequentes no tamanho e forma que podem ser observadas em diferentes anemias. Adaptado de Hoffbrand e Moss (2013).

De acordo com Hoffman et al. (2012), quanto a morfologia, as anemias classificam-se em:

- Microcítica: refere-se aos eritrócitos menores do que o normal, em geral, associa-se à diminuição de hemoglobina nos eritrócitos e, consequentemente, ocasiona anemias hipocrônicas que consistem em ter células mais pálidas do que o normal e tem como causa mais comum a deficiência de ferro. Ressalta-se também que a falha na produção de hemoglobina pode ser causada por fatores hereditários;
- Normocítica: as células vermelhas encontram-se normais e por isso trata-se de um tipo de anemia difícil de avaliar. Avalia-se por meio de estudos da presença de ferro no organismo, além de que o número reduzido de reticulócitos (eritrócitos imaturos) é o principal indício de anemia normocítica.

- Macrocítica: os glóbulos vermelhos apresentam-se aumentados e tem como principal causa a ausência de vitamina B₁₂ e folato (outro tipo de vitamina B), importantes nutrientes para saúde do sistema nervoso. As anemias macrocíticas dividem-se em megaloblástica e não megaloblástica.

A Figura 17 apresenta os eritrócitos em imagens de microscopia de acordo com a descrição feita acima. Em (A) anemia microcítica, em (B) anemia normocítica e em (C) anemia macrocítica.

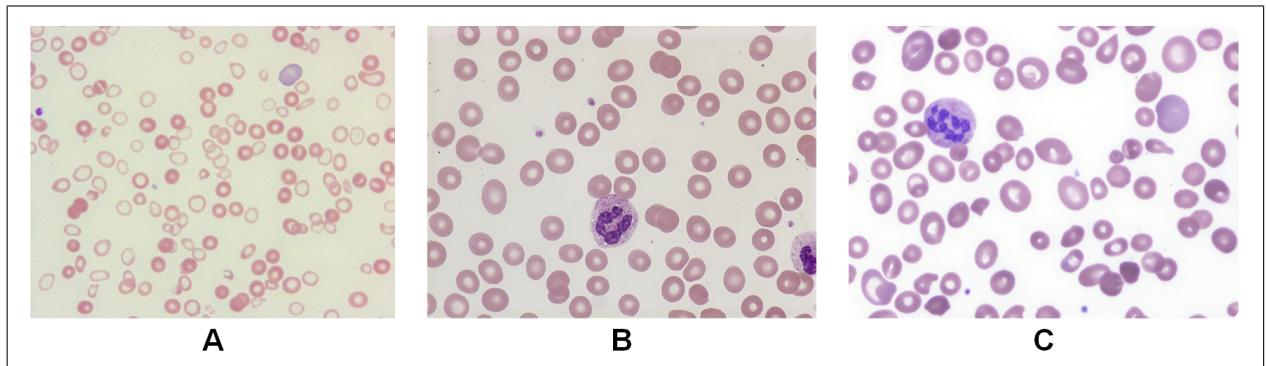


Figura 17 – Diferentes tipos de anemias de acordo com a morfologia. (A) Anemia microcítica. (B) Anemia normocítica. (C) Anemia macrocítica. Imagens disponíveis no *dataset* da Hematology (2015)

De acordo com Junqueira e Carneiro (1985), durante a análise do esfregaço sanguíneo, o tamanho, a forma, a coloração e as inclusões nos eritrócitos são relevantes. Portanto, a análise de tais características são fundamentais para o método proposto ser bem sucedido.

A seguir são apresentadas as principais características que devem ser observadas (COSTA; CESAR-JR., 2009) (GONZALEZ; WOODS, 2007):

- Área: descreve um objeto em determinada região pela quantidade de *pixels* que o compõem;
- Circularidade: complexidade do contorno de um objeto, define-se pela razão do quadrado do perímetro pela sua área, ou seja, área real do objeto.
- Desvio Padrão da Intensidade: variabilidade dos valores de intensidade à volta da média.
- Excentricidade: razão entre a distância e os focos da eclipse e o seu comprimento do eixo principal. O valor encontra-se entre 0 e 1, uma eclipse cuja excentricidade é 0 trata-se de um círculo, se o valor for 1 representa um segmento de reta;

- Extensão: proporção de *pixels* da área dividida pela área do contorno delimitador ((*bounding-box*));
- Intensidade Média: média de todos os valores de intensidade em uma região;
- Perímetro: distância em torno da fronteira da região. É calculado por meio da distância entre cada par adjacente de *pixels* em torno da fronteira da região;
- Solidez: relação da área de contorno para a área de fecho convexo.

2.2.6.2 Normalização das Características

As características obtidas dos objetos apresentam aspectos diferentes e em unidades diferentes, por exemplo, área que pode ser medida em μm^2 , perímetro e diâmetro em μm , circularidade e excentricidade que são adimensionais e variam de 0 até 1. Diante disso, torna-se necessário padronizar as características para que assim não ocorra discrepância ao colocá-las em um mesmo espaço, alterando-as em características sem dimensão por meio da estratégia de Transformação Normal de Características, definida pela Equação 2.11:

$$f'(i, j) = \frac{f(i, j) - \mu_j}{\sigma_j} \quad (2.11)$$

em que $f(i, j)$ é a característica j do objeto i , assim como $f'(i, j)$ é a versão normalizada. μ_j e σ_j são, respectivamente, a média e o desvio padrão da característica j de todos os objetos i . Sendo que após a normalização, todo o conjunto de características possuirá média 0 e desvio padrão 1 (COSTA; CESAR-JR., 2009).

2.2.6.3 K-Vizinhos mais Próximos (*K-Nearest Neighbors - KNN*)

Foi desenvolvido em 1950, mas apenas a partir dos anos 60, quando os computadores começaram a ficar mais potentes, que o método ganhou mais popularidade. Desde então, tem sido amplamente utilizado na área de reconhecimento de padrões (HAN; KAMBER; PEI, 2011). Tem-se como ideia principal estimar a classificação de uma instância X usando a classificação de uma ou mais instâncias próximas a X , ao considerar um determinado padrão (BRAMER, 2007).

De acordo com Han, Kamber e Pei (2011), o método *KNN* baseia-se na aprendizagem por analogia, em supor um conjunto D de tuplas em treinamento. Cada elemento de D é uma tupla (x_1, x_2, x_n, c) , em que c é a classe principal pertencente a tupla (x_1, \dots, x_n) , que representa um ponto no espaço n -dimensional. Ao considerar $Y = (y_1, \dots, y_n)$ como uma nova tupla que precisa ser classificada. A classificação de Y exige o cálculo das distâncias de Y a todas as tuplas de treinamento e considera-se as k tuplas de treinamento

mais próximas de Y . Por fim, dentre as k tuplas observa-se quais classes aparecem com maior frequência e, assim, realiza-se a classificação da tupla Y .

A distância entre as tuplas é calculada por meio de alguma métrica de distância, por exemplo, a distância Euclidiana (Equação 2.12)

$$d(X, Y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - y_i)^2} \quad (2.12)$$

Geralmente, é preciso normalizar os valores de cada atributo, a fim de que não se tenha discrepância entre valores de diferentes atributos, os quais podem influenciar tendenciosamente no cálculo da distância. O processo de normalização consiste em ter v como um valor do atributo A que aparece na tupla Y e que para normalizar v considera-se $v' \in [0,1]$ calculado pela Equação 2.13,

$$v' = \frac{v - \min_A}{\max_A - \min_A} \quad (2.13)$$

em que \min_A e \max_A são os valores mínimos e máximos que o atributo A pode assumir.

A Figura 18 ilustra o funcionamento do KNN , sendo que o valor de K define-se, preferencialmente, em valores ímpares a fim de evitar possíveis empates na classificação. Vale a pena observar que quando K assume um valor muito pequeno a classificação fica sensível a um ponto de ruído e se o valor de K for muito grande a classificação pode incluir elementos de outras classes (HALL; PARK; SAMWORTH, 2008).

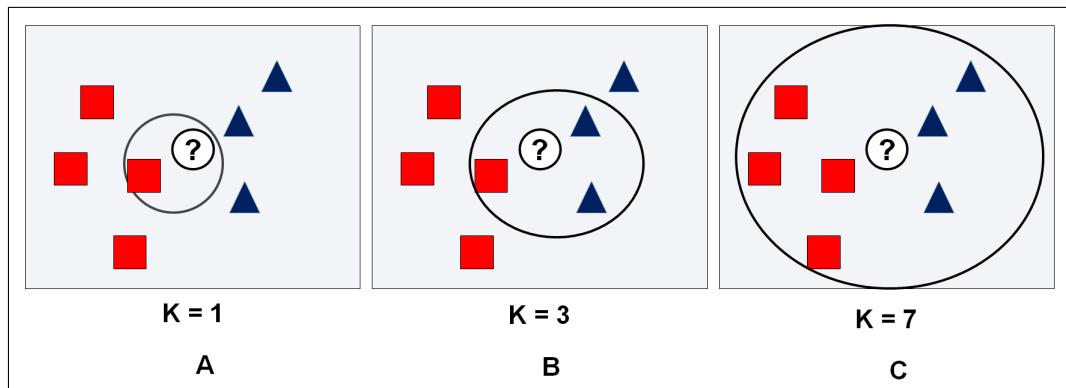


Figura 18 – Funcionamento do KNN . (A) K assume valor 1 e o novo elemento é classificado como quadrado. (B) K assume valor 3 e o novo elemento é classificado como triângulo. (C) K assume valor 7 e o novo elemento é classificado como quadrado. A escolha da classe pertencente deu-se a partir da distância do novo elemento em relação as demais classes.

Na Figura 18 (A) K assume 1 como valor e classifica o novo elemento como pertencente a classe dos quadrados; (B) mostra K com valor 3 e, nesse caso, classifica o novo

elemento como pertencente a classe dos triângulos e em (C) quando K assume o valor 7, o novo elemento pertence a classe dos quadrados.

2.2.6.4 Máquinas de Vetor de Suporte (*Support Vector Machines - SVM*)

As Máquinas de Vetor de Suporte (*Support Vector Machines - SVM*) constituem uma técnica embasada na Teoria de Aprendizagem Estatística (CORTES; VAPNIK, 1995) e começou a ser proposta nas décadas de 60 e 70, no entanto, teve suas primeiras aplicações práticas a partir de 1990 (HEASRT et al., 1998).

As *SVMs* permitem uma boa capacidade de generalização, pois evita-se a situação em que o preditor é muito especializado no conjunto de treinamento. Também apresentam robustez diante de objetos com grandes dimensões e, principalmente, contam com uma base teórica bem estabelecida dentro da Matemática e Estatística (BARTLETT et al.,).

Em suma pode-se dizer que o funcionamento da *SVMs* definem-se da seguinte maneira: dadas duas classes e um conjunto de pontos pertencentes a estas e as *SVMs* determinam um hiperplano que os separa de forma a colocar a maior quantidade possível de pontos da mesma classe no mesmo lado, ao mesmo tempo que a distância de cada classe a esse hiperplano é maximizada (HAN; KAMBER; PEI, 2011), como ilustrado na Figura 19 (A-B).

Considera-se a função de discriminação linear generalizada, $g(y)$, definida pela Equação 2.14

$$g(y) = \sum_{i=1}^d a_i \varphi(x_i) \quad (2.14)$$

em que a é o vetor de pesos e d é a dimensão elevada após a transformação, a função $g(y)$ define um hiperplano linear no espaço de características aumentado quando $g(x) = 0$. Classifica-se assim um objeto y_k em C_1 ($z_k = +1$) ou C_2 ($z_k = -1$) de acordo com a Equação 2.15,

$$z_k = g(y_k) \geq 1 \quad (2.15)$$

Em que a função $g(y_k)$ define um hiperplano que separa os elementos y_k da classe C_1 dos da classe C_2 . No entanto, de acordo com Duda, Hart e Stork (2012), o objetivo de treinamento do *SVM* é obter o hiperplano de separação que seja ótimo, ou seja, que apresenta a menor distância que separa o hiperplano de algum objeto y_k .

Ao considerar o valor da margem positivo, tem-se que todos os objetos y estão do lado correto do plano e a distância entre um objeto y e o plano é computado como $\frac{g(y)}{\|a\|}$ e gera a Equação 2.16,

$$\frac{z_k g(y_k)}{\|a\|} \geq b, \text{ para } k = 1, \dots, n \quad (2.16)$$

ou seja, não há nenhum ponto no espaço de características aumentado cuja distância em relação ao hiperplano seja menor do que b (Figura 19 (C)). Portanto, o algoritmo de aprendizagem do *SVM* busca determinar os valores do vetor de pesos a que maximiza b e assim obtém-se os vetores de suporte, que são os objetos (no espaço de características aumentado) mais próximos do hiperplano e por isso são os mais representativos para a classificação de objetos (Figura 19 (D-E)).

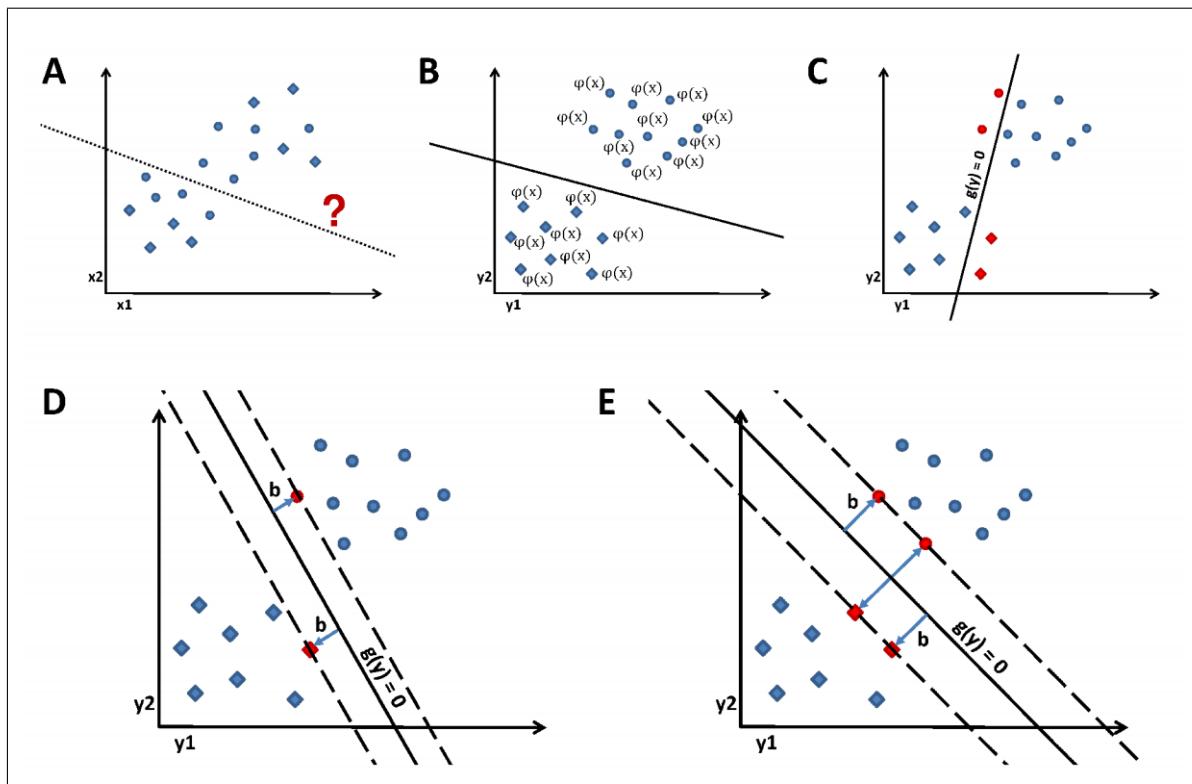


Figura 19 – Ilustração do processo de treinamento de um classificador *SVM*, em que os padrões (objetos) do conjunto de treinamento pertencem a duas classes C_1 (losangos, em que $z_k = -1$) e C_2 (círculos, em que $z_k = 1$). (A) No espaço original de características os padrões não são linearmente separáveis. (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. Adaptado de Mari e Saito (2015).

A escolha da função de mapeamento φ permite transformar os dados de treinamento x para um espaço de dimensão mais elevada y . Dessa forma, o treinamento da *SVM* define-se por minimizar $\| a \|$ e maximizar b , para isso utiliza-se o método dos multiplicadores integrados de Langrange, de acordo com a Equação 2.17,

$$L(a, \alpha) = \frac{1}{2} \| a \|^2 - \sum_{k=1}^n \alpha_k [z_k a^t y_k - 1] \quad (2.17)$$

busca-se minimizar L em relação a a e maximizar L em relação a $\alpha_k \geq 0$. Assim, o processo é reformulado em termos de maximizar a Equação 2.18,

$$L(\alpha) = \sum_{k=1}^n \alpha_k - \frac{1}{2} \sum_{k,j} \alpha_k \alpha_j z_k z_j y^t y_k \quad (2.18)$$

e respeitar a restrição da Equação 2.19.

$$\sum_{k=1}^n z_k \alpha_k = 0, \alpha_k \geq 0, k = 1, \dots, n. \quad (2.19)$$

2.3 Considerações Finais

Neste capítulo foram apresentados os conceitos fundamentais sobre os distúrbios em eritrócitos, tipos de anemias hereditárias e um conjunto de técnicas e algoritmos de processamento de imagens que serão utilizados nos métodos propostos. No próximo capítulo são apresentadas informações sobre trabalhos que assemelham-se com o tratado em questão.

3 Trabalhos Relacionados

São apresentadas a seguir, de forma sintetizada, informações sobre os trabalhos que apresentam aspectos em comum com tratado em questão.

Gonzalez-Hidalgo et al. (2015) propõem um método para análise da forma de eritrócitos em amostras de sangue periférico para identificação de doença falciforme. Faz uso de ajustes em elipse e de um novo algoritmo para detecção de pontos notáveis. Permitiu detectar de forma eficiente os eritrócitos anormais, excedendo mais de 98% para cada um dos testes, sendo superior aos resultados obtidos com métodos propostos anteriormente e que usaram a mesma base de dados. Este trabalho muito se assemelha com o proposto, principalmente por ter o objetivo de segmentar os eritrócitos e fazer uso da mesma base de dados, disponível em <<http://erythrocytesidb.uib.es/>>. No entanto, não conta com a classificação dos eritrócitos segmentados, preocupa-se apenas em avaliar a eficiência da segmentação.

O trabalho proposto por May, Aziz e Salamat (2013) conta com uma abordagem para quantificar e classificar automaticamente eritrócitos infectados por parasitas da malária. De acordo com os autores, esta abordagem pode ser aplicada em outros contextos. Possui como principais etapas: pré-processamento dos esfregaços de sangue, limiarização por Otsu, operações morfológicas de dilatação e erosão para remover os elementos de fundo e classificação com base no número de casos de eritrócitos infectados. Este trabalho compartilha aspectos em comum com o tratado em questão no quesito de utilizar etapas semelhantes para segmentação.

O método apresentado por Chandrasiri e Samarasinghe (2014) é capaz de identificar os principais tipos de anemias, incluindo as hereditárias, e quantificar as células no sangue. Extraiu-se a característica principal de cada tipo de anemia e limiarizou as imagens pelo método de Otsu, aplicou operações morfológicas e da transformada *Watershed* para solucionar o problema de células sobrepostas, além de contar com a transformada da distância para definir os marcadores para aplicação do *Watershed* a fim de corrigir o problema de super segmentação. Obteve 99,678% de eficácia em relação à outros propostos na literatura e quando comparado com trabalho proposto, assemelha-se por utilizar métodos semelhantes e diverge-se pelo fato de que o trabalho em questão terá seu foco apenas em anemias hereditárias, não se estendendo para os demais tipos.

Amendolia et al. (2003) usou rede neural artificial para detecção de talassemia. Nesta pesquisa comparou-se o desempenho entre os classificadores *KNN* e *SVM*, tendo como objetivo diferenciar casos patológicos de não patológicos e discriminar as patologias diferentes (talassemia- α e talassemia- β). O *KNN* não obteve resultados eficientes para

identificar casos patológicos de não patológicos, enquanto o *SVM* apresentou melhor precisão e permitiu identificar portadores de talassemia com até 95% de precisão. De forma semelhante, Ongun et al. (2001) faz uso de imagens sanguíneas segmentadas e extração três tipos de características que incluem forma, textura e cor. Realizou-se a avaliação do desempenho dos classificadores *SVM* e *KNN*, sendo que o *SVM* apresentou uma precisão de 91,03%. Ambos os trabalhos compartilham aspectos em comum com o presente trabalho em relação à escolha dos classificadores.

3.1 Considerações Finais

Neste capítulo foram apresentadas informações sobre os trabalhos que assemelham-se com o tratado em questão. No próximo capítulo serão descritos o material e métodos propostos.

4 Material e Métodos

Neste capítulo são descritos os métodos propostos para o desenvolvimento deste trabalho. De forma que estes, quando implementados e testados, possam constituir uma ferramenta útil nas pesquisas que verificam a eficiência de métodos computacionais para detecção e classificação de objetos em imagens de microscopia, bem como fornecer de forma automatizada e padronizada uma série de medidas quantitativas relacionadas à eritrócitos.

4.1 Ferramentas Computacionais

Escolheu-se desenvolver o trabalho em linguagem *Python*¹, que é interpretada e dinâmica, ideal para o trabalho interativo, poderosa o suficiente para grandes aplicações, por meio da distribuição *PythonXY*,² com módulos científicos que permitem desenvolver aplicações que necessitam de computação numérica e visualização, e instalação do *plugin PyDev*³ no *Eclipse*⁴. Devido ao fato do *Python* ser de fácil compreensão isso permite uma programação mais rápida e tê-lo disponível gratuitamente, com código aberto, em uma ampla comunidade de desenvolvedores o torna ideal para o desenvolvimento deste trabalho.

É importante ressaltar a presença de diversos módulos para programação científica. O *Numpy* é adequado para manipulação de arranjos e matrizes por meio de funções matemáticas de alto nível. O *Matplotlib* possibilita realizar a plotagem de gráficos 1D, 2D e 3D. O *Scipy* possui uma coleção de algoritmos numéricos para diversas aplicações científicas, incluindo processamento de sinais, otimização e estatística. O *Scikit-learn*, conjunto de ferramentas para aprendizado de máquina e mineração de dados e o *Scikit-image* para processamento de imagens, ambos pertencentes aos *Scikits*, de diversas áreas que podem ser utilizados em conjunto com as ferramentas do *Scipy*. O *OpenCV* é uma biblioteca multiplataforma para o processamento de imagens, visão computacional e aprendizagem de máquina (CHITYALA; PUDIPEDDI, 2014).

A Figura 20 resume as principais etapas dos métodos propostos. Tem-se a aquisição das imagens e a conversão de RGB para níveis de intensidade. O pré-processamento é aplicado sobre as imagens para que a etapa de segmentação possa ser bem sucedida. Após, ocorre a filtragem morfológica e a transformada *watershed*. Por fim, tem-se a extração de características e classificação das imagens resultantes da segmentação.

¹ Disponível em: <<http://www.python.org/>>.

² Disponível em: <<http://python-xy.github.io/>>

³ IDE *Python* para *Eclipse*.

⁴ IDE para desenvolvimento JAVA que também suporta outras linguagens.



Figura 20 – Ilustração geral das etapas do métodos propostos.

4.2 Aquisição das Imagens

Os eritrócitos serão obtidos da base de dados *Erythrocytes IDB*⁵ que conta com amostras de esfregaços de sangue periférico de pacientes voluntários do Departamento de Hematologia do Hospital Geral “Dr. Juan Bruno Zayas Alfonso” em Santiago de Cuba (GONZALEZ-HIDALGO et al., 2015). As imagens são de tamanho 500 x 375 pixels, como uma resolução de 480 dpi (*dots per inch* - pontos por polegada). Tiradas com um microscópio *Leika* com aumento de 100 vezes na lente e uma câmera *Kodak EasyShare V803*. As células foram analisadas por um especialista em hematologia e classificadas em: normal, foice ou com outras deformações, sendo que o especialista também determinou e classificou cada tipo das células que se encontravam sobrepostas.

4.3 Conversão RGB para imagens de intensidade

Após a aquisição, as imagens originais serão convertidas para imagens de intensidade, para que a próxima etapa possa ser bem executada. Para isso, deve-se importar o pacote *skimage.color*, o qual é uma coleção de funções de estilo de comando que fazem o trabalho do módulo *matplotlib*. Por fim, basta alterar o mapa de cores de acordo com a função *cmap*, conforme o exemplo abaixo:

```
1. from skimage import color  
2. img_color = color.rgb2gray(img)
```

4.4 Pré-processamento

A etapa de pré-processamento consiste em submeter as imagens à aplicação de filtros que tem por objetivo reduzir ruídos e imperfeições decorrentes da etapa de aquisição. A qualidade da imagem será melhorada para execução das etapas subsequentes. Os filtros necessários nessa etapa estão presentes nos módulos *scipy.ndimage* no pacote *filters* e *skimage* no pacote *exposure*. Pretende-se testar os filtros da média e mediana.

4.5 Segmentação

Posteriormente, o método de segmentação por limiarização de Otsu será utilizado a fim de que os objetos possam ser separados do fundo da imagem resultando em uma imagem binária. O módulo responsável pela aplicação do Otsu encontra-se na biblioteca *skimage* no pacote *filter*, conforme exemplificado a seguir:

⁵ Disponível em: <<http://erythrocytesdb.uib.es/>>

```
1. from skimage import color, filter  
2. # Obtém o limiar de Otsu sobre a imagem  
3. otsu = filter.threshold_otsu(im)
```

Operações de morfologia matemática podem ser aplicadas para filtrar imperfeições nas imagens binárias, como componentes conectados pequenos e bordas irregulares.

Após a segmentação, eventuais buracos poderão surgir e estes deverão ser preenchidos por meio de operações morfológicas, as quais encontram-se presentes na biblioteca *skimage*, no pacote *morphology*, exigindo apenas a definição de qual será a operação binária a ser realizada.

4.6 Transformada *Watershed* e Transformada *Watershed* com marcadores

Os componentes conectados que representam agrupamentos de eritrócitos sobrepostos ou muito próximos serão separados utilizando a Transformada *Watershed*. Como discutido na Seção 2.2.5, a Transformada *Watershed* sofre com o problema da supersegmentação. Para contornar esse problema optou-se por adotar a Transformada *Watershed* com Marcadores. O resultado da segmentação permitirá a obtenção de uma série de medidas quantitativas relacionadas à morfologia dos eritrócitos.

4.7 Extração de Características

Após a aplicação da Transformada *Watershed* com marcadores deve-se construir um vetor de características a fim de testar diferentes combinações de características para definir quais serão as melhores. O vetor de características computado para cada objeto será utilizado para classificá-los como: “eritrócito normal”, “eritrócito em forma de foice” e “eritrócito com outras deformações”. Como todas essas características serão apresentadas em diferentes faixas de valores, deve-se aplicar a Transformada Normal de Características sobre todo o conjunto de características de forma que este venha apresentar média 0 e desvio padrão 1, conforme descrito na Seção 2.2.6.2.

4.8 Classificação

Para a escolha dos classificadores a serem testados considerou-se outros trabalhos presentes na literatura relacionados com a classificação de eritrócitos e outros tipos de células em imagens de microscopia, um cenário semelhante com o abordado neste trabalho. Optou-se por utilizar os algoritmos de classificação supervisionados: K-Vizinhos mais

Próximos (*K-Nearest Neighbors - KNN*) e Máquinas de Vetor de Suporte (*Support Vector Machines - SVM*), para que assim tenha-se como resultado um processo de classificação mais eficiente e factível em aplicações reais.

A validação da classificação será realizada por meio de uma matriz de confusão, também conhecida como tabela de contingência, que permite a visualização do desempenho dos algoritmos. Possibilita-se assim a verificação do número de classificações corretas em oposição às classificações preditas para cada classe (COSTA; CESAR-JR., 2009).

De acordo com Han, Kamber e Pei (2011) os principais índices de medidas de desempenho computados considerando os valores de verdadeiro positivo (TP), falso positivo (FP) e falso negativo (FN) são:

- Precisão: porcentagem de amostras positivas classificadas corretamente sobre o total de amostras classificadas como positivas. Define-se pela Equação 4.1:

$$Precision = \frac{TP}{TP + FP} \quad (4.1)$$

- *Recall*: porcentagem de amostras positivas classificadas corretamente sobre o total de amostras positivas. Define-se pela Equação 4.2:

$$Recall = \frac{TP}{TP + FN} \quad (4.2)$$

- *F-Score*: média ponderada de precisão e *recall*. Define-se pela Equação 4.3:

$$FScore = \frac{2TP}{2TP + FP + FN} \quad (4.3)$$

Considera-se verdadeiro positivo se o elemento de entrada é positivo e o classificador o considera positivo; o falso positivo ocorre quando o elemento de entrada é negativo e o classificador o define como verdadeiro; o falso negativo consiste em se ter como entrada um elemento positivo e para o classificador ele é negativo (POWERS, 2011).

4.9 Considerações Finais

Neste capítulo foram apresentados os métodos propostos neste trabalho. No próximo capítulo serão descritos os resultados esperados.

5 Resultados Esperados

Com o desenvolvimento do trabalho espera-se definir um conjunto de técnicas que proporcionará a segmentação e classificação eficiente de eritrócitos em imagens de microscopia. Avaliar a performance dos métodos computacionais que serão utilizados e, dessa forma, contribuir para pesquisas relacionadas ao aprimoramento de diagnóstico médico auxiliado por imagens.

6 Cronograma

Este capítulo apresenta o cronograma para o desenvolvimento deste trabalho. O cronograma representado pela Tabela 1 tomou como base as tarefas chaves e o tempo estimado para realização do trabalho.

Tabela 1 – Cronograma do Projeto em Meses

| Atividade | Jan. | Fev. | Mar. | Abr. | Mai. | Jun. | Jul. |
|------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| Aquisição das Imagens | • | | | | | | |
| Implementação | | • | • | • | | | |
| Experimentos | | | • | | • | | |
| Análise dos Resultados | | | | • | • | | |
| Redação do TCC | | | | • | • | • | • |

Referências

- ABRASTA, A. B. de T. **Estatísticas: Números da Talassemia no Brasil**. 2015. Disponível em: <<http://www.abrasta.org.br/estatisticas-talassemia>>. Acesso em: 11/08/2015.
- ACHARYA, T.; RAY, A. K. **Image processing: principles and applications**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2005.
- ADIGA, P. U.; CHAUDHURI, B. An efficient method based on watershed and rule-based merging for segmentation of 3-d histo-pathological images. **Pattern Recognition**, Elsevier, v. 34, n. 7, p. 1449–1458, 2001.
- AMENDOLIA, S. R. et al. A comparative study of k-nearest neighbour, support vector machine and multi-layer perceptron for thalassemia screening. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, Elsevier, v. 69, n. 1, p. 13–20, 2003.
- BARTLETT, P. et al. Introduction to large margin classifiers. MIT Press.
- BEUCHER, S.; LANTUÉJOUL, C. Use of watersheds in contour detection. In: **International workshop on image processing, real-time edge and motion detection**. [S.l.: s.n.], 1979.
- BEUCHER, S.; MEYER, F. The morphological approach to segmentation: the watershed transformation. **OPTICAL ENGINEERING-NEW YORK-MARCEL DEKKER INCORPORATED-**, MARCEL DEKKER AG, v. 34, p. 433–433, 1992.
- BRAMER, M. **Principles of Data Mining (Undergraduate Topics in Computer Science)**. Secaucus, NJ, USA: Springer-Verlag New York, Inc., 2007. ISBN 1846287650.
- BUNN, H. F.; ASTER, J. C. **Pathophysiology of Blood Disorders (Lange Medical Books)**. [S.l.]: McGraw-Hill Education / Medical, 2011. ISBN 0071713786.
- BURGER, W.; BURGE, M. J. **Principles of Digital Image Processing: Fundamental Techniques**. 1. ed. [S.l.]: Springer Publishing Company, Incorporated, 2009. ISBN 1848001908, 9781848001909.
- CANÇADO, R. D.; JESUS, J. A. A doença falciforme no brasil:[editorial]. **Rev. bras. hematol. hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 204–206, 2007.
- CHANDRASIRI, S.; SAMARASINGHE, P. Automatic anemia identification through morphological image processing. In: **Information and Automation for Sustainability (ICIAfS), 2014 7th International Conference on**. [S.l.: s.n.], 2014. p. 1–5.
- CHITYALA, R.; PUDIPEDDI, S. **Image processing and acquisition using Python**. [S.l.]: CRC Press, 2014.
- CONSTANTINO, B. Reporting and grading of abnormal red blood cell morphology. **International journal of laboratory hematology**, Wiley Online Library, v. 37, n. 1, p. 1–7, 2015.

- COOLEY, T. B.; LEE, P. A series of cases of splenomegaly in children with anemia and peculiar bone changes. **Trans Am Pediatr Soc**, v. 37, n. 29.1925, 1925.
- CORTES, C.; VAPNIK, V. Support-vector networks. **Machine learning**, Springer, v. 20, n. 3, p. 273–297, 1995.
- COSTA, L. da F.; CESAR-JR., R. M. **Shape Classification and Analysis: Theory and Practice**. 2nd. ed. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, Inc., 2009. ISBN 0849379296, 9780849379291.
- DOUGHERTY, E. R.; LOTUFO, R. A.; SPIE, T. I. S. for O. E. **Hands-on morphological image processing**. [S.l.]: SPIE press Bellingham, 2003. v. 71.
- DOUGHERTY, G. **Digital image processing for medical applications**. [S.l.: s.n.], 2009. ISBN 978-0-511-53343-3.
- DUDA, R. O.; HART, P. E.; STORK, D. G. **Pattern classification**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2012.
- FORD, J. Red blood cell morphology. **International journal of laboratory hematology**, Wiley Online Library, v. 35, n. 3, p. 351–357, 2013.
- GONZALEZ-HIDALGO, M. et al. Red blood cell cluster separation from digital images for use in sickle cell disease. IEEE, 2014.
- GONZALEZ-HIDALGO, M. et al. Red blood cell cluster separation from digital images for use in sickle cell disease. **Biomedical and Health Informatics, IEEE Journal of**, v. 19, n. 4, p. 1514–1525, July 2015. ISSN 2168-2194.
- GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. **Digital image processing 3rd edition**. [S.l.]: Prentice Hall, 2007.
- HALL, P.; PARK, B. U.; SAMWORTH, R. J. Choice of neighbor order in nearest-neighbor classification. **The Annals of Statistics**, JSTOR, p. 2135–2152, 2008.
- HAN, J.; KAMBER, M.; PEI, J. **Data mining: concepts and techniques: concepts and techniques**. [S.l.]: Elsevier, 2011.
- HEASRT, M. et al. Trends and controversies-support vector machines. **IEEE Intelligent Systems**, v. 13, n. 4, p. 18–28, 1998.
- HEMATOLOGY, A. S. o. **ASH Image Bank**. 2015. Disponível em: <<http://www.hematology.org/>>. Acesso em: 10/10/2015.
- HERRICK, J. B. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. **Archives of Internal Medicine**, VI, n. 5, p. 517–521, 1910. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1001/archinte.1910.00050330050003>>.
- HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. **Fundamentos em hematologia**. [S.l.]: Artmed, 2013.
- HOFFMAN, R. et al. **Hematology: Basic Principles and Practice, Expert Consult Premium Edition-Enhanced Online Features**. [S.l.]: Elsevier Health Sciences, 2012.

- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. In: **Histologia básica**. [S.l.]: Guanabara Koogan, 1985.
- KAUSHANSKY, K. et al. **Williams Hematology, Eighth Edition**. [S.l.]: McGraw-Hill Education / Medical, 2010. ISBN 0071621512.
- LANTUÉJOUL, C. Détection automatique de lignes de défauts dans des systèmes eutectiques lamellaires. **Rapport interne. Cntre de Morphologie Mathematique Fontainebleau, France**, 1978.
- LEONELI, G. G. et al. Hemoglobinas anormais e dificuldade diagnóstica. **Rev Bras Hematol Hemoter**, SciELO Brasil, v. 22, n. 3, p. 396–403, 2000.
- LIN, G. 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**, Wiley Online Library, v. 56, n. 1, p. 23–36, 2003.
- LOTUFO, R. A.; AUDIGIER, R. et al. Morphological image processing. **Microscope Image Processing**. Burlington: Academic, p. 113–158, 2008.
- MARI, J. F.; SAITO, J. H. **Análise Quantitativa De Culturas De Neurônios Em Matrizes De Microeletrodos Por Meio Do Processamento De Imagens De Microscopia Confocal De Fluorescência**. Tese (Doutorado) — Universidade Federal de São Carlos, 2015.
- MAY, Z.; AZIZ, S. A. M.; SALAMAT, R. Automated quantification and classification of malaria parasites in thin blood smears. In: **Signal and Image Processing Applications (ICSIPA), 2013 IEEE International Conference on**. [S.l.: s.n.], 2013. p. 369–373.
- MCLEAN, E. et al. Worldwide prevalence of anaemia, who vitamin and mineral nutrition information system, 1993–2005. **Public health nutrition**, Cambridge Univ Press, v. 12, n. 04, p. 444–454, 2009.
- MELO-REIS, P. R. et al. A importância do diagnóstico precoce na prevenção das anemias hereditárias. **Rev Bras Hematol Hemoter**, SciELO Brasil, v. 28, n. 2, p. 149–52, 2006.
- ONGUN, G. et al. An automated differential blood count system. In: **Engineering in Medicine and Biology Society, 2001. Proceedings of the 23rd Annual International Conference of the IEEE**. [S.l.: s.n.], 2001. v. 3, p. 2583–2586 vol.3. ISSN 1094-687X.
- OTSU, N. A threshold selection method from gray-level histogram. **IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics**, v. 9, p. 62–66, 1979.
- PAIVA, R. B. de et al. A anemia falciforme como problema de saúde pública no brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 27, n. 1, p. 54–58, 1993.
- POWERS, D. M. Evaluation: from precision, recall and f-measure to roc, informedness, markedness and correlation. Bioinfo Publications, 2011.

- RITTER, N.; COOPER, J. Segmentation and border identification of cells in images of peripheral blood smear slides. In: **Proceedings of the Thirtieth Australasian Conference on Computer Science - Volume 62**. Darlinghurst, Australia, Australia: Australian Computer Society, Inc., 2007. (ACSC '07), p. 161–169. ISBN 1-920-68243-0. Disponível em: <<http://dl.acm.org/citation.cfm?id=1273749.1273768>>.
- SAÚDE, M. d. **Lançada campanha para desmitificar a anemia falciforme**. 2015. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2012/11/lancada-campanha-para-desmistificar-a-anemia-falciforme>>. Acesso em: 14/08/2015.
- SERRA, J. **Image analysis and mathematical morphology**. [S.l.]: Academic Press, Inc., 1983.
- SOILLE, P. **Morphological image analysis: principles and applications**. [S.l.]: Springer-Verlag New York, Inc., 2003.
- STUART, M. J.; NAGEL, R. L. Sickle-cell disease. **The Lancet**, Elsevier, v. 364, n. 9442, p. 1343–1360, 2004.
- TELEA, A. C. **Data visualization: principles and practice**. [S.l.]: CRC Press, 2007.
- WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. **The thalassaemia syndromes**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2008.
- WHIPPLE, G. H.; BRADFORD, W. Racial or familial anemia of children: associated with fundamental disturbances of bone and pigment metabolism (cooley-von jaksch). **American Journal of Diseases of Children**, American Medical Association, v. 44, n. 2, p. 336–365, 1932.
- WU, Q.; MERCHANT, F.; CASTLEMAN, K. **Microscope image processing**. [S.l.]: Amsterdam [etc.]: Elsevier, 2008.