

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA COMPUTAÇÃO

**DETECÇÃO DE LEUCÓCITOS EM IMAGENS
DE VÍDEO DE MICROSCOPIA INTRAVITAL
USANDO A TÉCNICA DE CONGRUÊNCIA DE
FASE**

KATHIANI ELISA DE SOUZA

ORIENTADOR: PROF. DR. RICARDO JOSÉ FERRARI

São Carlos – SP

Fevereiro/2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA COMPUTAÇÃO

**DETECÇÃO DE LEUCÓCITOS EM IMAGENS
DE VÍDEO DE MICROSCOPIA INTRAVITAL
USANDO A TÉCNICA DE CONGRUÊNCIA DE
FASE**

KATHIANI ELISA DE SOUZA

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

Orientador: Prof. Dr. Ricardo José Ferrari

São Carlos – SP

Fevereiro/2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S729d Souza, Kathiani Elisa de
Detecção de leucócitos em imagens de vídeo de
microscopia intravital usando a técnica de
congruência de fase / Kathiani Elisa de Souza. --
São Carlos : UFSCar, 2016.
81 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
São Carlos, 2016.

1. Detecção de leucócitos. 2. Congruência de fase.
3. Microscopia intravital. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Kathiani Elisa de Souza, realizada em 16/02/2016:

Prof. Dr. Ricardo José Ferrari
UFSCar

Prof. Dr. Bruno Augusto Nassif Travençolo
UFU

Prof. Dr. José Hiroki Saito
UFSCar

Aos meus pais Erolde e José por
compreenderem minha ausência.
Aos meus irmãos Márcio e Edmácia
pelos preciosos incentivos e conselhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por minha vida.

Ao meu orientador Ricardo José Ferrari pela oportunidade, pela confiança e pelos ricos ensinamentos transmitidos a mim.

Aos meus pais Erotilde e José por todo amor, dedicação e carinho durante toda a minha vida. Agradeço por compreenderem minha ausência e por tudo que fizeram por mim!

Aos meus irmãos Márcio e Edmárcia pelo carinho, por sempre apoiarem minhas decisões e me incentivarem a lutar pelos meus sonhos.

Ao meu querido Bento por estar sempre ao meu lado, por toda compreensão e por todo incentivo que me deu nos momentos mais difíceis desta caminhada.

À toda minha família que me nutre e me alegra. Amo vocês!

Às meninas da república Funilaria e Pintura: Franciele, Natália, Marília, Andressa, Carol, Daniela e Connie. Obrigada por me acolherem e se tornarem minha família!

Ao meu amigo Arthur Pinheiro pelo companheirismo.

Aos meus amigos Claudinéia, Carol e Arthur Andrade pelas agradáveis conversas.

Aos colegas do laboratório GAPIS Bruno, Amandia, Paulo e Carlos pelas contribuições e auxílios no trabalho.

À Universidade Federal de São Carlos e ao Departamento de Computação pela infraestrutura.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES - pelo apoio financeiro.

“A persistência é o menor caminho para o êxito.”

Charles Chaplin

RESUMO

Contar o número de leucócitos presentes em vasos sanguíneos é uma tarefa fundamental para entender mecanismos de inflamações e avaliar efeitos de drogas que estão sendo desenvolvidas para o tratamento de doenças inflamatórias. Em geral, a contagem de leucócitos é feita por um observador (técnico laboratorial ou especialista) usando uma sequência de imagens de microscopia intravital, obtidas do vaso sanguíneo de um animal de teste. Entretanto, a tarefa de contagem é demorada, propensa à erros, devido à fadiga visual do observador, e viesada, devido à variabilidade inter e intra-observador. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de uma técnica computacional para a detecção automática de leucócitos em imagens de vídeo de microscopia intravital. Para isso, a detecção dos leucócitos foi realizada em dois principais estágios. No estágio 1, a medida de congruência de fase, que é invariante a mudanças de contraste e iluminação em imagens, foi utilizada para o cálculo de uma medida de *blobness* usada na detecção de estruturas circulares nas imagens de microscopia intravital. No estágio 2, as estruturas circulares detectadas no estágio 1 foram analisadas localmente a fim de identificar apenas aquelas correspondentes aos leucócitos verdadeiros. Os resultados foram avaliados utilizando as métricas de precisão, revocação e medida-F1 e a área sob as curvas precisão-revocação. Além disso, a técnica proposta foi comparada com a técnica casamento de padrões.

Palavras-chave: detecção de leucócitos, congruência de fase, microscopia intravital

ABSTRACT

Counting the number of leukocytes present in the blood vessels is an important task to understand inflammation mechanisms and to assess the effects of drugs that are being developed for the treatment of inflammatory diseases. In general, leukocyte counting is done by an observer (laboratory technician or specialist) using a sequence of intravital microscopy images obtained from blood vessel of an animal testing. However, this procedure is time-consuming, prone to errors, due to visual fatigue of the observer, and biased, due to inter and intra-observer variability. Thus, the objective of this work was the development of computational technique for the automatic detection of leukocytes in intravital video microscopy images. For this, the detection of leukocytes was performed in two main stages. In stage 1, the phase congruency measure, which is invariant to changes of contrast and lighting images, was used to calculate a blobness measure used to detect circular structures in intravital microscopy images. In stage 2, the circular structures detected in stage 1 were analyzed locally to identify only those corresponding to true leukocytes. The results were evaluated using the precision, recall and F1-measure metrics and the area under the precision-recall curves. Furthermore, the proposed technique was compared with the template matching technique.

Keywords: *detection of leukocytes, phase congruency, intravital microscopy*

LISTA DE FIGURAS

2.1	Imagem de uma célula com seu contraste reduzido ao longo do tempo devido ao efeito de <i>Photobleaching</i> . A sigla BL indica a célula inicial e o número posicionado no canto inferior esquerdo indica o tempo de aquisição (Adaptada de Chen et al. (2005)).	19
2.2	Representação esquemática de um microscópio de fluorescência utilizado na obtenção de imagens de MI (Adaptada de Bishop et al. (2001)).	20
2.3	Etapas do processo de recrutamento de leucócitos: rolamento, adesão e transmigração (Extraído de Vilela (2008)).	21
4.1	Exemplo de um quadro do vídeo de MI utilizado neste trabalho (obtido do cérebro de um camundongo).	34
4.2	<i>Pipeline</i> de processamento realizado.	35
4.3	Máscara binária representando a região efetiva do vaso sanguíneo.	39
4.4	Pontos de máxima congruência de fase (destacados em vermelho) de componentes harmônicos da série de Fourier para ondas quadrada e triangular (Extraído de Kovese (2000)).	42
4.5	Medida de PC de uma função degrau com e sem ruído (Traduzida de Kovese (2000)).	45
4.6	Fluxograma da sequência de passos realizada para obtenção do mapa de <i>blobness</i>	48
4.7	Exemplo do mapa de <i>blobness</i> de um quadro do vídeo.	48
4.8	Exemplos de curvas Precisão-Revocação. A linha contínua indica o desempenho do algoritmo 1 e a linha tracejada indica o desempenho do algoritmo 2 (Traduzida de Davis e Goadrich (2006)).	53

4.9	Diagrama dos experimentos realizados para a definição dos parâmetros do banco de filtros de log-Gabor.	54
4.10	Banco de filtros de log-Gabor utilizado neste trabalho composto por 16 filtros, cada um em uma determinada escala e orientação.	56
4.11	Frequência central radial dos filtros e sua respectiva cobertura no log de frequência.	56
5.1	Média da medida-F1 (a) e média da AUCPR (b) com intervalo de confiança obtidas pela medida de <i>blobness</i> e pela técnica casamento de padrões.	63
5.2	Curvas precisão-revocação obtidas para a medida de <i>blobness</i> (linha vermelha) e para a técnica casamento de padrões (linha em azul).	64
5.3	Exemplo de um quadro processado do vídeo. a) Quadro original; b) leucócitos marcados visualmente; c) imagem resultante da medida de <i>blobness</i> ; d) imagem resultante da técnica casamento de padrões. Os círculos verdes indicam os TPs, os círculos azuis indicam os FPs e os símbolos 'x' indicam os FNs.	65
5.4	Valores da medida-F1 obtidos em cada limiar da medida de circularidade e no limiar da medida de <i>blobness</i> no qual o valor da medida-F1 foi maximizada. . .	67
5.5	Valores da medida-F1 obtidos em cada limiar da medida de circularidade e no limiar da técnica casamento de padrões no qual o valor da medida-F1 foi maximizada.	69
5.6	Imagens nas quais somente os FPs foram eliminados. Os círculos verdes indicam os TPs, os símbolos 'x' indicam os FNs, os círculos azuis indicam os FPs e os quadrados amarelos indicam os FPs que foram eliminados.	71
5.7	Imagem na qual os quadrados amarelos marcados com um símbolo 'x' indicam os TPs que foram eliminados e os quadrados amarelos que estão vazios indicam os FPs que foram eliminados corretamente após realizar o estágio de detecção 2.	72

LISTA DE TABELAS

3.1	Resumo dos trabalhos propostos pela literatura relacionando em ordem cronológica o nome dos autores, a abordagem, as métricas de avaliação empregadas, o número (Nº) de leucócitos detectados/rastreados (apenas um (U) ou múltiplos (M)) e o tipo de detecção realizada: automática (A) ou semiautomática (S). Na última linha é relacionada a técnica proposta neste trabalho.	31
4.1	Valores de $mult$ e σ_r para uma dada largura de banda.	55
5.1	Valores dos parâmetros $minw$, $mult$ e σ_r e valores da \overline{AUCPR} obtidos após fixar o número de orientações do banco de filtros em 4 e 6.	59
5.2	Valores dos parâmetros k , c e γ que foram fixados e os valores da \overline{AUCPR} resultantes.	60
5.3	Valores do parâmetro α que foram fixados e os valores resultantes de \overline{AUCPR}	61
5.4	Valores do parâmetro β que foram fixados e os valores resultantes de \overline{AUCPR}	61
5.5	Valores da $\overline{medida - F1}$ e \overline{AUCPR} obtidos com a medida de $blobness$ e com a técnica casamento de padrões.	62
5.6	Número de TPs, FPs e FNs e valores de precisão, revocação e medida-F1 obtidos para a medida de $blobness$ e para a técnica casamento de padrões. O número total de leucócitos presentes no vídeo é de 5588.	64
5.7	Número de TPs, FPs e FNs e os valores de Precisão (P), Revocação (R) e medida-F1 obtidos do vídeo após as estruturas circulares terem sido detectadas com a medida de $blobness$ e o estágio 2 ser aplicado. O número total de leucócitos no vídeo é de 5588.	67
5.8	\overline{AUCPR} obtida em cada limiar aplicado a medida de circularidade (de 0,1 a 0,9).	68

5.9	Números de TPs, FPs e FNs e os valores de Precisão (P), Revocação (R) e medida-F1 obtidos do quadro do vídeo após as estruturas circulares terem sido detectadas com a técnica casamento de padrões e o estágio 2 ser aplicado. . . .	69
5.10	\overline{AUCPR} obtida em cada limiar aplicado a medida de circularidade (de 0,1 a 0,9).	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AUCPR – *Área sob a curva Precisão-Revocação (Area Under the Curve Precision-Recall)*

AUC – *Área sob a curva (Area Under the Curve)*

FN – *Falso-Negativo*

FP – *Falso-Positivo*

GICOV – *Coefficiente de Variação de Gradiente Inverso (Gradient Inverse Coefficient of Variation)*

GVF – *Vetor de fluxo de gradiente (Gradient Vector Flow)*

MGVF – *Vetor de Fluxo de Gradiente de Movimento (Motion Gradient Vector Flow)*

MI – *Microscopia Intravital*

MPP – *Processos de Pontos Marcados (Marked Point Process)*

PC – *Congruência de Fase (Phase Congruency)*

RMSE – *Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático (Root Mean Square Error)*

RNA – *Rede Neural Artificial*

ROC – *Curva característica de resposta do observador (Receiver Operating Characteristic)*

TP – *Verdadeiro-Positivo*

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	15
1.1 Contexto e motivação	15
1.2 Objetivos principal e específicos	17
1.3 Organização do texto	17
CAPÍTULO 2 – MICROSCOPIA INTRAVITAL E RECRUTAMENTO DE LEUCÓCITOS	18
2.1 Microscopia intravital	18
2.2 Recrutamento de leucócitos	20
2.3 Considerações finais	21
CAPÍTULO 3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE TÉCNICAS DE DETECÇÃO DE LEUCÓCITOS EM IMAGENS DE MICROSCOPIA INTRAVITAL	23
3.1 Técnicas para a detecção de leucócitos em imagens de Microscopia Intravital	23
3.2 Discussão	30
3.3 Considerações finais	31
CAPÍTULO 4 – MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 Imagens de vídeo e procedimentos de Microscopia Intravital	33
4.2 <i>Pipeline</i> de processamento	34
4.3 Etapa de pré-processamento	35
4.3.1 Detecção e remoção de quadros com borramento excessivo	36

4.3.2	Redução de ruído	36
4.3.3	Padronização de histogramas	37
4.3.4	Estabilização do vídeo de Microscopia Intravital	37
4.3.5	Segmentação do vaso sanguíneo	38
4.4	Técnicas utilizadas no estágio de detecção 1	39
4.4.1	Filtros de Gabor 2D	40
4.4.2	Filtros de log-Gabor 2D	40
4.4.3	Congruência de Fase	41
4.4.3.1	Congruência de fase 1D	42
4.4.3.2	Congruência de fase 2D	44
4.4.4	Matriz de momentos de PC	46
4.4.5	Medida de <i>blobness</i>	47
4.4.6	Casamento de padrões	49
4.5	Técnicas utilizadas no estágio de detecção 2	49
4.5.1	Método de Otsu	49
4.5.2	Medida de Circularidade	50
4.6	Métricas de avaliação	51
4.7	Experimentos para definição dos parâmetros do método proposto	52
4.7.1	Experimentos para a definição dos parâmetros do banco de filtros	54
4.7.2	Experimentos para a definição dos parâmetros k , c e γ da medida de PC	57
4.7.3	Experimentos para a definição dos parâmetros α e β da medida de <i>blobness</i>	57
4.8	Considerações Finais	57

CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES **58**

5.1	Resultados dos experimentos realizados para a definição dos parâmetros do método proposto	58
-----	---	----

5.1.1	Experimentos para a definição dos parâmetros do banco de filtros . . .	58
5.1.2	Experimentos para a definição dos parâmetros k , c e γ da medida de PC	59
5.1.3	Experimentos para a definição dos parâmetros da medida de <i>blobness</i> .	60
5.2	Resultados do estágio de detecção 1	62
5.3	Resultados do estágio de detecção 2	66
5.4	Considerações finais	72
CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES		74
6.1	Conclusões finais	74
6.2	Contribuições do trabalho	75
6.3	Trabalhos futuros	76
6.4	Trabalho publicado referente à pesquisa desenvolvida	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		77

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1.1 Contexto e motivação

A inflamação é um conjunto de reações bioquímicas, vasculares e celulares que ocorre quando um organismo é afetado por algum dano, que pode ser causado por uma infecção ou lesão nos tecidos. Uma das reações da inflamação é o acúmulo e o recrutamento de leucócitos nos vasos sanguíneos próximos à região afetada. Os leucócitos são células que fazem parte do sistema imunológico e têm por função eliminar microrganismos e estruturas químicas estranhas ao organismo (SERHAN; WARD; GILROY, 2010). Durante o recrutamento, os leucócitos se deslocam do centro para a parede interna dos vasos sanguíneos (endotélio), onde começam a rolar e se aderir, até migrarem para a região afetada pela infecção ou lesão a fim de mitigar o dano causado (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2014).

Contar a quantidade de leucócitos presentes nos vasos sanguíneos é uma tarefa importante para entender os mecanismos de inflamações e avaliar o efeito de drogas desenvolvidas para o tratamento de doenças inflamatórias, tais como, esclerose múltipla, doença de Crohn e artrites (CUI; ACTON; LIN, 2006). Para a obtenção de estatísticas do recrutamento leucocitário, primeiro é realizada uma técnica denominada Microscopia Intravital (MI). Nessa técnica, um animal de teste, geralmente um animal de pequeno porte como ratos, camundongos e peixes, é submetido a procedimentos que permitem a visualização e a obtenção de uma sequência de imagens dos vasos sanguíneos através de um microscópio (GAVINS; CHATTERJEE, 2003). Em seguida, a contagem dos leucócitos é realizada visualmente por um observador (técnico laboratorial ou pesquisador) experiente diretamente nas imagens obtidas. Entretanto, esse processo visual possui vários problemas, visto que, é demorado, propenso à erros (devido à fadiga visual do observador), e viesado, devido a variabilidade inter e intra observador, que se reflete nos resultados de contagem (DONG; RAY; ACTON, 2005; NGUYEN et al., 2011). Diante dos

problemas mencionados, o desenvolvimento de um método automático de detecção de leucócitos visando substituir a contagem visual é de grande importância para aumentar a confiabilidade dos resultados dos experimentos de MI. Dessa maneira, será possível avaliar com maior exatidão o efeito de drogas sendo desenvolvidas para o tratamento de doenças inflamatórias e melhorar o entendimento dos eventos leucocitários e sua relação com processos inflamatórios (CUI; ACTON; LIN, 2006).

Portanto, com base no exposto acima, o principal objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de técnicas computacionais para a detecção automática de leucócitos em imagens de vídeo de MI. O desenvolvimento de um método automático de detecção e rastreamento de leucócitos em imagens de MI possui vários desafios, dos quais pode-se citar: a presença de ruído e artefatos nas imagens, causada principalmente por movimentos de respiração e de batimentos cardíacos do animal, e a variação de contraste e iluminação dos leucócitos, causada pelo efeito de *Photobleaching*¹ (RAY; ACTON, 2004). Outro desafio é a alta variação na aparência das imagens, dependendo do tecido estudado. Neste trabalho, foram utilizadas imagens de vídeo obtidas do cérebro de um camundongo em um estudo relacionado a doença de esclerose múltipla.

Até o momento vários grupos de pesquisa têm proposto abordagens automáticas e semiautomáticas para a detecção e o rastreamento de leucócitos em imagens de MI. Na maioria dos trabalhos, têm sido propostas abordagens que envolvem a utilização de contornos ativos e de técnicas de aprendizado supervisionado. No entanto, tais trabalhos não se atentam e nem discutem a degradação das imagens causada pelo efeito de *Photobleaching*, o que pode interferir diretamente no desempenho das abordagens propostas. Dessa forma, percebe-se a importância da utilização de uma técnica que seja invariante ao contraste e iluminação dos leucócitos, e por isso, menos suscetível ao impacto de tal efeito. Sendo assim, neste trabalho a medida de Congruência de Fase (*Phase Congruency* - PC) desenvolvida por Kovessy (1996), que possui a vantagem de ser invariante ao contraste e iluminação em imagens, foi utilizada como base para o desenvolvimento de uma medida de realce de estruturas circulares. Tal medida, denominada medida de *blobness*, foi utilizada para realçar as estruturas circulares possivelmente correspondentes aos leucócitos nas imagens de MI.

Para alcançar o objetivo principal deste trabalho, a detecção dos leucócitos foi realizada em dois principais estágios. No estágio 1, as estruturas circulares presentes nas imagens de MI foram realçadas utilizando a medida de *blobness* e, em seguida, detectadas usando um algoritmo

¹O efeito *Photobleaching* envolve a diminuição da absorção e da intensidade de fluorescência de determinado fluoróforo que, neste caso, é responsável por tornar os leucócitos brilhantes nas imagens (WU; MERCHANT; CASTLEMAN, 2010).

de busca por máximos locais. No estágio 2, foi realizada uma estratégia para eliminar o número de sinais falso positivos erroneamente detectados no estágio 1, a fim de identificar apenas as estruturas correspondentes aos leucócitos verdadeiros.

1.2 Objetivos principal e específicos

Este trabalho tem como objetivo principal o desenvolvimento de uma técnica computacional para a detecção automática de leucócitos em imagens de MI. A fim de alcançar tal objetivo, alguns objetivos específicos são realizados:

- Pré-processar a sequência de imagens de MI a fim de realizar a extração de quadros do vídeo com borramento excessivo, a redução de ruído, a padronização de histogramas de quadros sucessivos da sequência de imagens, o corregristo de imagens para a estabilização de movimento e a segmentação da região de interesse;
- Desenvolver uma medida de realce de estruturas circulares utilizando a medida de PC (estágio de detecção 1);
- Realizar o pós-processamento da sequência de imagens de MI a fim de eliminar os sinais falsos positivos (estágio de detecção 2);
- Avaliar os resultados dos dois estágios de detecção utilizando as métricas Precisão, Revocação, Medida-F1 e área sob a curva Precisão-Revocação;
- Comparar os resultados da técnica proposta com os da técnica casamento de padrões.

1.3 Organização do texto

O texto deste trabalho está organizado da seguinte forma. No Capítulo 2 são apresentadas informações sobre os procedimentos realizados usando a técnica de MI e o processo de recrutamento de leucócitos. No Capítulo 3 é apresentada uma revisão do estado da arte sobre técnicas de detecção de leucócitos em imagens de MI. No Capítulo 4 são apresentados os materiais e métodos utilizados para o desenvolvimento da pesquisa. No Capítulo 5 são apresentados os resultados e as discussões e, por fim, no Capítulo 6 são apresentadas as conclusões finais deste trabalho.

Capítulo 2

MICROSCOPIA INTRAVITAL E RECRUTAMENTO DE LEUCÓCITOS

Este capítulo apresenta em detalhes algumas informações necessárias para o entendimento deste projeto de pesquisa. São apresentados os detalhes sobre a técnica de MI e seus procedimentos, sobre a aquisição das imagens de MI e sobre o processo de recrutamento de leucócitos.

2.1 Microscopia intravital

A MI é uma técnica utilizada no estudo de mecanismos celulares e moleculares de interações entre os leucócitos e o endotélio, que ocorrem nos vasos sanguíneos de vários tecidos e em diferentes condições inflamatórias. Tal técnica permite a análise do comportamento de leucócitos pela observação e imageamento *in vivo*¹ dos vasos sanguíneos de animais de pequeno porte através de um microscópio. Esses animais são geralmente ratos, camundongos e peixes (GAVINS; CHATTERJEE, 2003) e os principais tecidos analisados são o músculo cremaster, o mesentério, o fígado, a medula e o cérebro (MARQUES et al., 2012).

Quando a MI é realizada em tecidos transparentes, como são os casos do músculo cremaster, do mesentério e do fígado, é possível utilizar um microscópio de luz convencional. Entretanto, em órgãos intransparentes como o cérebro é necessário utilizar a microscopia de fluorescência (MARQUES et al., 2012). Usando a microscopia de fluorescência é possível observar a estrutura de células vivas que são quimicamente marcadas com fluoróforos injetados na corrente sanguínea do animal. Os fluoróforos são moléculas que sofrem uma excitação causada pela absorção de luz de um comprimento de onda específico e emitem luz fluorescente com um comprimento de onda maior. Isso permite que uma célula se torne brilhante e possa ser diferen-

¹Trata-se de processos executados em organismos vivos (STEVENSON, 2010).

ciada das demais estruturas na imagem (WU; MERCHANT; CASTLEMAN, 2010). Um dos fluoróforos comumente utilizados é a Rodamina 6G (MARQUES et al., 2012).

Para realizar o imageamento *in vivo* e analisar o comportamento dos leucócitos é necessário expor cirurgicamente o tecido de interesse para permitir o acesso da objetiva do microscópio. No caso do cérebro, uma craniotomia² é realizada no animal anestesiado com a ajuda de uma mini broca de alta velocidade, permitindo que os vasos sanguíneos do tecido de interesse sejam expostos à fonte de luz ou laser e que sequências de imagens desses vasos sejam obtidas. No caso de períodos longos de anestesia, alguns procedimentos adicionais podem ser adotados para manter os parâmetros fisiológicos do animal. Dentre tais procedimentos, citam-se: uma canulação jugular, para a administração intravenosa de drogas, monitoramento da temperatura, realizado por um termômetro elétrico, e ventilação artificial dos pulmões por intubação da traqueia. Além disso, as taxas de pressão sanguínea, arterial e cardíaca podem ser continuamente monitoradas por meio de um cateter colocado na artéria carótida (MARQUES et al., 2012).

Um dos efeitos indesejáveis em imagens de MI obtidas pelo imageamento por fluorescência, como é o caso deste trabalho, é a variação de contraste que os leucócitos apresentam ao longo dos quadros do vídeo. Esse efeito, conhecido como *Photobleaching*, é um fenômeno inerente aos fluoróforos que têm a sua emissão de fluorescência reduzida ao longo do tempo, fazendo com que os leucócitos percam seu contraste. Tal fenômeno pode dificultar a visualização e quantificação de estruturas em imagens de fluorescência (WU; MERCHANT; CASTLEMAN, 2010). Uma imagem contendo uma célula com contraste reduzido pelo efeito de *Photobleaching* é apresentada na Figura 2.1.

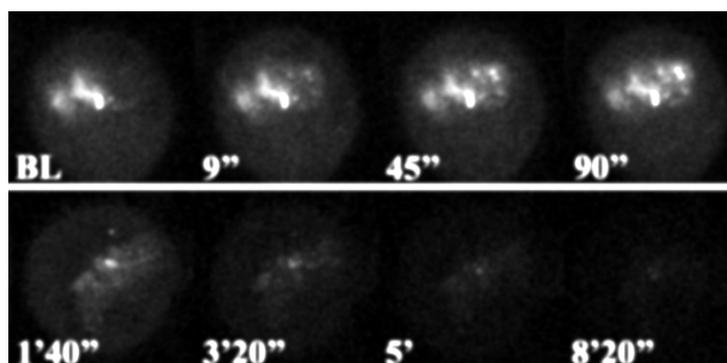


Figura 2.1: Imagem de uma célula com seu contraste reduzido ao longo do tempo devido ao efeito de *Photobleaching*. A sigla BL indica a célula inicial e o número posicionado no canto inferior esquerdo indica o tempo de aquisição (Adaptada de Chen et al. (2005)).

Um esquema de um microscópio de fluorescência utilizado para obter imagens de MI é ilustrado na Figura 2.2. Em tal esquema, um feixe de luz é emitido por uma lâmpada, que pode

²Refere-se a uma cirurgia craniana (MOSTANY; PORTERA-CAILLIAU, 2008).

ser de vapor de mercúrio ou laser, e passa por um filtro de excitação, localizado logo após a saída de luz. Esse filtro permite a passagem de luz de apenas determinados comprimentos de onda e bloqueia qualquer comprimento de onda curto de excitação residual. O feixe de luz é refletido pelo espelho dicróico e captado pela lente objetiva, que tem a função de fornecer uma imagem aumentada da amostra. Após a luz captada pela lente atingir a amostra, a fluorescência emitida pelo fluoróforo excitado é colhida pela lente objetiva novamente, passa pelo espelho dicróico e em seguida pelo filtro de emissão, que então transmite somente a banda de comprimentos de onda fluorescentes. A luz que ultrapassa o filtro de emissão é captada por uma câmera CCD (*Charge-Coupled Device*) que gera uma sequência de imagens dos vasos sanguíneos do animal. Durante o procedimento, as imagens obtidas são enviadas para um computador para serem analisadas por um especialista (MURPHY, 2002).

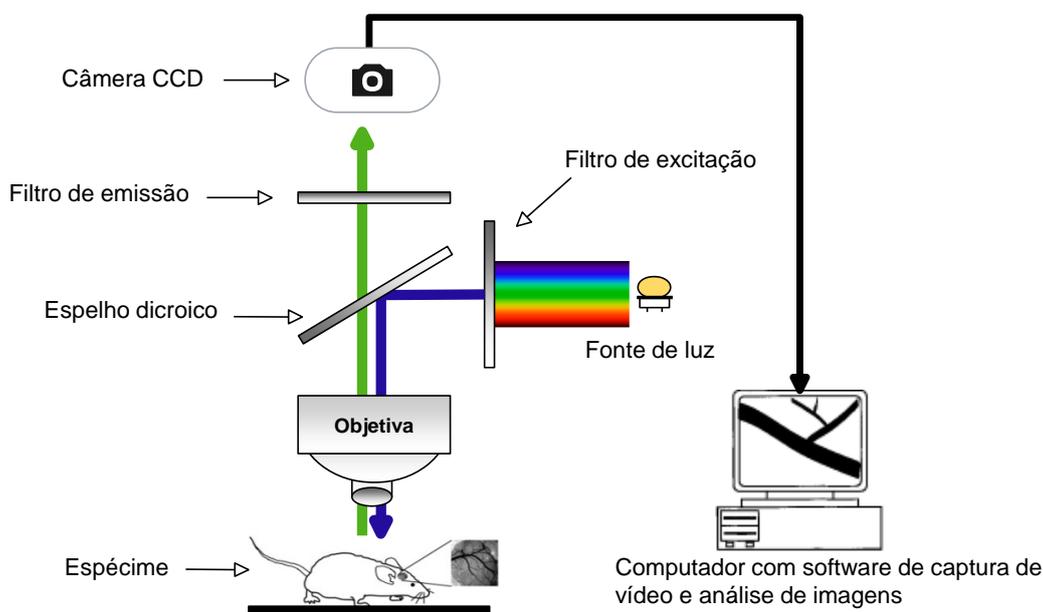


Figura 2.2: Representação esquemática de um microscópio de fluorescência utilizado na obtenção de imagens de MI (Adaptada de Bishop et al. (2001)).

2.2 Recrutamento de leucócitos

Uma das respostas de uma inflamação é o acúmulo e o recrutamento de leucócitos nos vasos sanguíneos (DOGO, 2010). O recrutamento consiste no deslocamento dos leucócitos do centro do vaso sanguíneo em direção à parede do endotélio e compõe-se de três etapas distintas que são: o rolamento, a adesão e a transmigração dos leucócitos (VILELA, 2008). Na etapa de rolamento, os leucócitos ao interagirem com moléculas de adesão, chamadas de selectinas,

diminuem sua velocidade e começam a rolar sob a parede do endotélio (*tethering*). Em seguida, após interagirem com moléculas de integrinas, os leucócitos se aderem ao endotélio e, por fim, ocorre a transmigração ou diapedese, que é o processo pelo qual os leucócitos, mediados por moléculas de quimiocinas, atravessam o endotélio (ZAGO, 2006). As três etapas do processo de recrutamento de leucócitos são ilustradas na Figura 2.3.

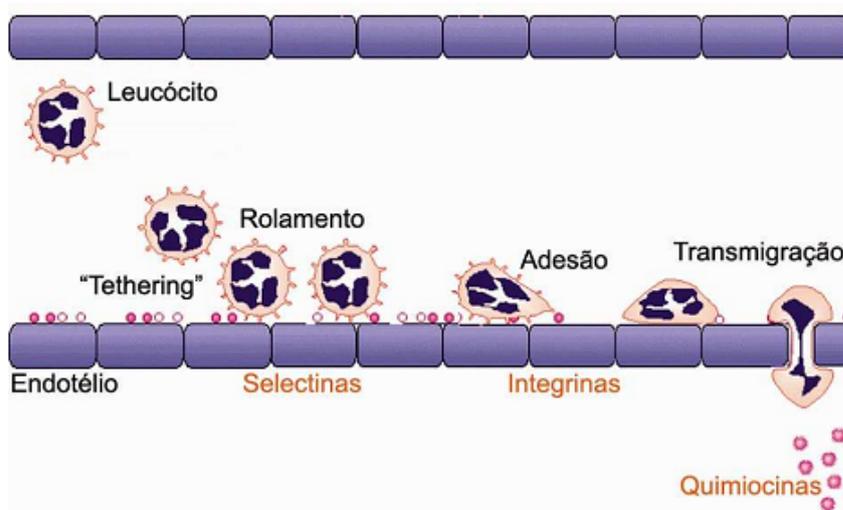


Figura 2.3: Etapas do processo de recrutamento de leucócitos: rolamento, adesão e transmigração (Extraído de Vilela (2008)).

A caracterização de um leucócito como aderido³ ou rolante⁴ é baseada no tempo em que este permanece parado dentro do vaso sanguíneo. Segundo Gavins e Chatterjee (2003), Vilela (2008) e Ferreira (2011), um leucócito é considerado aderente quando ele fica parado no endotélio por, no mínimo, 30 segundos. Vilela (2008) considera um leucócito como rolante se a sua velocidade for menor que a velocidade do fluxo sanguíneo. Diferentemente, Ferreira (2011) considera um leucócito como rolante se este move-se a uma velocidade menor que as hemácias dentro de um fluxo sanguíneo observado.

A velocidade de rolamento e o número de leucócitos rolantes e aderidos são algumas das estatísticas utilizadas na avaliação de um processo inflamatório (ACTON; RAY, 2004).

2.3 Considerações finais

Neste capítulo foram fornecidas informações complementares sobre a técnica de MI, os procedimentos realizados para a visualização dos vasos sanguíneos e sobre o processo de re-

³Trata-se de leucócitos que diminuem sua velocidade e rolam sob a parede do vaso sanguíneo.

⁴Trata-se de leucócitos que se encontram aderidos ao endotélio.

crutamento de leucócitos. Tais informações são importantes para entendimento da pesquisa desenvolvida neste trabalho.

Capítulo 3

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE TÉCNICAS DE DETECÇÃO DE LEUCÓCITOS EM IMAGENS DE MICROSCOPIA INTRAVITAL

Neste capítulo é apresentado o estado da arte em termos de técnicas automáticas de detecção de leucócitos em imagens de MI. Os trabalhos correlatos são apresentados em ordem cronológica.

3.1 Técnicas para a detecção de leucócitos em imagens de Microscopia Intravital

Egmont-Petersen et al. (2000) propuseram um método automático baseado em redes neurais artificiais (RNAs) para realizar a detecção de leucócitos em imagens de vídeo de MI. As RNAs foram treinadas com imagens de leucócitos sintéticos e reais, manualmente selecionados em imagens de MI. Os leucócitos sintéticos foram gerados a partir de um modelo estocástico que caracteriza a distribuição de intensidade de um leucócito. Esse modelo, criado com base na forma, contraste e textura dos leucócitos, permitiu gerar imagens de leucócitos com diferentes tamanhos e formas sob várias condições de iluminação. RNAs com diferentes topologias foram treinadas utilizando dois conjuntos de treinamento, ambos consistindo de 90 imagens de leucócitos e 9000 imagens correspondentes ao fundo. O primeiro conjunto de treinamento foi composto por leucócitos gerados usando o modelo estocástico desenvolvido e o segundo por imagens de leucócitos marcados manualmente. Em ambos os conjuntos de treinamento, as mesmas 9000 imagens de fundo foram utilizadas. Ao todo foram utilizadas 12 RNAs, 6 treinadas com imagens de leucócitos gerados artificialmente e 6 treinadas com leucócitos reais.

Cada RNA treinada foi utilizada para detectar leucócitos em 3 imagens de teste que pertenciam a seqüências de vídeo diferentes que não foram utilizadas para construir o conjunto de treinamento. Um limiar foi aplicado sob as saídas das RNAs e para comparar os resultados, a curva característica de resposta do observador (*Receiver Operating Characteristic* - ROC) e a área sob a curva ROC (*Area Under the Curve* - AUC) das RNAs foram computadas para a saída de cada RNA em cada imagem de teste. A média da AUC da melhor RNA treinada com imagens de leucócitos gerados artificialmente foi 0,90 e a média da AUC da melhor RNA treinada com imagens de leucócitos reais foi de 0,71. Esses resultados mostraram que as RNAs treinadas com imagens de leucócitos gerados artificialmente obtiveram melhor desempenho com um valor de AUC 18% maior que a da melhor RNA treinada com imagens de leucócitos reais.

O trabalho de Ray, Acton e Ley (2002) apresenta um modelo de contorno ativo para rastrear leucócitos em imagens de vídeo de MI. O funcional de energia do modelo foi composto pelos componentes de energia interna, que inclui os termos de energia de rigidez e elástica (*KASS; WITKIN; TERZOPOULOS, 1988*), energia externa, que usa a técnica do vetor de fluxo de gradiente (*Gradient Vector Flow* - GVF)(XU; PRINCE, 1998) e energia de restrição, que analisa o tamanho, forma, posição e número de pontos do contorno discretizado dos leucócitos. Foi utilizado também um filtro de Kalman para prever a posição do contorno ativo no próximo quadro durante o período em que o leucócito se encontrava ocluso. O rastreamento foi, então, realizado da seguinte maneira. Inicialmente, o contorno do leucócito foi marcado pelo usuário. A seguir, o modelo ativo se encarregou de deformar o contorno durante a evolução do algoritmo. A partir do segundo quadro, o contorno ativo foi inicializado com a posição e forma do leucócito obtido do quadro anterior e evoluído novamente para delinear o leucócito no novo quadro. Os autores utilizaram um vídeo com resolução espacial de 3, 10 pixels/ μm na direção horizontal e 3, 11 pixels/ μm na direção vertical, matriz imagem de 320×240 pixels e amostragem temporal de 30 quadros por segundo. Os testes foram realizados em 16 seqüências de vídeo tratadas e não-tratadas contendo de 31 a 167 quadros. As seqüências tratadas são obtidas de vasos sanguíneos tratados com TNF- α ¹ e apresentam células com velocidade de rolamento mais baixas que as não-tratadas. Resultados experimentais em ambientes reais e sintéticos mostraram que as energias de restrição de forma e tamanho, aplicadas ao contorno ativo, fizeram ele se adaptar corretamente à forma do leucócito. Os resultados também mostraram que o contorno ativo foi capaz de capturar adequadamente as células mesmo utilizando diferentes inicializações do contorno. Duas medidas de erro foram calculadas para avaliar o desempenho do método, a raiz quadrada do erro médio quadrático (*Root Mean Square Error* - RMSE), calculada para

¹O tratamento com a substância TNF- α aumenta o número de leucócitos rolantes e aderentes e diminui significativamente a velocidade dos leucócitos rolantes (HICKEY et al., 1997)

as posições dos centros das células automaticamente detectadas e manualmente marcadas, e o percentual de quadros rastreados. O quadro é considerado rastreado se o centro de uma célula, automaticamente determinada pelo método proposto, está dentro do raio de uma célula manualmente marcada. Os leucócitos foram rastreados utilizando o método proposto e mais dois outros métodos um baseado em correlação e outro baseado em centroides, como forma de comparar os resultados. Foram calculadas as médias do RMSE e do percentual de quadros rastreados utilizando os três métodos de rastreamento em sequências tratadas e não-tratadas. A média percentual de quadros corretamente rastreados em sequências tratadas e não-tratadas utilizando o contorno ativo foram, respectivamente, iguais a 99,9% e 74,4% (os maiores valores em comparação com as outras técnicas). A média do RMSE para sequências tratadas foi de 0,5 (menor que as outras técnicas) e para sequências não-tratadas foi de 4,6 (segundo menor valor).

Em Ray e Acton (2004), os autores apontam que o contorno ativo com energia externa baseada no GVF, proposto por Ray, Acton e Ley (2002) para rastrear leucócitos, não capturava células que rolavam rapidamente e que tinham um deslocamento entre quadros maior que o raio de uma célula. Sendo assim, os autores propuseram um contorno ativo que utiliza um novo componente de energia externa, que é baseado no vetor de fluxo de gradiente de movimento (*Motion Gradient Vector Flow* - MGVF). Nesse trabalho, foram realizados dois experimentos utilizando dois conjuntos de dados. O primeiro conjunto, utilizado no primeiro experimento, foi composto por 100 vídeos de MI com 91 quadros cada um, todos com amostragem temporal igual a 30 quadros por segundo. Esses vídeos foram obtidos de experimentos com camundongos *knockout*² e selvagens. O segundo conjunto, utilizado no segundo experimento, foi composto por 25 vídeos de MI, cada um com 31 quadros e amostragem temporal igual a 30 quadros por segundo. Nesse caso, as sequências foram obtidas de experimentos usando camundongos com trauma induzido. Os autores realizaram uma comparação entre o GVF e o MGVF. No primeiro experimento, o MGVF e o GVF foram avaliados para deslocamentos da posição inicial do contorno em: a) meio raio do leucócito, b) um raio do leucócito e c) nenhum deslocamento. No segundo experimento, o GVF e o MGVF foram comparados após a diminuição da taxa de amostragem das sequências de vídeo (aumentando o deslocamento quadro a quadro das células). Nesse caso, quatro taxas de amostragem foram consideradas: a) taxa de amostragem original, b) metade da amostragem, c) um terço da amostragem e d) um quarto da amostragem. Para analisar os resultados dos experimentos, e comparar o modelo proposto com o trabalho anterior, foi calculada a média do RMSE para os dois métodos de rastreamento. As médias de RMSE utilizando GVF com 4 taxas de amostragem foram 2,5 (30 fps), 2,7 (15 fps), 4,3 (10 fps)

²Um camundongo *knockout* refere-se a um camundongo modificado geneticamente, em que um gene ou sua função foi eliminada (CARVALHO; LOPES, 2006).

e 6,0 (7,5 fps). As médias do MGVF com as mesmas taxas de amostragem foram 1,6 (30 fps), 1,5 (15 fps), 1,8 (10 fps) e 3,9 (7,5 fps). A conclusão foi que o contorno ativo com o MGVF apresentou valores menores de RMSE em todas as taxas de amostragem. Segundo os autores, o GVF não foi adequado para rastrear leucócitos rolando rapidamente (na sequência com taxa de amostragem menor) enquanto que o MGVF funcionou bem para leucócitos com alta e baixa velocidade de rolamento (alta e baixa taxa de amostragem).

Mukherjee, Ray e Acton (2004) propuseram rastrear múltiplos leucócitos usando conjuntos de curvas de níveis (PARAGIOS; DERICHE, 2000) da imagem, calculados via decomposição de limiares. Nesse método, uma imagem é decomposta utilizando vários limiares, cada um para um nível de intensidade particular da imagem, gerando uma imagem contendo componentes conectados. Pela análise da forma e tamanho dos componentes conectados, objetos de interesse podem ser extraídos. A identificação de um leucócito foi realizada pela minimização de um funcional de energia que incorporou o gradiente da imagem e a homogeneidade da intensidade da região da imagem delimitada pelo contorno fechado. Para rastrear os leucócitos em quadros subsequentes foram delineados contornos que minimizassem o funcional de energia. A implementação discreta da solução de minimização do contorno fechado foi realizada com o método de conjunto de níveis baseado em operadores de área, que podem remover componentes conectados menores que uma escala pré-determinada. O vídeo usado no trabalho foi obtido com taxa de amostragem de 25 quadros por segundo, matriz imagem de 640×480 pixels e resolução espacial de $4,94 \text{ pixels}/\mu\text{m}$ na direção vertical e $4,68 \text{ pixels}/\mu\text{m}$ na direção horizontal. Os resultados do método proposto foram comparados com os de um método baseado em uma medida de correlação. A avaliação foi realizada usando a média percentual do número de quadros rastreados com sucesso e a média dos valores de RMSE, obtidas de 25 quadros extraídos de 4 vídeos distintos. Nesse caso, um quadro foi considerado rastreado se o centro de uma célula, detectado pelo método proposto, se encontrava dentro do raio de uma célula manualmente marcada. Os valores de RMSE foram calculados usando as posições dos centros dos leucócitos automaticamente detectados e dos centros manualmente marcados. As médias do percentual de quadros rastreados, utilizando o método de conjuntos de níveis para os vídeos 1, 2, 3 e 4 foram 88%, 85%, 91% e 96%, respectivamente. Utilizando o método de correlação para os mesmos vídeos, os resultados obtidos foram, respectivamente, 71%, 68%, 81% e 72%. As médias dos valores de RMSE utilizando o método de conjunto de níveis para os vídeos 1, 2, 3 e 4 foram iguais a 6,2, 4,9, 7,5 e 3,2 e utilizando o método baseado em correlação foram iguais a 9,6, 14,9, 13,1 e 8,3, respectivamente. O método baseado em conjunto de níveis apresentou melhor desempenho que o método baseado em correlação, visto que, utilizando o método proposto, a média do percentual de quadros rastreados foi maior e o RMSE foi menor.

Dong, Ray e Acton (2005) propuseram um método de detecção de leucócitos que consiste em três estágios principais. No primeiro estágio, os leucócitos foram identificados como elipses pela técnica *ellipse matching*. Após os leucócitos serem identificados, foram computados n valores do coeficiente de variação de gradiente inverso (*Gradient Inverse Coefficient of Variation* - GICOV), que é uma medida de distribuição da intensidade do gradiente direcional, para n elipses encontradas pelo *ellipse matching*. Em seguida, valores de máximo local do GICOV, dentro de uma vizinhança circular, foram determinados e considerados como potenciais centros de leucócitos. No segundo estágio, empregou-se um contorno ativo *B-spline*, inicializado com as elipses determinadas no passo anterior, para melhor delinear os detalhes da borda do leucócito. No terceiro estágio, os contornos extraídos foram separados em duas classes: leucócitos e não-leucócitos. Para isso, utilizou-se um classificador Bayesiano para encontrar um limiar ótimo γ para o valor de GICOV. Dois limiares foram selecionados: $\gamma = 7,2$ para leucócitos escuros e $\gamma = -7,9$ para leucócitos brilhantes. Os experimentos foram realizados usando um conjunto de 30 imagens, obtidas de vênulas do músculo cremaster de um camundongo, contendo 327 leucócitos. Os centroides dos leucócitos foram manualmente marcados nas imagens por um especialista e usados como referência para a avaliação dos resultados. O método proposto foi comparado com as técnicas transformada de *Hough*, transformada *edge-radius-symmetry* (CHABAT et al., 2001) e método dos conjuntos de níveis (MUKHERJEE; RAY; ACTON, 2004) usando as taxas de verdadeiro positivo (razão entre o número de leucócitos corretamente detectados e o número de leucócitos detectados manualmente pelo especialista) e de falso positivo (razão entre o número de leucócitos erroneamente detectados e o número de leucócitos marcados pelo especialista). Os resultados indicaram que o método proposto alcançou a maior taxa de verdadeiro positivo (78,6%) com a menor de taxa de falso positivo (13,1%). Os mesmos pares de medidas (taxas de verdadeiro positivo; falso positivo) para os demais métodos comparados foram: (44,3%, 23,2%) para a transformada de *Hough*, (48,9%, 34,6%) para a transformada *edge-radius-symmetry* e (54,7%, 36,7%) para o método dos conjuntos de níveis.

Anders, Zhang e Yuan (2006) utilizaram duas abordagens para detectar os leucócitos. Inicialmente, leucócitos em movimento que rolam sob a parede do vaso sanguíneo, foram detectados utilizando um algoritmo baseado em aprendizagem probabilística, no qual foi estimada uma função densidade de probabilidade, baseada em níveis de cinza, para cada pixel i . Cada pixel foi considerado como pertencente à região de interesse se o valor de sua função densidade de probabilidade foi maior que um determinado limiar. Em seguida, espúrios gerados da classificação realizada no passo anterior foram removidos usando um filtro da mediana. Após a aplicação do filtro, um algoritmo de crescimento de regiões foi utilizado para extrair grupos de pixels conectados, os quais foram utilizados para o cálculo dos centroides de cada grupo. O rastreamento

de cada leucócito foi realizado observando-se a distância mínima do centroide do leucócito no quadro atual em relação a sua posição no quadro anterior. Se a distância entre os centroides for menor que um determinado limiar, o par de centroides foi considerado correspondente. Na segunda abordagem, foram detectados os leucócitos aderidos à parede do vaso sanguíneo. Para isso, foi aplicada uma técnica de limiarização adaptativa, na qual foi selecionado um limiar para cada quadro do vídeo. Os leucócitos, obtidos como resultado da aplicação da primeira abordagem, foram extraídos e aqueles que permaneceram na mesma posição por mais que 9 quadros no vídeo, foram considerados leucócitos firmemente aderidos. A MI, neste caso, foi realizada na microcirculação do cérebro de um rato. Os resultados dos experimentos realizados com a primeira abordagem apresentaram uma taxa de falso positivos igual a 1,6% e o valor da métrica revocação igual a 0,50. Os resultados dos experimentos realizados com a segunda abordagem, para detecção de leucócitos aderentes, apresentaram uma taxa de falso positivos igual a 0 e o valor da métrica revocação igual a 0,95.

O trabalho de Cui, Acton e Lin (2006) utilizou uma abordagem baseada no algoritmo Monte Carlo para o rastreamento de um único leucócito rolante. No rastreador usado, o “estado alvo” foi a posição do centro do leucócito. Uma detecção de borda radial foi realizada e vários segmentos de linha radiais foram construídos a partir das coordenadas do centro do leucócito. Um operador de detecção de borda unidirecional foi aplicado em cada segmento de linha. A taxa de detecção obtida foi de 80%. As imagens de vídeo usadas possuíam matriz imagem de 320×240 pixels, resolução espacial de 2,47 pixels/ μm horizontalmente e 2,34 pixels/ μm verticalmente e resolução temporal de 30 quadros por segundo. Os experimentos foram realizados em 99 sequências de imagens e os quatro rastreadores foram avaliados de acordo com quatro medidas, a saber: 1) percentual de quadros rastreados; 2) RMSE; 3) último quadro rastreado; 4) 100% dos quadros rastreados, no caso em que todos os quadros da sequência foram rastreados. O desempenho do rastreador proposto foi comparado com um método baseado em centroide, um baseado em correlação e outro baseado em contorno ativo com GVF (RAY; ACTON; LEY, 2002). O rastreador Monte Carlo mostrou-se superior aos outros métodos em termos de: menor RMSE, maior porcentagem de quadros rastreados, maior número de sequências com o último quadro rastreado e, além disso, uma porcentagem de 100% dos quadros foram rastreados.

Dong e Acton (2007) propuseram uma abordagem para detectar leucócitos baseada no modelo de processos de pontos marcados (*Marked Point Process* - MPP). A abordagem é dividida em três etapas. Na primeira etapa, o método de detecção proposto em (DONG; RAY; ACTON, 2005) foi utilizado para obter uma primeira estimativa das possíveis localizações dos leucócitos. Na segunda etapa, um modelo representando um leucócito foi desenvolvido e os parâmetros deste modelo foram estimados a partir de um conjunto de 30 imagens contendo os centroides

dos leucócitos marcados manualmente. O modelo do leucócito foi então utilizado pelo modelo MPP para a identificação de leucócitos. Na terceira etapa o modelo MPP foi integrado a um *framework* Bayesiano. Nesse trabalho, foram utilizadas sequências de imagens de MI do músculo cremaster de camundongos com 256 níveis de cinza, matriz imagem de 640×480 pixels e amostragem de 25 quadros por segundo. O conjunto de teste consistiu-se de quatro vídeos compostos por 91 quadros cada. Os quadros capturados foram alinhados utilizando um método baseado em correlação. Se a distância entre dois leucócitos (um detectado automaticamente e outro anotado manualmente na imagem) foi menor que um limiar pré-definido, o leucócito foi considerado como corretamente detectado. Os leucócitos foram detectados em quatro sequências de vídeo distintas e para analisar o desempenho do detector proposto foram calculadas as médias das taxas de verdadeiro positivo (TP) (média = 84,19%), falso positivo (FP) (média = 11,69%), além das medidas de especificidade (média = 85,15%), valor preditivo positivo (média = 87,81%) e valor preditivo negativo (média = 80,92%). Os resultados do método proposto foram também comparados com resultados da detecção visual. A comparação foi feita via coeficiente de correlação de Pearson, que indica a concordância entre a detecção automática e visual. O valor obtido para esse coeficiente foi de 0,973, o que pode indicar uma forte concordância entre a detecção automática e visual. Para avaliar o desempenho do método proposto, realizou-se uma comparação com o método dos conjuntos de níveis e a transformada *edge-radius-symmetry*. O método proposto apresentou uma taxa de TP igual a 84,19% e taxa de FP de 11,69%, enquanto que para os demais métodos os pares de resultados obtidos (TP, FP) foram 54,78% e 31,05%, para o método dos conjuntos de níveis, e 64,27% e 22,02%, para a transformada *edge-radius-symmetry*.

No trabalho de Nguyen et al. (2011) foi apresentado um método para rastrear automaticamente múltiplos leucócitos que colidem uns com os outros. Para isso, foram criados estados de colisão, sendo que, para cada estado foi realizada a modelagem da aparência e do movimento do leucócito e, além disso, foram realizados testes de hipótese de colisão de possíveis transições entre os estados. Assim, o método proposto minimiza as falhas de rastreamento quando há colisão. No caso desse trabalho, a detecção dos leucócitos foi realizada da seguinte maneira. Foi utilizado o classificador AdaBoost binário para aprender a aparência de pixels pertencentes a leucócitos e aqueles pertencentes ao fundo da imagem. Para o treinamento, um conjunto de características, obtido para regiões com e sem a presença de leucócitos, foi extraído das imagens. Para cada região extraída, as seguintes características foram calculadas: 1) intensidade média; 2) desvio padrão de intensidade e 3) média radial normalizada. Para treinar o classificador, foram selecionados um conjunto de 100 amostras de leucócitos e 100 amostras de fundo. Essas amostras foram igualmente divididas em conjuntos de treinamento e validação e cada pi-

xel foi classificado como leucócito ou fundo da imagem. Para avaliar a precisão do método de detecção, foram marcadas manualmente a posição de 6049 leucócitos obtidos de 8 sequências de imagens de MI de vênulas do fígado de um camundongo. Nesse trabalho, uma célula foi considerada como detectada se a distância entre o seu centro e o centro de uma célula marcada manualmente foi menor que o raio de um leucócito. O método foi avaliado usando as métricas de Revocação e Precisão. Os valores de Revocação e Precisão obtidos da avaliação do método foram iguais a 80% e 73%, respectivamente.

3.2 Discussão

Na Tabela 3.1 é apresentado um resumo dos trabalhos propostos na literatura relacionando a abordagem e as métricas de avaliação empregadas, o número (N) de leucócitos detectados/rastreados (apenas um leucócito (U) ou múltiplos (M)) e o tipo de detecção realizada (automática (A) ou semiautomática (SA)). De acordo com esse resumo, observa-se que a maioria dos trabalhos propostos utilizam técnicas de aprendizado supervisionado e contornos ativos. Embora os trabalhos relatem um desempenho satisfatório na detecção dos leucócitos, algumas observações podem ser feitas a respeito de suas abordagens. Por exemplo, as abordagens baseadas em aprendizado supervisionado têm a desvantagem de precisar de treinamento prévio para serem utilizadas (Petersen et al., 2000; Nguyen et al., 2011; Dong et al., 2005; Dong et al., 2007). Já as abordagens que utilizam gradiente e informações de intensidade da imagem podem ser significativamente afetadas pela variação de contraste dos leucócitos (efeito *Photo-bleaching*). Exemplos de tais abordagens são os trabalhos de Ray, Acton e Ley (2002) e Ray e Acton (2004), que utilizam o gradiente da imagem para mover e ajustar contornos ativos aos leucócitos, o trabalho de Mukherjee, Ray e Acton (2004), que usa o gradiente da imagem para realizar a minimização de um funcional de energia e o trabalho de Anders, Zhang e Yuan (2006), que utiliza características de intensidade da imagem para extrair leucócitos em movimento via modelo probabilístico. Cabe ainda ressaltar que, nos trabalhos de Ray, Acton e Ley (2002) e Cui, Acton e Lin (2006), o centroide do leucócito foi marcado manualmente por um usuário para o início do rastreamento, o que as tornam abordagens semiautomáticas. Além dos trabalhos propostos na literatura, na Tabela 3.1 também são sumarizadas as principais características da técnica proposta neste trabalho.

Tabela 3.1: Resumo dos trabalhos propostos pela literatura relacionando em ordem cronológica o nome dos autores, a abordagem, as métricas de avaliação empregadas, o número (N^o) de leucócitos detectados/rastreados (apenas um (U) ou múltiplos (M)) e o tipo de detecção realizada: automática (A) ou semiautomática (S). Na última linha é relacionada a técnica proposta neste trabalho.

Autores	Abordagem	Avaliação	N^o/Tipo
Petersen <i>et al.</i> (2000)	RNAs	AUC (ROC)	M/A
Ray <i>et al.</i> (2002)	Contorno ativo GVF	RMSE / Percentual de quadros rastreados	U/SA
Ray <i>et al.</i> (2004)	Contorno ativo MGVF	RMSE	U/A
Mukherjee <i>et al.</i> (2004)	Conjuntos de níveis	RMSE / Percentual de quadros rastreados	M/A
Dong <i>et al.</i> (2005)	<i>Ellipse Matching</i> / Contorno ativo / Classificador Bayesiano	Taxa de TP e FP	M/A
Anders <i>et al.</i> (2006)	Aprendizado probabilístico <i>Threshold</i> adaptativo	Taxa de FP Revocação	M/A
Cui <i>et al.</i> (2006)	Algoritmo Monte Carlo	RMSE Percentual de quadros rastreados	U/SA
Dong <i>et al.</i> (2007)	Processos de Pontos Marcados	Taxa de TP e FP	M/A
Nguyen <i>et al.</i> (2011)	Aprendizado Supervisionado	Precisão Revocação	M/A
Método Proposto	Medida de <i>blobness</i>	Medida-F1/Área sob a curva Precisão-Revocação	M/A

3.3 Considerações finais

O desenvolvimento de técnicas automáticas para a detecção de leucócitos em imagens de MI continua sendo um grande desafio devido a fatores como ruído, artefatos de movimento e variação de contraste dos leucócitos nas imagens. A partir do estudo bibliográfico realizado, constatou-se que a maioria dos trabalhos propostos na literatura não se atentam e nem discutem a degradação das imagens causada por tal efeito, o que pode interferir diretamente no desempenho dos detectores propostos. Diante disso, percebe-se a importância da utilização de uma técnica que seja invariante ao contraste e iluminação dos leucócitos, e por isso, menos suscetível

ao impacto do efeito de *Photobleaching*. Portanto, neste trabalho de mestrado foi utilizada a medida de Congruência de Fase desenvolvida por Kovesi (1996), que é invariante ao contraste e iluminação em imagens, para o desenvolvimento de uma medida de *blobness* para o realce de estruturas circulares, potencialmente representando os leucócitos.

Capítulo 4

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são descritas as características das imagens de vídeo utilizadas neste trabalho e os procedimentos de MI que foram realizados para obtê-las. É apresentado o pipeline de processamento realizado e são descritos os detalhes das técnicas utilizadas em cada etapa de processamento, da técnica de casamento de padrões, das métricas de avaliação e dos experimentos que foram realizados para a definição dos parâmetros das técnicas utilizadas.

4.1 Imagens de vídeo e procedimentos de Microscopia Intra-vital

O vídeo de MI utilizado neste trabalho foi obtido pela técnica de MI realizada no Núcleo de Neurociências da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob a coordenação da Profa. Dra. Juliana Carvalho Tavares. Tal técnica foi realizada na microvasculatura do cérebro de um camundongo utilizando o microscópio *Zeiss Imager M.2* (Thornwood, NY) com objetiva 20XLD. As características de aquisição das imagens do vídeo, que possui 220 quadros, são: resolução espacial de 1,89 pixels/ μm , matriz imagem de 420×592 pixels, 8 bits de quantização e taxa de amostragem de 16 quadros por segundo.

Para a obtenção do vídeo, um camundongo foi anestesiado usando uma mistura de xilazina (10 mg/kg, Rompun, Bayer) e Ketamina S+ (200 mg/Kg, Laboratório Cristália, SP) injetada por via intraperitoneal. A veia da cauda foi canulada para administração de Rodamina 6G, reagentes experimentais e volumes adicionais de anestésico, quando necessário. A temperatura corporal do animal foi continuamente monitorada com um sensor introduzido no reto e mantida aproximadamente constante a 37 °C, com a ajuda de uma manta térmica (*Fine Science Tools*, FST, Vancouver, Canadá) colocada em contato com o corpo do animal. Uma craniotomia foi

realizada na região parietal utilizando uma minibroca (FST). A dura-máter foi removida e os vasos sanguíneos da pia-máter foram visualizados permitindo o imageamento dos mesmos.

Como exemplo, um quadro do vídeo obtido pelos procedimentos de MI, mencionados no parágrafo anterior, e utilizado nesta pesquisa é ilustrado na Figura 4.1.

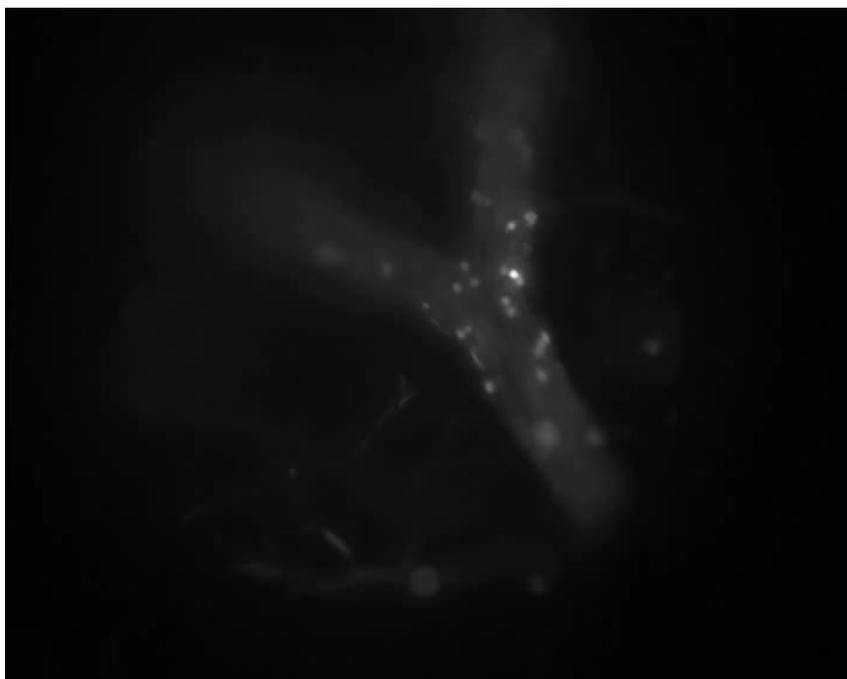


Figura 4.1: Exemplo de um quadro do vídeo de MI utilizado neste trabalho (obtido do cérebro de um camundongo).

4.2 Pipeline de processamento

Na Figura 4.2 são apresentadas as etapas de processamento realizadas neste trabalho. Conforme indicado nessa figura, primeiro foi realizada uma etapa de pré-processamento, a fim de eliminar os problemas relacionados à aquisição das imagens de vídeo de MI. Em seguida, a detecção dos leucócitos foi realizada em dois estágios. No estágio 1, as estruturas circulares foram detectadas em cada quadro do vídeo utilizando uma medida de *blobness* e aplicando um algoritmo de busca por máximos locais nas imagens resultantes do cálculo dessa medida. No estágio 2, foi realizada uma estratégia para eliminar células erroneamente detectadas no estágio 1 (sinais falsos positivos), a fim de identificar apenas as estruturas circulares correspondentes aos leucócitos reais. Para isso, primeiro foi realizada a limiarização de cada estrutura pelo método de Otsu. Em seguida, foi calculada a medida de circularidade de cada objeto binário e aplicado um limiar em tal medida para a detecção dos leucócitos. Nas próximas seções são descritos os detalhes das técnicas utilizadas na etapa de pré-processamento e nos dois estágios

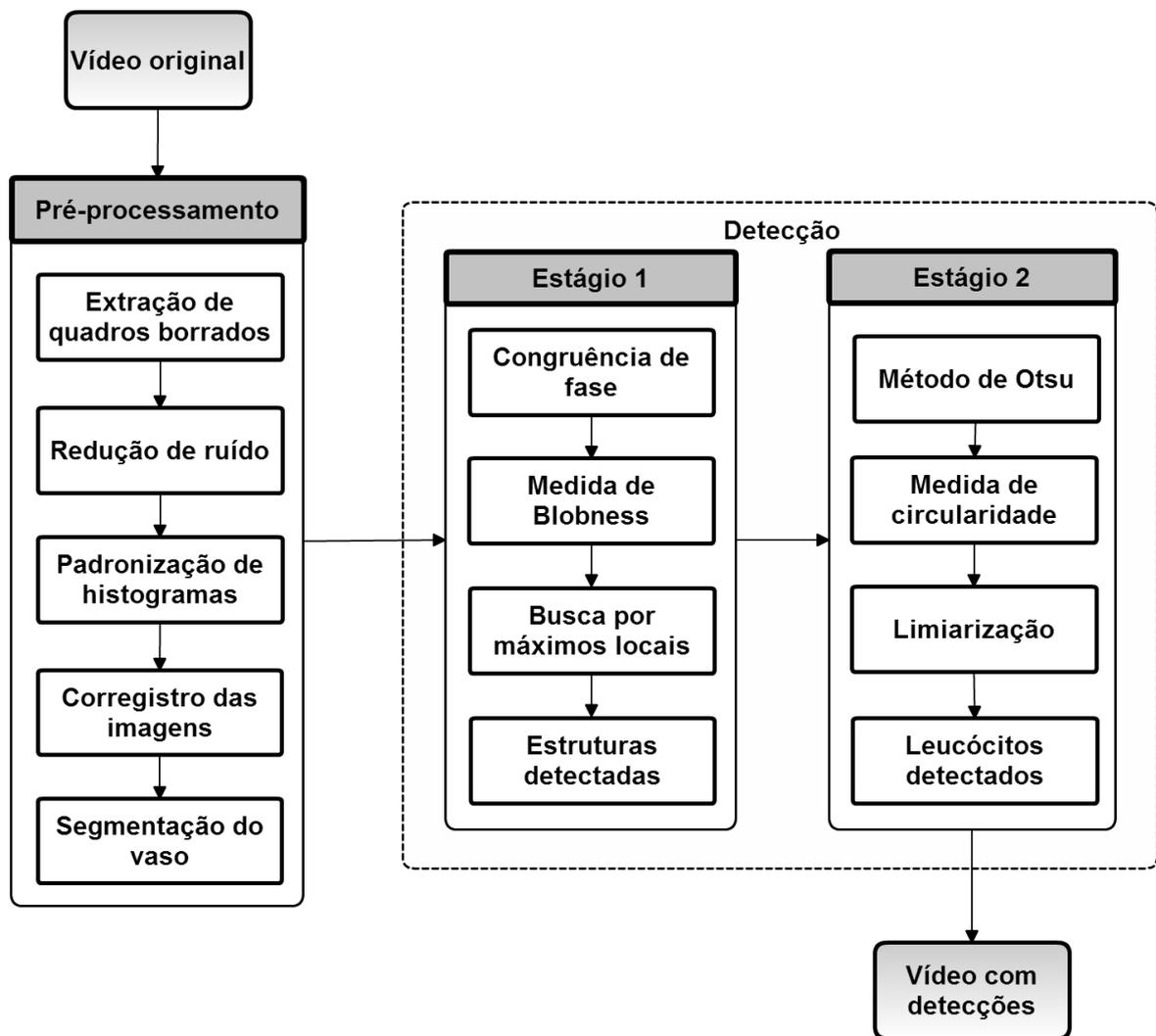


Figura 4.2: Pipeline de processamento realizado.

de detecção.

4.3 Etapa de pré-processamento

A etapa de pré-processamento das imagens de MI tem como principal objetivo eliminar problemas decorrentes do processo de aquisição das imagens e, assim, potencializar o sucesso da técnica de detecção dos leucócitos. Nessa etapa, primeiramente, os quadros do vídeo com borramento excessivo (devido ao movimento do animal) foram detectados e removidos. Em seguida, foram aplicadas técnicas para a remoção de ruído, a padronização dos histogramas de quadros consecutivos do vídeo e o correção das imagens. Por fim, foi realizada a segmentação da região do vaso sanguíneo para evitar processamentos desnecessários do vídeo e, principalmente, minimizar o número de células detectadas fora da região de interesse. Nas próximas seções são descritos os detalhes das técnicas utilizadas nessa etapa.

4.3.1 Detecção e remoção de quadros com borramento excessivo

Um dos desafios relacionados ao desenvolvimento de um esquema computacional automático para a detecção e rastreamento de células em imagens de MI é a determinação dos quadros de vídeo que foram significativamente afetados pelos movimentos cardíacos e respiratórios do animal e que precisam ser restaurados ou removidos antes do processamento de detecção dos leucócitos. A possibilidade de remoção dos quadros significativamente degradados depende da taxa de amostragem usada na aquisição das imagens. De qualquer maneira, a detecção automática dos quadros degradados é uma tarefa importante e necessária. Uma solução para esse problema foi proposta por Ferrari et al. (2015) e foi utilizada como primeiro estágio da etapa de pré-processamento. O método proposto utiliza estatísticas direcionais de mapas locais de energia obtidos pela convolução de cada quadro do vídeo com um banco de filtros de log-Gabor, especialmente projetados para a detecção de borramento de movimento. O banco de filtros foi construído a partir de 3 escalas e 6 orientações. A máxima resposta dos filtros, obtida para cada posição espacial da imagem numa dada orientação e ao longo das diferentes escalas, foi utilizada para gerar uma distribuição angular das respostas. A partir dessa distribuição, um conjunto de estatísticas direcionais foi extraído e analisado para determinar se o movimento presente na imagem era excessivo ou não. A hipótese do trabalho é que o borramento por movimento introduz mudanças locais na textura da imagem, inserindo grande quantidade de informação direcional nas bandas espectrais que não são nem tão altas e nem tão baixas, que podem ser observadas analisando-se as estatísticas direcionais das respostas dos filtros. Neste trabalho, os quadros contendo movimento excessivo (detectados pelo método proposto em Ferrari et al. (2015)) foram removidos da sequência de imagens.

4.3.2 Redução de ruído

O filtro Bilateral (TOMASI; MANDUCHI, 1998) foi utilizado neste trabalho para a redução de ruído das imagens de vídeo. Tal filtro é um método local, não iterativo e muito similar a um filtro Gaussiano, com a diferença que, no processo de filtragem de um determinado pixel da imagem, o filtro Bilateral utiliza, além da ponderação de localização espacial, uma ponderação baseada na diferença de intensidade do pixel com os demais de sua vizinhança. Assim, pixels vizinhos com grande diferença de intensidade do pixel central são ponderados com menos influência, mesmo estando próximos espacialmente (ZHANG; GUNTURK, 2008). Isso faz com que o filtro possua a propriedade de preservar bordas enquanto o realiza o borramento da imagem. A imagem resultante da aplicação do filtro Bilateral é calculada como

$$I^{filtrada}(\mathbf{s}) = \frac{1}{C} \sum_{i \in N} \exp \left\{ \frac{-\|\mathbf{s}_i - \mathbf{s}\|^2}{2\sigma_s^2} \right\} \times \exp \left\{ \frac{-|I^{original}(\mathbf{s}_i) - I^{original}(\mathbf{s})|^2}{2\sigma_I^2} \right\} \times I^{original}(\mathbf{s}_i), \quad (4.1)$$

onde, \mathbf{s} representa as coordenadas espaciais (x, y) do pixel a ser filtrado, \mathbf{s}_i são as coordenadas dos pixels dentro de uma janela de tamanho $N \times N$ centrada em \mathbf{s} . Os parâmetros σ_s e σ_I controlam a ponderação aplicada a cada um dos componentes do filtro (ponderação espacial e de intensidade). O valor C é uma constante de normalização, definida como

$$C = \sum_{i \in N} \exp \left\{ \frac{-\|\mathbf{s}_i - \mathbf{s}\|^2}{2\sigma_s^2} \right\} \times \exp \left\{ \frac{-|I^{original}(\mathbf{s}_i) - I^{original}(\mathbf{s})|^2}{2\sigma_I^2} \right\}. \quad (4.2)$$

4.3.3 Padronização de histogramas

Para minimizar o problema de redução de contraste causada pelo efeito de *Photobleaching* e, conseqüentemente, melhorar o desempenho dos métodos de correção que foram utilizados na estabilização do vídeo, uma técnica de correspondência de histogramas (NYÚL; UDUPA; ZHANG, 2000) foi aplicada para cada par de quadros consecutivos do vídeo. A ideia principal é normalizar os valores dos níveis de cinza das imagens por meio de seus histogramas. A técnica é originalmente baseada em um processo de treinamento que realiza, para cada histograma de uma imagem I_j , com valores de intensidade em $[s_{1,j}, s_{2,j}]$, o mapeamento linear para uma faixa de valores desejada (pré-estabelecida pelo usuário) $[s_1, s_2]$, seguido pela estimação de um conjunto de pontos de referência $\{q_{k,j} \mid i \leq k \leq l\}$ nesse histograma mapeado. O algoritmo produz como resultado um conjunto de pontos de referência médios $\{\bar{q}_{k,j} \mid i \leq k \leq l\}$. Assim, quando uma nova imagem de entrada I precisa ter seu histograma (com faixa de valores $[r_1, r_2]$) mapeado para o padrão estimado da imagem de referência do par, seus pontos de referência $\{q_k\}$ são obtidos e é feita uma sucessão de mapeamentos lineares envolvendo os intervalos que separam os pontos de referência correspondentes em $\{q_k\}$ e $\{\bar{q}_k\}$, isto é, mapeamentos de $[q_k, q_{k+1}]$ a $[\bar{q}_k, \bar{q}_{k+1}]$ para todo o $k = 1 \dots l - 1$, e também de $[r_1, q_1]$ a $[s_1, \bar{q}_1]$ e $[q_l, r_2]$ a $[\bar{q}_l, s_2]$.

4.3.4 Estabilização do vídeo de Microscopia Intravital

Embora as imagens de MI sejam obtidas de um animal anestesiado, os movimentos causados pela respiração e batimentos cardíacos do animal, podem mudar o plano focal do microscópio e ocasionar efeitos de borramento e distorções nas imagens. Esse fato pode comprometer significativamente tanto a análise visual, realizada por um observador, quanto a análise automática.

tica do vídeo de MI (RAY; ACTON, 2004), tornando necessária a sua estabilização. Algumas técnicas de processamento de imagens têm sido desenvolvidas a fim de corrigir borramentos e distorções nas imagens de MI (DUNN; HIGGINS, 1995; LEE et al., 2014). Além disso, componentes mecânicos empregados para estabilizar o animal de teste também foram propostos na literatura (VINEGONI et al., 2012). Contudo, tais componentes possuem a desvantagem de interferir no recrutamento leucocitário devido às forças aplicadas à estabilização do animal.

Neste trabalho, o método de Silva et al. (2014), que é baseado em técnicas de correção de imagens, foi utilizado para a estabilização do vídeo. Tal método, que mapeia os pixels de uma imagem móvel $M(x)$ para os pixels de uma imagem fixa $F(x)$, é aplicado a cada par de quadros consecutivos do vídeo e inicia-se pelo alinhamento dos centros de massa das imagens de entrada ($M(x)$ e $F(x)$ - par de quadros consecutivos). Após o alinhamento inicial, uma transformação afim (MATTE et al., 2001) é aplicada para alinhar (ainda de maneira grosseira) os quadros do vídeo. A seguir, a transformação deformável *demons* simétrica (THIRION, 1998) é aplicada para refinar o alinhamento dos quadros, resultantes da transformação afim. Os parâmetros das transformações foram obtidos da maximização da informação mútua (métrica de similaridade) (VIOLA; WELLS, 1997) usando um otimizador baseado no método de gradiente descendente.

4.3.5 Segmentação do vaso sanguíneo

Com o objetivo de diminuir o tempo de processamento do vídeo e, principalmente, minimizar o número de falso positivos, o método proposto em Sato et al. (1997) foi utilizado para a segmentação da região do vaso sanguíneo nos quadros estabilizados do vídeo. Esse método, que calcula a variância temporal de cada pixel ao longo dos quadros, leva em consideração o fato de que a variância dos níveis de cinza tende a ser maior na região do vaso sanguíneo (onde os leucócitos e outras células estão se locomovendo) e menor nas demais regiões. Assim, calcula-se uma imagem de variância temporal $S(x, y)$ definida por

$$S(x, y) = \frac{1}{n-1} \sum_{t=1}^n (I_t(x, y) - \bar{I}(x, y))^2, \quad (4.3)$$

em que, $I_t(x, y)$ é o t -ésimo quadro da sequência de n quadros do vídeo, e $\bar{I}(x, y)$ é a média temporal dos quadros, calculada como

$$\bar{I}(x, y) = \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n I_t(x, y).$$

Após a determinação da imagem de variância temporal $S(x,y)$, um borramento Gaussiano, usando um núcleo de borramento de 9×9 pixels, é aplicado sobre a mesma para a remoção de ruído. A seguir, a imagem é binarizada usando como limiar o valor médio dos níveis de cinza da imagem. Uma operação morfológica de abertura, usando um elemento estruturante na forma elíptica e de tamanho 15×15 , é aplicada para eliminar pequenas vênulas da imagem. Finalmente, a máscara binária (representando a região do vaso sanguíneo - Figura 4.3) é selecionada como a estrutura de maior área.



Figura 4.3: Máscara binária representando a região efetiva do vaso sanguíneo.

4.4 Técnicas utilizadas no estágio de detecção 1

A medida de Congruência de Fase (*Phase Congruency* - PC) desenvolvida por Kovess (1996) tem a importante propriedade de ser robusta a variações de iluminação e contraste nas imagens. Sendo assim, neste trabalho ela foi utilizada como base para o desenvolvimento de uma medida de realce de estruturas circulares nas imagens de MI. Tal medida, denominada medida de *blobness*, foi calculada utilizando os autovalores da matriz de momentos de PC.

Como a medida de PC utiliza filtros log-Gabor 2D para obter informações locais de frequência do sinal, em particular informação de fase, nas próximas seções são descritos os detalhes sobre filtros de Gabor 2D e log-Gabor 2D. Além disso, também é descrita a teoria sobre a medida de PC 1D e 2D, sobre a matriz de momentos de PC e sobre a medida de *blobness*. Por fim, também é descrita a técnica casamento de padrões, que foi utilizada neste trabalho como forma de comparação com o método proposto.

4.4.1 Filtros de Gabor 2D

Um filtro de Gabor 2D $h(x,y)$, no domínio espacial, é definido pelo produto entre uma senoide complexa e uma função Gaussiana bidimensional (MOVELLAN, 2002; DUNN; HIGGINS, 1995) como

$$h(x,y) = \frac{1}{2\pi\sigma_x\sigma_y} \exp \left\{ -\frac{1}{2} \left[\frac{x^2}{\sigma_x^2} + \frac{y^2}{\sigma_y^2} \right] \right\} \exp \{j2\pi f_0 x\}, \quad (4.4)$$

em que, σ_x e σ_y são os desvios padrões da Gaussiana e $\exp \{j2\pi f_0 x\}$ é uma senoide complexa que, usando a fórmula de Euler, pode ser decomposta nas partes real (cosseno) e imaginária (seno). O parâmetro f_0 , neste caso, representa a frequência da senoide (CLAUSI; JERNIGAN, 2000).

A construção de um banco (ou família) de filtros de Gabor consiste em um conjunto de filtros criados a partir da combinação de diferentes escalas e orientações (KRISHAN, 2009). A convolução dos filtros com uma determinada imagem permite estudar o conteúdo de frequências da imagem. Por serem altamente eficientes no processo de análise local de energia de um sinal, os filtros de Gabor têm sido utilizados com muito sucesso em análises de textura (GRIGORESCU; PETKOV; KRUIZINGA, 2002; STOITSIS et al., 2009; LI et al., 2010) e de elementos direcionais (LEE; WANG, 1999; ZHANG et al., 2014; FERRARI et al., 2015) em imagens. A principal razão para a eficiência desses filtros é a capacidade que eles apresentam de caracterização de um sinal, simultaneamente, nos domínios espacial (2D) e da frequência. Embora eficientes, filtros de Gabor possuem uma largura de banda limitada e um componente DC diferente de zero. Isso ocorre pois, quando o desvio padrão da Gaussiana que controla a largura de banda da função de transferência de um dado filtro, se torna maior do que um terço do seu centro de frequência (f_0), uma de suas “caudas” começa a sobrepor excessivamente a origem, o que leva a um componente DC diferente de zero (KOVESI, 1996).

4.4.2 Filtros de log-Gabor 2D

Uma alternativa para contornar as limitações dos filtros de Gabor, mencionadas no final do Seção 4.4.1, é utilizar filtros log-Gabor, propostos por Field (1987). Da mesma maneira que filtros de Gabor, filtros log-Gabor permitem a obtenção de informações locais de frequência de um sinal, mas com a vantagem de possuírem componente DC nulo e, portanto, permitirem a construção de filtros com largura de banda arbitrária (KOVESI, 1996).

Por não possuírem uma forma analítica no domínio espacial, o banco de filtros de log-

Gabor 2D é projetado no domínio da frequência e as funções de transferência dos filtros que o compõem são calculadas como (KOVESI, 2003):

$$G(\omega, \theta)_{|\omega_s, \theta_n, \sigma_\beta} = \exp \left\{ -0.5 \left[\frac{\log^2 \left(\frac{\omega}{\omega_s} \right)}{\log^2 (\sigma_\beta)} \right] \right\} \times \left[\frac{\cos(d\theta) + 1}{2} \right], \quad (4.5)$$

com

$$d\theta = \min \left(\left| \arctan(\sin(\theta - \theta_n), \cos(\theta - \theta_n)) \right| \times \frac{N}{2}, \pi \right). \quad (4.6)$$

O termo exponencial na Equação (4.5) corresponde a parte radial do filtro e o outro termo é o componente angular do filtro. A função de espalhamento $\cos(d\theta)$ do componente angular varia entre $-\pi$ e π e, portanto, a adição do valor 1 seguida da divisão do resultado por 2 faz com que esse componente retorne valores no intervalo entre 0 e 1. Os parâmetros ω_s , θ_n , σ_β representam, respectivamente, o centro de frequência radial, o ângulo de orientação e a largura de banda radial. N é o número de orientações dos filtros.

Na prática, o processo de filtragem de uma imagem usando o banco de filtros log-Gabor 2D é realizado no domínio da frequência. Para realizar este processo, primeiro a imagem é transformada do domínio espacial para o da frequência usando a transformada rápida de Fourier (GONZALEZ; WOODS, 2002). Em seguida, a função de transferência de cada filtro (Equação 4.5) é multiplicada pela imagem no domínio da frequência e, depois de transformar o resultado da multiplicação (da imagem pelo filtro) para o domínio espacial (usando a transformada rápida de Fourier inversa), os componentes real e imaginário resultantes são utilizados no cálculo dos componentes locais de magnitude e fase da imagem.

4.4.3 Congruência de Fase

Métodos de detecção de bordas, linhas e cantos que são baseados em gradiente, tais como os desenvolvidos por Sobel (GONZALEZ; WOODS, 2002), Marr e Hildreth (MARR; HILDRETH, 1980) e Canny (CANNY, 1986), são sensíveis a variações de iluminação das imagens. O modelo de percepção de características de um sinal (chamado de Modelo de Energia Local) desenvolvido por Morrone e Owens (1987) supõe que características visuais importantes (bordas, linhas e cantos) são percebidas em posições de uma imagem onde os componentes harmônicos de Fourier estão todos em fase.

4.4.3.1 Congruência de fase 1D

Por meio da análise visual de construções de séries de Fourier de um sinal é possível identificar pontos de máxima congruência de fase. Na Figura 4.4 são ilustrados alguns componentes harmônicos da série de Fourier de ondas quadrada e triangular, representados por linhas tracejadas, e o somatório desses componentes, representado pela linha contínua. Observa-se que, para a onda quadrada, todos os componentes harmônicos senoidais da série se encontram maximamente em fase no ponto da subida (ou descida) do degrau em um ângulo de 0° ou 180° . Em todos os demais pontos da onda quadrada, os valores individuais das fases se diferenciam, resultando em uma congruência de fase muito baixa. De modo similar, ao analisar a onda triangular, é possível notar que a congruência de fase é máxima no pico e nos vales da forma de onda, nos ângulos de 90° ou 270° , respectivamente (KOVESI, 2000).

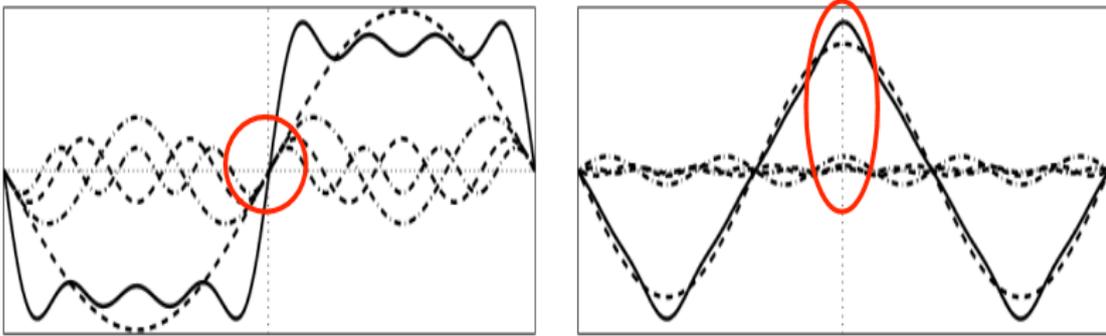


Figura 4.4: Pontos de máxima congruência de fase (destacados em vermelho) de componentes harmônicos da série de Fourier para ondas quadrada e triangular (Extraído de Kovesi (2000)).

Morrone e Owens (1987) definiram a função de Congruência de Fase (*Phase Congruency - PC*) 1D em termos da expansão de séries de Fourier de um sinal, para uma dada localização x , como

$$PC(x) = \max_{\bar{\phi}(x) \in [0, 2\pi]} \frac{\sum_n A_n \cos(\phi_n(x) - \bar{\phi}(x))}{\sum_n A_n}, \quad (4.7)$$

em que, A_n representa a amplitude do n -ésimo componente harmônico de Fourier, $\phi_n(x)$ representa o ângulo de fase local do componente de A_n na posição x . O valor de $\bar{\phi}(x)$ que maximiza esta equação é a amplitude média ponderada do ângulo de fase para todos os termos de Fourier na posição sendo considerada e n é o número de componentes da série. Claramente, o valor de congruência de fase, calculado pela Equação 4.7 encontra-se no intervalo entre 0 e 1, com o seu máximo valor ocorrendo quando todos os componentes de fase da série ($\phi_n(x)$) encontram-se na mesma orientação do ângulo médio ($\bar{\phi}(x)$).

Como pode ser observado, o cálculo da PC usando a Equação 4.7 é um tanto complicado devido ao fato do uso da série de Fourier. Venkatesh e Owens (1989) mostraram que a PC

é diretamente proporcional a energia local do sinal e , portanto, pode ser obtida pela busca de picos na função de energia local ($E(x)$), definida, para um perfil de luminância unidimensional, como

$$E(x) = \sqrt{F^2(x) + H^2(x)}, \quad (4.8)$$

em que, $F(x)$ é o sinal com seu componente DC (média das frequências) removido e $H(x)$ é a transformada de Hilbert de $F(x)$. Os componentes $F(x)$ e $H(x)$ podem ser aproximados pela convolução do sinal com um par de filtros em quadratura. Assim, pela definição de Venkatesh e Owens (1989), a PC é calculada como

$$PC(x) = \frac{|E(x)|}{\sum_n A_n}. \quad (4.9)$$

Kovesi (1996) apontou alguns problemas relacionados à função de PC proposta por Morone e Owens (1987) e implementada via modelo de energia local por Venkatesh e Owens (1989). Tais problemas são: (a) pobre localização das características, (b) alta sensibilidade ao ruído e (c) cálculo instável da medida PC, no caso das amplitudes de Fourier serem muito baixas.

Com o objetivo de contornar os problemas citados acima, Kovesi (1996) formulou uma nova medida de PC 1D que utiliza filtros log-Gabor para obter informações locais de frequência de um sinal em um dado ponto.

Ao tomar I como um sinal e M_n^e e M_n^o como filtros simétricos par (cosseno) e ímpar (seno), respectivamente, em uma dada escala n , pode-se considerar o par de respostas dos filtros (calculadas pela convolução de um sinal I com os filtros) como um vetor

$$[e_n(x), o_n(x)] = [I(x) * M_n^e, I(x) * M_n^o]. \quad (4.10)$$

A amplitude do resultado da convolução, para a escala n , é então definida por

$$A_n(x) = \sqrt{e_n(x)^2 + o_n(x)^2} \quad (4.11)$$

e a fase é dada por

$$\phi_n(x) = \arctan(e_n(x), o_n(x)). \quad (4.12)$$

Em cada ponto x do sinal haverá um conjunto de vetores resposta que corresponderá a cada escala do filtro.

No caso do modelo de Venkatesh e Owens (1989), as estimativas de $F(x)$ e $H(x)$ podem ser

obtidas pelo somatório das convoluções dos filtros pares e ímpares com o sinal, respectivamente, tais como

$$F(x) \simeq \sum_n e_n(x) \quad (4.13)$$

e

$$H(x) \simeq \sum_n o_n(x) \quad (4.14)$$

e o somatório das amplitudes pode ser estimado por

$$\sum_n A_n(x) \simeq \sum_n \sqrt{e_n(x)^2 + o_n(x)^2}. \quad (4.15)$$

A partir das equações acima, Kovési (1996) definiu a congruência de fase como:

$$PC(x) = \frac{\sqrt{F(x)^2 + H(x)^2}}{\sum_n A_n(x) + \varepsilon},$$

em que, a adição da constante ε (de valor muito pequeno) é utilizada para evitar divisão por zero.

4.4.3.2 Congruência de fase 2D

Kovési (1996) estendeu para sinais 2D (imagem bidimensional) a medida de PC inicialmente elaborada para sinais 1D, com foco na solução dos problemas relacionados ao modelo de PC de Morrone e Owens (1987). Nesse modelo, a análise de uma imagem 2D é realizada analisando-se as respostas dos filtros log-Gabor em várias escalas e orientações. A medida de PC 2D é definida como:

$$PC_{2D}(\mathbf{s}) = \frac{\sum_{n,o} W_{n,o}(\mathbf{s}) [A_{n,o}(\mathbf{s}) \Delta \Phi_{n,o}(\mathbf{s}) - T_o]}{\sum_{n,o} A_{n,o}(\mathbf{s}) + \varepsilon}, \quad (4.16)$$

em que, \mathbf{s} indica a localização espacial (x, y) , $A_{n,o}$ é a amplitude da imagem filtrada pelo filtro log-Gabor 2D de escala n e orientação o . O símbolo $[\cdot]$ indica que a quantidade contida dentro dos delimitadores é igual a ela mesma se o valor for positivo ou zero se o valor for negativo e ε é uma constante positiva pequena para evitar que a função se torne instável, caso a soma dos valores $A_{n,o}$ seja próxima de zero. O termo $W_o(\mathbf{s})$ é um fator de ponderação de propagação de frequências, definido como:

$$W_o(\mathbf{s}) = \frac{1}{1 + \left\{ \gamma \left[c - \frac{1}{N} \left(\frac{\sum_n \sum_o A_{n,o}(\mathbf{s})}{A_{max}(\mathbf{s}) + \varepsilon} \right) \right] \right\}}, \quad (4.17)$$

em que, γ é o fator de ganho que controla a intensidade (“agudeza”) do corte de frequência, c é o valor de corte da dispersão da resposta do filtro, abaixo do qual a congruência de fase é penalizada, e N é o número total de escalas sendo analisadas. O termo $\Delta\Phi_{n,o}(\mathbf{s})$ da Equação 4.16 é a função de desvio de fase, definida como

$$\Delta\Phi_{n,o}(\mathbf{s}) = \cos(\phi_n(\mathbf{s}) - \bar{\phi}(\mathbf{s})) - |\sin(\phi_n(\mathbf{s}) - \bar{\phi}(\mathbf{s}))|. \quad (4.18)$$

Um dos problemas da medida PC é sua alta sensibilidade ao ruído. Para ilustrar esse problema, duas funções degrau, uma com e outra sem ruído são ilustradas na Figura 4.5. Na função degrau sem ruído, observa-se que a PC é alta somente no ponto da subida da função, enquanto que na função com ruído, a medida de PC também responde a flutuações do sinal ao redor da subida da função. Para compensar tal efeito é necessário estimar o nível de energia que pertence ao ruído presente na imagem e remover a sua influência do cálculo da PC. Ao subtrair o efeito do ruído estimado da energia local, antes de normalizá-la pela soma das amplitudes da imagem filtrada, é possível eliminar respostas espúrias.

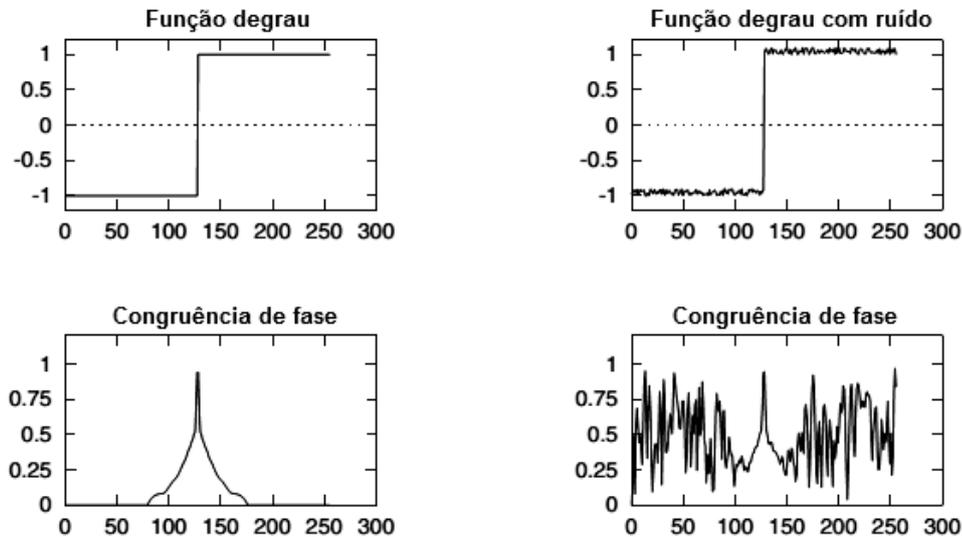


Figura 4.5: Medida de PC de uma função degrau com e sem ruído (Traduzida de Kovési (2000)).

Segundo Kovési (2000), a resposta de energia de ruído pode ser estimada pela média μ_r e variância σ_r da distribuição Rayleigh. Assim o parâmetro T_o da Equação 4.16 é a resposta de energia de ruído, estimada para cada orientação do banco de filtros, definida como

$$T = \mu_r + k\sigma_r, \quad (4.19)$$

em que, μ_r e σ_r correspondem, respectivamente, aos valores da média e variância de uma distribuição Rayleigh. Os valores de μ_r e σ_r são obtidos usando as respostas dos filtros para a menor

escala da representação.

4.4.4 Matriz de momentos de PC

A medida de PC, definida pela equação 4.16, embora seja eficiente para a detecção de bordas em uma imagem, ela ignora a maneira como a congruência de fase varia em relação à orientação em cada ponto da imagem. A fim de considerar a informação de orientação, Kovési (KOVESI, 2003) propôs calcular o momento da PC (para cada orientação) e, então, analisar o comportamento dessas medidas. Para isso, foi proposto o uso de uma matriz de orientações de congruência de fase, que corresponde a uma matriz de momentos (ou covariância) da medida de PC (M_{PC}). A análise dessa matriz de momentos é realizada a partir da decomposição em autovalores, os quais podem ser interpretados como os semi-eixos de uma elipse em 2D. Para cada pixel na posição espacial \mathbf{s} , a matriz de momentos é definida como:

$$M_{PC}(\mathbf{s}) = \begin{bmatrix} \sum_{\theta} PC_x^2(\mathbf{s}) & \sum_{\theta} PC_x(\mathbf{s})PC_y(\mathbf{s}) \\ \sum_{\theta} PC_x(\mathbf{s})PC_y(\mathbf{s}) & \sum_{\theta} PC_y^2(\mathbf{s}) \end{bmatrix}, \quad (4.20)$$

em que, os valores de $PC_x(\mathbf{s})$ e $PC_y(\mathbf{s})$ correspondem às projeções da medida de PC nos eixos x e y , para cada orientação θ . Os momentos máximo e mínimo, equivalentes aos autovalores máximo (λ_2) e mínimo (λ_1), da matriz da Equação 4.20, são definidos por

$$\lambda_2 = \frac{1}{2}(c + a + \sqrt{b^2 + (a - c)^2}) \quad (4.21)$$

e

$$\lambda_1 = \frac{1}{2}(c + a - \sqrt{b^2 + (a - c)^2}), \quad (4.22)$$

em que,

$$a = \sum_{\theta} PC_x^2(\mathbf{s}), \quad (4.23)$$

$$b = \sum_{\theta} PC_x(\mathbf{s})PC_y(\mathbf{s}), \quad (4.24)$$

e

$$c = \sum_{\theta} PC_y^2(\mathbf{s}). \quad (4.25)$$

4.4.5 Medida de *blobness*

Frangi et al. (1998) desenvolveram uma função para o realce de estruturas tubulares em imagens que utiliza a magnitude mútua dos autovalores da matriz Hessiana como um indicativo para a forma de tais estruturas. Em Jerman et al. (2015), essa função foi modificada para uma medida de *blobness* 3D para o realce de aneurismas intracraniais. Já em Silva, Ferrari e Tavares (2015) tal função foi modificada para uma medida de *blobness* 2D que utiliza os autovalores da matriz Hessiana, formulada como

$$B(\lambda_1, \lambda_2) = \left(1 - \exp\left(-\frac{R_A^2}{2\alpha^2}\right)\right) \times \left(1 - \exp\left(-\frac{S^2}{2\beta^2}\right)\right), \quad (4.26)$$

em que, λ_1 e λ_2 correspondem aos autovalores da matriz Hessiana ($\lambda_1 < 0$ e $\lambda_2 < 0$); $R_A = \frac{\lambda_1}{\lambda_2}$ é usado para minimizar a resposta da medida aos padrões em forma de linha e superfícies planas; $S = \sqrt{\lambda_1^2 + \lambda_2^2}$ ajuda a reduzir a influência de pixels associados ao ruído na imagem, uma vez que eles possuem autovalores baixos, e os parâmetros α e β podem ser ajustados para controlar a sensibilidade dos componentes do filtro.

Neste trabalho, a mesma medida de *blobness* da Equação 4.26 foi utilizada para o realce de estruturas circulares nas imagens de MI. A diferença é que ao invés de utilizar os autovalores da matriz Hessiana foram utilizados os autovalores de matrizes de momentos de PC, em que, $0 \leq \lambda_1 \leq \lambda_2$. Para evitar divisão por zero, visto que os autovalores podem ser iguais a zero, o termo R_A da Equação 4.26 foi modificado para $R_A = \frac{\lambda_1}{\lambda_2 + \varepsilon}$, em que, $\varepsilon = 0,0001$. Cabe ressaltar que os valores dessa medida sempre estão entre 0 e 1, sendo que, quanto mais próximo de 1, mais a estrutura se aproxima de um 'blob', ou seja, de uma estrutura aproximadamente circular.

A aplicação da medida de *blobness* resultou em um mapa de *blobness* para cada quadro do vídeo. A Figura 4.6 apresenta a sequência de passos que foi realizada para a obtenção de cada mapa. Observa-se que os filtros de log-Gabor 2D são criados para cada escala e orientação e cada filtro é multiplicado pela imagem no domínio da frequência. Em seguida, a medida de PC é computada para cada orientação do banco de filtros e então a matriz de momentos de PC é calculada para cada ponto da imagem. Os autovalores da matriz de momentos são calculados e a medida de *blobness* é computada para cada pixel da imagem. Ao final, obtém-se um mapa de *blobness* para cada quadro do vídeo. Um exemplo de tal mapa é apresentado na Figura 4.7.

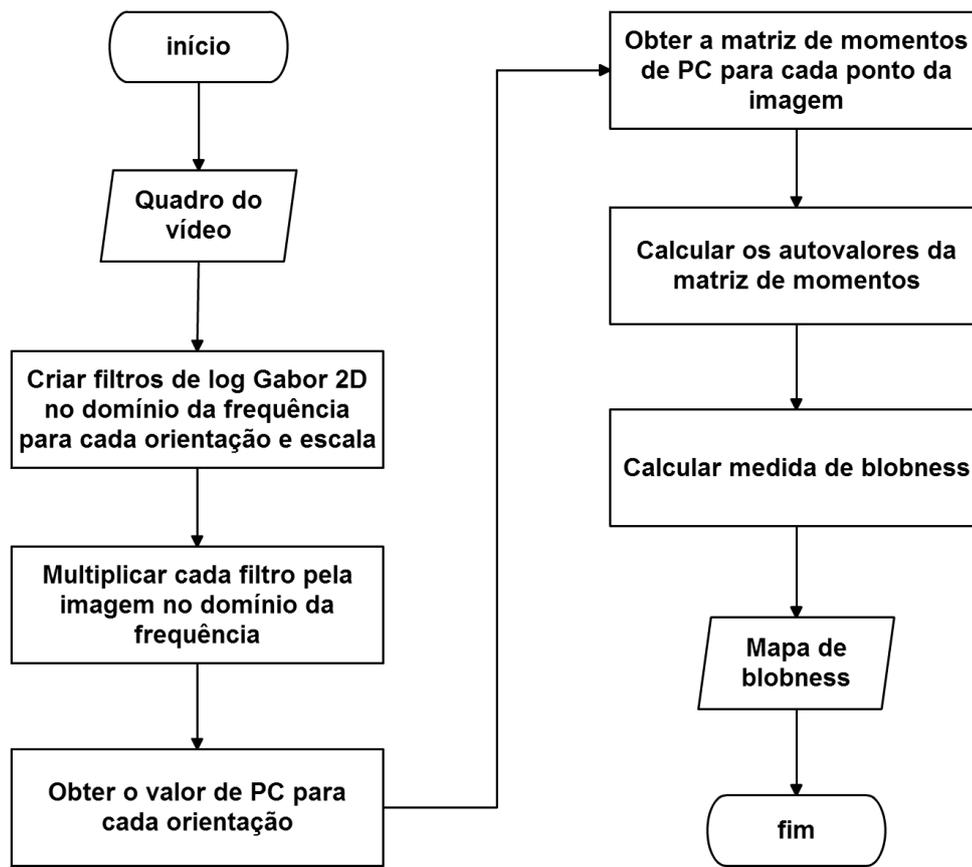


Figura 4.6: Fluxograma da seqüência de passos realizada para obtenção do mapa de *blobness*.



Figura 4.7: Exemplo do mapa de *blobness* de um quadro do vídeo.

4.4.6 Casamento de padrões

Casamento de padrões é uma técnica utilizada para encontrar uma parte específica de uma imagem em uma imagem maior. Essa técnica tenta encontrar os locais, em uma imagem $f(x,y)$ (imagem de busca), que correspondem a um determinado padrão $w(x,y)$ (imagem do objeto a ser detectado). Para uma imagem $f(x,y)$, de tamanho $M \times N$, e um padrão de tamanho $J \times K$, em que, $J \leq M$ e $K \leq N$, o pixel central do padrão é posicionado sobre o pixel superior esquerdo da imagem e o coeficiente de Correlação Cruzada Normalizada (NCC) é calculado. O padrão é deslocado pixel a pixel sobre a imagem de busca até que o coeficiente de NCC seja calculado para todos os pixels. Então, é gerada uma imagem contendo os coeficientes de correlação que variam entre -1 e 1, sendo que o valor 1 indica total correspondência entre o padrão e a imagem, 0 indica que não houve correspondência e -1 indica que houve uma correspondência inversa (os valores de escala de cinza invertidos) entre o padrão e a imagem. O NCC indica o grau de similaridade entre o padrão e a imagem de busca e é definido como

$$\gamma(x,y) = \frac{\sum_{s,t} [f(s,t) - \bar{f}(s,t)] [w(x+s,y+t) - \bar{w}_{x,y}]}{\sqrt{\sum_{s,t} [f(s,t) - \bar{f}(s,t)]^2 \sum_{s,t} [w(x+s,y+t) - \bar{w}_{x,y}]^2}}, \quad (4.27)$$

em que, $x = 0, 1, 2, \dots, M-1$, $y = 0, 1, 2, \dots, N-1$, \bar{w} é o valor médio dos pixels do padrão, \bar{f} é o valor médio da imagem na região onde f e w se sobrepõem (GONZALEZ; WOODS, 2002).

4.5 Técnicas utilizadas no estágio de detecção 2

No estágio de detecção 2, cada estrutura detectada como potencial leucócito no estágio de detecção 1 foi analisada localmente. Para isso, regiões de interesse, de tamanho igual a 15×15 pixels (valor escolhido com base no tamanho médio dos leucócitos nas imagens), foram determinadas e binarizadas utilizando o método de Otsu, visto que, o histograma dessas regiões possui uma característica bimodal. Em seguida, foi calculada uma medida de circularidade para cada região binária. Nas próximas subseções são descritos o método de Otsu e a medida de circularidade.

4.5.1 Método de Otsu

O método de Otsu é um algoritmo de limiarização proposto por Nobuyuki Otsu (OTSU, 1979). Utilizando tal método é possível selecionar o valor ideal de um limiar que separa os elementos da região de interesse do fundo da imagem. O limiar considerado ideal é aquele que

minimiza a variância intraclasses que é definida por

$$\sigma_w^2(t) = \omega_0(t)\sigma_0^2(t) + \omega_1(t)\sigma_1^2(t), \quad (4.28)$$

em que, $\omega_0(t)$ e $\omega_1(t)$ são as probabilidades de duas classes (objeto e fundo da imagem) serem separadas por um limiar t . Tais probabilidades são definidas por

$$\omega_0(t) = \sum_{i=0}^{t-1} p_i \quad (4.29)$$

e

$$\omega_1(t) = \sum_{i=t}^{L-1} p_i, \quad (4.30)$$

em que, i é o valor de intensidade da imagem e L é o valor de máxima intensidade da imagem. Na Equação 4.28, $\sigma_0^2(t)$ e $\sigma_1^2(t)$ são as variâncias das classes individuais definidas por

$$\sigma_0^2(t) = \sum_{i=1}^t (i - \mu_1(t))^2 \omega_0 \quad (4.31)$$

e

$$\sigma_1^2(t) = \sum_{i=t+1}^L (i - \mu_2(t))^2 \omega_1, \quad (4.32)$$

em que,

$$\mu_1(t) = \sum_{i=0}^{t-1} \frac{ip(i)}{\omega_0} \quad (4.33)$$

e

$$\mu_2(t) = \sum_{i=t}^{L-1} \frac{ip(i)}{\omega_1}. \quad (4.34)$$

4.5.2 Medida de Circularidade

Medidas de forma são comumente utilizadas para distinguir objetos em uma imagem. Uma dessas medidas é a medida de circularidade definida por

$$C = 4\pi \left(\frac{A}{P^2} \right), \quad (4.35)$$

em que, A é a área e P é o perímetro do objeto binário. A área é dada pela soma do número de pixels com valor 1 no objeto binário e o perímetro é dado pela contagem do número de pixels que tem valor 1 e que tem, pelo menos, um pixel vizinho com valor 0 (8 pixels de conectividade). A medida de circularidade tem seu valor máximo (valor 1) quando o objeto é um círculo. Tal medida é invariante a translação, rotação e escala (WU; MERCHANT; CASTLEMAN, 2010).

4.6 Métricas de avaliação

Após a etapa de detecção, os resultados foram avaliados utilizando as medidas de Precisão, Revocação e a medida-F1. Precisão e Revocação (LANDGREBE et al., 2006) são métricas de avaliação que podem indicar a eficácia de um sistema de detecção. Quanto mais próximas ambas métricas estiverem do valor 1, melhor será a eficácia do sistema de detecção. Essas métricas são definidas como:

$$\text{Precisão} = \frac{TP}{TP + FP} \quad (4.36)$$

e

$$\text{Revocação} = \frac{TP}{TP + FN}, \quad (4.37)$$

em que, TP (verdadeiros positivos) é o número de leucócitos corretamente detectados pela técnica; FP (falsos positivos) é o número de leucócitos detectados pela técnica que não correspondem a leucócitos reais e FN (falsos negativos) é o número de leucócitos que deixaram de ser detectados pela técnica. A medida-F1 (ZHANG; ZHANG, 2009) corresponde a média harmônica entre a Precisão e a Revocação e é definida como

$$\text{medida-F1} = \frac{2}{1/\text{Precisão} + 1/\text{Revocação}}. \quad (4.38)$$

Para o cálculo dessas métricas, os números de TPs, FPs e FNs foram determinados utilizando as localizações dos centroides dos leucócitos marcados manualmente (com o auxílio do *plug-in Manual Tracking*¹ do *software ImageJ*²) e as localizações dos pontos encontrados

¹<http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/track/track.html>

²<http://imagej.nih.gov/ij/>

nas imagens de vídeo pelas técnicas de detecção. A marcação manual resultou em uma lista contendo as coordenadas dos centroides dos leucócitos marcados. Essa lista foi utilizada para calcular a quantidade de TPs, FPs e FNs com base na distância Euclidiana entre o centroide de um ponto detectado automaticamente e o centroide de um leucócito marcado manualmente.

Neste trabalho, um ponto detectado foi considerado como TP se a distância Euclidiana entre o seu centroide e o centroide mais próximo da marcação manual foi menor ou igual a 9 pixels (esse valor foi determinado com base no raio médio dos leucócitos presentes nas imagens). Foram considerados como FPs os centroides detectados que não tiveram correspondência com a lista de centroides da marcação manual, ou seja, se nenhuma das distâncias foi menor que 9 pixels. Por fim, foram considerados como FNs os pontos que estavam presentes na lista de centroides da marcação manual e não estavam na lista de centroides de leucócitos detectados.

Com as métricas de Precisão e Revocação é possível construir curvas de Precisão-Revocação (*Area Under the Curve Precision-Recall - AUCPR*) que são tipicamente utilizadas para avaliar a performance de algoritmos sobre um conjunto de dados. Cada valor de Precisão-Revocação (intervalo de 0 a 1) é usado para construir um ponto na curva e a área sob as curvas indica o quão bom é o desempenho do algoritmo, sendo que quanto maior a área, melhor é o desempenho. Um caso ótimo é quando a curva se encontra no canto superior direito do espaço de Precisão-Revocação, o que indica que o algoritmo obteve um valor alto para ambas as métricas (DAVIS; GOADRICH, 2006). Exemplos de curvas Precisão-Revocação são ilustrados na Figura 4.8. Neste exemplo, observa-se que o algoritmo 2 possui uma pequena vantagem sobre o algoritmo 1.

4.7 Experimentos para definição dos parâmetros do método proposto

Para o cálculo da medida de PC, descrita na Subseção 4.4.3.2, são utilizados os parâmetros do banco de filtros log-Gabor e outros que controlam a precisão da medida de congruência de fase e ruído. Os parâmetros relacionados ao banco de filtros log-Gabor são: os números de escalas (n) e de orientações (o); o valor do comprimento de onda do filtro de menor escala ($minw$) (utilizado para calcular a máxima frequência central dos filtros); o desvio padrão da Gaussiana (σ_r) e o fator de escalonamento entre os centros de frequência de filtros sucessivos ($mult$), que definem a largura de banda dos filtros (uma oitava ou duas oitavas) e podem garantir a independência de suas respostas de frequência. Os outros parâmetros da medida de PC são: o valor de k utilizado no cálculo do limiar de ruído aplicado à medida de PC (vide Equação 4.19),

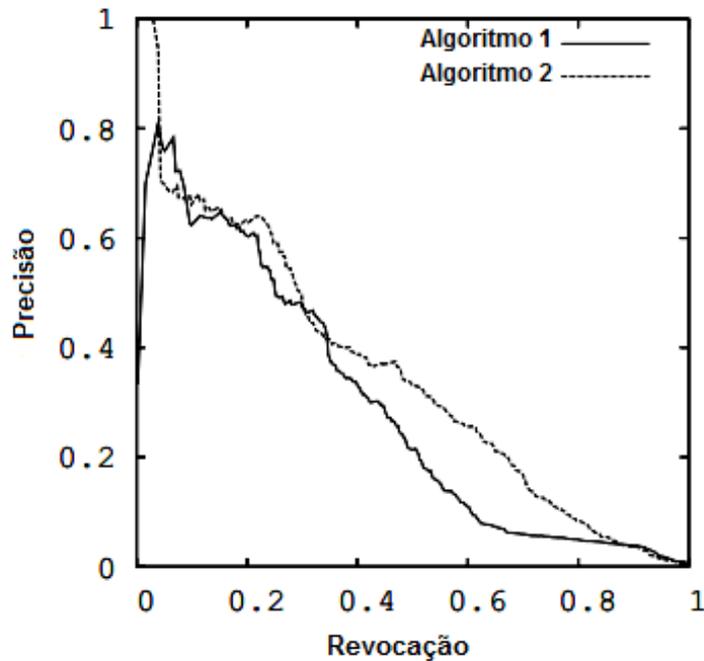


Figura 4.8: Exemplos de curvas Precisão-Revocação. A linha contínua indica o desempenho do algoritmo 1 e a linha tracejada indica o desempenho do algoritmo 2 (Traduzida de Davis e Goadrich (2006)).

o fator de ganho γ e o valor de corte c da função sigmoide de ponderação das frequências.

Não há uma forma única, geral ou pré-determinada para a definição dos parâmetros dos filtros de Gabor ou log-Gabor. Portanto, tal definição não é uma tarefa simples e deve ser realizada de acordo com o tipo de problema (análise de textura, detecção de bordas etc) ou, no caso deste trabalho, com o tipo de estrutura que se deseja realçar na imagem. Sendo assim, experimentos foram realizados a fim de encontrar o melhor conjunto de parâmetros para a medida de PC pela maximização de uma figura de mérito, no caso, a média da AUCPR (\overline{AUCPR}). Os experimentos foram realizados para a definição dos parâmetros do banco de filtros de log-Gabor, para a definição dos parâmetros k , γ e c da medida de PC e para a definição dos parâmetros α e β da medida de *blobness*.

Para realizar os experimentos foi utilizada uma sequência de imagens de MI previamente processada com as técnicas de pré-processamento mencionadas na Seção 4.3. Em cada experimento, para cada quadro do vídeo, a medida de *blobness* foi calculada e, em seguida, foi aplicado um algoritmo de busca por máximos locais a fim de detectar as estruturas circulares. O algoritmo de busca por máximos locais³ utiliza três parâmetros que são: o tamanho da janela de busca ($M \times N$), o valor de um limiar e o número máximo de máximos locais que devem ser

³<http://www.mathworks.com/help/vision/ref/vision.localmaximafinder-class.html>

encontrados. A janela de busca é movida pixel a pixel e dentro dessa janela o máximo local é determinado como o pixel de maior valor. Para ser um máximo local válido, o valor do máximo local deve ser maior ou igual ao valor de um limiar. O algoritmo foi aplicado utilizando uma janela de dimensão igual a 15×15 pixels, determinado com base no tamanho médio dos leucócitos nas imagens de vídeo de MI, e modificando-se o valor do limiar de 0,02 a 1,0 (com passo de 0,02). O número de máximos locais foi fixado em 40 e esse valor foi determinado com base na quantidade média de leucócitos por quadro do vídeo (25,4 leucócitos por quadro). Ao final de cada experimento a \overline{AUCPR} foi computada a partir da $AUCPR$ calculada para cada quadro do vídeo.

4.7.1 Experimentos para a definição dos parâmetros do banco de filtros

Todos os experimentos foram realizados fixando o número de escalas do banco de filtros em 4, visto que os leucócitos possuem aproximadamente o mesmo tamanho nas imagens de MI e, portanto, tal número é suficiente para cobrir a faixa de frequências necessária para realçá-los. Tendo fixado o número de escalas, os experimentos foram realizados utilizando 4 e 6 orientações no banco de filtros conforme indicado na Figura 4.9.

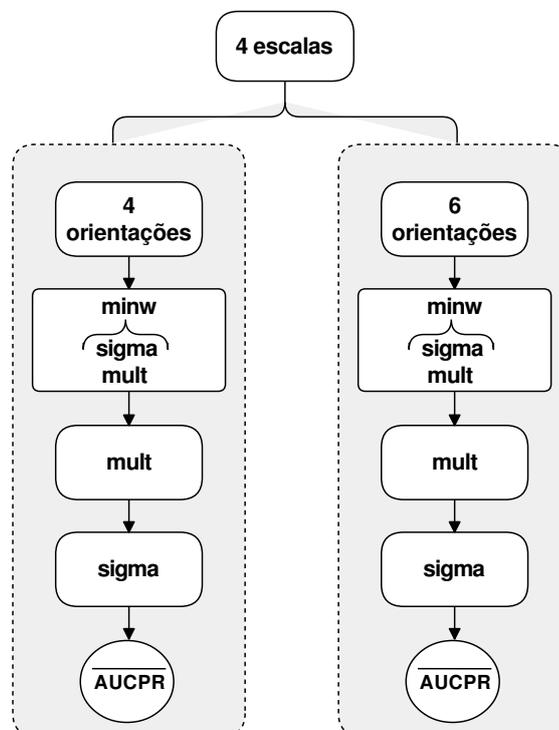


Figura 4.9: Diagrama dos experimentos realizados para a definição dos parâmetros do banco de filtros de log-Gabor.

No texto de sua tese de doutorado, Kovési (KOVESI, 1996) aponta que valores de σ_r iguais a 0,74 e 0,55 resultam em filtros com largura de banda aproximadamente igual a uma e duas oitavas, respectivamente. Kovési também aponta, com base em experimentos⁴, que utilizando os quatro diferentes pares de valores de $mult$ e σ_r apresentados na Tabela 4.1, é possível obter uma ampla cobertura espectral com a mínima sobreposição possível entre os filtros, garantindo a independência de suas respostas de frequência. Sendo assim, para cada orientação (4 e 6), variou-se o valor do parâmetro $minw$ de 3 a 10 e, para cada valor deste parâmetro, foram testados cada par de valores de $mult$ e σ_r apresentados na Tabela 4.1. Cabe ressaltar que, o mínimo valor de $minw$ foi igual a 3 para garantir que a máxima frequência central dos filtros fosse igual a 0,33 e, assim, evitar o efeito de *aliasing* que gera artefatos nas imagens quando a máxima resposta de frequência dos filtros ultrapassa o valor de 0,5.

Tabela 4.1: Valores de $mult$ e σ_r para uma dada largura de banda.

Largura de banda	$mult$	σ_r
Uma oitava	1,3	0,85
Uma oitava	1,6	0,75
Dois oitavas	2,1	0,65
Dois oitavas	3	0,55

Ao término desses experimentos foi selecionada, para cada orientação, a combinação de valores de $minw$, $mult$ e σ_r que maximizou o valor de \overline{AUCPR} . Em seguida, outros experimentos foram realizados utilizando os valores dessa combinação, fixando o valor de $minw$ e variando, primeiro o valor de $mult$ e depois o valor de σ_r (fixando o valor de $mult$ que maximizou a \overline{AUCPR}). Variou-se o valor de $mult$ e σ_r três valores acima e abaixo do valor selecionado ($mult$ com passo de 0,2 e σ_r com passo de 0,02). Ao final, para cada orientação obteve-se um valor de \overline{AUCPR} e selecionou-se para compor o banco de filtros, aquela na qual tal valor foi maximizado. Cabe ressaltar que, nesses experimentos os outros parâmetros da medida de PC ($k = 2$; $c = 0,4$; $\gamma = 10$) foram fixos de acordo com os valores propostos por Kovési (1999) e os valores dos parâmetros α e β da medida de *blobness* foram fixos em 0,5 conforme proposto em Frangi et al. (1998).

Ao final de todos os experimentos foram obtidos os valores finais dos parâmetros do banco de filtros que foram: $n = 4$, $o = 4$, $minw = 8$, $\sigma_r = 0,59$ (largura de banda de duas oitavas) e $mult = 2,1$. Na Figura 4.10 é apresentado o banco de filtros de log-Gabor resultante de tais parâmetros que é composto por 16 filtros, cada um para uma determinada escala e orientação. Observa-se que eles têm uma forma aproximadamente isotrópica, o que é uma importante característica para garantir o realce de estruturas circulares como os leucócitos. Nesse caso, a

⁴<http://www.peterkovesi.com/matlabfns/PhaseCongruency/Docs/convexpl.html>

mínima frequência central dos filtros foi limitada a 0.0135 ciclos/pixel e a máxima frequência a 0,1250 ciclos/pixel, como é ilustrado na Figura 4.11.

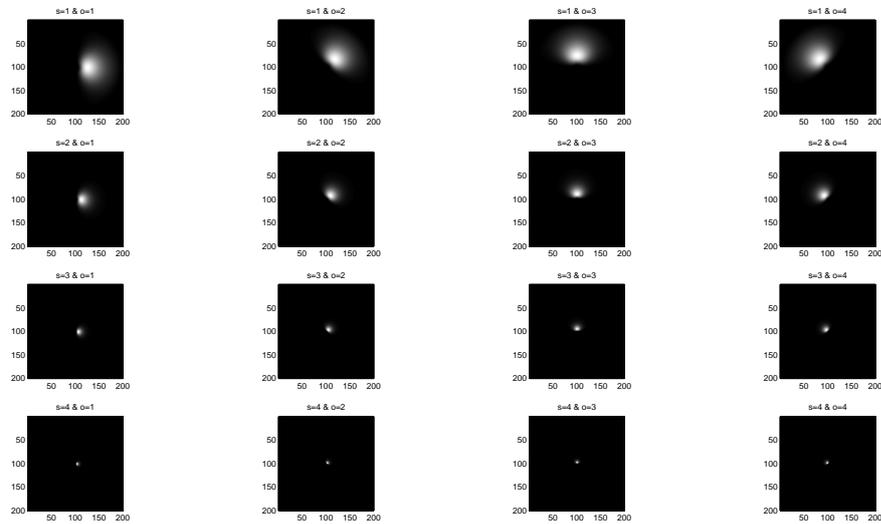


Figura 4.10: Banco de filtros de log-Gabor utilizado neste trabalho composto por 16 filtros, cada um em uma determinada escala e orientação.

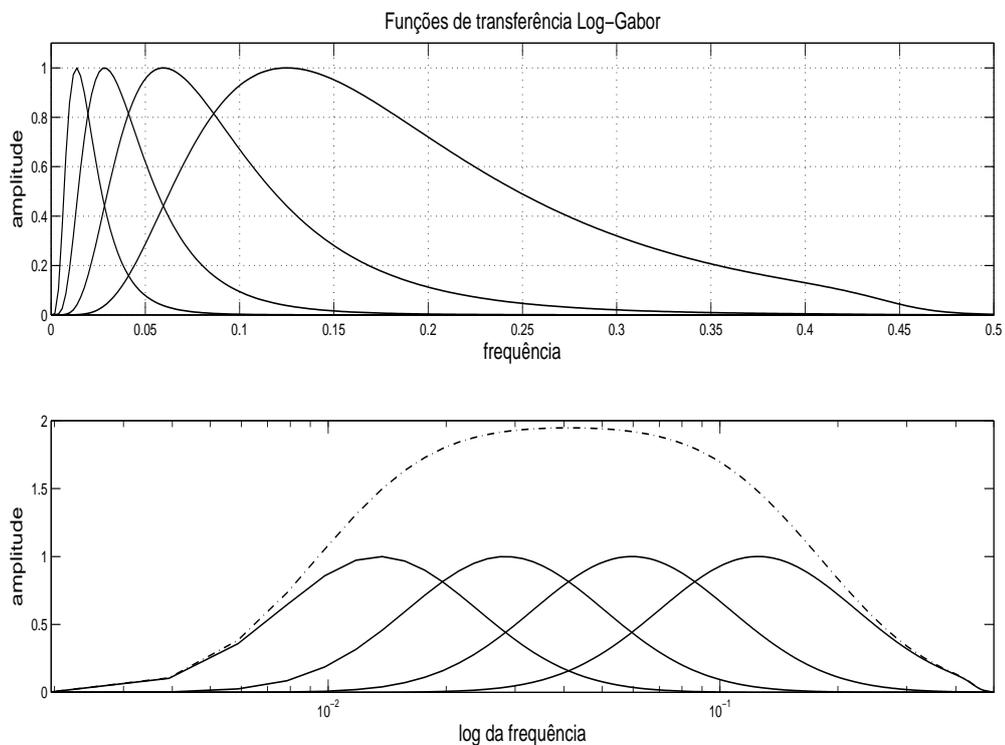


Figura 4.11: Frequência central radial dos filtros e sua respectiva cobertura no log de frequência.

4.7.2 Experimentos para a definição dos parâmetros k , c e γ da medida de PC

Foram realizados experimentos fixando os valores dos parâmetros do banco de filtros e variando os outros parâmetros de PC a partir dos valores propostos por Kovesi (1999) ($k = 2$; $c = 0,4$; $\gamma = 10$). Para a determinação do melhor conjunto de parâmetros foi realizada uma análise exaustiva variando-se um parâmetro por vez e fixando-se os demais. Primeiro variou-se o parâmetro k , depois o c e por último γ . Ao terminar de variar um parâmetro, o valor do parâmetro que resultou no maior valor de \overline{AUCPR} foi fixado e então, o próximo parâmetro foi testado. Dessa forma, variou-se os valores do limiar de ruído k de 2 a 9 (com passo de 1), do corte de propagação de frequências c de 0,1 a 0,9 (com passo de 0,1) e do fator de ganho da função de propagação de frequências da medida de PC (γ) de 2 a 10 (com passo de 1). No caso desses experimentos, os valores dos parâmetros α e β da medida de *blobness* continuaram fixos em 0,5. Ao final dos experimentos, o conjunto de parâmetros obtido foi $k = 9$, $c = 0,4$ e $\gamma = 5$ que foi utilizado no cálculo da medida de PC para o posterior cálculo da medida de *blobness* utilizada neste trabalho.

4.7.3 Experimentos para a definição dos parâmetros α e β da medida de *blobness*

Após variar os parâmetros da medida de PC, foram realizados dois passos para definir o melhor conjunto de parâmetros da medida de *blobness*. No primeiro passo variou-se o valor de α de 0,1 a 0,9, mantendo fixado o valor de β em 0,5. No segundo passo fixou-se o valor de α que resultou no maior valor de \overline{AUCPR} e variou-se o valor de β de 0,1 a 0,9 (com passo de 0,1). Em seguida, foi selecionado o valor de β que maximizou a \overline{AUCPR} e ao final dos experimentos o conjunto de parâmetros obtido e utilizado no cálculo da medida de *blobness* desenvolvida neste trabalho foi $\alpha = 0,1$ e $\beta = 0,7$.

4.8 Considerações Finais

Ao longo deste capítulo foram descritos os procedimentos de MI realizados para a obtenção das imagens de vídeo, os detalhes das imagens de vídeo utilizadas, o *pipeline* de processamento e os detalhes sobre as técnicas utilizadas nas etapas de pré-processamento e detecção dos leucócitos. Também foram descritas as métricas de avaliação utilizadas na análise dos resultados e por fim, foram descritos os experimentos realizados para a definição dos parâmetros das medidas de PC e *blobness*.

Capítulo 5

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo, são apresentados os resultados obtidos dos experimentos realizados para a definição dos parâmetros das medidas de PC e blobness e os resultados da detecção de leucócitos obtidos nos estágios de detecção 1 e 2. As discussões sobre tais resultados são apresentadas ao longo do texto.

5.1 Resultados dos experimentos realizados para a definição dos parâmetros do método proposto

5.1.1 Experimentos para a definição dos parâmetros do banco de filtros

Conforme descrito na Seção 4.7, foram realizados experimentos para a definição dos valores dos parâmetros do banco de filtros utilizado no cálculo da medida de PC. Para realizar os experimentos, o número de escalas do banco de filtros foi fixado em 4. Após fixar o número de escalas, experimentos foram realizados utilizando 4 e 6 orientações no banco de filtros. Para cada orientação, foram realizados experimentos para determinar os valores dos parâmetros $minw$, $mult$ e σ_r que maximizaram o valor de \overline{AUCPR} .

Após realizar os experimentos, obteve-se um conjunto de parâmetros e um valor de \overline{AUCPR} para cada orientação que foi fixada no banco de filtros. O conjunto de parâmetros e o valor de \overline{AUCPR} obtidos em cada orientação são apresentados na Tabela 5.1. Observa-se que, fixando o número de orientações do banco de filtros em 4 obteve-se um valor de \overline{AUCPR} igual a 0,736. Observa-se também que quando foram utilizadas 6 orientações no banco de filtros, o valor da \overline{AUCPR} foi igual a 0,713. Dado que, o maior valor da \overline{AUCPR} foi obtido com 4 orientações no banco de filtros, os valores de $minw$, $mult$ e σ_r utilizados no banco de filtros foram iguais a 8, 2, 1 e 0,59, respectivamente. Sendo assim, o conjunto de parâmetros utilizado no banco de

filtros foi igual a $n = 4$; $o = 4$; $minw = 8$; $mult = 2, 1$; $\sigma_r = 0,59$.

Tabela 5.1: Valores dos parâmetros $minw$, $mult$ e σ_r e valores da \overline{AUCPR} obtidos após fixar o número de orientações do banco de filtros em 4 e 6.

Número de orientações	Parâmetros ($minw$, $mult$, σ_r)	\overline{AUCPR}
4	$minw = 8$	0,736
	$mult = 2, 1$	
	$\sigma_r = 0,59$	
6	$minw = 8$	0,713
	$mult = 2, 1$	
	$\sigma_r = 0,61$	

5.1.2 Experimentos para a definição dos parâmetros k , c e γ da medida de PC

Após definir e fixar os valores dos parâmetros do banco de filtros, os outros parâmetros da medida de PC k , c e γ foram testados. Primeiro testou-se o valor de k , depois o valor de c e por último o valor de γ . Ao terminar de variar um parâmetro, o valor que resultou na maior \overline{AUCPR} foi fixado e então, o próximo parâmetro foi testado. Na Tabela 5.2 são apresentados os valores que foram fixados em cada parâmetro e a \overline{AUCPR} obtida após fixar cada valor. Observa-se que, os valores dos parâmetros k , c e γ que maximizaram a \overline{AUCPR} e que, por isso, foram utilizados no cálculo da medida de PC, foram iguais a 9, 0,4 e 5, respectivamente. Ao variar os valores dos parâmetros k e γ foram obtidos valores próximos de \overline{AUCPR} , indicando que a variação de tais parâmetros, dentro do intervalo de valores determinado, apresentou pouca influência nos resultados. No entanto, ao variar o valor do parâmetro c houve uma diferença significativa entre os valores de \overline{AUCPR} , visto que, o menor valor foi igual a 0,000 e o maior foi igual a 0,754.

Tabela 5.2: Valores dos parâmetros k , c e γ que foram fixados e os valores da \overline{AUCPR} resultantes.

Parâmetro	Valor	\overline{AUCPR}
k	2	0,736
	3	0,736
	4	0,740
	5	0,744
	6	0,745
	7	0,748
	8	0,753
	9	0,754
	c	0,1
0,2		0,690
0,3		0,735
0,4		0,754
0,5		0,727
0,6		0,571
0,7		0,225
0,8		0,011
0,9		0,000
γ	2	0,733
	3	0,750
	4	0,755
	5	0,761
	6	0,760
	7	0,757
	8	0,757
	9	0,757
	10	0,754

5.1.3 Experimentos para a definição dos parâmetros da medida de *blobness*

Após definir e fixar os valores dos parâmetros da medida de PC, os parâmetros α e β da medida de *blobness* foram testados. Primeiro variou-se o valor de α de 0,1 a 0,9, fixando o valor de β em 0,5. Depois obteve-se o valor de \overline{AUCPR} resultante de cada valor de α que foi

fixado. Em seguida, o valor de α que maximizou o valor de \overline{AUCPR} foi fixado e variou-se o valor de β de 0,1 a 0,9. Nas Tabelas 5.3 e 5.4 são apresentados os valores que foram fixados nos parâmetros α e β , respectivamente, bem como a \overline{AUCPR} obtida após fixar cada valor. Pode-se notar que os valores de α e β que maximizaram a \overline{AUCPR} e que, portanto, foram utilizados no cálculo da medida de *blobness*, foram iguais a 0,1 ($\overline{AUCPR}=0,772$) e 0,7 ($\overline{AUCPR}=0,776$), respectivamente.

Tabela 5.3: Valores do parâmetro α que foram fixados e os valores resultantes de \overline{AUCPR} .

α	\overline{AUCPR}
0,1	0,772
0,2	0,770
0,3	0,770
0,4	0,762
0,5	0,761
0,6	0,754
0,7	0,738
0,8	0,722
0,9	0,700

Tabela 5.4: Valores do parâmetro β que foram fixados e os valores resultantes de \overline{AUCPR} .

β	\overline{AUCPR}
0,1	0,016
0,2	0,236
0,3	0,653
0,4	0,761
0,5	0,772
0,6	0,774
0,7	0,776
0,8	0,775
0,9	0,776

5.2 Resultados do estágio de detecção 1

Após definir e fixar os valores dos parâmetros das medidas de PC e *blobness*, o estágio de detecção 1 foi realizado. O objetivo desse estágio foi detectar o maior número possível de estruturas circulares possivelmente correspondentes aos leucócitos nas imagens de MI. Sendo assim, a medida de *blobness* foi aplicada em cada quadro do vídeo e os valores da medida-F1 e AUCPR foram calculados para cada quadro. Em seguida, calculou-se os valores médios tanto da medida-F1 ($\overline{\text{medida} - F1}$) quanto da AUCPR (\overline{AUCPR}), apresentados na Tabela 5.5. Observa-se que, o valor médio da medida-F1 obtido com a medida de *blobness* foi igual a 0,790 (com intervalo de confiança de $\pm 0,008$). Nesse caso, o valor do limiar utilizado foi igual a 0,16 (limiar aplicado ao algoritmo de busca por máximos locais). Observa-se também que, o valor da \overline{AUCPR} obtido com a medida de *blobness* foi igual a 0,776 (com intervalo de confiança de $\pm 0,0113$).

Como forma de comparar os resultados, a técnica casamento de padrões também foi aplicada em cada quadro do vídeo e os valores médios da medida-F1 e da AUCPR também foram calculados. Tais valores são apresentados na Tabela 5.5. Observa-se que o valor médio da medida-F1 obtido com a técnica casamento de padrões foi igual a 0,745 (com intervalo de confiança de $\pm 0,006$). Nesse caso, o valor de limiar utilizado foi igual a 0,64 (limiar aplicado ao algoritmo de busca por máximos locais). Observa-se também que, o valor da \overline{AUCPR} obtido com a técnica casamento de padrões foi igual a 0,670 (intervalo de confiança de $\pm 0,0118$).

Tabela 5.5: Valores da $\overline{\text{medida} - F1}$ e \overline{AUCPR} obtidos com a medida de *blobness* e com a técnica casamento de padrões.

Técnica	$\overline{\text{medida} - F1}$	\overline{AUCPR}
<i>blobness</i>	0,790	0,776
casamento de padrões	0,745	0,670

Com base nos resultados mencionados acima, observa-se que tanto a $\overline{\text{medida} - F1}$ quanto a \overline{AUCPR} obtidas com a medida de *blobness* foram maiores que as obtidas com a técnica casamento de padrões. Na Figura 5.1 a) são apresentadas as médias da medida-F1 e da AUCPR obtidas com a medida de *blobness*, na qual as barras de erro representam o intervalo de confiança. Do mesmo modo, na Figura 5.1 b) são apresentadas as médias da medida-F1 e da AUCPR obtidas com a técnica casamento de padrões. Como pode ser observado nessas duas figuras, há uma diferença significativa entre a medida de *blobness* e a técnica casamento de padrões no que diz respeito aos valores médios da medida-F1 e da AUCPR.

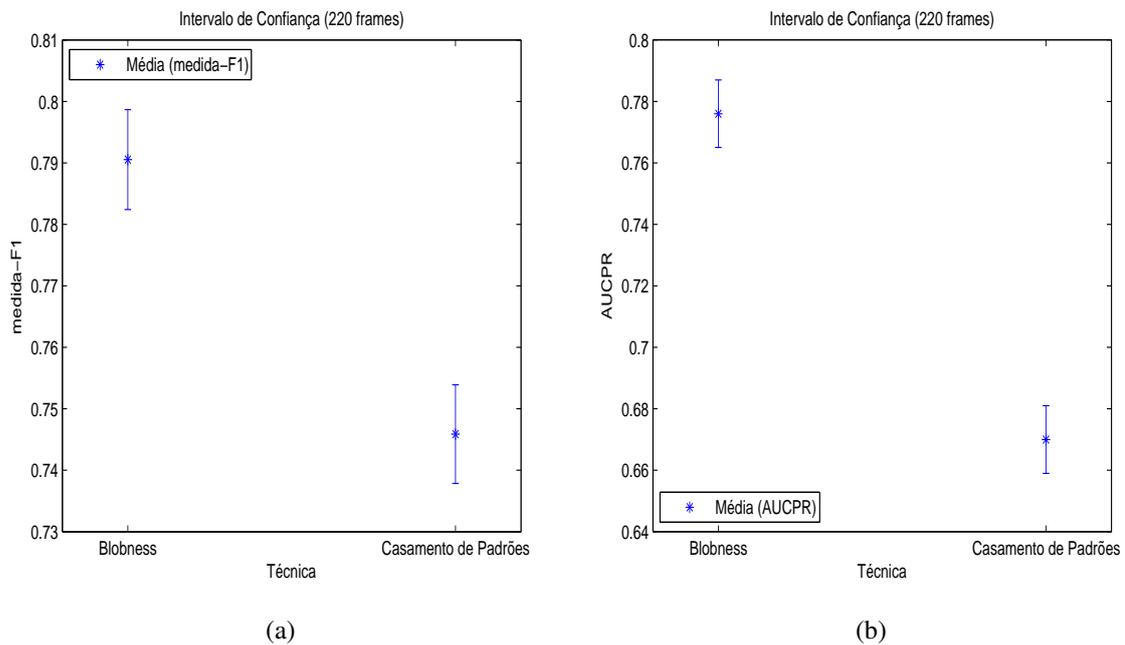


Figura 5.1: Média da medida-F1 (a) e média da AUCPR (b) com intervalo de confiança obtidas pela medida de *blobness* e pela técnica casamento de padrões.

Para calcular o desempenho global da técnica proposta foram calculadas curvas precisão-revocação e a área de tais curvas tanto para a medida de *blobness* quanto para a técnica casamento de padrões, desta vez usando o número total de TPs, FPs e FNs presentes no vídeo. Cada ponto na curva precisão-revocação foi obtido fixando-se o valor do limiar aplicado ao algoritmo de busca por máximos locais e calculando-se os valores de precisão e revocação. Os valores de AUCPR obtidos para a medida de *blobness* e para a técnica casamento de padrões foram iguais a 0,813 e 0,733, respectivamente. Na Figura 5.2 são apresentadas as curvas precisão-revocação resultantes da medida de *blobness* (linha vermelha) e da técnica casamento de padrões (linha azul), na qual observa-se que a AUCPR resultante da medida de *blobness* é maior que a obtida com a técnica casamento de padrões.

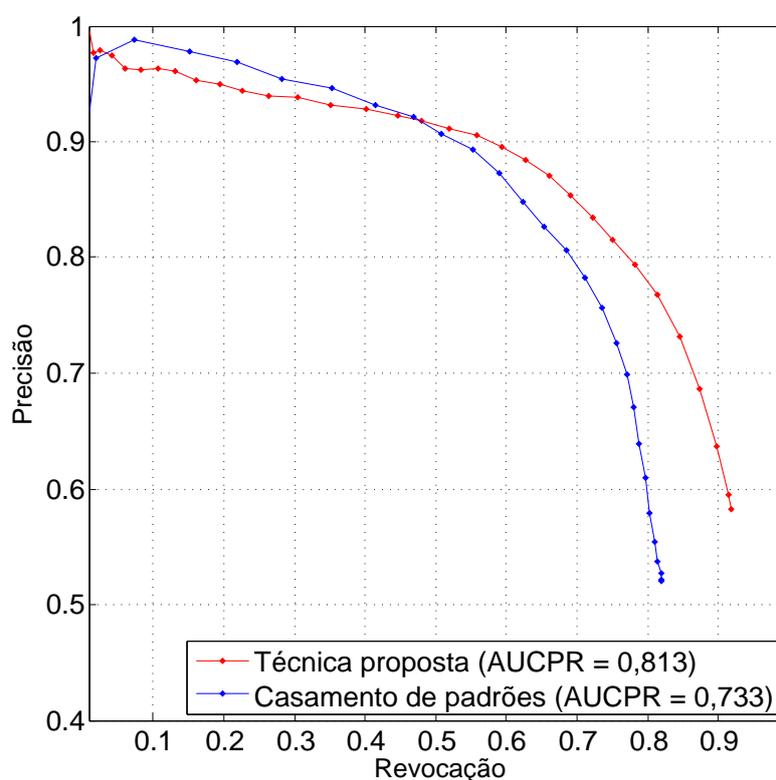


Figura 5.2: Curvas precisão-revocação obtidas para a medida de *blobness* (linha vermelha) e para a técnica casamento de padrões (linha em azul).

Além disso, por meio da curva precisão-revocação pôde-se determinar, para cada ponto de operação da curva, um valor para a medida-F1. Os maiores valores da medida-F1 obtidos para a medida de *blobness* e para a técnica casamento de padrões são apresentados na Tabela 5.6. Observa-se que, o maior valor da medida-F1 obtido para a medida de *blobness* foi igual a 0,790, com valores de precisão e revocação iguais a 0,767 e 0,814, respectivamente. Tais valores foram obtidos fixando-se o valor do limiar aplicado ao algoritmo de busca por máximos locais em 0,16. O maior valor da medida-F1 obtido para a técnica casamento de padrões foi igual a 0,745, com valores de precisão e revocação iguais a 0,756 e 0,735, respectivamente. Nesse caso o valor do limiar utilizado foi igual a 0,64.

Tabela 5.6: Número de TPs, FPs e FNs e valores de precisão, revocação e medida-F1 obtidos para a medida de *blobness* e para a técnica casamento de padrões. O número total de leucócitos presentes no vídeo é de 5588.

Técnica	TPs	FPs	FNs	Precisão	Revocação	medida-F1
<i>blobness</i>	4551	1380	1037	0,767	0,814	0,790
casamento de padrões	4108	1319	1480	0,756	0,735	0,745

Na Figura 5.3 são apresentadas imagens resultantes do processamento de um quadro do vídeo, no qual as estruturas circulares foram detectadas usando a medida de *blobness* e a técnica casamento de padrões. O quadro original é apresentado na Figura 5.3 (a) e os leucócitos marcados manualmente podem ser vistos como um símbolo 'x' na Figura 5.3 (b). Na Figura 5.3 (c) e (d) os TPs são representados por círculos verdes enquanto os círculos azuis e os símbolos 'x' indicam os FPs e os FNs, respectivamente. Nessa imagem específica observa-se que com a medida de *blobness* obteve-se maior número de TPs e menor número de FPs e FNs que a técnica casamento de padrões.

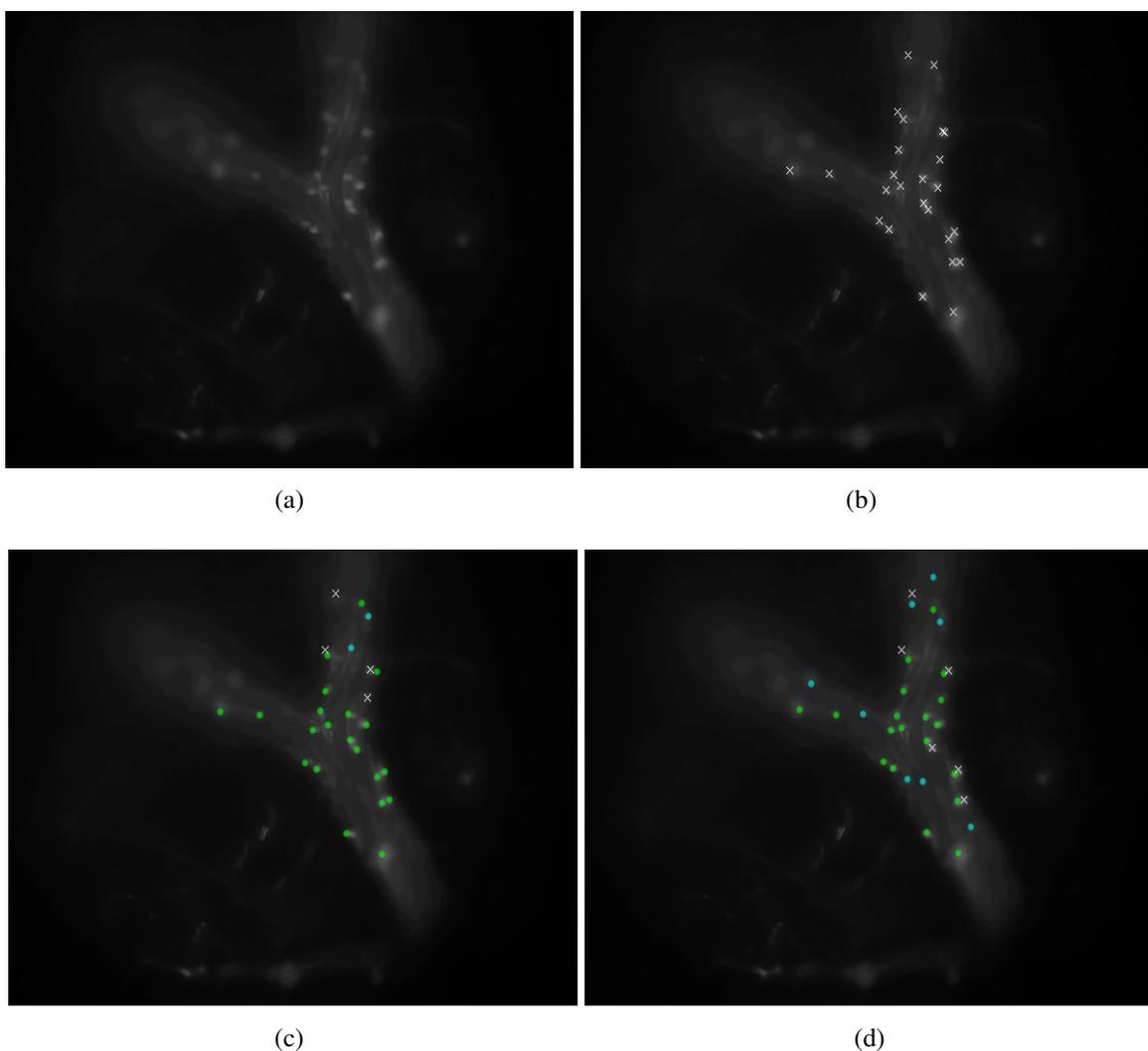


Figura 5.3: Exemplo de um quadro processado do vídeo. a) Quadro original; b) leucócitos marcados visualmente; c) imagem resultante da medida de *blobness*; d) imagem resultante da técnica casamento de padrões. Os círculos verdes indicam os TPs, os círculos azuis indicam os FPs e os símbolos 'x' indicam os FNs.

O tempo utilizado para calcular a medida de *blobness* para um quadro do vídeo foi igual a 1,21 segundos. O tempo para calcular o banco de filtros de log-Gabor 2D foi igual a 1,136

segundos. Sendo assim, para obter os mapas de *blobness* para os 220 quadros do vídeo foram necessários 267,336 segundos que correspondem a 4,456 minutos ($1,21 \times 220 + 1,136$). Para calcular a imagem de correlação resultante da técnica casamento de padrões, para cada quadro do vídeo, foram utilizados 0,061 segundos. Ao total, para calcular as imagens de correlação para os 220 quadros do vídeo foram necessários 13,421 segundos que correspondem a 0,223 minutos. No caso deste trabalho, o método proposto foi implementado usando MATLAB e todos os resultados foram obtidos utilizando um computador pessoal com um processador Core i5 (Quad Core - 2,40 GHz) e 8 GB de memória.

5.3 Resultados do estágio de detecção 2

Após as estruturas circulares terem sido detectadas, o estágio de detecção 2 foi aplicado a cada quadro do vídeo com o objetivo de eliminar as estruturas que correspondem aos falso positivos e manter o maior número possível de estruturas que correspondem aos leucócitos verdadeiros. Assim, conforme descrito na Seção 4.5 do capítulo anterior, as estruturas detectadas em cada quadro do vídeo foram binarizadas usando o método de Otsu e, em seguida, para cada estrutura binária foi calculada uma medida de circularidade.

Para avaliar os resultados obtidos após realizar o estágio de detecção 2, a medida-F1 foi obtida fixando-se o valor do limiar da medida de circularidade e variando o valor do limiar da medida de *blobness* de 0,02 a 1 (com passo de 0,02). Nesse caso, o valor do limiar da medida de circularidade foi fixado no intervalo de 0,1 a 0,9 (com passo de 0,1). Cabe ressaltar que para o cálculo da medida-F1 utilizou-se o número total de TPs, FPs e FNs do vídeo. Na Figura 5.4 são apresentados os valores da medida-F1 obtidos em cada limiar da medida de circularidade e no limiar da medida de *blobness* no qual a medida-F1 foi maximizada. Observa-se que o maior valor da medida-F1, igual a 0,791, foi obtido com o limiar da medida de circularidade igual a 0,4 e o da medida de *blobness* igual a 0,16.

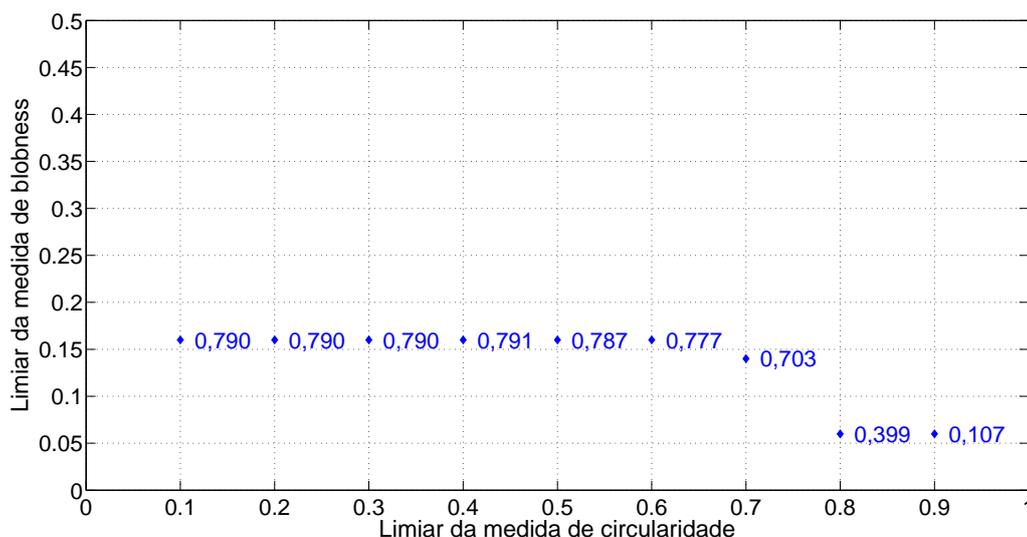


Figura 5.4: Valores da medida-F1 obtidos em cada limiar da medida de circularidade e no limiar da medida de *blobness* no qual o valor da medida-F1 foi maximizada.

Na Tabela 5.7 são apresentados para cada ponto de operação (Lc - limiar da medida de circularidade; Lb - limiar da medida de *blobness*) exibido na Figura 5.4, os números obtidos de TPs, FPs e FNs e os valores obtidos das métricas de Precisão (P), Revocação (R) e medida-F1. Observa-se que quanto maior o valor do limiar aplicado a medida de circularidade menor foi o número de FPs detectados. No entanto, apesar de o número de FPs detectados ter sido menor, observa-se que o número de TPs detectados também diminuiu.

Tabela 5.7: Número de TPs, FPs e FNs e os valores de Precisão (P), Revocação (R) e medida-F1 obtidos do vídeo após as estruturas circulares terem sido detectadas com a medida de *blobness* e o estágio 2 ser aplicado. O número total de leucócitos no vídeo é de 5588.

Lc	Lb	TPs	FPs	FNs	P	R	medida-F1
0,1	0,16	4551	1380	1037	0,767	0,814	0,790
0,2	0,16	4551	1380	1037	0,767	0,814	0,790
0,3	0,16	4551	1374	1037	0,768	0,814	0,790
0,4	0,16	4545	1352	1043	0,770	0,813	0,791
0,5	0,16	4480	1303	1108	0,774	0,801	0,787
0,6	0,16	4243	1079	1345	0,797	0,759	0,777
0,7	0,14	3513	862	2075	0,802	0,628	0,703
0,8	0,06	1530	400	4058	0,792	0,273	0,399
0,9	0,06	322	97	5266	0,768	0,057	0,107

Na Tabela 5.8 são apresentados os valores da \overline{AUCPR} obtidos fixando-se o valor do limiar

da medida de circularidade. Observa-se que o maior valor da \overline{AUCPR} , igual a 0,776, foi obtido fixando-se o limiar da medida de circularidade em 0,4 (tal valor de \overline{AUCPR} também foi obtido nos limiares 0,1, 0,2 e 0,3).

Tabela 5.8: \overline{AUCPR} obtida em cada limiar aplicado a medida de circularidade (de 0,1 a 0,9).

Limiar	\overline{AUCPR}
0,1	0,776
0,2	0,776
0,3	0,776
0,4	0,776
0,5	0,767
0,6	0,733
0,7	0,588
0,8	0,217
0,9	0,024

O estágio de detecção 2 também foi aplicado após as estruturas circulares terem sido detectadas com a técnica casamento de padrões. Para avaliar os resultados, a medida-F1 foi obtida fixando-se o valor do limiar da medida de circularidade e variando-se o valor do limiar da técnica de casamento de padrões de 0,02 a 1 (com passo de 0,02). O valor do limiar da medida de circularidade foi fixo no intervalo de 0,1 a 0,9 (com passo de 0,1). Na Figura 5.5 são apresentados os valores da medida-F1 obtidos em cada limiar da medida de circularidade tendo fixado o limiar da técnica casamento de padrões que maximizou o valor da medida-F1. Observa-se que o maior valor da medida-F1, igual a 0,746, foi obtido com os limiares da medida de circularidade e da técnica de casamento de padrões iguais a 0,4 e 0,64, respectivamente.

Na Tabela 5.9 são apresentados, para cada ponto de operação (L_c - limiar da medida de circularidade; L_b - limiar da técnica casamento de padrões) apresentado na Figura 5.5, os números obtidos de TPs, FPs, FNs e os valores obtidos de Precisão (P), Revocação (R) e medida-F1. Observa-se que quanto maior o valor do limiar aplicado a medida de circularidade menor foi o número de FPs detectados. Contudo, observa-se que apesar de o número de FPs detectados tenha sido menor, o número de TPs detectados também diminuiu.

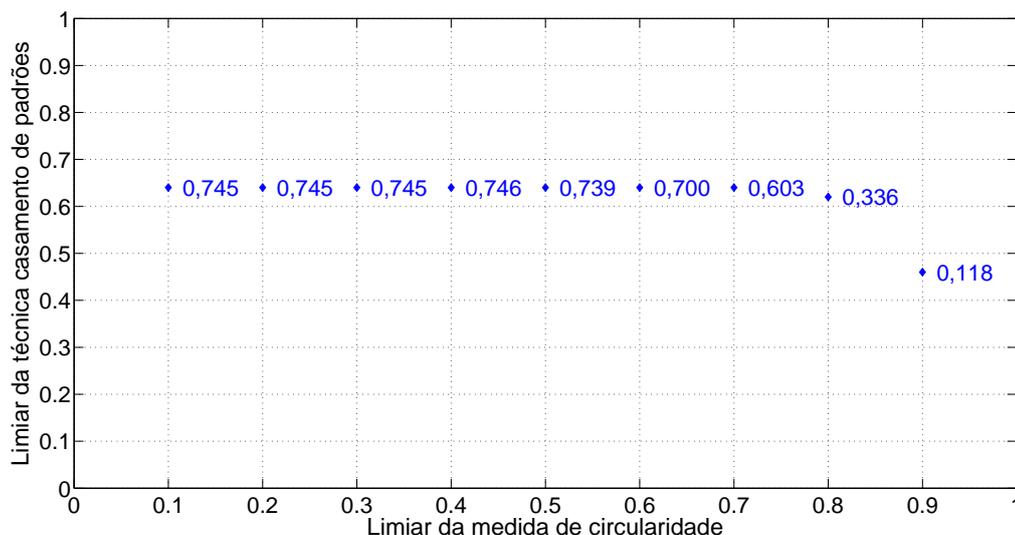


Figura 5.5: Valores da medida-F1 obtidos em cada limiar da medida de circularidade e no limiar da técnica casamento de padrões no qual o valor da medida-F1 foi maximizada.

Tabela 5.9: Números de TPs, FPs e FNs e os valores de Precisão (P), Revocação (R) e medida-F1 obtidos do quadro do vídeo após as estruturas circulares terem sido detectadas com a técnica casamento de padrões e o estágio 2 ser aplicado.

Lc	Lp	TPs	FPs	FNs	P	R	medida-F1
0,1	0,64	4108	1319	1480	0,756	0,735	0,745
0,2	0,64	4108	1319	1480	0,756	0,735	0,745
0,3	0,64	4105	1314	1483	0,757	0,734	0,745
0,4	0,64	4079	1266	1509	0,763	0,729	0,746
0,5	0,64	3946	1133	1642	0,776	0,706	0,739
0,6	0,64	3493	897	2095	0,795	0,625	0,700
0,7	0,64	2676	610	2912	0,814	0,478	0,603
0,8	0,62	1202	345	4386	0,776	0,215	0,336
0,9	0,46	385	498	5203	0,436	0,068	0,118

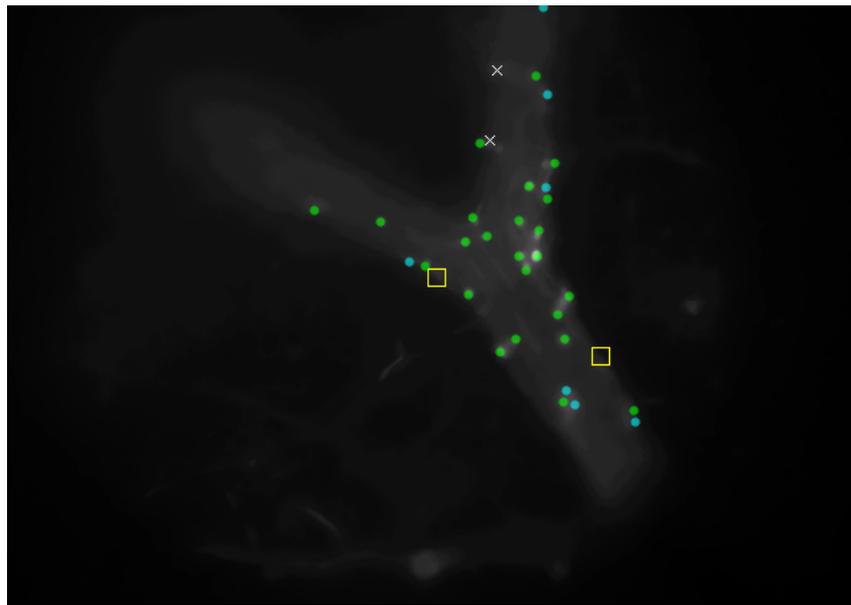
Na Tabela 5.10 são apresentados os valores da \overline{AUCPR} tendo fixado o valor do limiar da medida de circularidade. Observa-se que o melhor valor de \overline{AUCPR} igual a 0,670 foi obtido fixando o limiar da medida de circularidade em 0,3 (tal valor de \overline{AUCPR} também foi obtido nos limiares 0,1 e 0,2).

Tabela 5.10: \overline{AUCPR} obtida em cada limiar aplicado a medida de circularidade (de 0,1 a 0,9).

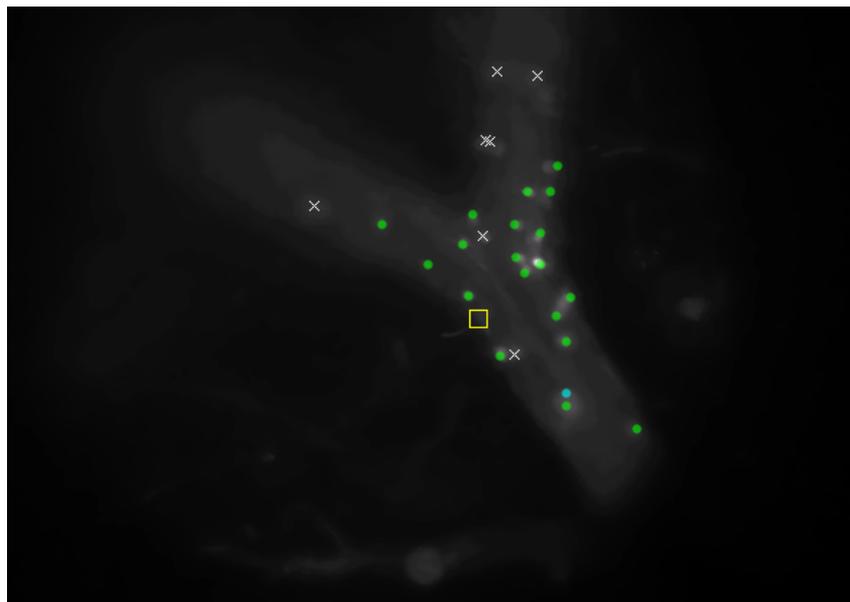
Limiar	\overline{AUCPR}
0,1	0,670
0,2	0,670
0,3	0,670
0,4	0,666
0,5	0,643
0,6	0,564
0,7	0,414
0,8	0,159
0,9	0,031

Comparando os resultados da aplicação do estágio de detecção 2 após as estruturas circulares terem sido detectadas pela técnica casamento de padrões e pela medida de *blobness*, observa-se que os maiores valores obtidos para a medida-F1 e para a \overline{AUCPR} foram obtidos utilizando a medida de *blobness*. Contudo, não houve um aumento significativo do valor da medida-F1 e o valor da \overline{AUCPR} se manteve o mesmo ou diminuiu em relação aos valores obtidos no estágio de detecção 1, devido ao fato de que alguns TPs também foram eliminados.

Na Figura 5.6 a) e 5.6 b) são apresentadas duas imagens nas quais somente sinais FPs foram eliminados. Nesta figura, os círculos verdes indicam os TPs, os símbolos 'x' indicam os FNs, os círculos azuis indicam os FPs que não foram eliminados e os quadrados amarelos indicam os FPs que foram eliminados após a aplicação do estágio de detecção 2.



(a)



(b)

Figura 5.6: Imagens nas quais somente os FPs foram eliminados. Os círculos verdes indicam os TP's, os símbolos 'x' indicam os FN's, os círculos azuis indicam os FPs e os quadrados amarelos indicam os FPs que foram eliminados.

Na Figura 5.7 é apresentada uma imagem na qual tanto TP's quanto FPs foram eliminados após a aplicação do estágio de detecção 2. Nesta figura os quadrados amarelos marcados com um 'x' indicam os TP's eliminados e os quadrados amarelos que estão vazios indicam os FPs que foram eliminados corretamente. No caso dos quadrados de números 5 e 6, observa-se que, pelo fato dos leucócitos estarem muito próximos, no lugar da região de interesse não há um círculo bem definido, o que faz com que a medida de circularidade de ambos tenha um valor

baixo e que, por isso, eles sejam considerados FPs. Ao observar a região de interesse na imagem original referente ao quadrado amarelo de número 4, percebe-se que a forma do leucócito não é exatamente um círculo devido a presença de borramento de movimento na imagem que afetou o formato do leucócito.

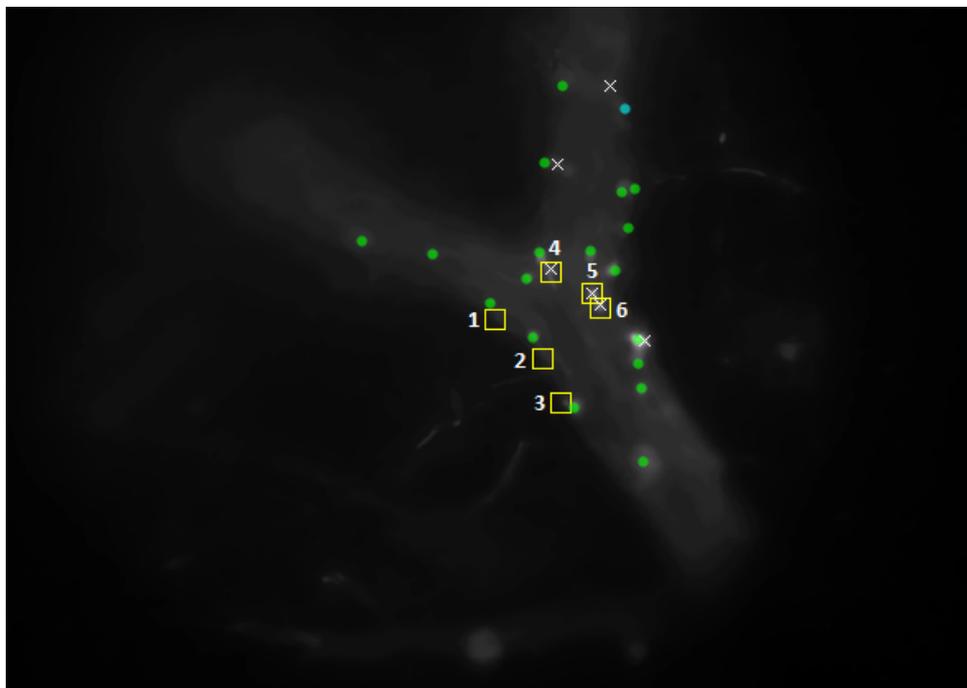


Figura 5.7: Imagem na qual os quadrados amarelos marcados com um símbolo 'x' indicam os TPs que foram eliminados e os quadrados amarelos que estão vazios indicam os FPs que foram eliminados corretamente após realizar o estágio de detecção 2.

5.4 Considerações finais

Este capítulo apresentou os resultados obtidos dos experimentos realizados para a definição dos parâmetros das técnicas utilizadas neste trabalho e os resultados obtidos após aplicação dos estágios de detecção 1 e 2. Os resultados do estágio de detecção 1 mostraram que a medida de *blobness* proposta foi capaz de detectar as estruturas circulares presentes nas imagens de MI. Além disso, a medida de *blobness* foi comparada com a técnica casamento de padrões e apresentou resultados superiores no que diz respeito a medida-F1 e a AUCPR (tanto os valores médios quanto os obtidos usando o número total de TPs, FPs e FNs do vídeo). Os resultados do estágio de detecção 2 mostraram que embora a estratégia proposta tenha eliminado alguns sinais falso positivos, não foi possível obter valores maiores da medida-F1 e da \overline{AUCPR} que os obtidos no estágio de detecção 1 sem a aplicação da estratégia. Analisando as imagens obtidas após a aplicação do estágio de detecção 2, observou-se que a métrica de circularidade utilizada falhou quando duas células se encontravam muito próximas umas das outras ou quando o formato das

células havia sido afetado por borramento de movimento.

Capítulo 6

CONCLUSÕES

Neste capítulo são apresentadas as conclusões finais do trabalho e as principais contribuições bem como as sugestões para trabalhos futuros.

6.1 Conclusões finais

A contagem do número de leucócitos presentes nos vasos sanguíneos de pequenos animais, em experimentos *in vivo* de microscopia intravital, é uma tarefa fundamental para entender os mecanismos envolvidos em processos inflamatórios e auxiliar na determinação do efeito de drogas desenvolvidas para o tratamento de doenças inflamatórias. Em geral, a contagem dos leucócitos é realizada visualmente por um observador experiente (técnico laboratorial ou pesquisador) diretamente em imagens de vídeo de MI, obtidas dos vasos sanguíneos do animal de teste. Entretanto, esse processo visual possui vários problemas, visto que é demorado, propenso à erros, devido à fadiga visual do observador, e viesado, devido a variabilidade inter e intra observador. Tais problemas podem se refletir diretamente nos resultados de contagem.

Diante do exposto acima, o principal objetivo deste trabalho de mestrado foi o desenvolvimento de uma técnica computacional para a detecção automática de leucócitos em imagens de vídeo de MI. Um dos desafios no desenvolvimento de algoritmos computacionais para a contagem de leucócitos em imagens de MI é a alta variação de contraste dos leucócitos ao longo dos quadros do vídeo, causada pelo efeito de *photobleaching*. Em geral, as técnicas existentes na literatura para a detecção de leucócitos baseiam-se na intensidade de cinza das imagens e, portanto, possuem a limitação de serem sensíveis à tal variação. Por outro lado, a medida de PC, utilizada neste trabalho para o cálculo de uma medida de realce de estruturas circulares, possui a vantagem de ser invariante à mudanças locais de contraste e iluminação das imagens.

Neste trabalho a detecção dos leucócitos foi realizada em dois principais estágios. No estágio 1, a medida de *blobness* desenvolvida foi capaz de detectar as estruturas circulares presentes nas imagens de MI. Os resultados de detecção do estágio 1 foram avaliados usando as métricas medida-F1 e AUCPR e foram comparados com os da técnica casamento de padrões. Os resultados indicaram que o método proposto alcançou valores superiores aos da técnica de casamento de padrões considerando-se os valores médios da medida-F1 e da AUCPR bem como os valores da medida-F1 e da AUCPR calculados usando o número total de TPs, FPs e FNs presentes no vídeo (*blobness*: $\overline{\text{medida-F1}} = 0,790$, $\overline{\text{AUCPR}} = 0,776$, medida-F1 = 0,790, AUCPR = 0,813; casamento de padrões: $\overline{\text{medida-F1}} = 0,745$, $\overline{\text{AUCPR}} = 0,670$, medida-F1 = 0,745, AUCPR = 0,733). No estágio 2, foi investigada e implementada uma estratégia baseada em uma métrica de circularidade das células, a fim de eliminar os sinais falso positivos erroneamente detectados no estágio 1 mas, tentando, no entanto, manter os valores da medida-F1 e da $\overline{\text{AUCPR}}$ os mais altos possíveis. Os resultados mostraram que a estratégia, embora tenha sido capaz de eliminar sinais falso positivos, não foi capaz de aumentar os valores da medida-F1 e da $\overline{\text{AUCPR}}$ em relação aos valores obtidos no estágio 1 sem a aplicação da estratégia. Após análises, verificou-se que a diminuição dos valores dessas métricas deveu-se ao fato de que em algumas imagens, a métrica de circularidade, usada no estágio 2, falhou quando duas células se encontravam muito próximas umas das outras ou quando o formato das células havia sido afetado por borramento de movimento.

6.2 Contribuições do trabalho

A seguir são citadas as principais contribuições deste trabalho:

- Desenvolvimento de uma medida de realce de estruturas circulares nas imagens de MI a partir do uso da técnica de PC;
- Criação de uma estratégia de pós-processamento para distinguir entre leucócitos verdadeiros e falsos nas imagens de MI, detectados no estágio 1 do método proposto;
- Aplicação da técnica proposta para o processamento de imagens reais de MI com aplicação direta na contagem de leucócitos.

6.3 **Trabalhos futuros**

Conforme descrito no capítulo anterior, a medida de *blobness* proposta neste trabalho foi capaz de realçar as estruturas circulares correspondentes aos leucócitos nas imagens de MI. Contudo, a estratégia proposta para eliminar os sinais falso positivos erroneamente detectados não foi tão eficaz, visto que, em alguns casos muitos sinais verdadeiro positivos também foram eliminados. Os trabalhos futuros visam aprimorar a etapa de pós-processamento para que apenas os sinais falso positivos possam ser eliminados. Uma das possibilidades é utilizar outras técnicas que permitem a análise da forma de objetos, como por exemplo, o cálculo de momentos invariantes da imagem, mais especificamente momentos de segunda ordem.

Além disso, trabalhos futuros também visam melhorar os resultados de detecção criando outra estratégia para ajustar os parâmetros das medidas de PC e *blobness*. Uma das possibilidades é utilizar algoritmos de aprendizado de máquina para aprender os melhores parâmetros a serem utilizados no cálculo das medidas de PC e *blobness*. Uma vez que os leucócitos são detectados, eles podem ser rastreados ao longo dos quadros do vídeo e outras estatísticas do recrutamento leucocitário podem ser obtidas, tais como: o número de leucócitos aderidos, o número de leucócitos rolantes e a velocidade média dos leucócitos.

6.4 **Trabalho publicado referente à pesquisa desenvolvida**

- Souza, K. E.; Gregório da Silva, B. C.; Ferrari, R. J. *Automatic detection of leukocytes from intravital video microscopy using the phase congruency technique*. In: XI Workshop de Visão Computacional. São Carlos - SP, 2015.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. *Cellular and Molecular Immunology*. USA: Elsevier Health Sciences, 2014.

ACTON, S.; RAY, N. Detection and tracking of rolling leukocytes from intravital microscopy. In: *IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: Nano to Macro*. Arlington, VA, USA: IEEE Xplore Digital Library, 2004. p. 1235–1238.

ANDERS, X.; ZHANG, C.; YUAN, H. Automatic intravital video mining of rolling and adhering leukocytes. In: *International Conference on Machine Learning and Applications*. Orlando, Florida, USA: IEEE Xplore Digital Library, 2006. p. 174–179.

BISHOP, J. J.; NANCE, P. R.; POPEL, A. S.; INTAGLIETTA, M.; JOHNSON, P. C. Effect of erythrocyte aggregation on velocity profiles in venules. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 280, n. 1, p. 222–236, 2001.

CANNY, J. A computational approach to edge detection. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, v. 8, n. 6, p. 679–698, 1986.

CARVALHO, T.; LOPES, O. O emprego de camundongo geneticamente modificado como modelo de estudo para doenças cardiovasculares. *Medicina (Ribeirão Preto. Online)*, v. 39, n. 1, p. 110–116, 2006.

CHABAT, F.; HU, X. P.; HANSELL, D. M.; YANG, G. Z. ERS transform for the automated detection of bronchial abnormalities on ct of the lungs. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, v. 20, n. 9, p. 942–952, 2001.

CHEN, D.; DUNDR, M.; WANG, C.; LEUNG, A.; LAMOND, A.; MISTELI, T.; HUANG, S. Condensed mitotic chromatin is accessible to transcription factors and chromatin structural proteins. *The Journal of cell biology*, v. 168, n. 1, p. 41–54, 2005.

CLAUSI, D. A.; JERNIGAN, M. E. Designing gabor filters for optimal texture separability. *Pattern Recognition*, v. 33, n. 11, p. 1835–1849, 2000.

CUI, J.; ACTON, S. T.; LIN, Z. A monte carlo approach to rolling leukocyte tracking in vivo. *Medical Image Analysis*, v. 10, n. 4, p. 598–610, 2006.

DAVIS, J.; GOADRICH, M. The relationship between precision-recall and roc curves. In: *Proceedings of the 23rd international conference on Machine learning*. Pittsburgh, Pennsylvania, EUA: ACM Digital Library, 2006. p. 233–240.

DOGO, C. R. *Caracterização dos efeitos tóxicos da fração ativa de cepa SPC 920 Geitlerinema amphibium (cyanophyceae, oscillatoriales) na microcirculação e em fibras musculares: análise por microscopia intravital*. Dissertação (Mestrado) — Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2010.

DONG, G.; ACTON, S. T. Detection of rolling leukocytes by marked point processes. *Journal of Electronic Imaging*, v. 16, n. 3, p. 033013–033013–11, 2007.

DONG, G.; RAY, N.; ACTON, S. T. Intravital leukocyte detection using the gradient inverse coefficient of variation. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, v. 24, n. 7, p. 910–924, 2005.

DUNN, D.; HIGGINS, W. E. Optimal gabor filters for texture segmentation. *IEEE Transactions on Image Processing*, v. 4, n. 7, p. 947–964, 1995.

EGMONT-PETERSEN, M.; SCHREINER, U.; TROMP, S.; LEHMANN, T.; SLAAF, D.; ARTS, T. Detection of leukocytes in contact with the vessel wall from *in vivo* microscope recordings using a neural network. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. 47, n. 7, p. 941–951, 2000.

FERRARI, R. J.; PINTO, C. H. V.; SILVA, B. C. Gregório da; BERNARDES, D.; CARVALHO-TAVARES, J. Automatic detection of motion blur in intravital video microscopy image sequences via directional statistics of log-gabor energy maps. *Medical & Biological Engineering & Computing*, n. 2, p. 151–163, 2015.

FERREIRA, R. G. *Avaliação dos efeitos induzidos pelo ácido nicotínico e pela nicotinamida sobre a migração de neutrófilos induzida por diferentes estímulos em camundongos*. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2011.

FIELD, D. J. Relations between the statistics of natural images and the response properties of cortical cells. *Journal of the Optical Society of America*, v. 4, n. 12, p. 2379–2394, 1987.

FRANGI, A. F.; NIESSEN, W. J.; VINCKEN, K. L.; VIERGEVER, M. A. Multiscale vessel enhancement filtering. In: *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention*. Cambridge, MA, EUA: Springer Berlin Heidelberg, 1998. p. 130–137.

GAVINS, F. N.; CHATTERJEE, B. E. Intravital microscopy for the study of mouse microcirculation in anti-inflammatory drug research: Focus on the mesentery and cremaster preparations. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 49, n. 1, p. 1–14, 2003.

GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. *Digital Image Processing*. 2. ed. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall, 2002.

GRIGORESCU, S. E.; PETKOV, N.; KRUIZINGA, P. Comparison of texture features based on gabor filters. *Image Processing, IEEE Transactions on*, v. 11, n. 10, p. 1160–1167, 2002.

HICKEY, M. J.; REINHARDT, P.; OSTROVSKY, L.; JONES, W. M.; JUTILA, M. A.; PAYNE, D.; ELLIOTT, J.; KUBES, P. Tumor necrosis factor-alpha induces leukocyte recruitment by different mechanisms in vivo and in vitro. *The Journal of Immunology*, v. 158, n. 7, p. 3391–3400, 1997.

JERMAN, T.; PERNUS, F.; LIKAR, B.; SPICLIN, Z. Blob enhancement and visualization for improved intracranial aneurysm detection. *IEEE Transactions on Visualization and Computer Graphics*, n. 99, p. 1–1, 2015.

KASS, M.; WITKIN, A.; TERZOPOULOS, D. Snakes: Active contour models. *International Journal of Computer Vision*, v. 1, n. 4, p. 321–331, 1988.

KOVESI, P. *Invariant measures of image features from phase information*. Tese (Doutorado) — University of Western Australia, Perth, Western, Australia, 1996.

KOVESI, P. Image features from phase congruency. *Videre: Journal of computer vision research*, v. 1, n. 3, p. 1–26, 1999.

KOVESI, P. Phase congruency: A low-level image invariant. *Psychological Research Psychologische Forschung*, v. 64, n. 2, p. 136–148, 2000.

KOVESI, P. Phase congruency detects corners and edges. In: *International Conference on Digital Image Computing: Techniques and Applications (DICTA 2003)*. Sydney, Australia: Australian Pattern Recognition Society, 2003. p. 309–318.

KRISHAN, A. *Evaluation of Gabor filter parameters for image enhancement and segmentation*. Tese (Doutorado) — Thapar University, Patiala, Punjab, Índia, 2009.

LANDGREBE, T. C.; PACLIK, P.; DUIN, R. P. W.; BRADLEY, A. P. Precision-recall operating characteristic (p-roc) curves in imprecise environments. In: *International Conference on Pattern Recognition*. Hong Kong, China: IEEE Xplore Digital Library, 2006. v. 4, p. 123–127.

LEE, C.-J.; WANG, S.-D. Fingerprint feature extraction using gabor filters. *Electronics Letters*, v. 35, n. 4, p. 288–290, 1999.

LEE, S.; VINEGONI, C.; SEBAS, M.; WEISSLEDER, R. Automated motion artifact removal for intravital microscopy, without a priori information. *Scientific reports*, v. 4, n. 4507, 2014.

LI, W.; MAO, K.; ZHANG, H.; CHAI, T. Selection of gabor filters for improved texture feature extraction. In: *IEEE International Conference on Image Processing*. Atlanta, GA, EUA: IEEE Xplore Digital Library, 2010. p. 361–364.

MARQUES, P. E.; OLIVEIRA, A. G.; AMARAL, S. S.; NUNES-SILVA, A.; ALMEIDA, A. F. S. Intravital microscopy: Taking a close look inside the living organisms. *African Journal of Microbiology Research*, v. 6, n. 7, p. 1603–1614, 2012.

MARR, D.; HILDRETH, E. Theory of edge detection. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 207, n. 1167, p. 187–217, 1980.

MATTES, D.; HAYNOR, D. R.; VESSELLE, H.; LEWELLYN, T. K.; EUBANK, W. Nonrigid multimodality image registration. *Medical Imaging 2001: Image Processing*, International Society for Optics and Photonics (SPIE), v. 4322, p. 1609–1620, 2001.

MORRONE, M. C.; OWENS, R. A. Feature detection from local energy. *Pattern Recognition Letters*, v. 6, n. 5, p. 303–313, 1987.

MOSTANY, R.; PORTERA-CAILLIAU, C. A craniotomy surgery procedure for chronic brain imaging. *Journal of Visualized Experiments*, n. 12, 2008.

- MOVELLAN, J. R. *Tutorial on Gabor filters*. 2002. University of California - San Diego, California, USA.
- MUKHERJEE, D.; RAY, N.; ACTON, S. Level set analysis for leukocyte detection and tracking. *IEEE Transactions on Image Processing*, v. 13, n. 4, p. 562–572, 2004.
- MURPHY, D. B. *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2002.
- NGUYEN, N. H.; KELLER, S.; NORRIS, E.; HUYNH, T. T.; CLEMENS, M. G.; SHIN, M. C. Tracking colliding cells *in vivo* microscopy. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. 58, n. 8, p. 2391–2400, 2011.
- NYÚL, L. G.; UDUPA, J. K.; ZHANG, X. New variants of a method of MRI scale standardization. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, v. 19, n. 2, p. 143–150, 2000.
- OTSU, N. A Threshold Selection Method from Gray-level Histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics*, v. 9, n. 1, p. 62–66, 1979.
- PARAGIOS, N.; DERICHE, R. Geodesic active contours and level sets for the detection and tracking of moving objects. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, v. 22, n. 3, p. 266–280, 2000.
- RAY, N.; ACTON, S. Motion gradient vector flow: an external force for tracking rolling leukocytes with shape and size constrained active contours. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, v. 23, n. 12, p. 1466–1478, 2004.
- RAY, N.; ACTON, S.; LEY, K. Tracking leukocytes *in vivo* with shape and size constrained active contours. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, v. 21, n. 10, p. 1222–1235, 2002.
- SATO, Y.; CHEN, J.; ZOROOFI, R.; HARADA, N.; TAMURA, S.; SHIGA, T. Automatic extraction and measurement of leukocyte motion in microvessels using spatiotemporal image analysis. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. 44, n. 4, p. 225–236, 1997.
- SERHAN, C.; WARD, P.; GILROY, D. *Fundamentals of Inflammation*. Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press, 2010.
- SILVA, B. C. Gregório da; FREIRE, P. G.; BERNARDES, D.; CARVALHO-TAVARES, J.; MELLO, R. F.; FERRARI, R. J. Técnica de estabilização de movimento em microscopia intravital utilizando métodos de co-registro de imagens. In: *XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica*. Uberlândia, MG, Brasil: Universidade Federal de Uberlândia, 2014. p. 193–196.
- SILVA, B. da; FERRARI, R.; TAVARES, J. C. Detection of leukocytes in intravital video microscopy based on the analysis of hessian matrix eigenvalues. In: *Conference on Graphics, Patterns and Images (SIBGRAPI)*. Salvador, Bahia, Brasil: Sociedade Brasileira de Computação, 2015. p. 345–352.
- STEVENSON, A. *Oxford Dictionary of English*. Oxford, Reino Unido: Oxford University Press, 2010. (Oxford reference online premium).

STOITSIS, J.; GOLEMATI, S.; TSIAPARAS, N.; NIKITA, K. Texture characterization of carotid atherosclerotic plaque from b-mode ultrasound using gabor filters. In: *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*. Minneapolis, Minnesota, USA: IEEE Xplore Digital Library, 2009. p. 455–458.

THIRION, J.-P. Image matching as a diffusion process: an analogy with maxwell's demons. *Medical image analysis*, v. 2, n. 3, p. 243–260, 1998.

TOMASI, C.; MANDUCHI, R. Bilateral filtering for gray and color images. In: *Sixth International Conference on Computer Vision*. Bombay, Índia: IEEE Xplore Digital Library, 1998. p. 839–846.

VENKATESH, S.; OWENS, R. An energy feature detection scheme. In: *International Conference on Image Processing*. Singapore, Singapore: IEEE, 1989. p. 553–557.

VILELA, M. C. *Investigação do recrutamento celular em camundongos selvagens e TNFR1 no modelo experimental de encefalite herpética grave*. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2008.

VINEGONI, C.; LEE, S.; GORBATOV, R.; WEISSLEDER, R. Motion compensation using a suctioning stabilizer for intravital microscopy. *IntraVital*, v. 1, n. 2, p. 115–121, 2012.

VIOLA, P.; WELLS, W. M. Alignment by maximization of mutual information. *International Journal of Computer Vision*, v. 24, n. 2, p. 137–154, 1997.

WU, Q.; MERCHANT, F.; CASTLEMAN, K. *Microscope image processing*. San Diego, California, USA: Academic Press, 2010.

XU, C.; PRINCE, J. L. Snakes, shapes, and gradient vector flow. *IEEE Transactions on Image Processing*, v. 7, n. 3, p. 359–369, 1998.

ZAGO, A. C. *Importância da interação entre a integrina Mac-1 dos leucócitos e a glicoproteína Ib das plaquetas para o recrutamento de leucócitos pelas plaquetas e para a resposta inflamatória à lesão vascular*. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil, 2006.

ZHANG, E.; ZHANG, Y. *F-Measure*. 1. ed. New York, USA: Springer Publishing Company, 2009. 1147 p.

ZHANG, M.; GUNTURK, B. Multiresolution bilateral filtering for image denoising. *IEEE Transactions on Image Processing*, v. 17, n. 12, p. 2324–2333, 2008.

ZHANG, W.-C.; WANG, F.-P.; ZHU, L.; ZHOU, Z.-F. Corner detection using Gabor filters. *Image Processing, IET*, v. 8, n. 11, p. 639–646, 2014.