

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA COMPUTAÇÃO

**DETECÇÃO E RASTREAMENTO DE
LEUCÓCITOS EM IMAGENS DE
MICROSCOPIA INTRAVITAL VIA
PROCESSAMENTO ESPAÇO-TEMPORAL**

BRUNO CÉSAR GREGÓRIO DA SILVA

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 E RASTREAMENTO DE
LEUCÓCITOS EM IMAGENS DE
MICROSCOPIA INTRAVITAL VIA
PROCESSAMENTO ESPAÇO-TEMPORAL**

BRUNO CÉSAR GREGÓRIO DA SILVA

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)

S586d Silva, Bruno César Gregório da
Detecção e rastreamento de leucócitos em imagens de
microscopia intravital via processamento espaço-
temporal / Bruno César Gregório da Silva. -- São
Carlos : UFSCar, 2016.
101 p.

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

1. Detecção e rastreamento de leucócitos. 2.
Microscopia intravital. 3. Matriz Hessiana. 4.
Corregistro de imagens. 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 do candidato Bruno Cesar Gregorio da Silva, realizada em 19/02/2016:

Prof. Dr. Ricardo José Ferrari
UFSCar

Prof. Dr. Bruno Augusto Nassif Travençolo
UFU

Prof. Dr. Adilson Gonzaga
USP

AGRADECIMENTOS

Agradeço à todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho, em especial ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo José Ferrari e à colaboradora Profa. Dra. Juliana Carvalho Tavares, pelos seus ensinamentos, conselhos e todo outro tipo de suporte que me tenham oferecido.

Agradeço também aos meus familiares e namorada pelo apoio dado e aos meus colegas de laboratório pelas construtivas discussões e observações. Por fim, agradeço ao grupo BIPG¹, ao laboratório GAPIS e ao DC-UFSCar pela estrutura disponibilizada e à CAPES e à FAPESP (número de processo: 2013/26171-6) pelo apoio financeiro durante minha pesquisa.

¹<http://www.bipgroup.dc.ufscar.br>

RESUMO

Nos últimos anos, um grande número de pesquisadores tem voltado seus esforços e interesses para o estudo *in vivo* dos mecanismos celulares e moleculares da interação leucócito-endotélio na microcirculação de vários tecidos e em várias condições inflamatórias. O principal objetivo desses estudos é desenvolver estratégias terapêuticas mais eficazes para o tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes. Atualmente, a análise de interações leucócito-endotélio em pequenos animais é realizada de maneira visual a partir de uma sequência de imagens de microscopia intravital. Além de ser demorado, esse procedimento pode levar à fadiga visual do observador e, portanto, gerar falsas estatísticas. Nesse contexto, este trabalho de pesquisa tem como objetivo estudar e desenvolver técnicas computacionais para a detecção e rastreamento automáticos de leucócitos em vídeos de microscopia intravital. Para isso, resultados do processamento quadro a quadro do vídeo (2D – análise espacial) serão combinados com os resultados da análise tridimensional (3D=2D+t – análise espaço-temporal) do volume formado pelo empilhamento dos quadros do vídeo. A principal técnica abordada para ambos os processamentos é baseada na análise local dos autovalores da matriz Hessiana. Enquanto o processamento de imagens 2D tem como objetivo a detecção de leucócitos sem se preocupar com seu rastreamento, o processamento 2D+t pretende auxiliar na análise dinâmica de movimentação das células (rastreamento), sendo capaz de prever movimentos celulares em casos de oclusão, por exemplo. Neste trabalho foram utilizados vídeos de microscopia intravital obtidos a partir de um estudo da Esclerose Múltipla realizado com camundongos. Técnicas de redução de ruído e estabilização do movimento das sequências de imagens compõem a etapa de pré-processamento, assim como técnicas para a definição e análise dos caminhos celulares compõem a etapa de pós-processamento. Resultados das etapas de processamento 2D e 2D+t, comparados com a convencional análise visual, demonstraram a eficácia da abordagem proposta.

Palavras-chave: detecção e rastreamento de leucócitos, microscopia intravital, matriz Hessiana, registro de imagens.

ABSTRACT

Over the last few years, a large number of researchers have directed their efforts and interests for the *in vivo* study of the cellular and molecular mechanisms of leukocyte-endothelial interactions in the microcirculation of many tissues under different inflammatory conditions. The main goal of these studies is to develop more effective therapeutic strategies for the treatment of inflammatory and autoimmune diseases. Nowadays, analysis of the leukocyte-endothelial interactions in small animals is performed by visual assessment from an intravital microscopy image sequences. Besides being time consuming, this procedure may cause visual fatigue of the observer and, therefore, generate false statistics. In this context, this work aims to study and develop computational techniques for the automatic detection and tracking of leukocytes in intravital video microscopy. For that, results from frame to frame processing (2D – spatial analysis) will be combined with those from the three-dimensional analysis (3D=2D+t – spatio-temporal analysis) of the volume formed by stacking the video frames. The main technique addressed for both processings is based on the analysis of the eigenvalues of the local Hessian matrix. While the 2D image processing aims the leukocyte detection without worrying about their tracking, 2D+t processing is intended to assist on the dynamic analysis of cell movement (tracking), being able to predict cell movements in cases of occlusion, for example. In this work we used intravital video microscopy obtained from a study of Multiple Sclerosis in mice. Noise reduction and registration techniques comprise the preprocessing step. In addition, techniques for the analysis and definition of cellular pathways comprise the post processing step. Results of 2D and 2D+t processing steps, compared with conventional visual analysis, have shown the effectiveness of the proposed approach.

Keywords: detection and tracking of leukocytes, intravital video microscopy, Hessian matrix, temporal image registration.

LISTA DE FIGURAS

2.1	Esquema básico de um microscópio de fluorescência (BLACHNICKI, 2006).	22
2.2	Exemplos de quadros de vídeo de MI sem (a) e com (b) artefatos de movimento.	23
2.3	Efeito <i>photobleaching</i> observado em uma sequência de imagens igualmente espaçadas (12 segundos) (PROLONG, 2015).	24
2.4	Mecanismo de recrutamento de leucócitos.	26
2.5	Procedimento laboratorial para a avaliação do rolamento e adesão de leucócitos na microvasculatura cerebral de camundongos.	28
3.1	Modelo desenvolvido em (EGMONT-PETERSEN et al., 2000) para modelar a distribuição de intensidade dos leucócitos e criar as imagens sintéticas de treinamento.	34
3.2	Estágios do método proposto por Sat <i>et al.</i> em (SATO et al., 1997).	35
3.3	Estágios do método proposto por Sat <i>et al.</i> em (SATO et al., 1995).	36
4.1	Diagrama com as etapas do esquema computacional desenvolvido para a detecção automática de leucócitos em imagens de vídeo de MI.	39
4.2	Sequência de imagens simuladas com (primeira linha) e sem (segunda linha) ruído Gaussiano. Cada quadro de ambas as sequências sofreu um borramento Gaussiano com valores de sigma variando entre 0 e 3.	40
4.3	Arcabouço de desenvolvimento da etapa de estabilização dos quadros de vídeo (GREGÓRIO DA SILVA et al., 2014).	44
4.4	Imagens resultantes da etapa de segmentação da região de interesse dos vídeos. (a) e (f) variância temporal dos quadros. (b) e (g) variância temporal após o borramento Gaussiano. (c) e (h) imagem binária após limiarização. (d) e (i) resultado da operação morfológica de abertura. (e) e (j) imagem resultante da análise de regiões.	49

4.5	Características de uma estrutura tubular brilhante em uma imagem 3D com fundo escuro. A direção longitudinal da estrutura é dada pelo autovetor correspondente ao autovalor de menor magnitude.	55
4.6	Resultado do processamento 2D+t. (a) Imagem espaço-temporal original formada pelo empilhamento dos quadros do vídeo e (b) imagem processada para o realce de estruturas tubulares representando a trajetória dos leucócitos no vaso sanguíneo ao longo do tempo.	57
4.7	Imagem de um objeto circular contendo as etapas das iterações de erosão aplicadas (PALÁGYI, 2015).	59
4.8	Resultados da etapa de esqueletização: (a) e (b) representam as imagens binarizadas; (c) e (d) representam os esqueletos após a aplicação do algoritmo de <i>thinning</i>	61
4.9	Exemplos de segmentos dos caminhos das células. Um caminho com uma bifurcação não necessariamente representa um elemento espúrio (ver (a)), ele pode conter parte de outro caminho que se cruza em determinado ponto (ver (b)). . .	63
4.10	Ilustração dos passos do algoritmo de separação. (a) imagem original, (b) 1ª iteração, (c) 2ª iteração, (d) 3ª iteração, (e) 4ª iteração e identificação de máximos locais como voxels em vermelho e (f) eliminação dos voxels vizinhos.	64
4.11	Os 26 vizinhos de um ponto P	65
4.12	Direções utilizadas no código da cadeia desenvolvido.	66
4.13	Exemplos de vetores de deslocamento para o cálculo da distância percorrida por uma célula. (a) Deslocamento vertical, indica que a célula está imóvel; (b) deslocamento horizontal, indica que a célula percorreu a distância de $1x$ ou $1y$; e (c) deslocamento diagonal, indica que a célula percorreu a distância de $\sqrt{x^2 + y^2}$	67
4.14	Características do cone utilizado no algoritmo para a conexão de segmentos. . .	68
4.15	Exemplo da criação dos cones para diferentes iterações do algoritmo.	70
4.16	Passos seguidos no algoritmo de conexão dos segmentos. (a) Imagem original; (b) busca na região indicada pelo cone e definição dos vetores direcionais; (c) comparação angular entre os vetores direcionais dos segmentos candidatos; (d) busca pelos pontos detectados no processamento 2D; e (e) segmentos conectados.	71

5.1	Resultados da projeção de linha. Imagens das projeções de linha antes ((a) e (c)) e depois da técnica de correção ((b) e (d)).	76
5.2	Métrica PSNR processada sobre todas as imagens residuais obtidas da subtração de pares de quadros consecutivos de ambos os vídeos. (a) e (c) valores de PSNR antes do correção; (b) e (d) valores de PSNR depois do correção das imagens.	77
5.3	Resultados do detector baseado na matriz Hessiana para a sequência de imagens simuladas sem ruído. A primeira coluna da figura ilustra as imagens simuladas originais. Os resultados diretos do método aplicado para os quatro quadros podem ser observados na segunda coluna da figura. A terceira coluna mostra as mesmas respostas em outro esquema de cores, reescalado no intervalo de [0 255].	79
5.4	Resultados do detector baseado na matriz Hessiana para a sequência de imagens simuladas com ruído Gaussiano. A primeira coluna da figura ilustra as imagens simuladas originais. Os resultados diretos do método aplicado para os quatro quadros podem ser observados na segunda coluna da figura. A terceira coluna mostra as mesmas respostas em outro esquema de cores, reescalado no intervalo de [0 255].	80
5.5	Curvas de precisão-revoção obtidas para os métodos aplicados na detecção espacial de leucócitos sobre a primeira sequência de imagens para duas marcações manuais, A e B.	81
5.6	Curvas de precisão-revoção obtidas para os métodos aplicados na detecção espacial de leucócitos sobre a segunda sequência de imagens reais de MI.	81
5.7	Exemplos de quadros processados para o vídeo 1 (primeira coluna) e 2 (segunda coluna). Linhas: 1) Quadros originais, 2) leucócitos manualmente anotados, 3) e 4) são, respectivamente, a saída do algoritmo baseado na matriz Hessiana e do <i>Template Matching</i> . Quadrados brancos indicam as detecções FPs, enquanto as circunferências em vermelho representam os FNs. Os leucócitos detectados (TPs e FPs) por ambas as técnicas são indicados como círculos verdes.	84
5.8	Análise dos valores de limiar aplicados na etapa de binarização das imagens.	85
5.9	Comparações entre os resultados do processamento 2D+t e as marcações manuais: (a) 1-A, (b) 1-B, e (c) 2. As linhas azuis indicam os pontos TPs e as linhas vermelhas os FPs.	87

5.10	Comparações entre os resultados dos processamentos 2D e 2D+t. As linhas azuis indicam os pontos TPs e as linhas vermelhas os FPs.	88
------	---	----

LISTA DE TABELAS

2.1	Breve comparação entre diferentes técnicas de imageamento utilizadas para a MI (AMORNPHIMOLTHAM; MASEDUNSKAS; WEIGERT, 2011).	23
3.1	Resultados obtidos por Tang <i>et al.</i> (TANG et al., 2002).	31
3.2	Resultados obtidos por Acton <i>et al.</i> (ACTON; WETHMAR; LEY, 2002).	31
3.3	Resultados obtidos por Ray <i>et al.</i> (RAY; ACTON, 2004).	32
3.4	Resumo comparativo dos métodos usados para a detecção/rastreamento de leucócitos em imagens de MI. O tipo de algoritmo é representado como U: unicelular e M: multicelular. O símbolo ✓ denota que o método em questão é capaz de resolver a atividade analisada (detecção, rastreamento e problemas de oclusão).	37
4.1	Possíveis padrões locais que podem ser detectados em uma imagem via análise dos autovalores λ_i da matriz Hessiana. A legenda usada é definida para os autovalores como: H=alto (<i>high</i>), L=baixo (<i>low</i>), N=ruído (<i>noisy</i>). Os sinais +/- indicam o sinal dos autovalores. Os autovalores são ordenados por suas magnitudes como: $ \lambda_1 \leq \lambda_2 \leq \lambda_3 $	52
4.2	Códigos do algoritmo e suas respectivas direções.	66
4.3	Parâmetros utilizados na definição do cone de busca nas diversas iterações.	69
5.1	Resultados encontrados para as medidas de PSNR aplicadas nos dois vídeos de MI.	76
5.2	Valores resultantes da detecção dos leucócitos para o melhor F_1 -score encontrado em ambas as técnicas. O número total de leucócitos é 5851 e 8048 para o primeiro e segundo vídeos, respectivamente.	82
5.3	Valores médios das áreas sob as curvas, $\overline{\text{AUCPRs}}$, calculados a partir das medidas de área estimadas para todos os quadros do vídeo de forma individual e com um intervalo de confiança de 95%.	83

5.4	Valores resultantes do processamento 2D+t a partir dos limiares encontrados na etapa de binarização das imagens.	85
5.5	Medidas extraídas do rastreamento celular automático para os vídeos reais de MI utilizados.	89
A.1	Contagem do número de classificações em concordância ou não, entre dois especialistas em suas anotações manuais.	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANN	Artificial Neural Networks (Redes Neurais Artificiais)
AUCPR	Area Under the Precision-Recall Curve (Área sob a curva Precisão-Revocação)
CARS	Coherent Anti-stokes Raman Scattering
CCN	Correlação Cruzada Normalizada
EAE	Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (Modelo Experimental de Esclerose Múltipla)
FLIM	Fluorescent Lifetime Imaging Microscopy
FN	False Negative (Falso-Negativo)
FP	False Positive (Falso-Positivo)
fps	Frames Per Second (quadros por segundo)
FST	Fine Science Tools
GGVF	Generalized Gradient Vector Flow
GICOV	Gradient Inverse Coefficient of Variation
GVF	Gradient Vector Flow
IC	Intervalo de Confiança
IM	Informação Mútua
IR	Infrared (Infravermelho)
ITK	Insight segmentation and registration ToolKit
MGVF	Motion Gradient Vector Flow

MI	Microscopia Intravital
MPM	MultiPhoton Microscopy
NNC	Núcleo de Neurociências
OFDI	Optical Frequency Domain Imaging
PSNR	Peak Signal-to-Noise Ratio (Relação Sinal-Ruído de Pico)
RMSE	Root Mean Square Error (Raiz do Erro Médio Quadrático)
ROC	Receiver Operating Characteristic
SHG	Second Harmonic Generation
SNC	Sistema Nervoso Central
SNR	Signal-to-Noise Ratio (Relação Sinal-Ruído)
THG	Third Harmonic Generation
TM	Template Matching (Casamento de Padrões)
TNF	Tumor Necrosis Factor
TP	True Positive (Verdadeiro-Positivo)
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	16
1.1 Contextualização e motivação	16
1.2 Objetivos	18
1.2.1 Objetivo Geral	18
1.2.2 Objetivos Específicos	19
1.3 Organização da dissertação	19
CAPÍTULO 2 – A MICROSCOPIA INTRAVITAL E O RECRUTAMENTO LEUCOCITÁRIO	20
2.1 Considerações iniciais	20
2.2 A técnica: Microscopia Intravital	21
2.3 Desafios inerentes da MI	22
2.4 Recrutamento leucocitário	25
2.4.1 Estudo do recrutamento leucocitário na microcirculação cerebral por MI	27
2.5 Parâmetros leucocitários	27
2.6 Procedimentos laboratoriais utilizados	28
2.7 Considerações finais	29
CAPÍTULO 3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: DETECÇÃO E RASTREAMENTO DE LEUCÓCITOS	30
3.1 Principais trabalhos	30

3.2	Considerações finais	37
CAPÍTULO 4 – METODOLOGIA		38
4.1	Esquema computacional	38
4.2	Banco de imagens	40
4.3	Pré-processamento	41
4.3.1	Detecção e remoção de quadros com movimentos excessivos	41
4.3.2	Redução de ruído	42
4.3.3	Realce de contraste	43
4.3.4	Estabilização do vídeo	44
4.3.5	Segmentação da região de interesse	48
4.4	Análise multiescalar da matriz Hessiana	49
4.5	Detecção	52
4.5.1	Processamento 2D (espacial)	52
4.5.1.1	<i>Detecção de estruturas em forma de bolha a partir da matriz Hessiana</i>	<i>53</i>
4.5.1.2	<i>Casamento de padrões por correlação (Template Matching)</i>	<i>54</i>
4.5.2	Processamento 2D+t (espaço-temporal)	54
4.6	Pós-processamento	57
4.6.1	Pós-processamento 2D (espacial)	57
4.6.2	Pós-processamento 2D+t (espaço-temporal)	58
4.6.2.1	Esqueletização	59
4.6.2.2	Estruturação dos esqueletos	62
	Separação dos caminhos	62
	Código da Cadeia 3D	65
4.7	Refinamento e combinação dos processamentos	67
4.8	Métodos de análise	71

4.8.1	Análise da estabilização dos vídeos de MI	71
4.8.2	Análise da detecção 2D (espacial)	72
4.8.3	Análise da detecção 2D+t (espaço-temporal)	73
4.8.4	Análises comparativas	74
4.9	Considerações finais	74
CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES		75
5.1	Resultados da etapa de pré-processamento	75
5.2	Resultados do processamento 2D (espacial)	77
5.2.1	Primeiro experimento: imagens simuladas	78
5.2.2	Segundo experimento: imagens reais	78
5.3	Resultados do processamento 2D+t (espaço-temporal)	83
5.4	Considerações finais	89
CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES FINAIS		90
6.1	Conclusões	90
6.2	Contribuições	91
6.3	Trabalhos publicados e submetidos relacionados à pesquisa	92
6.4	Sugestões para trabalhos futuros	93
APÊNDICE A – DERIVAÇÃO DO ÍNDICE DE CONCORDÂNCIA		94
REFERÊNCIAS		96

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

Este capítulo apresenta o problema investigado neste trabalho e a motivação por trás da pesquisa, servindo como introdução ao conteúdo apresentado nos capítulos seguintes.

1.1 Contextualização e motivação

O envolvimento da microcirculação no insulto inflamatório é compreendido por complexas interações e mecanismos biológicos de doenças associadas a diversas condições inflamatórias (PITTET; WEISSLEDER, 2011; SUMEN et al., 2004). Apesar da existência de um diversificado conjunto de sistemas experimentais *in vitro* para a sondagem da morfologia e de funções moleculares de células imunológicas, o cenário mais eficaz (quando não único) para a medição desses atributos continua sendo por meio de técnicas *in vivo*.

Devido a desejáveis características, como grande profundidade focal e alta resolução espacial e temporal, a microscopia intravital – MI (ELLINGER; HIRT, 1929, 1930) – tornou-se uma ferramenta essencial para o estudo de sistemas biológicos *in vivo*, proporcionando a visualização do comportamento de células do sistema imune em órgãos linfoides e em tecidos periféricos. Com o seu uso é possível, por exemplo, avaliar o tráfego celular *in vivo* nos diferentes contextos inflamatórios, facilitando a compreensão de mecanismos imunológicos de doenças e permitindo o desenvolvimento de novos fármacos (PINHO et al., 2011; ACTON; WETHMAR; LEY, 2002). Sua prática levou ainda a inúmeras descobertas em relação aos mecanismos moleculares, biofísicos e à adesão de leucócitos às células endoteliais (SUMEN et al., 2004).

Técnicas semiautomáticas de rastreamento de células migratórias (LACKIE; CHAABANE; CROCKET, 1987) aplicadas a imagens de vídeo obtidas de experimentos *in vitro* têm sido usadas com relativo sucesso. Nesses casos, os principais métodos usados são os rastreadores de cen-

troides (GHOSH; WEBB, 1994; DIVIETRO et al., 2001), que usam a intensidade do centro de massa da célula para o rastreamento de sua posição em uma sequência de imagens, e os rastreadores por correlação (GELLES; SCHNAPP; SHEETZ, 1988; ANDERSON et al., 1992; KUSUMI; SAKO; YAMAMOTO, 1993; GUILFORD; GORE, 1995; SCHÜTZ; SCHINDLER; SCHMIDT, 1997), que utilizam uma ou mais imagens de uma determinada célula como referência e realizam a correlação da(s) mesma(s) com as imagens de vídeo a fim de determinar a presença e localização daquela célula na sequência de imagens.

Diferente do que ocorre nas análises *in vitro*, onde as condições de aquisição das imagens podem ser controladas, nas análises *in vivo* pela MI a contagem e a avaliação dos leucócitos rolantes e aderidos nas paredes dos vasos sanguíneos são realizadas visualmente por um especialista. No entanto, a análise visual é um trabalho repetitivo, consome muito tempo e, dependendo do grau de resposta inflamatória, pode afetar significativamente a precisão das medições devido à fadiga visual do observador (ACTON; RAY; DONG, 2005).

Portanto, o desenvolvimento de métodos automáticos para a análise de experimentos *in vivo* é uma tarefa de grande importância e interesse para muitos laboratórios de análises clínicas e de pesquisa. No entanto, uma série de fatores que degradam a qualidade das imagens (e limitam uma solução eficaz) precisam ser considerados durante o desenvolvimento de um sistema automático de processamento de imagens de MI, dos quais pode-se citar: (a) baixa relação sinal-ruído (*signal-to-noise ratio* – SNR), (b) variações na iluminação das imagens e na intensidade das células marcadas ao longo do tempo (efeito *photobleaching* (ANDRESEN et al., 2012)), (c) oclusão de células e imagens com fundos complexos (*clutter*), ou seja, com alta densidade de células presentes e (d) borramento e artefatos de movimento, causados principalmente pela respiração e batimento cardíaco do animal em estudo (ACTON; RAY, 2004; RAY; ACTON, 2004). Dentre os diversos problemas citados, os borrarmentos e os artefatos de movimento são os mais limitantes para o sucesso do processamento automático das imagens de vídeo de experimentos *in vivo*. Embora esse problema possa ser minimizado por meio da aplicação de técnicas para a estabilização do vídeo, dependendo da região anatômica analisada, o movimento que afeta as imagens pode ser bastante complexo (com componentes horizontais e verticais), sendo necessária a aplicação de técnicas de restauração de imagens. O problema mais evidente que o movimento pode acarretar é a perda momentânea das posições espaciais dos leucócitos, causando falhas no rastreamento dessas células (ACTON; WETHMAR; LEY, 2002) e, por consequência, gerando falsas estatísticas em relação à dinâmica das mesmas.

Devido às limitações mencionadas acima, os algoritmos usados em análises *in vitro*, em geral, não são suficientemente robustos para o uso em imagens *in vivo* de MI. A intensidade

do centroide usada por rastreadores de centroide, por exemplo, não é um atributo robusto à presença de ruído ou ao efeito *photobleaching*. Rastreadores por correlação, além de sofrerem com os mesmos problemas dos rastreadores de centroide, também são incapazes de realizar com sucesso o rastreamento de alvos deformáveis, presentes na etapa de transmigração dos leucócitos, e também de lidar com o problema de oclusão de células.

Portanto, embora o processamento quadro a quadro das imagens de MI para a detecção e segmentação dos leucócitos possa ser realizado de maneira satisfatória para o caso de vídeos estabilizados e imagens com bom contraste, o problema de movimento discutido anteriormente pode degradar significativamente o rastreamento das células. Nesse contexto, este trabalho de pesquisa envolve a utilização de diversas técnicas como etapa de pré-processamento e segue uma abordagem que visa combinar os resultados da detecção dos leucócitos quadro a quadro no vídeo (processamento 2D) e os resultados da segmentação tridimensional (3D=2D+t) do volume formado pelo empilhamento dos quadros do vídeo. Assim, enquanto o processamento 2D do vídeo pode produzir informações mais precisas sobre a morfologia das células, o processamento 2D+t (análise espaço-temporal) pode auxiliar tanto na análise da dinâmica das células, quanto na eliminação de ambiguidades decorrentes da sobreposição das mesmas (problema de oclusão).

1.2 Objetivos

Os objetivos geral e específicos deste trabalho de pesquisa são listados nas subseções seguintes.

1.2.1 Objetivo Geral

O objetivo principal deste trabalho é a pesquisa e o desenvolvimento de um sistema computacional automático para auxiliar na detecção e rastreamento de leucócitos em imagens de vídeo de MI de experimentos *in vivo* do cérebro de camundongos. O desenvolvimento do sistema é baseado em técnicas de processamento de imagens e visão computacional combinando informações espaciais, obtidas do processamento 2D quadro a quadro do vídeo, e temporais, obtidas do processamento 2D+t da pilha formada pelos quadros do vídeo.

1.2.2 Objetivos Específicos

Para tornar possível o desenvolvimento do sistema proposto, alguns objetivos específicos foram definidos:

- Selecionar um subconjunto de quadros consecutivos de vídeos de MI do cérebro de camundongos para serem usados no desenvolvimento e teste dos métodos;
- Efetuar a marcação manual dos centroides dos leucócitos em todos os quadros dos subconjuntos selecionados;
- Realizar a integração das diferentes etapas (redução de ruído, estabilização de movimento, segmentação da região de interesse etc.) do pré-processamento das imagens;
- Testar e avaliar a robustez dos métodos envolvidos no pré-processamento;
- Desenvolver e avaliar quantitativamente técnicas para a detecção dos leucócitos - processamento 2D;
- Desenvolver e avaliar quantitativamente a técnica de detecção de estruturas tubulares no processamento 2D+t;
- Analisar a combinação das informações do processamento 2D com os resultados obtidos no processamento 2D+t;
- Testar e avaliar a robustez do método desenvolvido em imagens reais de MI;
- Gerar as estatísticas finais para o recrutamento leucocitário.

1.3 Organização da dissertação

Este trabalho é composto por seis capítulos, incluindo este primeiro. No segundo capítulo são abordadas as informações necessárias para contextualizar o leitor no tema da pesquisa, referindo-se à técnica de imageamento pela MI e suas possíveis aplicações. No terceiro capítulo encontra-se a revisão bibliográfica contendo a descrição dos principais trabalhos publicados, relacionados à detecção e rastreamento de leucócitos em imagens de MI. O quarto capítulo apresenta de maneira detalhada a metodologia usada neste trabalho, abordando todas as técnicas desenvolvidas dentro do que foi proposto. No quinto capítulo são apresentados os resultados obtidos das diferentes etapas de desenvolvimento do trabalho e, por fim, no último e sexto capítulo são expostas as conclusões e as ideias para trabalhos futuros.

Capítulo 2

A MICROSCOPIA INTRAVITAL E O RECRUTAMENTO LEUCOCITÁRIO

Este capítulo apresenta informações importantes referentes à técnica de MI e sua aplicação no contexto do trabalho. As seções seguintes dividem-se entre uma descrição sobre o funcionamento de um microscópio de fluorescência, os desafios inerentes da técnica de MI, suas aplicações e os procedimentos laboratoriais realizados para a aquisição das imagens utilizadas neste trabalho.

2.1 Considerações iniciais

Nas duas últimas décadas a biologia celular tem se desenvolvido de maneira muito rápida, devido principalmente às novas técnicas de imageamento de células em culturas. Porém, apesar do cultivo celular ser um sistema muito flexível e de fácil manuseio, tanto pelo especialista quanto geneticamente, modelos *in vitro* nem sempre reconstituem perfeitamente o ambiente tecidual dos animais sob determinadas condições fisiológicas (WEIGERT et al., 2010). Por exemplo, análises em culturas celulares realizadas sobre superfícies de vidro ou plástico, que são as mais comuns, sofrem com a perda da organização celular tridimensional, que é um processo celular crucial em alguns casos (CUKIERMAN et al., 2001). Além disso, mesmo em modelos tridimensionais, que também são muito utilizados atualmente, pode haver a perda de componentes essenciais no ambiente analisado, como moléculas de sinalização¹ e outros tipos de células (CUKIERMAN et al., 2001; GHAJAR; BISSELL, 2008; XU; BOUDREAU; BISSELL, 2009). Com isso, grandes esforços estão sendo direcionados ao imageamento e, conseqüentemente, ao estudo de eventos celulares em órgãos de animais vivos, com o objetivo de alcançar as mesmas capaci-

¹As moléculas de sinalização de origem celular podem pertencer a várias famílias de substâncias bioquímicas e atuam como mensageiras entre duas células pouco distantes entre si.

dades de análise dos modelos *in vitro* disponíveis. Dentre as técnicas de obtenção de imagens para estudos *in vivo* destaca-se a microscopia intravital, a qual foi utilizada para a obtenção das imagens utilizadas neste trabalho de pesquisa.

2.2 A técnica: Microscopia Intravital

O recente desenvolvimento de tecnologias direcionadas a proteínas fluorescentes e a microscópios de fluorescência para aplicações em análises de células vivas, resultou em uma enorme avalanche de informações referentes a quase todos os processos celulares imagináveis, causando um avanço significativo no conhecimento englobado pela biologia celular (MASEDUNSKAS et al., 2012). Dentre as técnicas de microscopia desenvolvidas destaca-se a microscopia intravital, que é uma ferramenta sofisticada de pesquisa que permite observar *in vivo* a microcirculação em órgãos de animais anestesiados ou conscientes e também analisar interações biológicas complexas e de mecanismos potenciais de doenças (PITTET; WEISSLEDER, 2011).

A MI pode revelar respostas em análises celulares na forma espacial e temporal, podendo ser conduzida sob condições próximas àquelas encontradas em um ambiente natural. Essa característica se sobrepõe às técnicas *in vitro* por, justamente, ser capaz de reproduzir interações celulares de forma mais realística. Isso se dá pelo fato de que as células em análise têm seu comportamento influenciado por diversos fatores, incluindo os gradientes de citocinas, as interações com outros componentes celulares e extracelulares, a compartimentalização anatômica e as forças do fluxo sanguíneo (PITTET; WEISSLEDER, 2011).

A técnica de MI é baseada na microscopia de fluorescência, ou seja, na geração de contraste pela excitação dos níveis de energia de uma molécula por intermédio de um componente geralmente designado como fluoróforo ou fluorocromo. A excitação é obtida por meio da iluminação da amostra a partir de uma fonte de luz, como uma lâmpada de mercúrio ou um laser, que fornece fótons com comprimentos de onda variando entre o ultravioleta (UV) e o infravermelho (IR).

Em um microscópio de fluorescência, o comprimento de onda da iluminação é definido pelo uso de um filtro (filtro de excitação - localizado após a fonte de luz) que limita a transmissão de luz a uma estreita faixa de comprimentos de onda. A luz então incide sobre um espelho dicróico (separador de feixes) e é refletida para baixo, através da lente objetiva, e sobre a amostra. Moléculas de dentro da amostra absorvem a excitação primária e reemitem uma luz de maior comprimento de onda (de menor energia). A lente objetiva coleta a luz fluorescente emitida, que passa então através do espelho dicróico. Qualquer luz de excitação indesejada é bloqueada

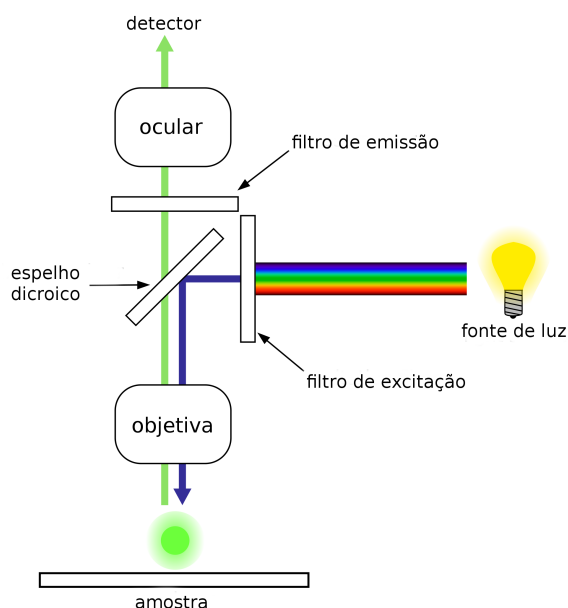


Figura 2.1: Esquema básico de um microscópio de fluorescência (BLACHNICKI, 2006).

por um terceiro filtro (filtro de emissão ou de barreira). Assim, apenas a luz emitida a partir de moléculas fluorescentes da amostra é observada e/ou registrada. Na Figura 2.1 é possível observar o esquemático de um microscópio de fluorescência.

Existem, basicamente, duas principais modalidades de excitação de luz: linear e não-linear. A primeira, que é utilizada em instrumentos convencionais como microscópios fluorescentes e confocais, é baseada no fato de que a intensidade de emissão é linear em relação à intensidade da luz de excitação. A segunda é baseada nas mais complexas e não-lineares interações entre a luz incidente e a amostra, situação em que ambas absorvem ou espalham e recombina dois ou mais fótons (AMORNPHIMOLTHAM; MASEDUNSKAS; WEIGERT, 2011). As diversas e singulares propriedades dos processos não-lineares levaram ao desenvolvimento de múltiplas modalidades de imageamento, que têm sido amplamente exploradas com o intuito de gerar imagens em alta resolução em organismos vivos. As modalidades mais utilizadas para a MI podem ser observadas na Tabela 2.1.

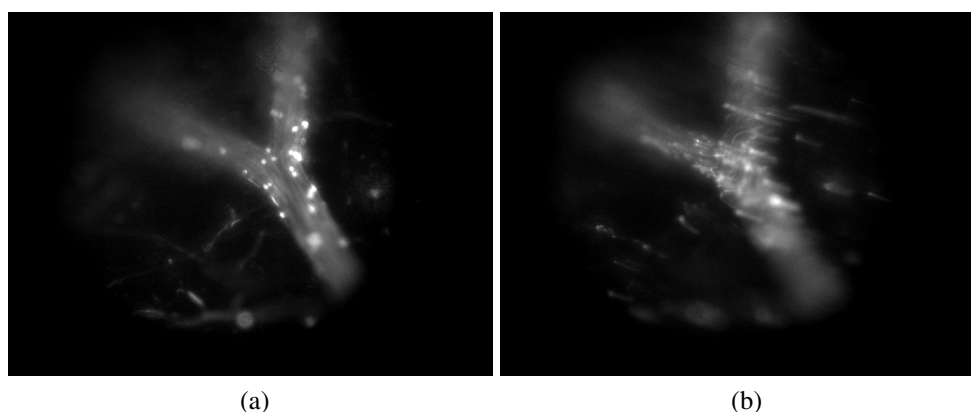
2.3 Desafios inerentes da MI

Diferente do que ocorre na análise *in vitro*, na qual as condições de aquisição das imagens podem ser controladas, o desenvolvimento de métodos automáticos de análise *in vivo* em MI apresenta enormes desafios para pesquisadores devido a vários fatores que afetam diretamente a qualidade das imagens, dos quais citam-se:

Tabela 2.1: Breve comparação entre diferentes técnicas de imageamento utilizadas para a MI (AMORNPHIMOLTHAM; MASEDUNSKAS; WEIGERT, 2011).

Técnica de imageamento	Vantagens	Limitações
<i>Single photon microscopy</i>	Alta resolução temporal Alta resolução espacial	Penetração tecidual (50 - 60 μ m) Fototoxicidade e <i>photobleaching</i> Emissão fora de foco
<i>Multiphoton microscopy</i> (MPM)	Penetração tecidual profunda (centenas de microns) Sem emissão fora de foco Fototoxicidade e <i>photobleaching</i> reduzidos	Resolução temporal
<i>Second and third harmonic generation</i> (SHG e THG)	Imageamento de moléculas endógenas Sem emissão fora de foco Fototoxicidade e <i>photobleaching</i> reduzidos	Resolução temporal Penetração tecidual
<i>Coherent anti-Stokes Raman scattering</i> (CARS)	Imageamento de moléculas endógenas Fototoxicidade e <i>photobleaching</i> reduzidos	Resolução temporal Penetração tecidual
<i>Fluorescent lifetime imaging microscopy</i> (FLIM)	Penetração tecidual profunda (similar ao MPM) Informação metabólica no microambiente tecidual	Resolução temporal
<i>Optical frequency domain imaging</i> (OFDI)	Penetração tecidual profunda (mais do que 1mm) Aquisição rápida dos dados Fototoxicidade e <i>photobleaching</i> reduzidos Não é necessário para rotulagem exógena	Menor resolução temporal que MPM

Borramento e artefatos de movimento Movimentos peristálticos ou mesmo aqueles causados pela respiração e batimento cardíaco do animal, podem resultar em uma combinação de deslocamentos verticais e horizontais do órgão em análise. Essa combinação de movimentos tem como principal consequência a perda momentânea de foco do microscópio que, mesmo utilizando a opção de auto-ajuste focal, é incapaz de corrigir seu plano focal a tempo, gerando assim imagens borradas e trêmulas. A Figura 2.2 ilustra um exemplo de dois quadros de um vídeo de MI utilizado neste trabalho de pesquisa. O quadro mais à esquerda (Figura 2.2(a)) representa uma imagem sem artefatos de movimento, enquanto o quadro mais à direita (Figura 2.2(b)) uma imagem borrada e trêmula, o que dificulta muito as condições de análise.

**Figura 2.2: Exemplos de quadros de vídeo de MI sem (a) e com (b) artefatos de movimento.**

Com o intuito de minimizar os movimentos, primeiramente deve-se realizar procedimentos cirúrgicos específicos e posicionar devidamente os órgãos expostos. Porém, mesmo após a aplicação de anestésias e tentativas de estabilização por meio de aparatos mecânicos, os movimentos podem persistir dependendo do órgão em análise. Em procedimentos realizados na medula espinhal ou no cérebro de animais (como no caso deste trabalho), por exemplo, a introdução de mecanismos físicos para a estabilização é uma tarefa arriscada, pois pode induzir efeitos celulares não desejáveis. Como resultado, tem-se uma sequência de imagens contendo artefatos de movimento que podem obstruir estruturas de interesse, complicar a caracterização de mudanças estruturais e causar falsas estatísticas na quantificação de objetos, como a perda de uma ou mais células no processo de detecção e rastreamento.

Efeito *photobleaching* O fenômeno do *photobleaching* (ou da tradução literal, fotodegradação) ocorre quando o fluoróforo perde permanentemente a habilidade de fluorescer devido a danos químicos induzidos por fótons e modificações covalentes. O número médio de ciclos de excitação ou emissão que ocorrem em um determinado fluoróforo antes do efeito *photobleaching* é dependente da estrutura molecular e do ambiente local. Alguns fluoróforos “degradam” rapidamente depois de emitir apenas alguns fótons, enquanto outros, mais robustos, podem sofrer milhares ou milhões de ciclos antes do efeito ter início. Como consequência, tem-se uma perda gradual de contraste nas imagens em análise, como pode ser visto na Figura 2.3, por exemplo.

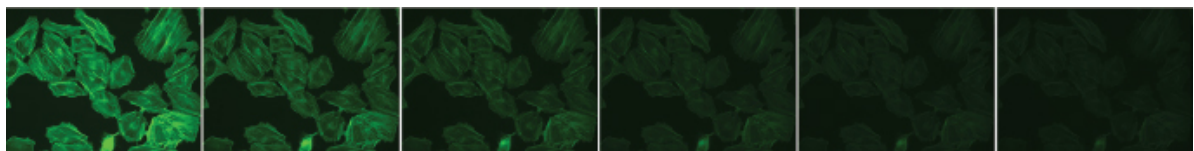


Figura 2.3: Efeito *photobleaching* observado em uma sequência de imagens igualmente espaçadas (12 segundos) (PROLONG, 2015).

O efeito *photobleaching* pode ser reduzido limitando-se o tempo de exposição dos fluoróforos sob a fonte de luz (tempo de exposição do animal) ou diminuindo-se a energia de excitação aplicada. Entretanto, essas abordagens também podem restringir o período de observação da amostra e reduzir o sinal de fluorescência mensurável.

Perda de contraste e oclusão celular Considerando que as estruturas da microcirculação são tridimensionais, o imageamento por MI sofre ainda com a localização espacial dos objetos de interesse. Conforme as células marcadas com fluorescência se afastam ou se aproximam do plano focal do microscópio, elas sofrem uma perda de contraste considerável. O mesmo pode

ser dito daquelas que se encontram sob um complexo ambiente formado por diferentes células presentes na microcirculação. A presença dessas células em alta densidade pode causar uma poluição visual (*clutter*), ou mesmo a completa oclusão do objeto em análise, prejudicando o acompanhamento celular, por exemplo.

Entrada e saída de células do campo de visão A dinâmica celular também é um fator que deve ser levado em consideração em análises *in vivo*. A entrada e saída de células do campo de visão do microscópio acontece de maneira contínua e pode atrapalhar o rastreamento automático. O desaparecimento de uma célula em rastreamento deve ser devidamente analisado com o intuito de descobrir se ocorreu uma oclusão celular ou se a célula simplesmente saiu do campo de visão. O mesmo ocorre com o surgimento de novas células no decorrer do vídeo, que pode caracterizar o aparecimento de uma nova célula no campo de visão ou apenas a reaparição de uma célula, já em análise, após uma oclusão.

Conjunto de validação A fim de validar quantitativamente um método automático desenvolvido para a detecção e rastreamento de células em imagens de MI é importante que os seus resultados sejam comparados com os resultados obtidos da análise visual de um ou mais operadores especializados (pesquisadores ou técnicos laboratoriais). A medida de variação inter e intra observadores é de grande importância para que um intervalo de confiança possa ser definido e, assim, permitir que o método desenvolvido seja analisado.

Embora o imageamento de diferentes órgãos pela MI apresente características distintas, os problemas listados acima devem ser considerados no desenvolvimento de algoritmos para a detecção e rastreamento de células, independentemente do órgão ou tecido sendo analisado.

2.4 Recrutamento leucocitário

Em meados do século XIX uma forma rudimentar da MI, mesmo sendo realizada de maneira mais simplória e em tecidos superficiais praticamente transparentes, já revelava que o fluxo sanguíneo ocorria dentro de microvasos (LEEUEWENHOEK; HOOLE, 1800) e que a movimentação dos leucócitos podia extravasar de forma ativa para dentro dos tecidos lesionados (DUTROCHET, 1824; WAGNER, 1839). Entretanto, somente em 1843 o pesquisador W. Addison (ADDISON, 1843) finalmente relatou a descoberta do envolvimento da microcirculação no insulto inflamatório por meio das interações leucócito-endotélio.

A inflamação, classicamente descrita como “inchaço, vermelhidão, quente e dolorosa”, é produzida em uma área do corpo como uma reação a um ferimento ou infecção (GAVINS; CHATTERJEE, 2004). A geração eficaz de uma resposta imune a essa inflamação é criticamente dependente da habilidade de leucócitos migrarem do sangue em direção ao foco inflamatório. Esse processo é mediado por uma sequência de interações de diferentes moléculas de adesão sobre os leucócitos e sobre células endoteliais dos vasos sanguíneos. Entre essa cascata de eventos envolvidos no recrutamento leucocitário, inclui-se o contato inicial dessas células com o endotélio vascular, o rolamento (fraca e firme adesão sobre o endotélio), a quimiotaxia e a migração dessas células do fluxo sanguíneo para o tecido foco da inflamação (HYNES; LANDER, 1992).

As interações iniciam-se com um contato do leucócito circulante com o endotélio vascular. Após esse contato, o leucócito rola ao longo da parede do vaso e há uma forte redução de sua velocidade. Esse processo é mediado por moléculas de adesão da família das selectinas e seus respectivos carboidratos ligantes ou por α 4-integrinas (LUSTER; ALON, 2005). Após a captura inicial dos leucócitos por essas moléculas, inicia-se o processo de rolamento. A interação das integrinas com as imunoglobulinas causa redução na velocidade de rolamento e estabiliza a interação leucócito-endotélio, resultando no aprisionamento e firme adesão da célula ao endotélio vascular (STEEBER; CAMPBELL, 1998). Esse processo conduz finalmente à diapedese (migração dos leucócitos para o tecido). A Figura 2.4 ilustra resumidamente os processos que envolvem o recrutamento leucocitário descrito.

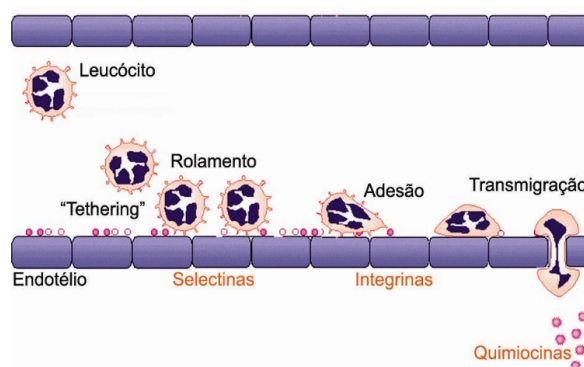


Figura 2.4: Mecanismo de recrutamento de leucócitos.

Por meio da MI é possível estudar o movimento dos leucócitos na microcirculação e, conseqüentemente, as funções efetoras que englobam a capacidade dos leucócitos em engolfar (fagocitar), eliminar e digerir vários patógenos. Pode-se dizer, portanto, que o recrutamento de leucócitos tem um importante papel na resposta imunológica e, por ser possível observá-lo mediante análises de vídeos de MI, essa técnica tornou-se uma ferramenta essencial em diversas áreas, como a neurobiologia, imunologia, biologia de tumores (MASEDUNSKAS et al., 2012) e

para a indústria farmacêutica, com o estudo de novos fármacos, identificando e validando sua eficácia (ou falha).

2.4.1 Estudo do recrutamento leucocitário na microcirculação cerebral por MI

A microcirculação cerebral, a qual será o alvo dos estudos deste trabalho de pesquisa, é totalmente diferente dos outros leitos vasculares. Os vasos da pia-máter podem apresentar um diâmetro entre 20-120 μm , existe uma extensa rede capilar envolvida e a velocidade do fluxo sanguíneo é maior que em outros tecidos, como por exemplo, no fígado. O fluxo também possui uma característica que é típica da microcirculação cerebral: os capilares apresentam um fluxo intermitente e as artérias e veias de pequeno e médio calibre apresentam um fluxo oscilante, isto é, o sangue pode fluir em uma direção e logo depois em outra direção dentro do mesmo segmento de vaso sanguíneo (ROSENBLUM; ZWEIFACH, 1963).

O recrutamento de leucócitos dentro do sistema nervoso central (SNC) é mais complicado devido à presença de uma rede contínua de junções fechadas e da falta de fenestras. Essa estrutura que limita as trocas entre substâncias solúveis (hormônios, citocinas e imunoglobulinas) e o sangue constitui a barreira hematoencefálica. O cérebro tem sido considerado um “órgão imuno-privilegiado” pela presença dessa barreira, que impede a indução de recrutamento de leucócitos. Estudos relacionados ao recrutamento leucocitário na microcirculação cerebral por MI têm sido conduzidos pela Profa. Dra. Juliana Carvalho Tavares (SANTOS et al., 2005, 2008; MARTIN et al., 2010). Tais estudos observaram, por meio da técnica de MI do cérebro de camundongos, o recrutamento de leucócitos na microcirculação cerebral após a indução do modelo experimental de Esclerose Múltipla (EAE).

2.5 Parâmetros leucocitários

Neste trabalho, os leucócitos foram considerados aderidos ao endotélio venular se permanecessem estacionados por um período mínimo de 10 segundos. Os leucócitos rolantes foram aqueles que se moveram a uma velocidade menor que a dos eritrócitos e para medir a adesão, vasos da pia-máter com diâmetro entre 50-120 μm foram utilizados.

2.6 Procedimentos laboratoriais utilizados

As imagens utilizadas neste trabalho foram obtidas do Núcleo de Neurociências (NNC) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os procedimentos laboratoriais descritos a seguir e apresentados resumidamente no desenho esquemático da Figura 2.5, foram realizados pela Profa. Dra. Juliana Carvalho Tavares, colaboradora desta pesquisa.

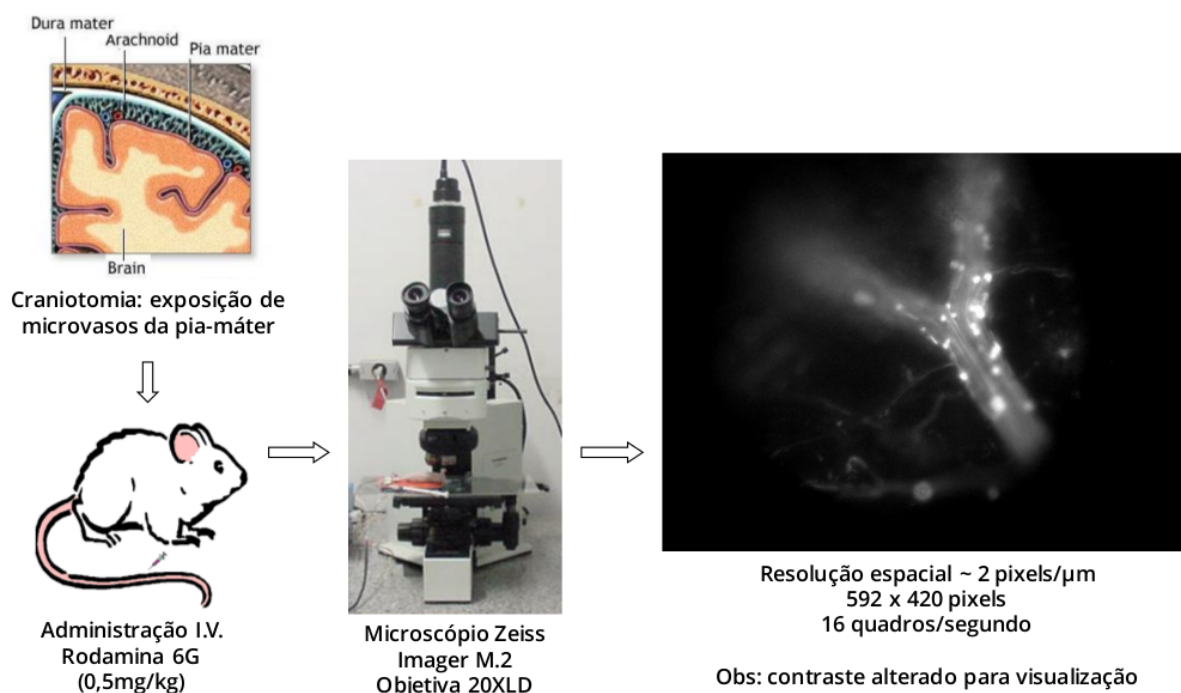


Figura 2.5: Procedimento laboratorial para a avaliação do rolamento e adesão de leucócitos na microvasculatura cerebral de camundongos.

Primeiramente, os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina (10 mg/kg, Rompun, Bayer) e Ketamin S+ (200 mg/Kg, Laboratório Cristália, SP), injetada por via intraperitoneal. A veia da cauda foi canulada para a administração de Rodamina 6G e de reagentes experimentais e volumes adicionais de anestésico, quando necessário. A Rodamina 6G é um corante fluorescente para os leucócitos, que se acumula nas mitocôndrias e possibilita a visualização dos leucócitos mesmo na presença de uma velocidade de fluxo alta. A temperatura corporal foi continuamente monitorada com um sensor introduzido no reto e mantida a 37°C com uma manta térmica (*Fine Science Tools*, FST, Vancouver, Canadá) colocada em contato com o corpo do animal. A craniotomia foi realizada na região parietal utilizando uma mini broca (FST). A dura-máter foi removida e os vasos da pia-máter foram visualizados. Para a observação dos eventos microcirculatórios nos vasos cerebrais dos camundongos, um microscópio Zeiss Imager M.2 (*Thornwood*, NY) com objetiva 20XLD foi utilizado. O equipamento possui uma câmera de vídeo (*Optronics*) montada no microscópio e projeta a imagem em um

monitor para visualização dos eventos leucocitários em tempo real. As imagens são gravadas diretamente em um computador acoplado ao equipamento para posterior análise. Atualmente, os eventos leucocitários (número de leucócitos aderidos e em rolamento) são determinados por análise visual das imagens de vídeo.

2.7 Considerações finais

Ao longo deste capítulo foram apresentadas informações importantes e necessárias para embasar o uso da técnica de MI no contexto deste trabalho de pesquisa como, por exemplo, detalhes físicos e químicos da formação das imagens, os desafios inerentes da técnica, o que é possível analisar em uma abordagem como essa e a descrição completa dos procedimentos laboratoriais realizados para a aquisição das imagens utilizadas. No próximo capítulo serão abordadas em mais detalhes as principais técnicas propostas na literatura relacionadas à detecção e rastreamento de células em imagens de MI.

Capítulo 3

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: DETECÇÃO E RASTREAMENTO DE LEUCÓCITOS

Técnicas semiautomáticas de rastreamento de células migratórias (LACKIE; CHAABANE; CROCKET, 1987) aplicadas a imagens de vídeo obtidas de experimentos in vitro têm sido usadas com relativo sucesso, porém não funcionam de maneira satisfatória em análises in vivo. Embora o processamento das imagens em MI seja mais difícil (devido à fatores como os citados na Seção 2.3), essa técnica de imageamento possibilita uma caracterização valiosa para as interações entre as células e os vasos/tecidos, o que não é totalmente possível em análises in vitro. Este capítulo trata, portanto, das técnicas propostas na literatura que estão relacionadas à aplicação deste trabalho, ou seja, aos diferentes métodos desenvolvidos para a detecção e rastreamento de leucócitos em análises in vivo de MI.

3.1 Principais trabalhos

No caso de imagens de vídeo obtidas por meio de experimentos *in vitro*, os principais métodos encontrados na literatura são: (1) os rastreadores de centroides (GHOSH; WEBB, 1994; DIVIETRO et al., 2001), (2) os rastreadores por correlação ou *template matching* (GELLES; SCHNAPP; SHEETZ, 1988; ANDERSON et al., 1992; KUSUMI; SAKO; YAMAMOTO, 1993; GUILFORD; GORE, 1995; SCHÜTZ; SCHINDLER; SCHMIDT, 1997), e (3) os rastreadores por contornos ativos ou *snakes* (KASS; WITKIN; TERZOPOULOS, 1987). A fim de comparar essas técnicas em vídeos de MI, Tang *et al.* (TANG et al., 2002) realizaram experimentos em 100 vídeos. A avaliação dos métodos foi realizada usando o número médio de quadros rastreados (44,1 quadros para o método de correlação, 9,7 para o rastreador de centroides e 80 para *snakes*) e o valor da raiz do erro médio quadrático (RMSE) calculado em micrômetros (25 μm para o método de correlação, 43,3 μm para o rastreador de centroides e 2,8 μm para *snakes*) sobre a distância entre a célula

detectada e a sua posição correspondente na marcação manual. Os autores constataram que o método de contornos ativos produziu melhores respostas em vídeos de experimentos *in vivo* se comparado aos demais.

As mesmas técnicas usadas por Tang *et al.* (TANG *et al.*, 2002) foram também aplicadas por Goobic *et al.* (GOOBIC *et al.*, 2001) em vídeos de análises *in vivo* com tratamento TNF- α ¹ realizadas no músculo cremaster de ratos. Os autores relataram ainda o uso dos métodos super-rastreadores de centroide e super-correlação, que são modificações dos métodos tradicionais. Seus resultados, sumarizados na Tabela 3.1, incluem o valor médio da porcentagem de quadros rastreados e o valor médio do RMSE para cada uma das cinco técnicas avaliadas.

Tabela 3.1: Resultados obtidos por Tang *et al.* (TANG *et al.*, 2002).

Técnica	Média de quadros rastreados (%)	RMSE médio (μm)
Rastreador de centroide	39,01	6,22
Rastreador por correlação	71,11	3,41
Rastreador de super-centroide	61,23	4,87
Rastreador de super-correlação	90,41	1,94
Contornos ativos	100	0,33

A ideia do *template matching* adaptativo, já abordada nos métodos de super-centroide e super-correlação em (GOOBIC *et al.*, 2001), foi aplicada diretamente por Acton *et al.* (ACTON; WETHMAR; LEY, 2002) no rastreamento de leucócitos em imagens de MI do músculo cremaster de ratos. Os experimentos foram realizados com e sem o tratamento TNF- α . A abordagem proposta por Acton *et al.* envolveu, além do uso de *templates* adaptativos, o corregristo dos quadros usando imagens de bordas, a eliminação de ruídos por filtragem morfológica e o tratamento de oclusões das células pelo filtro de Kalman. Uma janela foi criada em torno do ponto selecionado (manualmente) para a formação do *template* da célula inicial. Os *templates* em quadros posteriores (adaptados) foram então atualizados conforme seus antecessores. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Resultados obtidos por Acton *et al.* (ACTON; WETHMAR; LEY, 2002).

Medida de avaliação	Com TNF-α	Sem TNF-α
Velocidade média dos leucócitos rolantes ($\mu\text{m/s}$)	5,6 \pm 0,4	20,3 \pm 0,4
Desvio padrão da velocidade média observada (%)	6,9	5,6
Média da diferença absoluta das posições dos centroides (μm)	1,2	4
Valor médio do RMSE para a velocidade dos leucócitos (%)	12	8

Segundo Acton, esses resultados se mostraram superiores quando comparados ao método de rastreamento por centroides. Embora o método proposto no trabalho de Acton levou em

¹*Tumor Necrosis Factor α* : tratamento das vênulas que é capaz de aumentar a resposta inflamatória e diminuir a velocidade das células rolantes.

consideração possíveis mudanças morfológicas que os leucócitos podem ter durante a técnica de MI, as limitações referentes à identificação manual das células iniciais (atividade não desejada) e à correta adaptação do *template* no caso em que as células se encontram oclusas, não foram tratadas.

Ray *et al.* (RAY; ACTON; LEY, 2002) propuseram o uso de contornos ativos para a detecção e rastreamento de leucócitos usando restrições de forma e escala dos leucócitos para a formulação do funcional de energia. Como energia externa, adotou-se o campo GGVF (*Generalized Gradient Vector Flow*) (XU; PRINCE, 1998b, 1998a). Os resultados obtidos foram comparados com marcações manuais e com os resultados das técnicas de rastreamento por centroides e correlação. Os valores médios do RMSE em relação às posições dos leucócitos detectados e manualmente anotados para as imagens com e sem tratamento, foram, respectivamente, de 0,5 μm e 4,6 μm , com desvio padrão de 0,2 μm e 6,2 μm . A média (\pm desvio padrão) de quadros rastreados atingiu $99,9 \pm 0,3\%$ nas imagens tratadas e $74,4 \pm 33,4\%$ nas demais. As principais limitações desse método são: alto custo computacional, instabilidades em relação à inicialização dos pontos de controle do contorno, inicialização manual e limitada a uma margem de erro de 3 a 4 pixels do centro do leucócito e, por fim, o método não trata da questão da entrada e saída de células no campo visual das imagens.

Ray *et al.* (RAY; ACTON, 2004) também compararam as técnicas GVF (*Gradient Vector Flow*) e MGVF (*Motion Gradient Vector Flow*), a qual foi proposta em substituição ao GVF, que se mostrou inadequado no caso em que o deslocamento (quadro-a-quadro) de um leucócito excede o tamanho de um raio da célula. Os testes foram realizados para as duas abordagens usando quatro diferentes resoluções temporais, que simularam a variação de deslocamento das células. Os resultados são apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Resultados obtidos por Ray *et al.* (RAY; ACTON, 2004).

Campo	Valor médio do RMSE (μm)			
	30 <i>fps</i>	15 <i>fps</i>	10 <i>fps</i>	7,5 <i>fps</i>
GVF	2,5	2,7	4,3	6,0
MGVF	1,6	1,5	1,8	3,9

Avaliando-se os resultados, o MGVF se mostrou superior ao GVF, principalmente nos casos onde o deslocamento da célula foi maior do que o valor do seu raio. Porém, para a aplicação da técnica é necessário saber previamente a direção do fluxo sanguíneo.

Dong *et al.* (DONG; RAY; ACTON, 2005) usaram um modelo de contornos ativos para a detecção automática de leucócitos. O modelo proposto utiliza como representação paramétrica a técnica *B-spline* (MENET; MARC; MEDIONI, 1990) e como energia de restrição uma função

denominada GICOV (*Gradient Inverse Coefficient of Variation*). A medida GICOV pode ser entendida como a razão entre a média e o desvio padrão das derivadas direcionais da imagem sobre todo o contorno da célula. A identificação inicial das células foi realizada pela técnica de casamento de padrões. Após essa etapa, o modelo de contornos ativos foi aplicado para o refinamento das bordas estimadas. Como resultado, o método apresentou acurácia de 78,6% com taxa de FP de 13,1% na detecção dos leucócitos. Usando essa mesma metodologia, Sahoo *et al.* (SAHOO; RAY; ACTON, 2006) propuseram a identificação de leucócitos usando um padrão em forma de gota. Os resultados obtidos qualitativamente indicaram uma melhor adaptação do modelo.

Em (MUKHERJEE; RAY; ACTON, 2004), Mukherjee *et al.* propuseram que a detecção e a segmentação dos leucócitos fossem realizadas por meio da análise do conjunto de curvas de nível da imagem. A ideia usada foi a de minimizar um funcional de energia que quantificasse a qualidade da solução de uma dada curva delineando uma célula detectada. O rastreamento celular foi então posto como um problema de maximização de uma medida de similaridade entre as curvas de nível em quadros consecutivos. Como resultados, as médias de quadros rastreados pelos métodos proposto e de correlação foram de 90% e 73%, respectivamente, assim como valores médios de 5,45 μm e 11,47 μm para o RMSE entre as posições dos centroides encontrados nas duas técnicas e na marcação manual.

Cui *et al.* (CUI; ACTON; LIN, 2006) usaram a técnica Monte Carlo para o rastreamento individual de leucócitos em vídeos de MI do músculo cremaster de ratos. A abordagem iniciou-se com o alinhamento dos quadros por meio da técnica de casamento de padrões, cujo padrão de interesse se dava pelo primeiro quadro do vídeo em análise. A posição inicial do centroide do leucócito foi determinada manualmente nos três primeiros quadros do vídeo, pois a técnica realiza a predição de movimento usando dois quadros anteriores. A partir dessa predição, pontos amostrais ao redor do centroide, ponderados conforme a intensidade local da célula, foram gerados. Os pontos foram organizados de maneira a formar linhas radiais em torno do centroide e permitir que um operador de detecção de bordas unidimensional (BLAKE; ISARD, 1998) fosse aplicado. A posição do centroide do leucócito no quadro posterior foi então determinada pela amostra de maior peso. Os resultados foram comparados com as técnicas de rastreamento por centroides, correlação e contornos ativos (usando GVF). Usando 99 vídeos de microscopia, a técnica proposta obteve um valor médio de RMSE igual a 0,47 μm , com uma média de 82,77% dos quadros rastreados, uma quantidade de 57 quadros finais rastreados e 53 vídeos com todos os quadros rastreados. Apesar da abordagem proposta necessitar das marcações manuais iniciais, o método mostrou-se menos sensível à presença da parede do vaso sanguíneo e a ruídos Gaussiano e sal e pimenta, se comparado à técnica de contornos ativos.

Egmont-Petersen *et al.* (EGMONT-PETERSEN *et al.*, 2000) usaram Redes Neurais Artificiais (*Artificial Neural Networks* – ANN) para a detecção de leucócitos em imagens de vídeo de MI do mesentério de ratos e camundongos. Nesse trabalho, os autores compararam a aplicação de uma ANN usando duas bases de treinamento obtidas a partir de imagens reais e sintéticas de células. As imagens sintéticas foram geradas por um modelo estocástico desenvolvido, o qual teve o intuito de modelar a distribuição de intensidade dos leucócitos, conforme ilustrado na Figura 3.1.

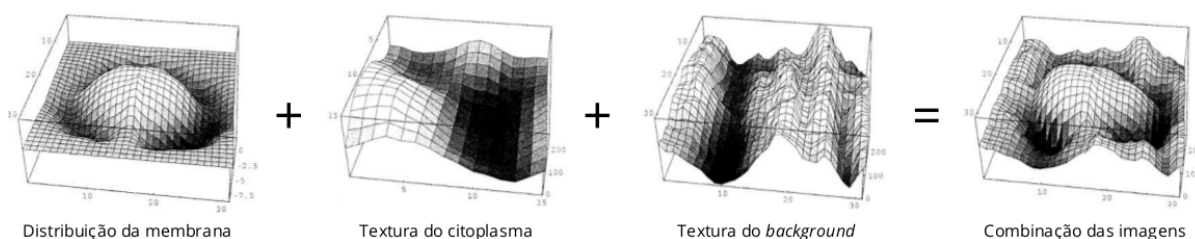


Figura 3.1: Modelo desenvolvido em (EGMONT-PETERSEN *et al.*, 2000) para modelar a distribuição de intensidade dos leucócitos e criar as imagens sintéticas de treinamento.

A classificação usando regiões de 13×13 pixels na imagem indicava se ela pertencia ou não a um leucócito. A média das áreas sob as curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) usando o método proposto foi de 0,90 para imagens sintéticas e de 0,71 para imagens reais. Além da necessidade da criação de um conjunto de treinamento para a ANNs, o rastreamento das células não foi tratado nesse trabalho.

Eden *et al.* (EDEN *et al.*, 2005) recorreram novamente ao uso de ANNs para a detecção de leucócitos em imagens de MI. A abordagem proposta iniciou-se com a detecção de movimento por meio da subtração do fundo da imagem. Após essa detecção grosseira, aplicou-se uma ANN para o reconhecimento das células, que tiveram, posteriormente, seus pontos analisados como agrupamentos. Para contornar o problema de sobreposição nas imagens de vídeo, Eden utilizou o método proposto por Chetverikov *et al.* (CHETVERIKOV; VERESTÓI, 1999; CHETVERIKOV, 2001). Com essas técnicas foi possível realizar a detecção e o rastreamento de leucócitos em nove vídeos coloridos do mesentério de ratos. Como resultados, o trabalho apresentou, além de uma análise da segmentação dos vasos, um valor de 0,85 para o coeficiente de correlação aplicado nos conjuntos de testes para a detecção dos leucócitos e uma compatibilidade de 97% entre as estatísticas manuais e automáticas na média das velocidades das células encontradas em cada quadro. O algoritmo também foi comparado com outro método de predição de movimento (IPAN (VERESTÓY; CHETVERIKOV, 1998)) e testado sem e com a abordagem do cálculo do fluxo sanguíneo (acurácia de 88% e 94%, respectivamente).

Em (SATO *et al.*, 1997) (publicado em 1997, mas submetido em 1994), Sato *et al.* propuse-

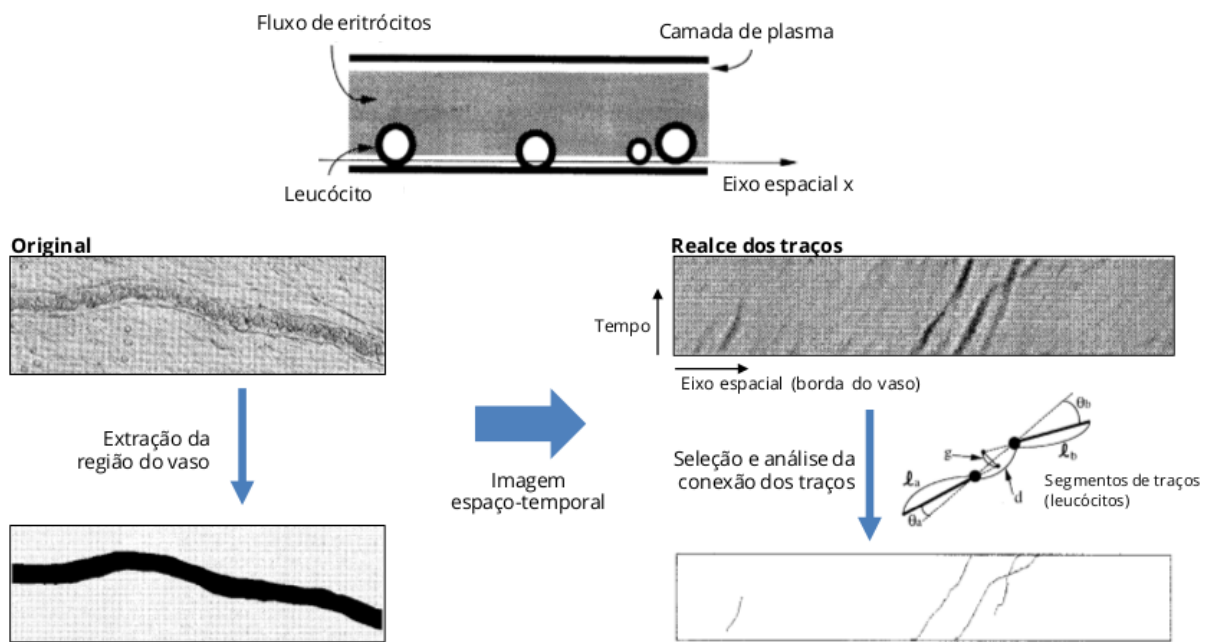


Figura 3.2: Estágios do método proposto por Sat *et al.* em (SATO *et al.*, 1997).

ram o desenvolvimento de um sistema automático para a extração e medição da velocidade de leucócitos aderidos nas paredes dos vasos sanguíneos (camadas de plasma) no mesentério de ratos. O método é baseado nas informações de projeção de linhas na forma espaço-temporal. Para isso, a camada de plasma foi segmentada e seus eixos utilizados como eixos espaciais nas imagens espaço-temporais (2D). A partir das imagens espaço-temporais geradas, os movimentos dos leucócitos foram identificados como traços (linhas curvas) aparentes nos eixos. O problema do aparecimento de traços cruzados nas imagens espaço-temporais foi formulado como um problema de otimização combinatorial e resolvido usando uma rede do tipo Hopfield (HOPFIELD, 1982). Os estágios desse trabalho podem ser vistos na Figura 3.2. Como resultado foi apresentado um gráfico gerado a partir de diferentes valores de parâmetros do algoritmo, no qual seus valores para TP (verdadeiros-positivos) e FP (falsos-positivos) foram, na maioria dos casos, superiores a 70% e inferiores a 5%, respectivamente. Um coeficiente de correlação foi também calculado entre as velocidades dos leucócitos encontradas manualmente e automaticamente pelo método, resultando em um valor de 0,929. Mesmo explorando apenas as células localizadas nas bordas dos vasos, o trabalho de Sato permitiu que o movimento de leucócitos pudesse ser verificado de forma individual na camada de plasma, o que pode ser útil na análise da transmigração de células.

Em 1995, Sato *et al.* publicaram um trabalho (SATO *et al.*, 1995) que teve como objetivo melhorar algumas limitações do trabalho anterior (SATO *et al.*, 1997). Para isso, os autores criaram filtros mais elaborados e analisaram imagens espaço-temporais 2D+t, cujos eixos são paralelos e verticais perante aos vasos. Com essa nova abordagem foi possível estender a análise dos

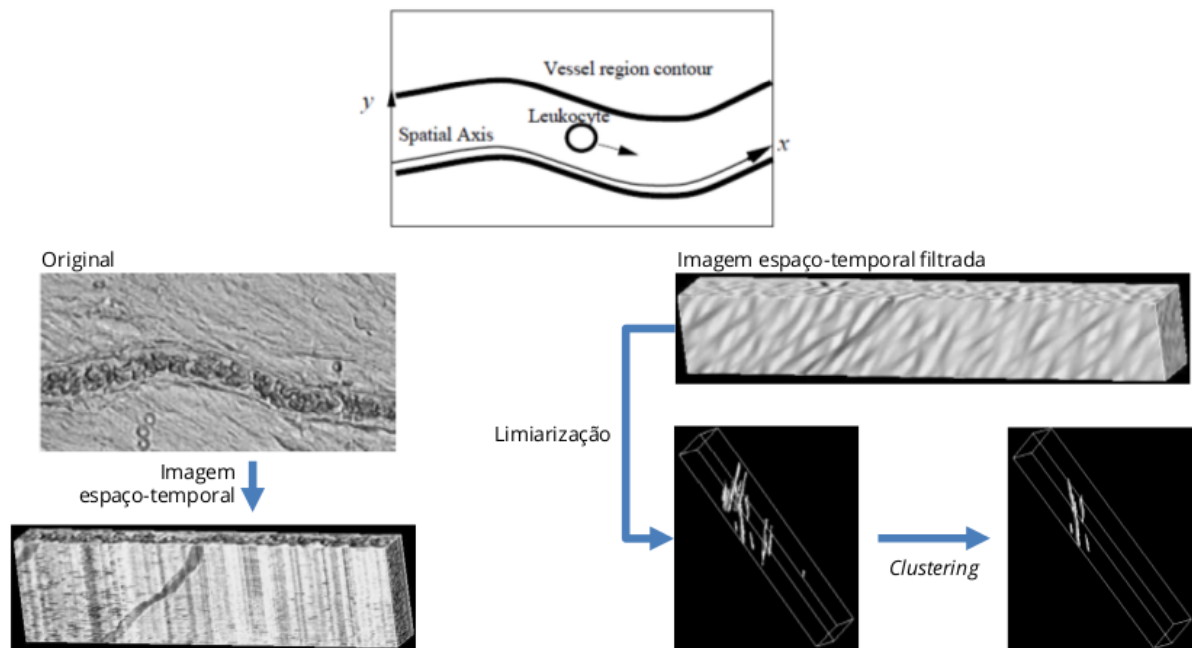


Figura 3.3: Estágios do método proposto por Sat *et al.* em (SATO et al., 1995).

leucócitos ao interior dos vasos, e não apenas às regiões da camada de plasma. Nesse trabalho foram utilizados filtros de Gabor para reconhecer e segmentar objetos em movimento. Após a aplicação dos filtros foram usados algoritmos de crescimento de região a fim de identificar cada traço do leucócito. Os passos seguidos por Sato *et al.* são sumarizados na Figura 3.3. Além das sequências de imagens usadas no trabalho anterior, os autores utilizaram imagens de vasos capilares da retina humana e imagens de angiografia fluorescente. Os resultados apresentados fornecem apenas características visuais.

Um resumo comparativo entre os métodos analisados previamente nesta seção é apresentado na Tabela 3.4. Esta tabela resumo leva em consideração as habilidades dos métodos em: (1) detectar ou rastrear células de maneira individual ou em conjunto; (2) realizar a detecção de leucócitos; (3) realizar o rastreamento de leucócitos; e (4) tratar de problemas de oclusão celular.

Tabela 3.4: Resumo comparativo dos métodos usados para a detecção/rastreamento de leucócitos em imagens de MI. O tipo de algoritmo é representado como U: unicelular e M: multicelular. O símbolo ✓ denota que o método em questão é capaz de resolver a atividade analisada (detecção, rastreamento e problemas de oclusão).

Trabalho	Tipo	Detecção	Rastreamento	Oclusão
(ACTON; WETHMAR; LEY, 2002)	U	✓	✓	✓
(RAY; ACTON; LEY, 2002)	U	✓	✓	✓
(RAY; ACTON, 2004)	U	✓	✓	
(DONG; RAY; ACTON, 2005)	M	✓		
(SAHOO; RAY; ACTON, 2006)	M	✓		
(MUKHERJEE; RAY; ACTON, 2004)	M	✓	✓	
(CUI; ACTON; LIN, 2006)	U	✓	✓	
(EGMONT-PETERSEN et al., 2000)	U	✓		
(EDEN et al., 2005)	M	✓	✓	✓
(SATO et al., 1997)	M	✓	✓	✓
(SATO et al., 1995)	M	✓	✓	✓

3.2 Considerações finais

Neste capítulo foram descritas diversas técnicas propostas na literatura para a detecção e o rastreamento de leucócitos em imagens de MI. No estudo realizado observou-se que nenhum dos trabalhos utilizou imagens provenientes do cérebro de animais, das quais apresentam sérios desafios, conforme discutido no capítulo anterior. A abordagem da análise espaço-temporal 2D+t só foi adotada na aplicação de análises *in vivo* no trabalho proposto por Sato *et al.* (SATO et al., 1995), porém limitando-se a análises visuais e utilizando-se de técnicas computacionalmente custosas para a detecção dos leucócitos. Outro ponto a ser destacado é que, na maioria dos trabalhos, a detecção inicial das células foi realizada de maneira manual, tornando os métodos ainda dependentes de especialistas. Diante desses fatos, o presente trabalho de pesquisa visa a completa independência externa, atuando por meio da combinação das informações adquiridas na detecção bidimensional com aquelas obtidas tridimensionalmente (imagens espaço-temporais 2D+t). No próximo capítulo são apresentadas as técnicas utilizadas na metodologia deste trabalho.

Capítulo 4

METODOLOGIA

Após a apresentação dos principais trabalhos relacionados à detecção e rastreamento de células em imagens de MI no Capítulo 3, este capítulo traz a metodologia desenvolvida durante a pesquisa, dentro do contexto da análise espaço-temporal pretendida. Nele, o estudo da análise dos autovalores da matriz Hessiana para o realce de estruturas geométricas é detalhado como a principal técnica a ser utilizada no esquema computacional proposto, assim como todos os outros métodos também usados nas etapas de pré- e pós-processamento. As bases de dados utilizadas são também descritas neste capítulo.

4.1 Esquema computacional

Tendo em vista as dificuldades encontradas ao se realizar análises visuais de imagens de MI, este trabalho de pesquisa propõe o desenvolvimento de um esquema computacional para a detecção e rastreamento automáticos de leucócitos em MI usando uma abordagem espaço-temporal. As principais etapas do esquema computacional proposto são ilustradas no diagrama de blocos da Figura 4.1.

Para garantir uma maior robustez aos métodos de detecção e rastreamento de leucócitos, este trabalho propôs o uso de diferentes técnicas como uma etapa de pré-processamento ao esquema computacional. Conforme pode ser observado na Figura 4.1, as técnicas abordadas no pré-processamento têm como objetivo remover os quadros com movimentos excessivos, reduzir o nível de ruído nas imagens, padronizar o contraste das imagens ao longo do vídeo, estabilizar os movimentos restantes na sequência de imagens e segmentar a região de interesse a ser analisada.

Após a etapa de pré-processamento das imagens, o sistema se divide entre os processamentos espacial (2D) e espaço-temporal (2D+t). No processamento espacial, os quadros do vídeo

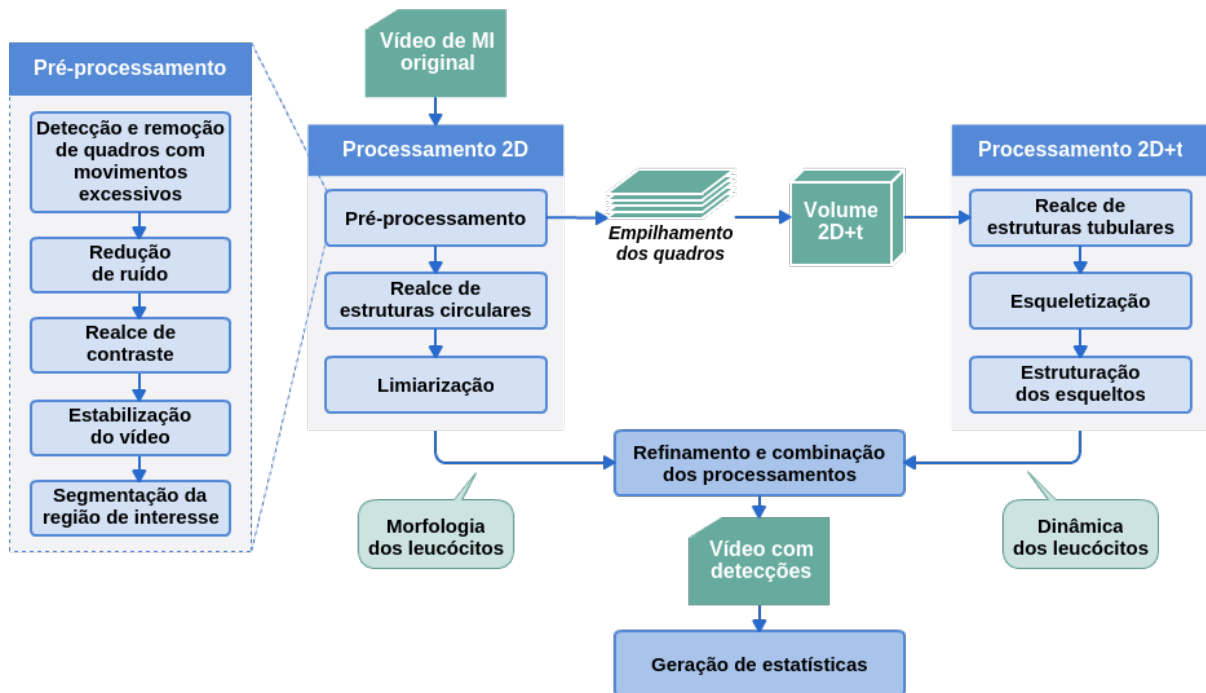


Figura 4.1: Diagrama com as etapas do esquema computacional desenvolvido para a detecção automática de leucócitos em imagens de vídeo de MI.

são processados separadamente como imagens bidimensionais, permitindo uma melhor análise da morfologia das células. Em contrapartida, no processamento espaço-temporal, os quadros do vídeo, após serem alinhados, são empilhados para formar um volume (3D=2D+t). Por meio desse volume é possível, então, detectar estruturas tubulares que representem os leucócitos e, conseqüentemente, realizar a análise da dinâmica dessas células. A combinação dessas duas abordagens visa tornar o esquema computacional proposto menos suscetível aos problemas decorrentes da aquisição das imagens, como, por exemplo, as ambigüidades oriundas da sobreposição de células e as descontinuidades de movimento das mesmas, causadas pela eliminação de quadros corrompidos por movimento.

A principal técnica que compõe o esquema computacional proposto neste trabalho é baseada na análise local dos autovalores da matriz Hessiana, a qual foi aplicada tanto na etapa do processamento 2D quanto no processamento 2D+t. Ela é descrita em detalhes ao decorrer deste capítulo e sua estabilidade foi avaliada tanto em imagens sintéticas bidimensionais, simulando os leucócitos (detalhadas na seção a seguir), quanto em imagens reais de MI. Técnicas responsáveis por refinar e combinar os resultados das detecções foram propostas como uma etapa de pós-processamento e também são detalhadas ao decorrer do capítulo.

A partir desse padrão de desenvolvimento é possível utilizar diferentes técnicas em cada etapa de processamento, o que torna o código mais genérico e modularizado. O esquema proposto foi desenvolvido na linguagem C++ em conjunto com as bibliotecas abertas OpenCV

(OPENCV, 2010) e ITK (NEZ et al., 2003), as quais possuem várias funções que facilitam a implementação da captura e processamento de vídeos e imagens.

4.2 Banco de imagens

Imagens simuladas Imagens simuladas foram utilizadas com o intuito de testar o algoritmo de detecção 2D. Dois conjuntos de imagens de 200×200 pixels foram criados de acordo com as características presentes no vídeo de MI, ou seja, a disparidade entre o tamanho das células, a diferença de contraste, o borramento e o ruído, ajustados de forma que esses conjuntos representem de maneira fidedigna os problemas enfrentados na detecção espacial no método proposto.

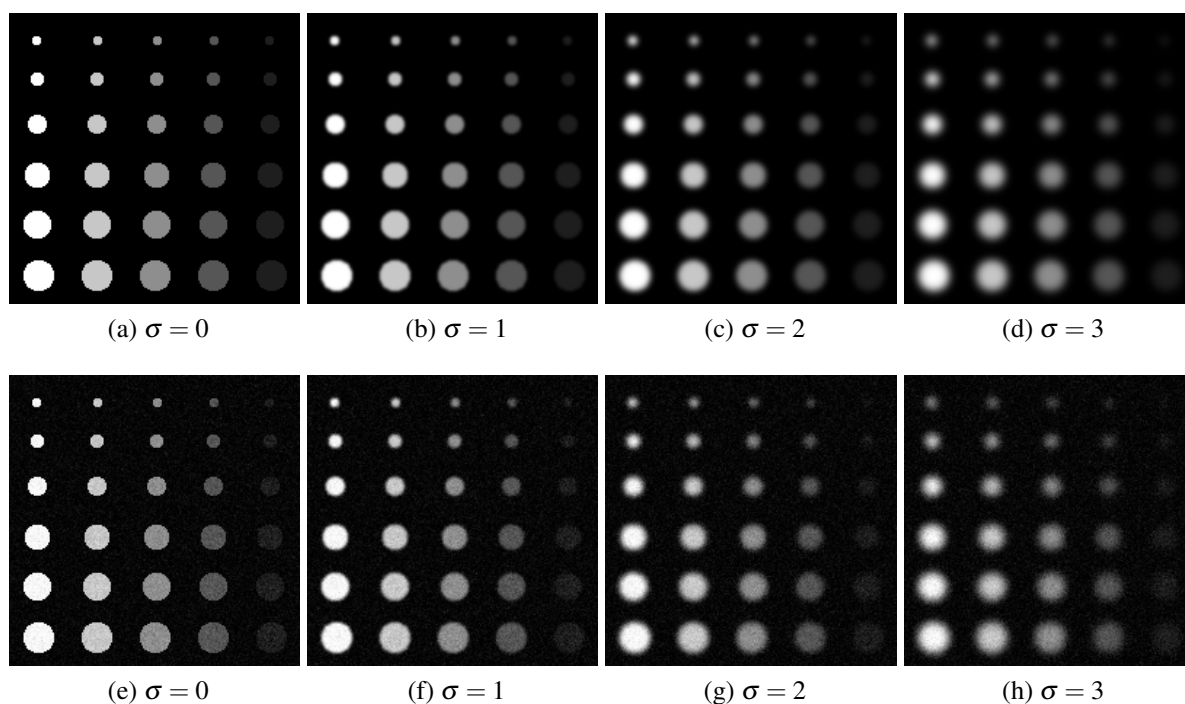


Figura 4.2: Sequência de imagens simuladas com (primeira linha) e sem (segunda linha) ruído Gaussiano. Cada quadro de ambas as sequências sofreu um borramento Gaussiano com valores de sigma variando entre 0 e 3.

As imagens citadas podem ser vistas na Figura 4.2. A primeira linha da Figura 4.2 representa a simulação dos leucócitos em um ambiente sem ruídos. Para cada coluna da imagem, um borramento Gaussiano com desvio padrão σ foi aplicado, correspondendo, respectivamente a $\sigma = 0$, $\sigma = 1$, $\sigma = 2$ e $\sigma = 3$. As imagens da segunda linha da Figura 4.2 foram criadas a partir da simulação de um ruído Gaussiano com desvio padrão igual a 10, a fim de analisar a estabilidade do método em relação a presença de ruído nas sequências de imagens dos vídeos.

Imagens reais de MI As imagens usadas neste projeto foram obtidas a partir de eventos microcirculatórios de vasos cerebrais de camundongos, conforme descrito na Subseção 2.6. Dois vídeos foram utilizados, sendo que um deles apresenta um total de 330 quadros, com uma taxa de amostragem de 16 *fps*, 8 bits de quantização, matriz imagem de 592×420 pixels e resolução espacial de 1,89 pixels/ μm , enquanto o outro vídeo apresenta um total de 401 quadros, taxa de amostragem de 16 *fps*, 16 bits de quantização, matriz imagem de 460×344 pixels e resolução espacial de 0,66 pixels/ μm .

4.3 Pré-processamento

Neste trabalho foram desenvolvidas técnicas de pré-processamento com a finalidade de garantir uma maior robustez aos métodos de detecção e rastreamento dos leucócitos. Essas técnicas foram aplicadas em imagens reais (quadro a quadro do vídeo) e fazem parte da etapa inicial do esquema de desenvolvimento proposto. Com exceção das técnicas de remoção de quadros com movimento excessivo e de estabilização das imagens, as demais técnicas de pré-processamento foram ajustadas de maneira qualitativa por análise visual. Os principais objetivos da etapa de pré-processamento são: eliminação de quadros com movimento excessivo, redução de ruído nas imagens, realce do contraste das estruturas a serem analisadas, estabilização do movimento presente no vídeo e determinação da região de interesse da imagem (vaso sanguíneo usado na análise). Cada um dos estágios citados é descrito com mais detalhes nas subseções seguintes.

4.3.1 Detecção e remoção de quadros com movimentos excessivos

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 de respiração 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. Isso porque, com uma alta taxa de amostragem, os quadros do vídeo com movimentos excessivos podem ser removidos sem que ocorra a perda da continuidade de movimento das células a serem rastreadas. De qualquer maneira, a detecção automática dos quadros degradados é uma tarefa importante e necessária. Uma solução para esse problema foi proposta em (FERRARI et al., 2015) e foi utilizada como primeiro estágio neste trabalho de pesquisa.

O método proposto em (FERRARI et al., 2015) utiliza estatísticas direcionais de mapas locais de energia obtidos da 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, 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, e isso pode ser observado analisando-se as estatísticas direcionais das respostas dos filtros.

Neste trabalho, os quadros contendo movimentos excessivos (detectados pelo método proposto em (FERRARI et al., 2015)) foram detectados e removidos das sequências de imagens. Isso só foi possível pois a amostragem temporal do vídeos utilizados era suficiente para garantir que a sua retirada não acarretasse na perda da continuidade de movimento das células e, dessa forma, prejudicasse o rastreamento das mesmas.

4.3.2 Redução de ruído

Com o intuito de melhorar a relação sinal-ruído (SNR) das imagens de MI, neste trabalho o filtro bilateral (TOMASI; MANDUCHI, 1998) foi utilizado para a redução de ruído das imagens. Nessa técnica, o valor de cada pixel na imagem é substituído por uma média ponderada dos valores de intensidade dos pixels de sua vizinhança Ω . Em geral, os pesos da média ponderada são baseados na distribuição Gaussiana – como é o caso deste trabalho – e não dependem apenas da distância Euclidiana dos pixels, mas também das diferenças radiométricas (por exemplo, diferenças de alcance, tais como a intensidade do pixel, profundidade, etc). Isso permite, por meio da varredura sistemática de cada pixel, ajustar o peso em conformidade com as características dos pixels de sua vizinhança e, dessa maneira, preservar as bordas da imagem. A imagem filtrada pelo filtro bilateral ($I_{FB}(\mathbf{x})$) é definida por:

$$I_{FB}(\mathbf{x}) = \frac{1}{W_p} \sum_{\mathbf{x}_i \in \Omega} I(\mathbf{x}_i) G_{\sigma_s}(\|\mathbf{x} - \mathbf{x}_i\|) G_{\sigma_r}(|I(\mathbf{x}) - I(\mathbf{x}_i)|), \quad (4.1)$$

na qual, $I(\mathbf{x})$ é a intensidade do pixel em análise na imagem original, \mathbf{x} representa as coordenadas do pixel e Ω o conjunto de pixels vizinhos a serem considerados. G_{σ_s} corresponde a um núcleo Gaussiano (espacial) com desvio padrão σ_s que suaviza as diferenças nas coordenadas dos pixels e G_{σ_r} um núcleo Gaussiano (de alcance) com desvio padrão σ_r que diminui a in-

fluência dos pixels \mathbf{x}_i quando seus valores de intensidade diferem de $I(\mathbf{x})$. W_p é um fator de normalização que garante que a soma das ponderações dos pixels seja igual a um, ou seja,

$$W_p = \sum_{\mathbf{x}_i \in \Omega} G_{\sigma_s}(\|\mathbf{x} - \mathbf{x}_i\|) G_{\sigma_r}(|I(\mathbf{x}) - I(\mathbf{x}_i)|). \quad (4.2)$$

Neste trabalho os parâmetros $\sigma_s = 9$ e $\sigma_r = 10$ foram obtidos de maneira experimental com o intuito de realçar o contraste das bordas dos leucócitos e dos vasos sanguíneos nas imagens de MI, propiciando, assim, uma maior estabilidade aos processos de correção e detecção presentes nos próximos estágios de desenvolvimento.

4.3.3 Realce de contraste

Para minimizar o problema da redução de contraste causada pelo efeito *photobleaching* e, conseqüentemente, melhorar o desempenho dos métodos de correção e, principalmente, o de detecção dos leucócitos, a técnica de correspondência entre histogramas (NYÚL; UDUPA; ZHANG, 2000) foi aplicada para cada par de quadros consecutivos do vídeo. A ideia principal dessa técnica é realizar uma normalização entre os valores dos níveis de cinza das imagens processadas por intermédio de seus histogramas. Ela é originalmente baseada em um processo que realiza um mapeamento linear do histograma de uma imagem I_j com valores de intensidade em $[s_{1,j}, s_{2,j}]$ para uma outra faixa desejada de valores, $[s_1, s_2]$, preestabelecida pelo usuário, seguido pela estimação de um conjunto de pontos de referência $\{q_{k,j} | 1 \leq k \leq l\}$ nesse histograma mapeado. O algoritmo produz como resultado um conjunto de pontos de referência médios, $\{\bar{q}_k | 1 \leq k \leq l\}$. Assim, quando uma nova imagem de entrada I do par de quadros consecutivos do vídeo precisa ter seu histograma (com faixa de valores $[r_1, r_2]$) mapeado para o padrão (estimado para a imagem de referência do par), seus pontos de referência $\{q_k\}$ são obtidos e então é realizada uma sucessão de mapeamentos lineares envolvendo os intervalos que separam 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 $k = 1 \dots l - 1$, e também de $[r_1, q_1]$ a $[s_1, \bar{q}_1]$ e de $[q_l, r_2]$ a $[\bar{q}_l, s_2]$.

Neste trabalho, o parâmetro l foi definido como 7 e as imagens de referência são as primeiras de cada par consecutivo de quadros do vídeo. Essa abordagem normaliza a intensidade das estruturas de interesse para os algoritmos de detecção e facilita a estimação do movimento entre os quadros do vídeo.

4.3.4 Estabilização do vídeo

A estabilização do vídeo, resultante após a etapa de remoção dos quadros demasiadamente borrados, é realizada por meio de técnicas de correção de imagens, aplicadas de forma modular conforme proposto em (GREGÓRIO DA SILVA et al., 2014) e especialmente desenvolvidas para a aplicação em imagens de vídeos de MI. O arcabouço proposto, conforme ilustrado na Figura 4.3, subdivide a técnica de correção em componentes comuns, permitindo, assim, a simplificação e a implementação do *software*. Ele é funcionalmente composto de duas entradas, quadros móvel e de referência, e quatro módulos, métrica, otimizador, interpolador e transformação espacial. Com essa divisão em componentes, tal estrutura sugere o uso do padrão de projeto “*pattern strategy*”, do qual diferentes algoritmos são encapsulados separadamente, mas podendo ser usados de maneiras alternadas (ALEXANDRESCU, 2001; GAMMA, 2004).

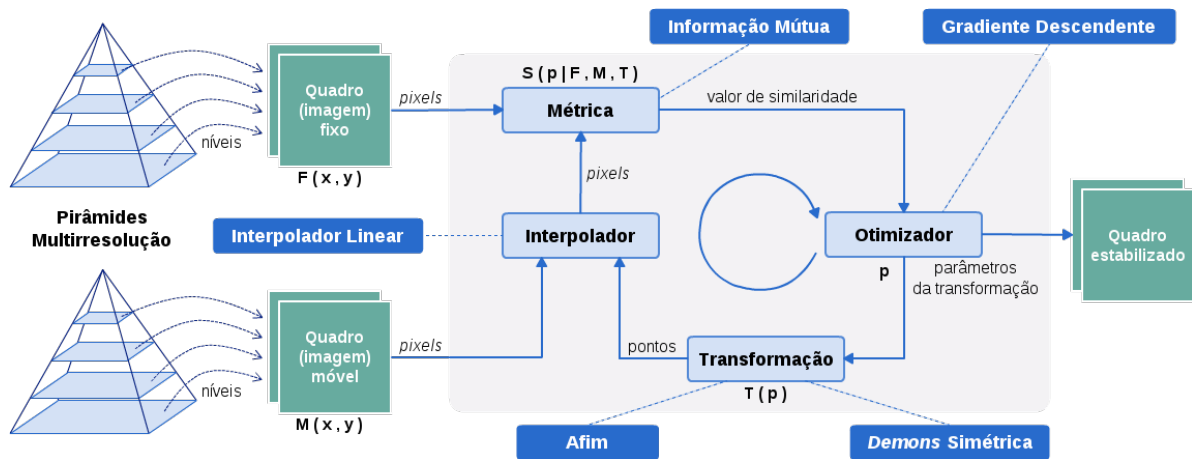


Figura 4.3: Arcabouço de desenvolvimento da etapa de estabilização dos quadros de vídeo (GREGÓRIO DA SILVA et al., 2014).

A técnica de correção proposta consiste em encontrar uma função de transformação $T(p)$ capaz de corrigir os desalinhamentos entre pares de quadros consecutivos do vídeo, representados aqui por uma imagem fixa $F(x)$ e uma imagem móvel $M(x)$. As imagens (fixa e móvel) de entrada são processadas a partir de um esquema multirresolução que utiliza pirâmides Gaussianas, como pode ser visto na Figura 4.3. A estimação dos parâmetros do algoritmo é iniciada a partir das imagens de menor resolução ($(592 \times 420) \div 2^n$, no qual $n = 4$ é o número de níveis de decomposição usado neste trabalho), que se encontram no nível superior das pirâmides. Os parâmetros estimados nesse nível são então usados, no algoritmo, como valores iniciais para o próximo nível das pirâmides (imagens de maior resolução). Esse procedimento é repetido até que as bases das pirâmides (imagens com resolução máxima) sejam processadas.

A abordagem multirresolução descrita acima, permite uma redução no tempo de processamento do algoritmo, assim como um aumento na estabilidade e robustez do método. O conjunto

de parâmetros p da transformação $T(p)$ é obtido de maneira iterativa por meio do mapeamento de todos os pixels do quadro móvel $M(\mathbf{x})$ para os seus correspondentes no quadro fixo $F(\mathbf{x})$, via minimização da métrica de similaridade $S(p|F, M, T)$. As técnicas utilizadas em cada módulo do algoritmo de estabilização são descritas a seguir.

Métrica: É responsável por prover uma medida de similaridade entre as imagens (fixa e móvel) de entrada. Neste trabalho, uma métrica baseada na informação mútua (IM) (PLUIM; MAINTZ; VIERGEVER, 2003) foi utilizada. Ela mede a dependência estatística entre dois conjuntos de dados (imagens de entrada) levando em consideração a quantidade de informação que uma variável aleatória possui sobre a outra. A IM é definida em termos de entropia da seguinte maneira:

$$\begin{aligned} S(p|F, M, T) &= IM(F, T) \\ &= H(F) + H(M|T) - H(F, M|T), \end{aligned} \quad (4.3)$$

em que $H(\cdot)$ é a entropia de uma variável randômica (neste caso, imagens F e M), que pode ser calculada a partir da probabilidade marginal (histograma normalizado), $P(\cdot)$, das imagens como:

$$H(F) = - \sum_{m \in F} P(m) \log P(m), \quad (4.4)$$

$$H(M|T) = - \sum_{n \in M} P(n|T) \log P(n|T). \quad (4.5)$$

Nas Equações (4.4) e (4.5), m e n representam, respectivamente, as intensidades dos pixels nas imagens F e M . A entropia conjunta das imagens F e M , que é o último termo na Equação (4.3), é calculada a partir da distribuição de probabilidade conjunta, $P(m, n|T)$, como:

$$H(F, M|T) = - \sum_{m \in F, n \in M} P(m, n) \log P(m, n|T). \quad (4.6)$$

Neste trabalho foi utilizado como métrica uma implementação da técnica da informação mútua proposta por Mattes (MATTES et al., 2001). Nela, apenas um conjunto de amostras de intensidades é utilizado a partir das imagens. Usando esse conjunto, as funções de densidades de probabilidade marginal e conjunta são avaliadas em posições discretas ou *bins* uniformemente distribuídos dentro do intervalo dinâmico das imagens. Valores de entropia são, então, calculados por meio da soma ao longo dos *bins*.

Otimizador: Um otimizador baseado no método de gradiente descendente (KLEIN; PLUIM; STARING, 2009) foi usado na busca do melhor conjunto de parâmetros p que minimiza a medida de similaridade S entre as duas imagens de entrada F e M . Começando com um

conjunto inicial de parâmetros (provenientes das imagens do topo das pirâmides), o processo de otimização busca iterativamente a solução ótima ao avaliar o valor da métrica em diferentes posições do espaço de busca dos parâmetros da transformação. A técnica do otimizador por gradiente descendente utiliza apenas a derivada de primeira ordem e segue a negativa do gradiente. Portanto, sua direção de busca é dada pela função:

$$s_n = -\nabla g(\mathbf{x}_n), \quad (4.7)$$

na qual $g(\mathbf{x}_n)$ corresponde à função da métrica $S(p|F, M, T)$ em um determinado ponto \mathbf{x}_n . É conveniente utilizar o gradiente apenas para indicar o sentido do passo, mas não a amplitude do mesmo. Desta forma, a busca pelos parâmetros ideais é atualizada como:

$$\mathbf{x}_{n+1} = \mathbf{x}_n + \Delta\mathbf{x}_n = \mathbf{x}_n + \lambda_n s_n = \mathbf{x}_n - \lambda_n \nabla g(\mathbf{x}_n), \quad (4.8)$$

no qual $\Delta\mathbf{x}_n = \mathbf{x}_{n+1} - \mathbf{x}_n$ é o vetor de \mathbf{x}_n a \mathbf{x}_{n+1} , s_n é a direção de busca do gradiente descendente e λ_n o escalar que determina o comprimento a ser percorrido. O tamanho do passo λ_n é dirigido por uma taxa de aprendizagem.

Interpolador: Como o mapeamento dos pontos de uma imagem à outra é realizado no sistema de coordenadas físicas, é necessário que exista um interpolador para que os valores espaciais encontrados sejam mapeados de volta ao domínio da imagem. Para isso, utilizou-se a técnica de interpolação linear, a qual assume que os valores de intensidade dos pixels variam linearmente entre as posições da “grade” da imagem. Ela é calculada como uma soma ponderada dos 2^{k-1} vizinhos:

$$M(\mathbf{x}) = \sum_i w_i M(\mathbf{x}_i), \quad (4.9)$$

em que k é a dimensão do espaço da imagem e os pesos w_i são calculados a partir da distância entre a posição desejada e seus vizinhos:

$$w_i = \prod_n (1 - |(\mathbf{x}_n) - (\mathbf{x}_i)_n|). \quad (4.10)$$

Transformação: Após o alinhamento inicial, usando o centro de massa das imagens de entrada, o método de correção aplicado utiliza duas técnicas de transformação geométrica para corrigir os desalinhamentos entre os quadros do vídeo, as transformações afim e *demons* simétrica (THIRION, 1998) (deformável). Matematicamente, uma transformação geométrica representa o mapeamento dos pontos de um espaço X (imagem móvel) a um espaço Y (imagem fixa). Uma transformação afim T , que representa uma combinação linear das operações de rotação, translação, escala e cisalhamento, foi aplicada para cada

posição \mathbf{x} da imagem móvel (aqui, um ponto em X é representado por um vetor coluna \mathbf{x}) para produzir um ponto transformado \mathbf{x}' ,

$$\mathbf{x}' = T(\mathbf{x}). \quad (4.11)$$

Essa transformação resulta em um alinhamento não muito preciso entre as imagens de entrada. Após a transformação afim foi aplicado o processo de correção deformável proposto em (THIRION, 1998) para refinar o alinhamento anterior. Uma transformação deformável consiste em encontrar o mapeamento de uma imagem $M(\mathbf{x})$ a outra $F(\mathbf{x})$ usando um campo de deformação $u(\mathbf{x})$ (AVANTS; TUSTISON; SONG, 2009). A deformação é definida no espaço físico da imagem e fornece a diferença do posicionamento entre as duas imagens passadas. Dessa maneira, se uma característica definida em $F(\mathbf{x})$ tem sua equivalência em $M(\mathbf{y})$, o campo de deformação u em \mathbf{x} é calculado como

$$u(\mathbf{x}) = \mathbf{y} - \mathbf{x}, \quad (4.12)$$

e, portanto, ela pode ser aplicada para deformar uma imagem M dentro de uma imagem F como:

$$M_{deformada} = M(\mathbf{x} + u(\mathbf{x})). \quad (4.13)$$

A ideia principal da técnica de transformação deformável (THIRION, 1998) é a existência de uma “grade” regular de forças que deforma uma imagem deslocando seus pixels na direção normal às forças presentes. A orientação e a magnitude dos vetores de deslocamento são derivados da equação do fluxo óptico instantâneo (HORN; SCHUNCK, 1981). Nesse caso, assume-se que as intensidades dos níveis de cinza dos pontos em movimento não se alteram com o passar do tempo, isto é, $I(\mathbf{x}(t), t) = const$, com $\mathbf{x}(t)$ representando as coordenadas do ponto no instante t . Nesse caso, têm-se dois quadros consecutivos ($F(\mathbf{x})$ para o quadro fixo e $M(\mathbf{x})$ para o quadro móvel) do vídeo a serem comparados e deseja-se encontrar um vetor de deslocamento $u(\mathbf{x})$ que deixe $M(\mathbf{x})$ o mais próximo de $F(\mathbf{x})$. Pode-se, então, considerar que $F(\mathbf{x})$ e $M(\mathbf{x})$ são separados por uma unidade de tempo: $\partial i / \partial t = M(\mathbf{x}) - F(\mathbf{x})$ e $u(\mathbf{x}) = (d\mathbf{x}/dt)$ é a velocidade instantânea de $F(\mathbf{x})$ para $M(\mathbf{x})$, assim:

$$u(\mathbf{x}) \cdot \nabla F(\mathbf{x}) = -(M(\mathbf{x}) - F(\mathbf{x})). \quad (4.14)$$

No contexto do fluxo óptico (HORN; SCHUNCK, 1981), $u(\mathbf{x})$ representa a velocidade porque as imagens processadas correspondem a quadros sucessivos do vídeo, ou seja, $u(\mathbf{x})$ é o deslocamento durante o intervalo de tempo entre os dois quadros (THIRION, 1998). A Equação (4.14), como já bem conhecida na literatura do fluxo óptico, não é suficiente para

especificar $u(\mathbf{x})$ localmente e, nesse caso, ela é geralmente determinada usando alguma forma de regularização. Para o corregristo, a projeção do vetor na direção do gradiente da intensidade é dada por

$$u(\mathbf{x}) = -\frac{(M(\mathbf{x}) - F(\mathbf{x})) \nabla F(\mathbf{x})}{\|\nabla F\|^2 + (M(\mathbf{x}) - F(\mathbf{x}))^2 / K}, \quad (4.15)$$

no qual K é o fator de normalização que explica o desequilíbrio entre as unidades de intensidade e gradiente. Esse fator é calculado como o valor quadrático médio do espaçamento dos pixels. A inclusão de K faz com que a força computacional seja invariante à escala do pixel nas imagens. Como as imagens processadas provêm de vídeos de MI, pode-se considerar que estruturas isoladas existirão em uma das imagens de entrada e não na outra. Tem-se, como exemplo, a entrada e saída de leucócitos nos quadros. O resultado da presença dessas estruturas é uma assimetria obtida a partir da Equação (4.15). Para a restauração dessa simetria considera-se o gradiente de ambas as imagens durante uma iteração, assim:

$$u(\mathbf{x}) = -\frac{2 \cdot (M(\mathbf{x}) - F(\mathbf{x})) (\nabla F(\mathbf{x}) + \nabla M(\mathbf{x}))}{\|\nabla F + \nabla M\|^2 + (M(\mathbf{x}) - F(\mathbf{x}))^2 / K}. \quad (4.16)$$

4.3.5 Segmentação da região de interesse

Outra etapa importante do pré-processamento das imagens de MI é a segmentação da região na qual os eventos leucocitários estão sendo observados. A determinação dessa região, por exemplo, pode reduzir tanto o tempo de processamento do algoritmo quanto o número de sinais falso-positivos (leucócitos detectados erroneamente). A extração da região de interesse, neste trabalho, foi realizada avaliando-se a variância temporal de cada pixel, como proposto em (SATO et al., 1997). A ideia principal, neste caso, é que o nível de intensidade de cinza de cada pixel dentro da região do vaso (onde as células sanguíneas fluem continuamente) tende a variar mais intensamente do que a região externa (tecido). Porém, como a região a ser analisada nas imagens utilizadas geralmente corresponde apenas à vênula com maior espessura e melhor foco sob o microscópio, foi observado que a técnica para segmentação baseada na abordagem proposta em (SATO et al., 1997) sozinha não era suficiente, pois esta também respondia aos movimentos presentes em vasos capilares menos espessos das imagens. Portanto, outros passos foram acrescentados ao método de Sato *et al.*

Após o cálculo da variância temporal dos quadros, um borramento Gaussiano (com núcleo de tamanho 9×9 pixels) foi aplicado na imagem resultante. Em seguida, uma imagem binária foi criada usando-se a técnica de limiarização baseada no valor médio da imagem (GLASBEY,

1993) e nela foi aplicada uma operação morfológica de abertura com um elemento estruturante de forma circular no tamanho de 15×15 pixels baseado na espessura dos menores vasos da imagem, a fim de descartar estruturas menos espessas que não são de interesse para a detecção. Como último passo, selecionou-se a região de maior área como sendo aquela de interesse, ou seja, a região do vaso sanguíneo na qual os eventos leucocitários serão analisados. As imagens resultantes dos passos citados para os dois vídeos reais utilizados podem ser vistas na Figura 4.4.

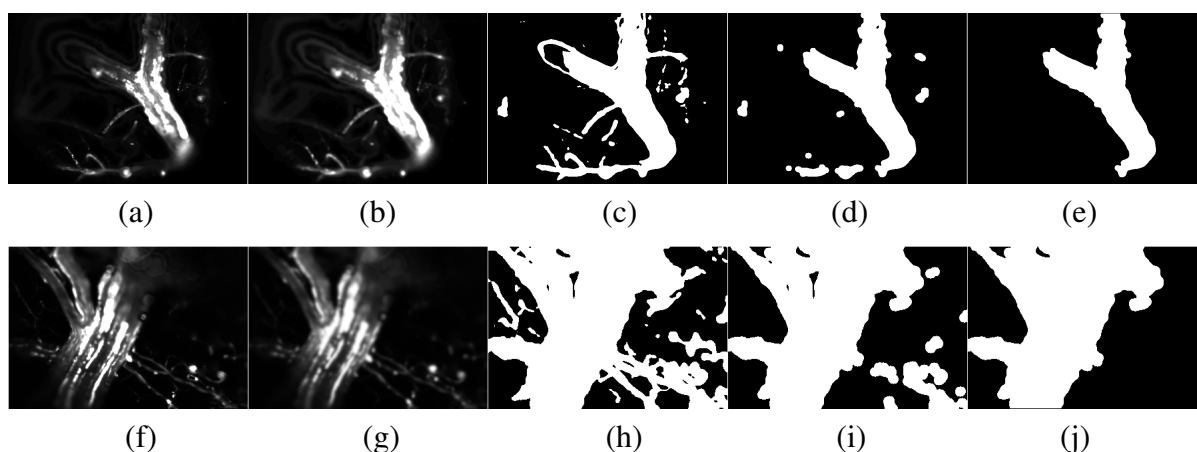


Figura 4.4: Imagens resultantes da etapa de segmentação da região de interesse dos vídeos. (a) e (f) variância temporal dos quadros. (b) e (g) variância temporal após o borramento Gaussiano. (c) e (h) imagem binária após limiarização. (d) e (i) resultado da operação morfológica de abertura. (e) e (j) imagem resultante da análise de regiões.

4.4 Análise multiescalar da matriz Hessiana

Considerando que as imagens de microscopia são projeções de estruturas tridimensionais compostas por células e microvasos, os leucócitos podem estar posicionados sobre ou sob o plano focal do microscópio. Isso pode mudar a aparência de seu tamanho nas imagens, fazendo com que as células se apresentem em diferentes escalas. Por essa razão, o uso de um sistema baseado na análise de estruturas locais por intermédio de uma abordagem multiescalar (DZYUBAK; RITMAN, 2011) é proposto neste trabalho como a principal técnica para a detecção dos leucócitos.

Como o tamanho real dos leucócitos é desconhecido a princípio, técnicas de borramento ou suavização podem ser usadas para a representação dessas células nas diferentes escalas possíveis. A ideia inicial da abordagem é, portanto, gerar uma família de imagens suavizadas $I(\mathbf{x}; \sigma)$, calculadas a partir da convolução da imagem original $I_0(\mathbf{x})$ com núcleos Gaussianos $G(\mathbf{x}; \sigma)$,

como

$$I(\mathbf{x}; \sigma) = I_0(\mathbf{x}) * G(\mathbf{x}; \sigma), \quad (4.17)$$

sendo \mathbf{x} um vetor de dimensão k que representa a posição na imagem e

$$G(\mathbf{x}; \sigma) = \frac{1}{(\sqrt{2\pi}\sigma)^k} e^{-\frac{\|\mathbf{x}\|^2}{2\sigma^2}}, \quad (4.18)$$

corresponde a um núcleo Gaussiano com desvio padrão σ . Neste caso, σ representa a escala de análise.

Porém, é desejável que a análise sobre o objeto de interesse seja realizada em sua escala real. Assim, a escolha do valor do parâmetro σ , que descreve a escala ideal em cada localização geométrica, é realizada usando uma função de resposta $R(\mathbf{x}; \sigma)$, criada a partir das derivadas parciais da Equação (4.17), dada como

$$R(\mathbf{x}; \sigma) = \frac{\partial^{h+m+\dots+n} I(\mathbf{x}; \sigma)}{\partial x_1^h \partial x_2^m \dots \partial x_k^n}, \quad (4.19)$$

em que h, m e n são as ordens das derivadas parciais e $x_i \in \mathbf{x}$, $i = 1, 2, \dots, k$. Devido às propriedades comutativas da convolução, a ordem das operações nas Equações (4.17) e (4.19) pode ser alterada de maneira que a Equação (4.19) pode ser reescrita como:

$$R(\mathbf{x}; \sigma) = I_0(\mathbf{x}; \sigma) * \frac{\partial^{h+m+\dots+n} G(\mathbf{x}; \sigma)}{\partial x_1^h \partial x_2^m \dots \partial x_k^n}. \quad (4.20)$$

A escala local mais adequada é então definida pelo valor do parâmetro σ correspondente ao máximo valor resultante da função $R(\mathbf{x}; \sigma)$. Isso indica que a escala do núcleo Gaussiano, para a maior resposta em R , é aquela que mais se aproxima do tamanho característico do objeto. Como a amplitude dos operadores derivativos Gaussianos tende a diminuir com o aumento da escala (devido ao fato de que com o aumento de escala a resposta é cada vez mais suavizada), Lindeberg (LINDBERG, 1998) sugere o uso das chamadas derivadas normalizadas γ -parametrizadas, que se diferem das derivadas parciais pela introdução de um fator normalizante $\sigma^{(h+m+\dots+n)\gamma}$, de forma que

$$\frac{\partial^{h+m+\dots+n}}{\partial u_1^h \partial v_2^m \dots \partial w_k^n} = \sigma^{(h+m+\dots+n)\gamma} \frac{\partial^{h+m+\dots+n}}{\partial x_1^h \partial x_2^m \dots \partial x_k^n}. \quad (4.21)$$

Desta maneira, o aumento da suavização é compensado e, conseqüentemente, a acurácia da seleção da escala adequada, realizada automaticamente, é melhorada. O valor de $\gamma = 1,25$ foi experimentalmente determinado por Majer (MAJER, 2001) por trabalhar de forma satisfatória em uma variedade de perfis de estruturas.

Além da determinação do parâmetro de escala, como descrito acima, analisando-se as va-

riações de intensidade identificadas pelas derivadas normalizadas é possível determinar a geometria das estruturas locais presentes em uma imagem. Para isso, um conjunto de derivadas parciais de segunda ordem, aplicado à imagem (suavizada por núcleos Gaussianos), pode ser usado para modelar e analisar as estruturas de objetos. Uma das combinações de derivadas parciais mais conhecidas na literatura recebe o nome de matriz Hessiana, que é comumente utilizada para a análise de características locais em imagens. Funções especiais, que permitem identificar objetos com padrões de forma específicos em uma imagem, podem ser construídas usando os autovalores da matriz Hessiana.

Dada uma escala σ , a matriz Hessiana $H_\sigma(I; \mathbf{x})$ de uma imagem I é uma matriz quadrada e simétrica, composta de derivadas parciais de segunda ordem calculadas para cada ponto \mathbf{x}_0 ,

$$H_\sigma(I; \mathbf{x}) = \begin{bmatrix} I_{\sigma x_1^2} & I_{\sigma x_1 x_2} & \cdots & I_{\sigma x_1 x_k} \\ I_{\sigma x_2 x_1} & I_{\sigma x_2^2} & \cdots & I_{\sigma x_2 x_k} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ I_{\sigma x_k x_1} & I_{\sigma x_k x_2} & \cdots & I_{\sigma x_k^2} \end{bmatrix}, \quad (4.22)$$

em que

$$I_{\sigma x_i^2} = I_0(\mathbf{x}) * \left(\partial^{2\gamma} \frac{\partial^2}{\partial x_i^2} G(\mathbf{x}; \sigma) \right) \quad (4.23)$$

e

$$I_{\sigma x_i x_j} = I_{\sigma x_j x_i} = I_0(\mathbf{x}) * \left(\partial^{2\gamma} \frac{\partial^2}{\partial x_i \partial x_j} G(\mathbf{x}; \sigma) \right). \quad (4.24)$$

O objetivo da análise dos autovalores da matriz Hessiana é extrair as principais direções nas quais as estruturas locais de uma imagem possam ser decompostas. Nesse caso, $\lambda_{\sigma,k}$ é o autovalor correspondente ao k -ésimo autovetor normalizado $\hat{\mathbf{u}}_{\sigma,k}$ do Hessiano H_σ , calculado para a escala σ . Da definição de autovalores, segue:

$$H_\sigma \hat{\mathbf{u}}_{\sigma,k} = \lambda_{\sigma,k} \hat{\mathbf{u}}_{\sigma,k}, \quad (4.25)$$

e, portanto,

$$\hat{\mathbf{u}}_{\sigma,k}^T H_\sigma \hat{\mathbf{u}}_{\sigma,k} = \lambda_{\sigma,k}. \quad (4.26)$$

A decomposição por autovalor extrai as direções ortonormais da matriz Hessiana na vizinhança de um ponto na imagem. Em geral, os sinais e as proporções dos autovalores podem ser usados como uma assinatura para a determinação da forma de um objeto de interesse na imagem. Assumindo que os autovalores da matriz Hessiana são ordenados em ordem crescente de seus valores absolutos ($|\lambda_1| \leq |\lambda_2| \leq \dots \leq |\lambda_k|$), as relações que eles possuem para diferentes estruturas locais em imagens (2D e 3D) são sumarizadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Possíveis padrões locais que podem ser detectados em uma imagem via análise dos autovalores λ_i da matriz Hessiana. A legenda usada é definida para os autovalores como: H=alto (*high*), L=baixo (*low*), N=ruído (*noisy*). Os sinais +/- indicam o sinal dos autovalores. Os autovalores são ordenados por suas magnitudes como: $|\lambda_1| \leq |\lambda_2| \leq |\lambda_3|$.

2D		3D			Tipo do padrão local (polaridade)
λ_1	λ_2	λ_1	λ_2	λ_3	
N	N	N	N	N	ruído, nenhuma orientação preferencial
		L	L	H-	estrutura na forma de prato (brilhante)
		L	L	H+	estrutura na forma de prato (escura)
L	H-	L	H-	H-	estrutura tubular (brilhante)
L	H+	L	H+	H+	estrutura tubular (escura)
H-	H-	H-	H-	H-	estrutura na forma de bolha (brilhante)
H+	H+	H+	H+	H+	estrutura na forma de bolha (escura)

Por descrever localmente a forma de objetos específicos em uma imagem, neste trabalho, a análise da matriz Hessiana foi investigada para a identificação de objetos (padrões) em forma de bolha (correspondendo aos leucócitos) nos quadros de vídeos de MI e padrões tubulares nos volumes 2D+t, formados pelo empilhamento dos quadros. No último caso, as estruturas tubulares detectadas representam os caminhos percorridos pelos leucócitos ao longo do tempo.

4.5 Detecção

Como citado nas seções anteriores, a técnica de detecção dos leucócitos é composta por duas etapas de processamento do vídeo, uma 2D (processamento quadro a quadro do vídeo) e outra 2D+t (processamento 3D da pilha de quadros). As subseções seguintes descrevem a técnica de detecção das estruturas de interesse a partir da matriz Hessiana que, neste trabalho, correspondem a estruturas em forma de bolha (imagens 2D) e estruturas tubulares (volume 2D+t). Para efeito comparativo, a técnica de casamento de padrões ou *Template Matching* também foi usada no processamento 2D para a detecção dos leucócitos nas imagens de MI.

4.5.1 Processamento 2D (espacial)

Esta subseção aborda as duas técnicas utilizadas para a detecção dos leucócitos nos quadros de vídeo.

4.5.1.1 Detecção de estruturas em forma de bolha a partir da matriz Hessiana

Ao tratar o problema da detecção de leucócitos por meio da análise local dos autovalores da matriz Hessiana é possível incorporar a informação de forma na solução. Como nos quadros do vídeo de MI (processamento 2D) os leucócitos se assemelham com estruturas circulares (ou bolhas) brilhantes em um fundo escuro, tais informações podem ser usadas para destacar essas estruturas (células) nas imagens. Além disso, sabe-se que estruturas isotrópicas se caracterizam por possuir autovalores com valores de magnitude similares e diferentes de zero. De acordo com a Tabela 4.1, para a detecção de estruturas isotrópicas brilhantes na forma de bolha em imagens bidimensionais, deve-se procurar por regiões na imagem cujos autovalores da matriz Hessiana local são, simultaneamente, altos e negativos.

Frangi *et al.* (FRANGI *et al.*, 1998) sugeriram o uso de uma medida de dissimilaridade $B_\sigma(\boldsymbol{\lambda})$, que é uma função dos autovalores da matriz Hessiana calculada para cada ponto da imagem, para mensurar o quanto uma determinada estrutura se assemelha a uma bolha brilhante. Nesse caso, a função $B_\sigma(\boldsymbol{\lambda})$ para imagens bidimensionais é definida como

$$B_\sigma(\boldsymbol{\lambda}) = \begin{cases} \left(1 - \exp\left(-\frac{R_A^2}{2\alpha^2}\right)\right) \left(1 - \exp\left(-\frac{S^2}{2c^2}\right)\right), & \text{se } \lambda_1 < 0 \text{ e } \lambda_2 < 0, \\ 0, & \text{caso contrário,} \end{cases} \quad (4.27)$$

em que α e c são parâmetros que controlam a sensibilidade da resposta da função para as medidas R_A e S . O valor de α foi fixado em 0,5 e o valor de c foi calculado como um décimo do valor máximo do Laplaciano da imagem, conforme sugerido por Dzyubak e Ritman em (DZYUBAK; RITMAN, 2011). A medida $R_A = |\lambda_{k-1}|/|\lambda_k|$ representa uma relação geométrica que é essencial na distinção entre estruturas circulares ou tubulares em imagens bidimensionais. Em contrapartida, a medida $S = \sqrt{\sum_{i \leq k} \lambda_i^2}$, conhecida como norma de Frobenius da matriz Hessiana, permite coibir a influência de pixels ruidosos na resposta da função $B_\sigma(\boldsymbol{\lambda})$, pois, como eles apresentam autovalores com baixos valores de magnitude, nesse caso, o segundo termo da Equação (4.27) irá reduzir consideravelmente a resposta da função. O parâmetro σ em $B_\sigma(\boldsymbol{\lambda})$ indica que as respostas são calculadas para diferentes escalas da imagem. Como a resposta da função é máxima quando a escala se aproxima do tamanho real do objeto de interesse, a detecção das células é estimada localmente como

$$B(\boldsymbol{\lambda}) = \max_{\sigma \in [\sigma_{min}, \sigma_{max}]} B_\sigma(\boldsymbol{\lambda}), \quad (4.28)$$

em que σ_{min} e σ_{max} são as escalas mínimas e máximas em que se espera encontrar os leucócitos. Esses valores, que devem ser determinados a fim de cobrir toda a variação de tamanho dos leucócitos, são passados como entrada para o algoritmo.

Neste trabalho, os valores de σ foram ajustados como valores entre $\sigma_{min} = 3$ e $\sigma_{max} = 5$ com passos de 20 iterações para as imagens simuladas, $\sigma_{min} = 1$ e $\sigma_{max} = 3$ em passos de 10 iterações para a primeira sequência de imagens reais de MI e $\sigma_{min} = 2$ e $\sigma_{max} = 5$ em passos de 20 iterações para a segunda sequência de imagens reais. Esses valores mostraram-se suficientes para cobrir toda a variação de tamanho dos leucócitos em ambos os conjuntos de imagens.

4.5.1.2 Casamento de padrões por correlação (*Template Matching*)

O casamento de padrões (*Template Matching* – TM) (GONZALEZ; WOODS, 1992) baseado na Correlação Cruzada Normalizada (CCN) é um algoritmo de reconhecimento de padrões que realiza a detecção de objetos similares em uma imagem $I(x, y)$, tendo como entrada a própria imagem e um objeto $T(x, y)$ (*template*) a ser detectado. Esse método foi desenvolvido e aplicado nas imagens reais de MI apenas com o intuito de comparação com a técnica baseada na análise dos autovalores da matriz Hessiana, dentro do esquema computacional proposto. O algoritmo utiliza como medida de similaridade o coeficiente de CCN, calculado como:

$$\rho(x, y) = \frac{\sum_r \sum_s [T(r, s) - \bar{T}] \cdot [I(x + r, y + s) - \bar{I}_T]}{\sqrt{\sum_r \sum_s [T(r, s) - \bar{T}]^2 \cdot \sum_r \sum_s [I(x + r, y + s) - \bar{I}_T]^2}}, \quad (4.29)$$

em que \bar{T} é o valor médio da intensidade dos pixels em $T(x, y)$ (calculado uma única vez), \bar{I}_T é o valor médio de I na região coincidente com a posição corrente de T e as somas são realizadas apenas sobre as coordenadas comuns a $I(x, y)$ e $T(x, y)$, delimitadas pelas variáveis r e s dos somatórios.

O coeficiente de correlação ρ indica o grau de similaridade entre o *template* T e a região de pesquisa na imagem I . Ele tem sua escala no intervalo $[-1, 1]$ e é, portanto, normalizado pelas amplitudes de T e I , sendo que $\rho = 1$ indica total correspondência entre T e uma região de I , $\rho = 0$ que não houve correspondência e $\rho = -1$ que houve correlação inversa. Para a aplicação do algoritmo, a região de uma célula foi extraída de uma das imagens reais e utilizada como *template*.

4.5.2 Processamento 2D+t (espaço-temporal)

Analisando-se o volume 2D+t formado a partir do empilhamento dos quadros do vídeo, nota-se que o caminho percorrido pelos leucócitos ao longo do tempo pode ser visualizado como estruturas tubulares. A detecção dessas estruturas em uma imagem tridimensional pode também ser realizada a partir da análise dos autovalores da matriz Hessiana local. Nesse caso

em particular, os autovalores desejados em um dado ponto \mathbf{x}_0 devem ter a seguinte relação de valores: $|\lambda_1| \approx 0$, $|\lambda_1| \ll |\lambda_2|$ e $\lambda_2 \approx \lambda_3$, sendo λ_2 e λ_3 negativos e com valores de magnitude altos, conforme a Tabela 4.1. Entretanto, essa assinatura dos autovalores é apenas parte da informação obtida por meio da análise local da matriz Hessiana. O autovetor correspondente ao autovalor de menor magnitude pode ser usado como uma estimacão da direção longitudinal da estrutura tubular, por exemplo (Figura 4.5).

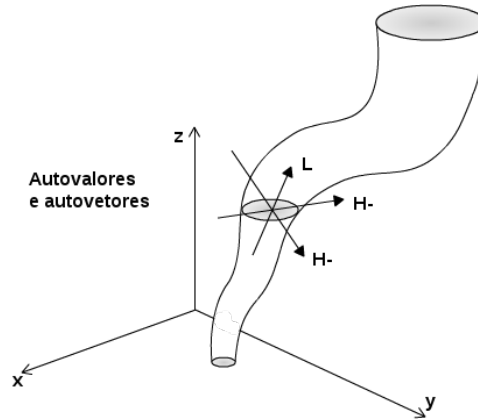


Figura 4.5: Características de uma estrutura tubular brilhante em uma imagem 3D com fundo escuro. A direção longitudinal da estrutura é dada pelo autovetor correspondente ao autovalor de menor magnitude.

Assim como na análise apresentada na Subseção 4.5.1, o processamento em imagens 3D também considera o uso de componentes geométricos para a criação de uma medida de dissimilaridade. Para tanto, duas relações geométricas baseadas nos autovalores e autovetores da matriz Hessiana 3×3 , os quais possuem conexão direta com as direções dos eixos e dimensões de um elipsoide centralizado no ponto \mathbf{x}_0 da imagem, são sugeridas por Frangi *et al.* (FRANGI *et al.*, 1998). A primeira delas (R_B) representa a discordância em relação a uma estrutura do tipo bolha, porém, não consegue distinguir entre estruturas do tipo linha ou prato (superfície):

$$R_B = \frac{\text{volume}/(4\pi/3)}{(\text{área da maior seção transversal}/\pi)^{3/2}} = \frac{|\lambda_1|}{\sqrt{|\lambda_2\lambda_3|}}. \quad (4.30)$$

Essa relação alcança seu máximo valor para uma estrutura do tipo bolha e é zero sempre que $\lambda_1 \approx 0$, ou λ_1 e λ_2 tendem a diminuir (note que λ_1/λ_2 permanecem limitados mesmo quando o segundo autovalor é muito pequeno, desde que sua magnitude é sempre maior que a primeira).

A segunda relação, correspondente a mesma medida R_A para análises bidimensionais, refere-se a área da maior seção transversal do elipsoide (no plano ortogonal a $\hat{\mathbf{u}}_1$, correspondente ao autovalor com menor magnitude λ_1) e explica a relação entre as duas maiores derivadas de segunda ordem. Essa relação é essencial na distinção entre os padrões estruturais do tipo prato

(superfície) e linha, onde apenas neste último caso ela valerá zero, ou seja:

$$R_A = \frac{(\text{área da maior seção transversal})/\pi}{(\text{comprimento do maior semi-eixo})^2} = \frac{|\lambda_{k-1}|}{|\lambda_k|} = \frac{|\lambda_2|}{|\lambda_3|}. \quad (4.31)$$

Por serem invariantes à variação de intensidade de cinza da imagem, essas relações garantem que as medidas extraídas capturem apenas informações geométricas da imagem. Dessa forma, ao adicioná-las à medida de dissimilaridade para a identificação de estruturas tubulares em imagens 3D, tem-se:

$$V_\sigma(\boldsymbol{\lambda}) = \begin{cases} 0, & \text{se } \lambda_2 > 0 \text{ ou } \lambda_3 > 0, \\ \left(1 - \exp\left(-\frac{R_A^2}{2\alpha^2}\right)\right) \exp\left(-\frac{R_B^2}{2\beta^2}\right) \left(1 - \exp\left(-\frac{S^2}{2c^2}\right)\right), & \text{caso contrário,} \end{cases} \quad (4.32)$$

em que α , β e c são, então, os limiares que controlam a sensibilidade da função para as medidas R_A , R_B e S , respectivamente. O valor de β foi, assim como α , fixado em 0,5, enquanto o parâmetro c e a medida S seguiram a mesma abordagem usada na análise bidimensional, descrita na Subseção 4.5.1. Novamente, como a resposta da medida de dissimilaridade é máxima quando a escala se aproxima do tamanho real do objeto de interesse, a detecção das estruturas tubulares é estimada como

$$V(\boldsymbol{\lambda}) = \max_{\sigma \in [\sigma_{min}, \sigma_{max}]} V_\sigma(\boldsymbol{\lambda}), \quad (4.33)$$

em que σ_{min} e σ_{max} são as escalas mínimas e máximas em que se espera encontrar a estrutura de interesse.

Neste trabalho, o processamento 2D+t tem como entrada um volume gerado a partir do empilhamento dos quadros do vídeo de MI. Cabe ressaltar que esse volume 2D+t só é gerado após o pré-processamento de todos os quadros do vídeo, com ênfase, principalmente, na etapa de estabilização dos quadros, que garante o alinhamento entre as estruturas tubulares formadas pelas posições dos leucócitos ao longo do tempo.

Na Figura 4.6 (a) é apresentado o volume 2D+t gerado a partir do empilhamento dos quadros de um vídeo real de MI. O resultado do processamento espaço-temporal por meio da técnica da análise da matriz Hessiana para a detecção de estruturas tubulares é apresentado na Figura 4.6 (b), cujos leucócitos e seus caminhos estão realçados ao longo do vídeo. O eixo Z nas figuras indica o tempo, enquanto os eixos X e Y representam as dimensões da imagem.

Para a detecção dos caminhos dos leucócitos foram considerados apenas os autovalores seguindo os padrões de estruturas tubulares descritos na Tabela 4.1, ou seja, um autovalor com valor baixo de magnitude e outros dois negativos e com valores altos de magnitude. O intervalo determinado aos valores de sigma aplicados foi $\sigma_{min} = 2$ e $\sigma_{max} = 5$ com passo de 20 iterações.

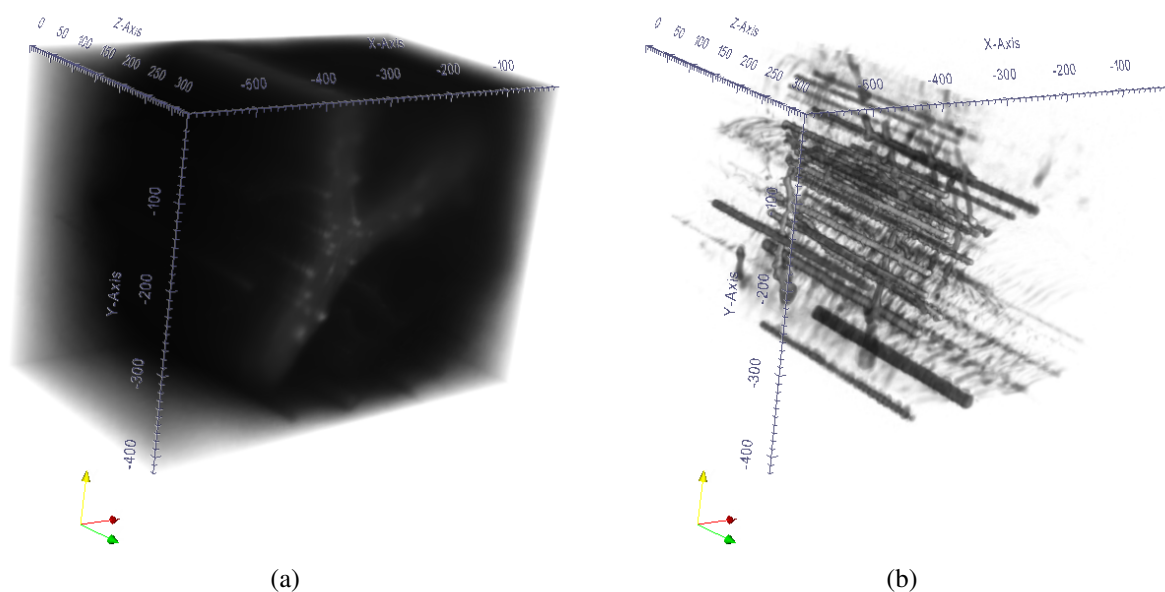


Figura 4.6: Resultado do processamento 2D+t. (a) Imagem espaço-temporal original formada pelo empilhamento dos quadros do vídeo e (b) imagem processada para o realce de estruturas tubulares representando a trajetória dos leucócitos no vaso sanguíneo ao longo do tempo.

4.6 Pós-processamento

Neste trabalho também foram desenvolvidas técnicas de pós-processamento visando melhorar as respostas obtidas dos métodos de detecção aplicados. Os principais objetivos dessa etapa de processamento são: diminuir o número de falso-positivos, aumentar a precisão do algoritmo de detecção, criar estruturas de manipulação bem definidas para o rastreamento e realizar um melhor estudo da dinâmica das células. Cada um dos estágios citados é descrito com mais detalhes nas subseções seguintes.

4.6.1 Pós-processamento 2D (espacial)

Como resultado do processamento 2D tem-se uma sequência de imagens contendo todas as possíveis estruturas do tipo bolha detectadas pelo algoritmo. Como mencionado anteriormente, devido ao posicionamento dos leucócitos sob o plano focal do microscópio, tem-se uma diferença significativa em seus tamanhos e especialmente em seus contrastes. Por essa razão, as imagens resultantes do detector aplicado são formadas por valores reais. Assim, para melhorar a detecção das células, uma técnica de limiarização adaptativa foi aplicada localmente nas

imagens resultantes. A técnica, cuja forma é

$$I_R(x,y) = \begin{cases} 1 & \text{se } I(x,y) > L(x,y), \\ 0 & \text{caso contrário,} \end{cases} \quad (4.34)$$

foi aplicada para binarizar as imagens resultantes do método. O valor da função de limiarização $L(x,y)$ é representado por uma soma ponderada (correlação cruzada com uma janela Gaussiana) da vizinhança de tamanho $N \times N$ centralizada na posição (x,y) . O tamanho da janela Gaussiana foi definido em $N = 17$, considerando o raio do maior leucócito nas imagens (observado visualmente). O valor do desvio padrão da janela Gaussiana é definido automaticamente conforme o tamanho especificado da vizinhança.

Com a binarização das respostas do algoritmo de detecção pela técnica de limiarização adaptativa, tem-se agora um conjunto de regiões circulares detectadas. Para cada região foi calculada a respectiva posição do centroide que, posteriormente, foi comparada às marcações manuais dos especialistas. Entretanto, a fim de reduzir o número de falso-positivos, outras duas etapas, descritas a seguir, foram efetuadas.

Primeiramente, a máscara calculada na etapa de pré-processamento foi aplicada sobre todos os quadros resultantes, selecionando, assim, apenas as células detectadas dentro da região de interesse. Por fim, cada ponto de centroide (candidatos à leucócitos) teve seus pixels vizinhos (em um raio de 5 pixels, determinado conforme o tamanho médio dos raios identificados manualmente) analisados nas imagens originais. Com os valores de intensidade desses pixels as imagens resultantes foram refinadas, escolhendo apenas aquelas regiões cujo valor médio foi maior ou igual a um determinado limiar. Todo esse processo foi conduzido para eliminar as baixas respostas do detector, causadas, provavelmente, por pixels ruidosos. O valor de limiar aplicado foi avaliado em um intervalo de 0 a 255, espaçado de uma unidade. A partir dos resultados encontrados com esses valores de limiarização foram calculadas as medidas de precisão, revocação e *F-score* (descritas na Subseção 4.8.2) e, conseqüentemente, a geração de um gráfico. Assim, avaliando-se as respostas encontradas para tais medidas foi possível determinar o melhor valor de limiar aplicado.

4.6.2 Pós-processamento 2D+t (espaço-temporal)

Similarmente às imagens resultantes do processamento 2D, os resultados do processamento 2D+t são imagens formadas por valores reais, as quais representam os caminhos dos leucócitos ao longo do vídeo, observados como estruturas tubulares realçadas pela técnica da Hessiana. Para que uma análise quantitativa pudesse ser realizada sobre essas imagens foi necessário que

cada caminho realçado fosse identificado e rotulado de forma única e simples. Para isso, um conjunto de técnicas foi estudado e implementado usando as imagens tridimensionais (2D+t), das quais pode-se destacar: uma técnica de esqueletização, o código da cadeia e uma técnica para a separação de estruturas. Todas elas são descritas em detalhes nas subseções seguintes.

4.6.2.1 Esqueletização

No espaço Euclidiano 3D, a esqueletização de um objeto é a localização geométrica dos centros de todas as esferas máximas inscritas no mesmo, na qual essas esferas tocam a borda em mais de um ponto (LEE; KASHYAP; CHU, 1994). Ela pode ser considerada uma característica simplista de um objeto, usada para reduzir o espaço de busca de pontos característicos em um modelo geométrico. Neste trabalho, uma técnica de esqueletização foi utilizada com o intuito de se obter a região central das estruturas tubulares identificadas pelo processamento espaço-temporal 2D+t.

Uma das formas mais utilizadas para se obter o esqueleto de um objeto é realizando o afinamento, ou do inglês, *thinning*. Essa abordagem tem como principal característica a eliminação dos pontos de borda do objeto repetidamente, respeitando as restrições topológicas (preservação do número de objetos conectados, cavidades e orifícios da forma original do objeto (MORGENTHALER, 1980)) e geométricas (condição que é usada para garantir a largura e a localização desejada do esqueleto) até atingir um pequeno conjunto de pontos conectados. A técnica de erosão simétrica tem sido amplamente utilizada com o intuito de obter as linhas centrais do objeto (ou seja, o esqueleto) e, conseqüentemente, garantir a conectividade do mesmo. A Figura 4.7 ilustra um exemplo do processo de esqueletização aplicado sobre um objeto circular.

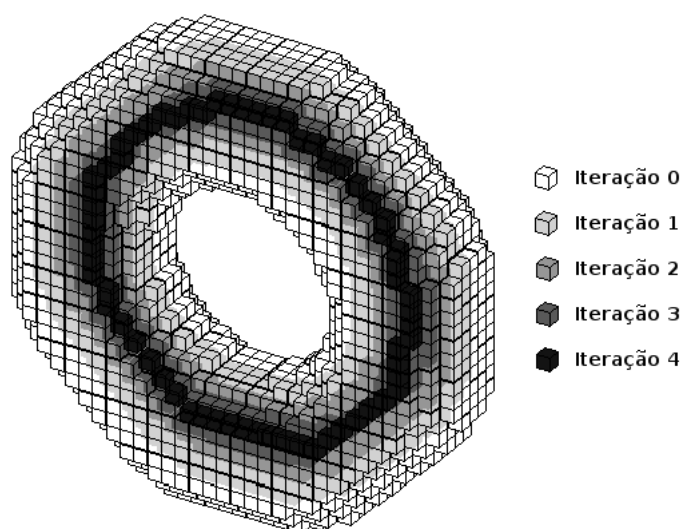


Figura 4.7: Imagem de um objeto circular contendo as etapas das iterações de erosão aplicadas (PALÁGYI, 2015).

Existem duas principais abordagens para a realização do *thinning*: a) filtros baseados em núcleos e b) árvores de decisão. Filtros baseados em núcleos estão relacionados à aplicação de um elemento estruturante a uma dada imagem e, geralmente, podem ser estendidos a dimensões superiores ao 3D (JONKER, 2000). Métodos baseados em árvores de decisão são limitados ao 2D e ao 3D, porém, se bem projetados, podem ser potencialmente mais rápidos do que os filtros morfológicos, encontrando mais pontos a serem eliminados a cada iteração.

Neste trabalho, o método baseado em árvores de decisão proposto por Lee *et al.* (LEE; KASHYAP; CHU, 1994) foi utilizado para a obtenção dos esqueletos das estruturas tubulares, representando, desta maneira, os caminhos dos centroides dos leucócitos ao longo do vídeo em análise. Como uma etapa de pré-processamento para o algoritmo de esqueletização, a imagem espaço-temporal resultante da aplicação do método da Hessiana foi binarizada a partir de um limiar. O limiar foi definido avaliando-se a maior resposta para as medidas finais de detecção (ver Subseção 4.8.2), conforme descrito na Seção de resultados 5.3.

O algoritmo utilizado baseia-se na realização de diversos testes com o intuito de verificar se um determinado voxel pode ser eliminado do objeto (estrutura tubular) ou não. Esse procedimento é feito iterativamente para todos os voxels pertencentes aos objetos da imagem até que não ocorram mais alterações. Resumidamente, um voxel pode ser eliminado do objeto se:

1. é um voxel de superfície. Esse teste considera apenas uma das seis direções do voxel (6-conectado em 3D) por vez. Assim, o processo de *thinning* é realizado simetricamente, garantindo que as linhas centrais não sejam deslocadas para um dos lados do objeto;
2. não pertencer ao final de uma linha, porque as linhas centrais devem permanecer;
3. sua eliminação não alterar a característica de Euler (MORGENTHALER, 1980) da imagem, isto é, se não forem criados novos buracos ou cavidades na imagem;
4. sua eliminação não alterar o número de objetos conectados na imagem.

O algoritmo utiliza a ideia de conectividade em uma vizinhança de 26 voxels (26-conectado) para os objetos e de 6 voxels (6-conectado) para o fundo da imagem, garantindo, como consequência dos testes, que não sejam criados buracos ou cavidades, e que a conectividade dos objetos se mantenha inalterada. Os resultados obtidos por essa etapa de processamento para duas sequências de imagens reais pode ser visto na Figura 4.8.

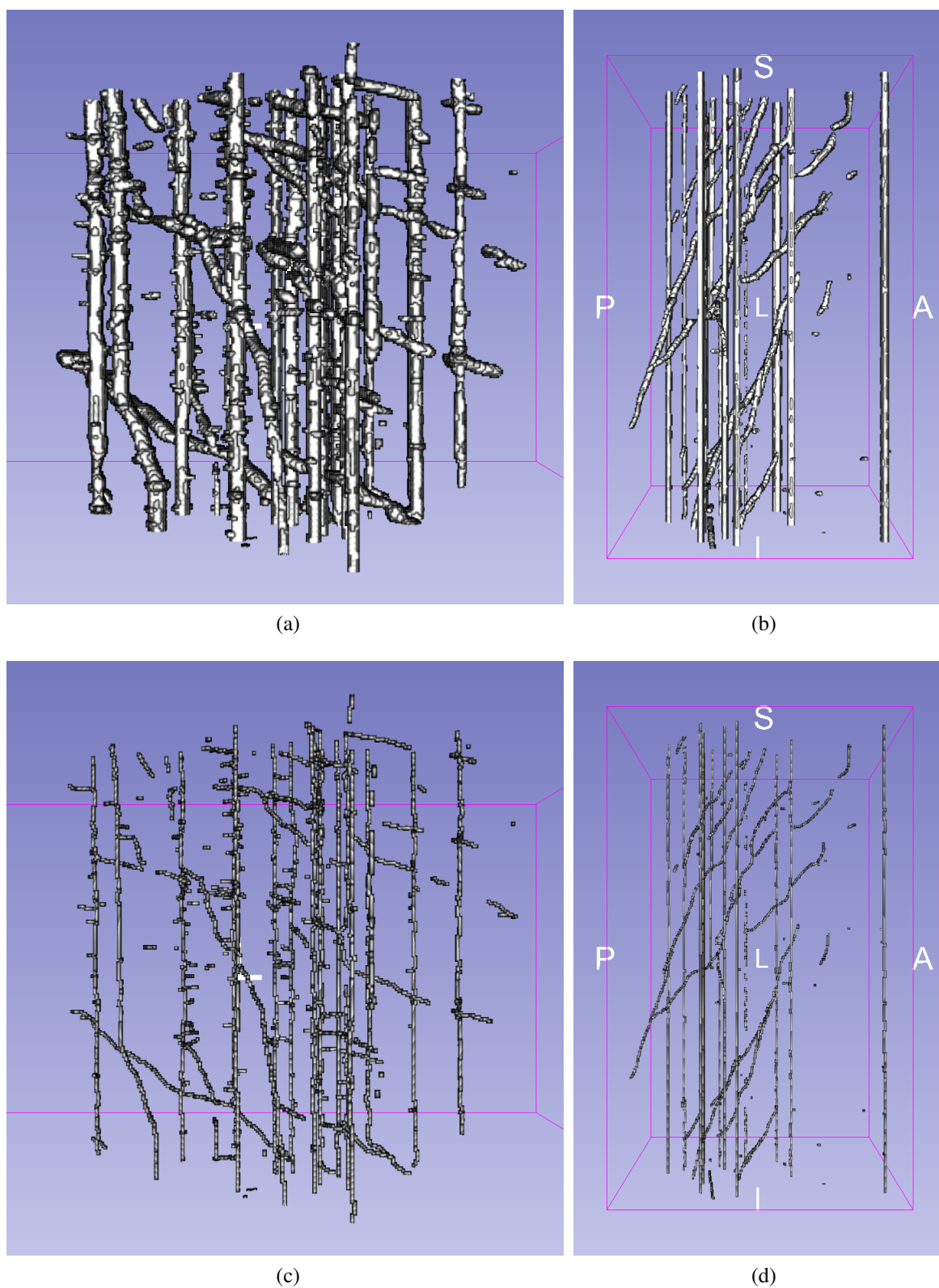


Figura 4.8: Resultados da etapa de esqueletização: (a) e (b) representam as imagens binarizadas; (c) e (d) representam os esqueletos após a aplicação do algoritmo de *thinning*.

4.6.2.2 Estruturação dos esqueletos

Após a etapa de esqueletização das estruturas tubulares detectadas na imagem espaço-temporal 2D+t, os caminhos encontrados precisam ainda ser processados para a eliminação de elementos espúrios (pequenos caminhos decorrentes, principalmente, de artefatos de movimento) e para a separação de cada um na imagem. Essa tarefa permite a identificação e obtenção de estatísticas individuais para cada célula.

Neste trabalho, optou-se pelo uso do código da cadeia (FREEMAN, 1961) para a representação de cada um dos caminhos obtidos após a esqueletização. O motivo é que essa técnica, além de ser bastante eficaz, é capaz de preservar a informação dos objetos, permitindo uma considerável redução no tamanho dos dados. Além disso, o código da cadeia é o formato de entrada padrão para uma série de algoritmos relacionados ao reconhecimento de padrões e à análise da morfologia de objetos. Entretanto, para que cada caminho na imagem espaço-temporal 2D+t seja determinado corretamente, é necessária a separação dos caminhos antes do uso do código da cadeia. As subseções a seguir abordam a aplicação dessa etapa de forma detalhada, assim como a descrição do algoritmo usado para a construção do código da cadeia.

Separação dos caminhos

O principal objetivo dessa etapa é o isolamento de cada caminho detectado com o intuito de identificar, para cada célula, a posição inicial, o percurso e a posição final no volume 2D+t. Isso porque, ao realizar os processos de binarização e *thinning*, muitos caminhos acabam se conectando devido à proximidade entre eles (células muito próximas no vídeo) ou pelo pouco movimento ainda presente nas imagens de vídeo utilizadas.

Outro ponto que vale ser destacado é que, devido ainda ao movimento residual presente no vídeo, mesmo após o método de estabilização, ou mesmo ao súbito salto de algumas células, o aparecimento de traços (linhas) horizontais nos esqueletos é notável nas imagens resultantes. Essa característica pode ser tratada como um elemento espúrio presente no esqueleto, ou do termo em inglês, *spurious*. A abordagem mais simples (e uma das mais utilizadas) para a eliminação desses elementos é o uso da técnica de limiarização, na qual exclui-se os segmentos¹ encontrados em pontos de junção do esqueleto cujo comprimento seja inferior a um valor de limiar previamente definido. Nesse caso, segmentos como o destacado em vermelho na Figura 4.9(a) são eliminados. Entretanto, tratando-se de imagens provenientes da movimentação de células, é possível que esse segmento pertença ao caminho de outra célula, como pode ser

¹Define-se, neste trabalho, segmento como sendo a parte de um caminho.

observado na Figura 4.9(b) na cor azul, tornando a técnica de limiarização inadequada para esses casos. A conexão entre os pontos pertencentes ao mesmo caminho é algo que deverá, portanto, ser avaliado em uma etapa posterior.

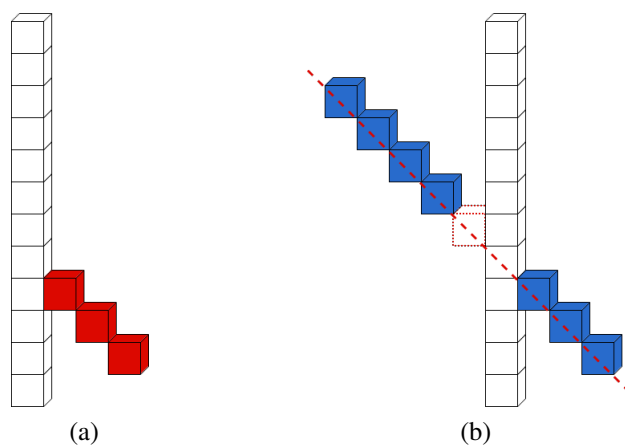


Figura 4.9: Exemplos de segmentos dos caminhos das células. Um caminho com uma bifurcação não necessariamente representa um elemento espúrio (ver (a)), ele pode conter parte de outro caminho que se cruza em determinado ponto (ver (b)).

Por ora os pontos de junção devem ser identificados e eliminados, ocasionando na separação de todos os caminhos com algum ponto de bifurcação e possibilitando a criação de estruturas únicas para cada segmento separadamente. Pontos de junção são definidos por voxels cujo número de vizinhos (26-conectado, no caso) é maior do que dois.

O algoritmo desenvolvido para a separação dos caminhos inicia-se pela busca dos pontos de junção dos esqueletos, ou por aqueles cujo número de vizinhos é zero (pontos isolados), e com a criação de uma matriz acumulativa do tamanho da imagem de entrada. Para cada ponto de junção identificado, um peso é acrescido no mesmo ponto na matriz acumulativa. O cálculo dessa ponderação está relacionado com a vizinhança do voxel, ou seja, para cada vizinho 6-conectado o valor acrescido é de 2 e para os demais vizinhos o valor é de 1. O algoritmo repete esses passos sobre toda a imagem por um determinado número de vezes, definido aqui neste trabalho como 4. Isso faz com que as regiões mais centrais de cada conjunto de pontos de junção tenham um valor superior às demais. A partir dessa matriz acumulativa são calculados, então, os máximos locais de cada região pela técnica desenvolvida em (BEARE; LEHMANN, 2005). Após a identificação dos pontos de máximo, é feita a exclusão de todos os voxels da vizinhança (26-conectado), resultando na separação dos caminhos. Todos os passos desse processo de separação podem ser visualizados na Figura 4.10, na qual os números representam os valores acumulados na matriz e os voxels em vermelho representam os máximos locais encontrados para os dois exemplos de caminhos da figura.

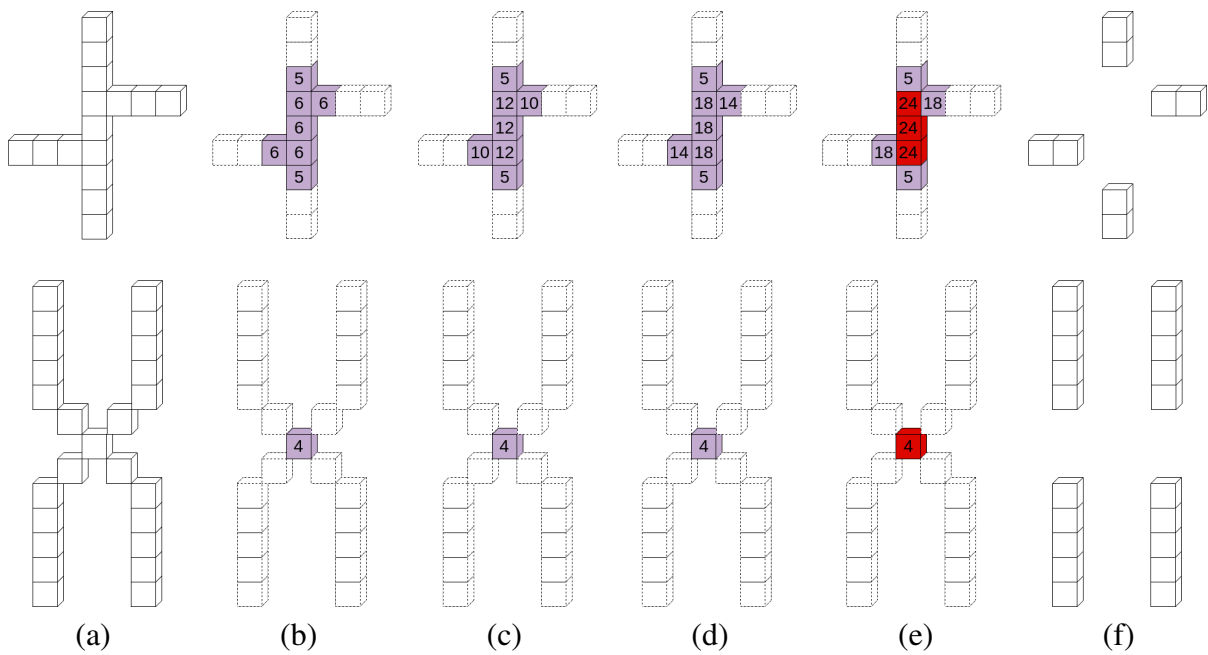


Figura 4.10: Ilustração dos passos do algoritmo de separação. (a) imagem original, (b) 1ª iteração, (c) 2ª iteração, (d) 3ª iteração, (e) 4ª iteração e identificação de máximos locais como voxels em vermelho e (f) eliminação dos voxels vizinhos.

Os processos descritos acima podem ser melhor acompanhados pelo Algoritmo 4.1. A identificação dos segmentos deve agora ser iniciada pelo código da cadeia, pois estes não mais possuem pontos de bifurcação. O algoritmo utilizado é descrito na seção a seguir.

Algoritmo 4.1 Separação dos caminhos na imagem espaço-temporal 2D+t.

Entrada: imagem do esqueleto dos caminhos dos leucócitos $I(\mathbf{x})$

```

1:  $C \leftarrow I$  ▷ cópia da imagem de entrada
2:  $M \leftarrow \{\}$  ▷ inicializa matriz acumulativa com zeros
3:  $i \leftarrow 1$ 
4: while  $i \leq Niteracoes$  do
5:   for cada voxel  $\mathbf{x} \in objeto$  do
6:     if  $C(\mathbf{x}) \geq i$  then
7:       if  $Nvizinhos = 0$  ou  $Nvizinhos > 2$  then
8:          $M(\mathbf{x}) \leftarrow M(\mathbf{x}) + CALCULAPESO(\mathbf{x})$ 
9:       end if
10:    end if
11:  end for
12:   $C \leftarrow M$ 
13:   $i \leftarrow i + 1$ 
14: end while
15:  $I \leftarrow MAXIMOSLOCAIS(M)$ 
16:  $ELIMINAVOXELS(I)$ 

```

Saída: imagem $I(\mathbf{x})$ com os segmentos separados

Código da Cadeia 3D

A fim de se criar uma estrutura para descrever os caminhos dos leucócitos de forma simples e eficiente, o código da cadeia 3D proposto por Bose (BOSE, 2000) foi adaptado e utilizado neste trabalho. O desenvolvimento desse algoritmo é baseado no trabalho de Freeman de 1961 (FREEMAN, 1961), que introduziu o uso da técnica na literatura. Nele, o conjunto de voxels vizinhos (26-conectado) de um ponto P é denotado por $N(P)$ e pode ser visto na Figura 4.11.

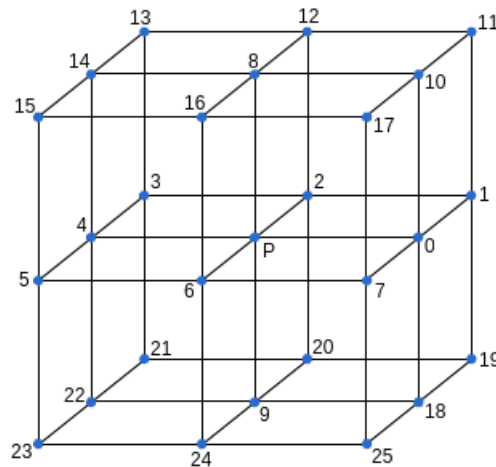


Figura 4.11: Os 26 vizinhos de um ponto P .

Assim, se P tem as coordenadas (i, j, k) , então

$$N(P) = \{(x, y, t) : 0 < [(i-x)^2 + (j-y)^2 + (k-t)^2]^{\frac{1}{2}} \leq \sqrt{3}\}, \quad (4.35)$$

e $x, y, t \in \mathbb{Z}$, em que \mathbb{Z} é o conjunto de inteiros.

Para cada ponto $P(x, y, t)$ em uma imagem 3D, o algoritmo utiliza as informações apresentadas na Tabela 4.2, cujas coordenadas representam as direções a partir do ponto P .

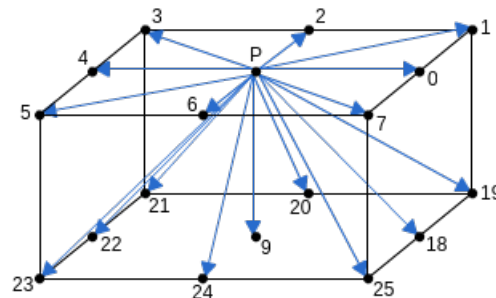
Entretanto, ao contrário do algoritmo de Bose, neste trabalho apenas as direções no mesmo eixo temporal (t) ou diretamente abaixo dele ($t + 1$) serão consideradas, ou seja, apenas o conjunto de direções $\{0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25\}$, conforme pode ser visto na Figura 4.12. A razão pelo uso desse conjunto na análise da imagem espaço-temporal baseia-se no fato de que um deslocamento na direção $t - 1$ implicaria em voltar no tempo, o que não seria possível neste caso, visto que a determinação do código da cadeia inicia-se sempre nos pontos mais superiores de qualquer segmento (primeiros pontos no tempo).

De acordo com o algoritmo proposto por Bose, a ordem das direções de busca é a seguinte:

4,3,2,1,0,7,6,5,
9,22,21,20,19,18,25,24,23.

Tabela 4.2: Códigos do algoritmo e suas respectivas direções.

Código	Direção	Código	Direção
0	$(x+1, y, t)$	13	$(x-1, y-1, t-1)$
1	$(x+1, y-1, t)$	14	$(x-1, y, t-1)$
2	$(x, y-1, t)$	15	$(x-1, y+1, t-1)$
3	$(x-1, y-1, t)$	16	$(x+1, y+1, t-1)$
4	$(x-1, y, t)$	17	$(x, y+1, t-1)$
5	$(x-1, y+1, t)$	18	$(x+1, y, t+1)$
6	$(x, y+1, t)$	19	$(x+1, y-1, t+1)$
7	$(x+1, y+1, t)$	20	$(x, y-1, t+1)$
8	$(x, y, t-1)$	21	$(x-1, y-1, t+1)$
9	$(x, y, t+1)$	22	$(x-1, y, t+1)$
10	$(x+1, y, t-1)$	23	$(x-1, y+1, t+1)$
11	$(x+1, y-1, t-1)$	24	$(x, y+1, t+1)$
12	$(x, y-1, t-1)$	25	$(x+1, y+1, t+1)$

**Figura 4.12: Direções utilizadas no código da cadeia desenvolvido.**

No caso das imagens espaço-temporais utilizadas, tem-se um conjunto de segmentos com ponto inicial e final. Para a determinação desses pontos, conhecidos como *end points*, foi feita uma busca pelos voxels cujo número de vizinhos 26-conectados seja igual a 1. O processo de codificação do algoritmo inicia-se para cada *end point* encontrado, seguindo a ordem temporal da imagem $(t, t+1, t+2, \dots)$. Desta maneira, partindo de um *end point* (ponto inicial), o percurso da célula vai sendo codificado e ao se deparar com um novo *end point* ao longo do caminho (ponto final), o algoritmo instantaneamente pára e salva o código da cadeia do segmento. Esse procedimento é feito até que todos os *end points* encontrados sejam definidos como pontos iniciais ou finais, garantindo que todos os segmentos (já separados em etapa anterior) sejam determinados.

A estruturação pelo código da cadeia permite realizar, portanto, o rastreamento das células e, conseqüentemente, calcular medidas quantitativas das mesmas. Para calcular a distância percorrida por uma célula na imagem espaço-temporal 2D+t, por exemplo, basta que a resolução espacial seja definida e que os valores a serem somados sigam os padrões dos vetores apresentados nas Figuras 4.13 (b) e (c), em que a distância só é válida caso o vetor direcional pertença

a outro eixo temporal ($t - 1$ ou $t + 1$) e seja diagonal ao ponto em análise.

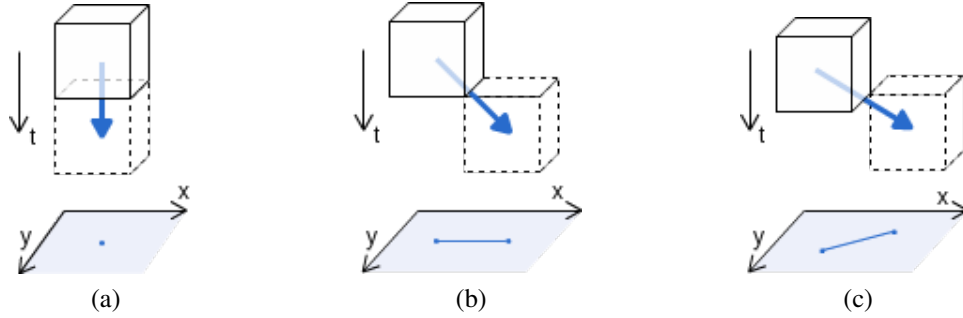


Figura 4.13: Exemplos de vetores de deslocamento para o cálculo da distância percorrida por uma célula. (a) Deslocamento vertical, indica que a célula está imóvel; (b) deslocamento horizontal, indica que a célula percorreu a distância de $1x$ ou $1y$; e (c) deslocamento diagonal, indica que a célula percorreu a distância de $\sqrt{x^2 + y^2}$.

Em outras palavras, a distância percorrida por uma célula é definida por:

$$D = N_{\alpha_x} R_x + N_{\alpha_y} R_y + N_{\beta} \sqrt{R_x^2 + R_y^2}, \quad (4.36)$$

em que as medidas R_x e R_y representam as resoluções (em μm) nos eixos espaciais x e y , respectivamente, e

N_{α_x} = número de voxels do conjunto de direções α para o eixo x ,

N_{α_y} = número de voxels do conjunto de direções α para o eixo y ,

N_{β} = número de voxels do conjunto de direções β ,

em que

$$\alpha_x = \{10, 14, 18, 22\},$$

$$\alpha_y = \{12, 16, 20, 24\},$$

$$\beta = \{11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25\}.$$

4.7 Refinamento e combinação dos processamentos

A fim de refinar e combinar os resultados dos processamentos 2D e 2D+t, esta etapa de processamento tem o objetivo de realizar (quando necessário) a conexão dos segmentos que foram detectados e separados nos estágios do processamento espaço-temporal anteriores. Como nessa etapa do método os segmentos encontram-se armazenados na forma de vetores de pontos, a informação de ponto inicial e final para cada um deles é facilmente obtida. Desta maneira, para determinar se uma conexão precisa ser feita, foi desenvolvido um algoritmo capaz de realizar

a busca pelo segmento mais adequado a ser conectado, ou seja, aquele cuja dinâmica é a mais próxima.

O algoritmo parte dos pontos finais dos segmentos e baseia-se na busca por pontos iniciais dentro de uma região em forma de cone. Como parâmetros, define-se um valor h de altura e um valor angular a de abertura para o cone, como pode ser observado na Figura 4.14.

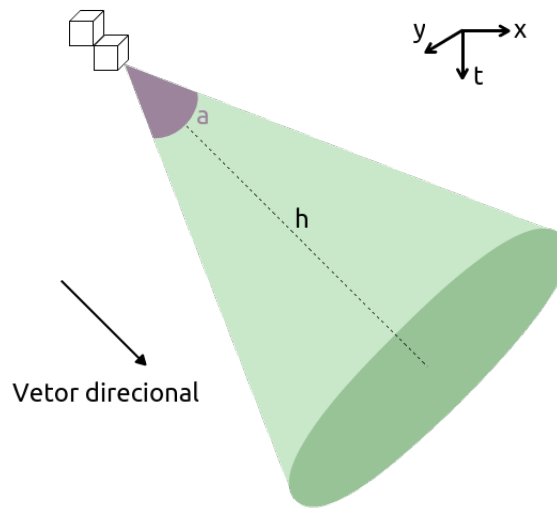


Figura 4.14: Características do cone utilizado no algoritmo para a conexão de segmentos.

A direção pela qual o cone será desenhado é dada pela soma vetorial das direções dos n voxels anteriores ao ponto final do segmento em análise. Para este trabalho o número n foi definido como 10 ou o valor total de voxels do segmento, caso este possua menos de 10 voxels em sua composição. O vetor direcional (\vec{A}) encontrado para o segmento em análise é então comparado com aquele obtido de cada segmento pertencente à região do cone (\vec{B}), ou seja, uma comparação é feita entre os vetores direcionais de todos os segmentos candidatos à conexão (caso exista mais de um candidato). Um valor máximo de 20° foi definido para o aceite do segmento a ser conectado, buscando, porém, aquele que apresentar a menor diferença angular entre seus vetores direcionais. O cálculo da diferença entre esses vetores é dado em radianos por:

$$\alpha = \arccos \frac{\vec{A} \cdot \vec{B}}{\|\vec{A}\| \cdot \|\vec{B}\|}. \quad (4.37)$$

Em adição ao cálculo da diferença angular, nesta etapa foram utilizadas também as informações do resultado da detecção 2D, caracterizando a combinação entre os processamentos 2D e 2D+t. Para isso, os voxels do segmento de conexão foram analisados. Esses voxels foram determinados a partir de uma linha criada pelo algoritmo de Bresenham (JOY, 1999) e foram

comparados com os melhores resultados (baseados na medida *F-Score*) dos métodos aplicados na detecção espacial. O número de pontos similares encontrados na detecção espacial (em um raio de 2 na distância Euclidiana) é contabilizado para cada segmento de conexão candidato, de maneira que

$$F_2 = \frac{\text{número de pontos encontrados}}{\text{total de pontos do segmento de conexão}}, \quad (4.38)$$

representa a relação entre os pontos encontrados e o total de pontos pertencentes à linha de conexão.

Para, enfim, determinar qual segmento candidato à conexão deve ser utilizado, foi criada a Equação (4.39):

$$F = \beta F_1 + (1 - \beta) F_2, \quad (4.39)$$

em que $F_1 = \cos(\alpha)$ e β é um parâmetro de ponderação entre as duas medidas, definido neste trabalho como 0,5. Como resultado, tem-se a resposta de F no intervalo de $[0, 1]$, sendo que quanto mais próximo do valor 1, maior é probabilidade da conexão estar correta. Sendo assim, o segmento que apresentar a maior resposta de F será aquele selecionado para a conexão.

Os valores dos parâmetros h e a dos cones foram modificados, conforme indicado na Tabela 4.3, em 8 iterações consecutivas, iniciando-se com um cone de altura pequena e base larga e alterando tais valores até atingir um cone de grande altura e base estreita. Esses valores foram definidos com o intuito de, gradativamente, diminuir a região lateral de busca e aumentar o alcance do algoritmo, tornando-o mais eficiente na seleção dos segmentos a serem conectados.

Tabela 4.3: Parâmetros utilizados na definição do cone de busca nas diversas iterações.

Iteração	Altura h do cone (em voxels)	Ângulo a de abertura (em graus)
1	3	50°
2	5	40°
3	10	30°
4	15	20°
5	20	10°
6	25	5°
7	30	3°
8	40	3°

Na Figura 4.15 é possível observar a motivação pela qual os diferentes valores de parâmetros (ilustrados como cones de diferentes tamanhos) são aplicados de forma iterativa. Nela, fica claro que ao considerar apenas um valor para cada parâmetro na criação do cone (linha tracejada na imagem), este abrangeria uma região muito grande e provavelmente desnecessária, causando uma quantidade maior de falsas conexões.

Levando-se em consideração toda a descrição anterior, em resumo, o algoritmo utilizado

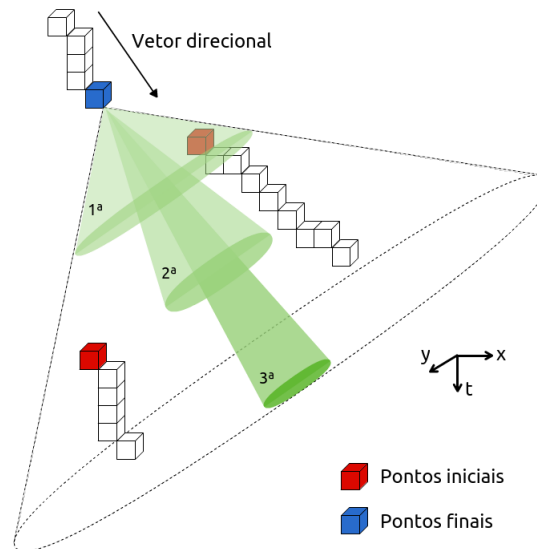


Figura 4.15: Exemplo da criação dos cones para diferentes iterações do algoritmo.

segue os seguintes passos para a identificação de um segmento a ser conectado:

1. Seleciona-se o ponto final de um segmento;
2. Calcula-se o vetor direcional a partir dos 10 últimos voxels do segmento em análise;
3. Os parâmetros do cone são obtidos conforme o número da iteração (como descrito na Tabela 4.3) e a direção do vetor calculada na etapa anterior;
4. Para cada ponto inicial dos segmentos é verificado se este encontra-se dentro da região espacial do cone;
5. Em caso positivo, calcula-se o vetor direcional do segmento selecionado. Se a diferença angular entre os vetores analisados for inferior ou igual a 20° , a conexão é realizada (por meio da criação de uma linha usando o algoritmo de Bresenham (JOY, 1999), ligando os pontos final e inicial dos segmentos em questão;
6. Para os casos no qual existem mais de um segmento possível de conexão, é selecionado aquele cujo valor da resposta F é superior aos demais.

Os passos descritos nesta seção podem ser melhor visualizados na Figura 4.16.

Se, mesmo após a conexão dos segmentos, a quantidade de voxels pertencentes a um caminho for inferior a 50, este segmento é excluído da imagem resultante. Isso porque, ao eliminar

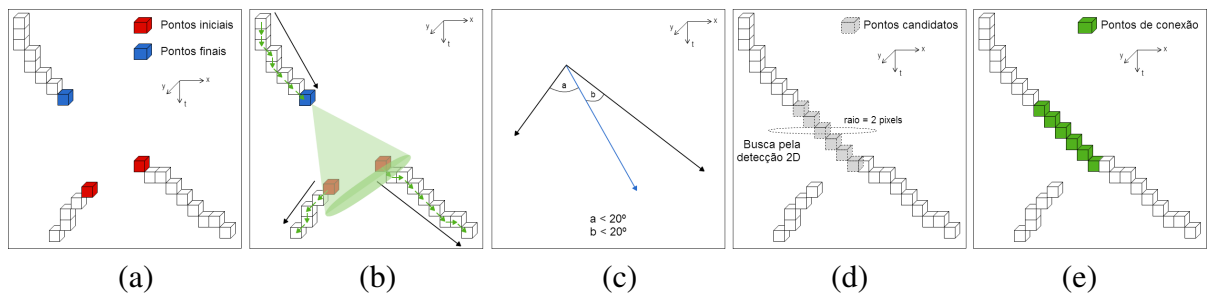


Figura 4.16: Passos seguidos no algoritmo de conexão dos segmentos. (a) Imagem original; (b) busca na região indicada pelo cone e definição dos vetores direcionais; (c) comparação angular entre os vetores direcionais dos segmentos candidatos; (d) busca pelos pontos detectados no processamento 2D; e (e) segmentos conectados.

pequenos segmentos na imagem, a chance de eliminação de falsos-positivos também é grande. Este valor foi definido de acordo com a resolução temporal (16 *fps*) dos vídeos utilizados no trabalho e o tempo mínimo de permanência da célula no campo visual de 3 segundos, ou seja, $3 \text{ seg} \times 16 \text{ fps} \approx 50$ quadros. Esse procedimento foi aplicado também nas marcações manuais dos vídeos analisados.

4.8 Métodos de análise

Esta subseção aborda os métodos de análise desenvolvidos e como eles foram usados para a avaliação dos métodos de estabilização do vídeo e detecção e rastreamento dos leucócitos.

4.8.1 Análise da estabilização dos vídeos de MI

Visto que os resultados das técnicas de detecção e rastreamento dos leucócitos dependem diretamente da técnica de estabilização do vídeo de MI, aplicada na etapa de pré-processamento das imagens, então, essa técnica foi avaliada quantitativamente e qualitativamente, utilizando as métricas (técnicas) abaixo.

Projeção de linha Por meio da técnica de projeção de linha é possível obter uma análise visual de todo o vídeo processado. Tal técnica produz uma imagem formada pelo empilhamento vertical das linhas centrais dos quadros que compõem o vídeo. Dessa maneira, analisando-se os perfis de intensidade empilhados, é possível observar o quão alinhados (ou desalinhados) estão as bordas de objetos presentes nos quadros do vídeo.

Relação sinal-ruído de pico (PSNR) O termo PSNR define a relação entre a máxima energia possível de um sinal e o ruído que afeta a fidelidade da sua representação entre os quadros do vídeo. Ele é vulnerável aos tipos de distorção causados pelo desalinhamento de pixels, como a mudança espacial, rotação e redimensionamento (KORHONEN; JUNYONG, 2012).

A medida PSNR é definida como

$$PSNR = 20 \log_{10} \left(\frac{MAX_I}{RMSE} \right), \quad (4.40)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{mn} \sum_1^m \sum_1^n \| I_{t+1}(x,y) - I_t(x,y) \|^2}, \quad (4.41)$$

em que MAX_I representa o máximo valor do sinal existente na imagem I e $I_t(x,y)$ representa o pixel da imagem no momento t na posição (x,y) . A quantidade de linhas e colunas da imagem é dada, respectivamente, como m e n . Neste trabalho, o PSNR foi calculado sobre o resíduo resultante da subtração entre pares de quadros consecutivos do vídeo. Nesse caso, se o resíduo for pequeno, então o valor do PSNR será alto, indicando um bom alinhamento entre os dois quadros. De outra forma, se o resíduo for alto, indicando um alto grau de desalinhamento, então o valor do PSNR será baixo.

4.8.2 Análise da detecção 2D (espacial)

Para a análise dos resultados do método de detecção 2D foram utilizadas as coordenadas espaciais dos centroides dos leucócitos manualmente identificados (*ground truth*) e anotados sob supervisão da Profa. Dra. Juliana Carvalho Tavares da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). As coordenadas dos centroides automaticamente detectados pelos métodos desenvolvidos foram obtidas e registradas para a mesma sequência de imagens de vídeo de MI (imagens reais). Nessa análise, um leucócito (referenciado pelo seu centroide) foi considerado corretamente detectado pelos métodos se, para uma dada distância ao redor do mesmo, houver um leucócito (centroide) anotado no *ground truth*. O valor dessa distância foi estabelecido como 5 pixels com base no valor médio do raio das células marcadas manualmente no vídeo em análise. Com isso, foi possível encontrar valores de TP, FP e FN.

O desempenho global do método para a detecção 2D foi então calculado a partir das medidas clássicas de precisão P , revocação R e F -measure (ou F_ω -score) (GOUTTE; GAUSSIER, 2005), que são baseadas na contagem do número de TPs, FPs e FNs ao longo da sequência de imagens:

$$P = \frac{TP}{(TP + FP)}, \quad (4.42)$$

$$R = \frac{TP}{(TP + FN)}, \quad (4.43)$$

$$F = \frac{1}{\psi \frac{1}{P} + (1 - \psi) \frac{1}{R}} = (1 + \omega^2) \cdot \frac{P \cdot R}{\omega^2 P + R}. \quad (4.44)$$

O número de verdadeiros positivos (TP) representa a quantidade acumulada de leucócitos corretamente detectados pelo algoritmo ao longo do vídeo em análise (localizados dentro da margem de 5 pixels de distância), os falsos positivos (FP) são representados pelo número acumulado de leucócitos detectados automaticamente mas que não correspondem a leucócitos reais (ou identificados manualmente) e os falsos negativos (FN) representam o número acumulado de leucócitos que o algoritmo não conseguiu detectar.

A precisão do sistema expressa a taxa de acertos efetivos dentre aquilo que foi detectado (TP+FP), enquanto a revocação expressa a taxa do que foi corretamente detectado dentre as reais instâncias positivas (TP+FN). A F_ω -score pode ser considerada uma medida de compensação entre as avaliações feitas por P e R por meio de uma média harmônica ponderada. Ela mede a eficácia dos resultados atribuindo ω vezes mais importância à taxa de revocação do que à taxa de precisão. A medida mais utilizada (F_1) envolve a mesma ponderação para ambas as taxas, ou seja, $\psi = 0.5$ e, conseqüentemente, $\omega = 1$. Outras duas medidas comumente utilizadas em F_ω são as ponderações da forma F_2 , e $F_{0.5}$, cujas ponderações dão maior importância para as taxas de revocação e precisão, respectivamente. Quanto mais próximas as grandezas estiverem do valor máximo 1, melhor é a eficácia do sistema de detecção.

Neste trabalho, a medida F_1 -score teve seu parâmetro $\omega = 1$ escolhido por atribuir a mesma ponderação às duas taxas avaliadas (P e R). Os resultados foram analisados dentro do intervalo do limiar aplicado sobre a média dos pixels vizinhos nas imagens originais, conforme descrito na etapa de pós-processamento (Seção 4.6.1). A partir do resultado obtido para cada valor de limiar entre 0 e 255 (variando em uma unidade) gerou-se um gráfico de precisão-revocação e, conseqüentemente, valores diferentes para a medida F_1 -score e para a área sob a curva do gráfico (AUCPR).

4.8.3 Análise da detecção 2D+t (espaço-temporal)

De maneira similar ao processo de avaliação dos resultados da detecção 2D, as imagens resultantes do processamento espaço-temporal foram comparadas com as marcações manuais das células. Vale destacar, entretanto, que no processamento espaço-temporal as células estão sendo rastreadas ao longo do tempo e a posição de seus centroides deve ser avaliada perante as marcações manuais já rotuladas. Assim, para cada caminho detectado pelo algoritmo, uma

coordenada inicial no *ground truth* é pesquisada dentro de um raio de 5 pixels. Porém, ao encontrar uma marcação válida, a análise continua buscando apenas as posições referentes às marcações de mesmo rótulo, certificando-se de que a avaliação do rastreamento celular está sendo realizada de maneira correta. Com isso, as medidas de precisão, revocação e F_1 -score podem ser calculadas da mesma forma como foi descrita na seção anterior.

4.8.4 Análises comparativas

O índice de aceitação ou concordância entre os especialistas nas marcações manuais das células é uma medida de grande importância para que um intervalo de confiança possa ser definido e, assim, permitir que o método desenvolvido seja analisado de maneira mais robusta. Entre os vídeos reais utilizados neste trabalho, apenas um deles foi analisado por dois especialistas, permitindo que fosse feita a avaliação intra observadores.

O índice de concordância (S) usado é um caso especial da estatística de kappa (BARTKO, 1991) e pode ser utilizado para medir a concordância entre os observadores. Seu cálculo é similar à medida F_1 -score e derivado do coeficiente kappa original (consultar Apêndice A para mais detalhes):

$$S = \frac{2TP}{(2TP + FP + FN)}. \quad (4.45)$$

Como uma análise qualitativa da comparação entre os processamentos 2D e 2D+t, as imagens resultantes foram combinadas, apresentando as discordâncias de forma visual, conforme apresentado na Seção 5.3 de resultados.

4.9 Considerações finais

Este capítulo descreveu a metodologia empregada neste trabalho para o desenvolvimento dos métodos propostos, além de apresentar as informações sobre as características dos vídeos de MI utilizados. Os métodos descritos envolveram as etapas de pré-processamento, as técnicas utilizadas para a detecção e rastreamento de leucócitos, o pós-processamento e as métricas de análise dentro da proposta do trabalho. No capítulo seguinte serão apresentados os resultados obtidos durante o desenvolvimento da pesquisa.

Capítulo 5

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Após o detalhamento da metodologia do trabalho, este capítulo apresenta e discute os resultados obtidos nesta pesquisa. Os resultados, análises e discussões aqui apresentadas seguem o andamento do esquema computacional proposto, iniciando pelos resultados das etapas de pré-processamento, o estudo da aplicação do método baseado na Hessiana em imagens simuladas, a aplicação desse método em imagens reais de MI e a avaliação quantitativa e qualitativa dos processamentos 2D e 2D+t.

5.1 Resultados da etapa de pré-processamento

O algoritmo de correção de imagens, como descrito na subseção 4.8.1, foi visualmente avaliado através da técnica de projeção de linha. O resultado da aplicação dessa técnica nas duas sequências de imagens de MI utilizadas neste trabalho pode ser visto na Figura 5.1.

Comparando ambas as projeções na Figura 5.1, um padrão, comumente designado como “dentes de serra”, pode ser observado em (a) e levemente em (c). Esse padrão visual indica o desalinhamento dos quadros ao longo do vídeo antes do pré-processamento. Por outro lado, nas imagens (b) e (d) esse padrão é significativamente suavizado, indicando a presença de linhas mais contínuas e conseqüentemente um melhor alinhamento dos quadros após o processo de correção.

Uma análise quantitativa da estabilização dos vídeos também foi conduzida neste trabalho. Para tal, a métrica PSNR foi calculada para imagens residuais obtidas da subtração de pares de quadros consecutivos ao longo de todo o vídeo, antes e após a estabilização. Os valores encontrados para as mesmas sequências de imagens de MI podem ser observados na Figura 5.2 e na Tabela 5.1.

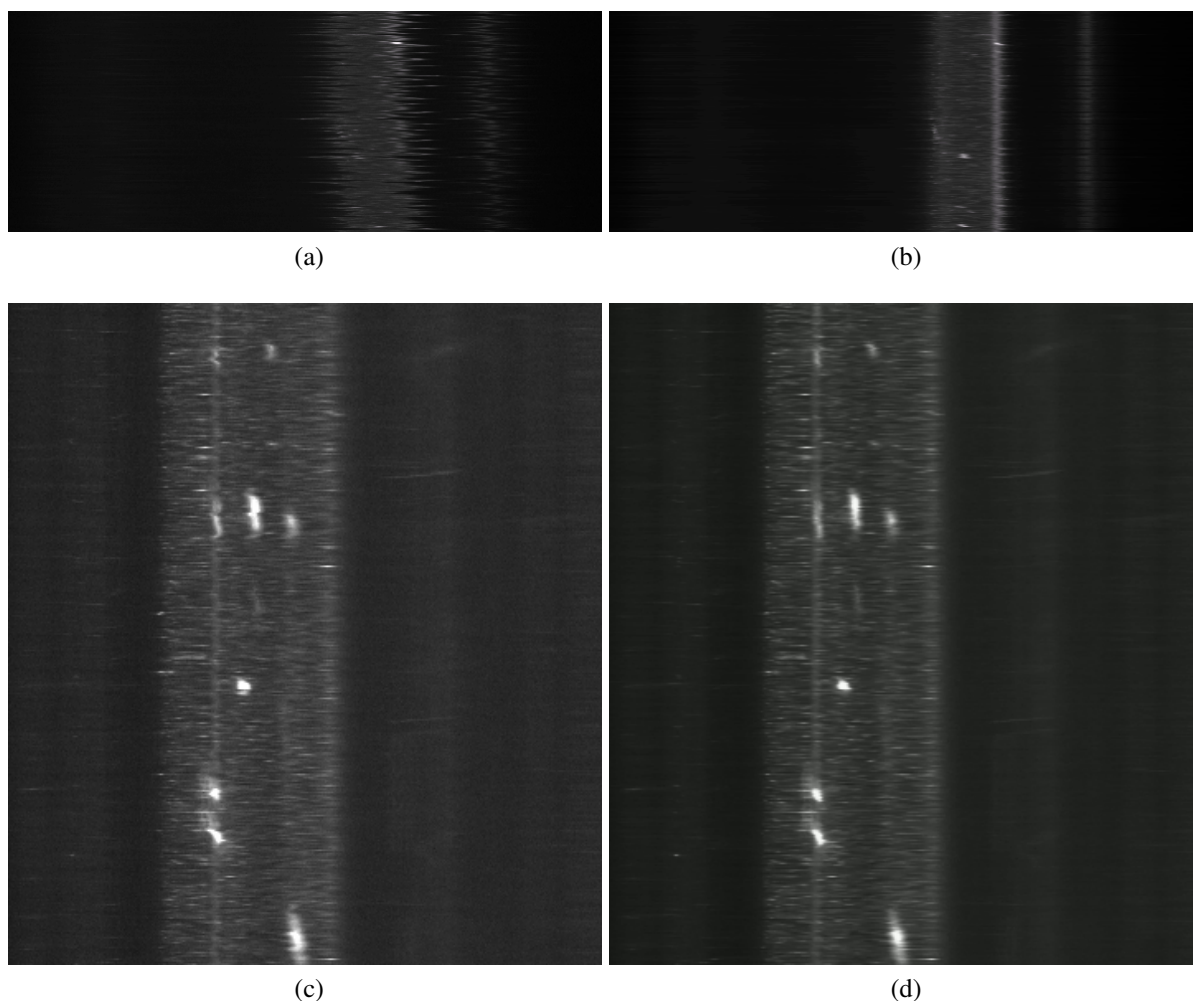


Figura 5.1: Resultados da projeção de linha. Imagens das projeções de linha antes ((a) e (c)) e depois da técnica de correção ((b) e (d)).

Os valores de média e desvio padrão dos quadros originais (antes do correção - painéis esquerdos da Figura 5.2) foram, respectivamente, 35,28 dB e 3,13 dB para o primeiro vídeo e 31,21 dB e 0,71 dB para o segundo vídeo. Enquanto que para os quadros estabilizados (painéis direitos da figura) eles foram 37,79 dB e 1,62 dB para o primeiro vídeo e 32,46 dB e 0,97 dB para o segundo, respectivamente.

Tabela 5.1: Resultados encontrados para as medidas de PSNR aplicadas nos dois vídeos de MI.

	Vídeo	Média (dB)	Desvio padrão (dB)
1	Original	35,28	3,13
	Estabilizado	37,79	1,62
2	Original	31,21	0,71
	Estabilizado	32,46	0,97

Essas respostas mostram uma redução considerável de movimento nas imagens apesar de os valores da métrica serem relativamente pequenos (menores que 40 dB), o que é uma consequên-

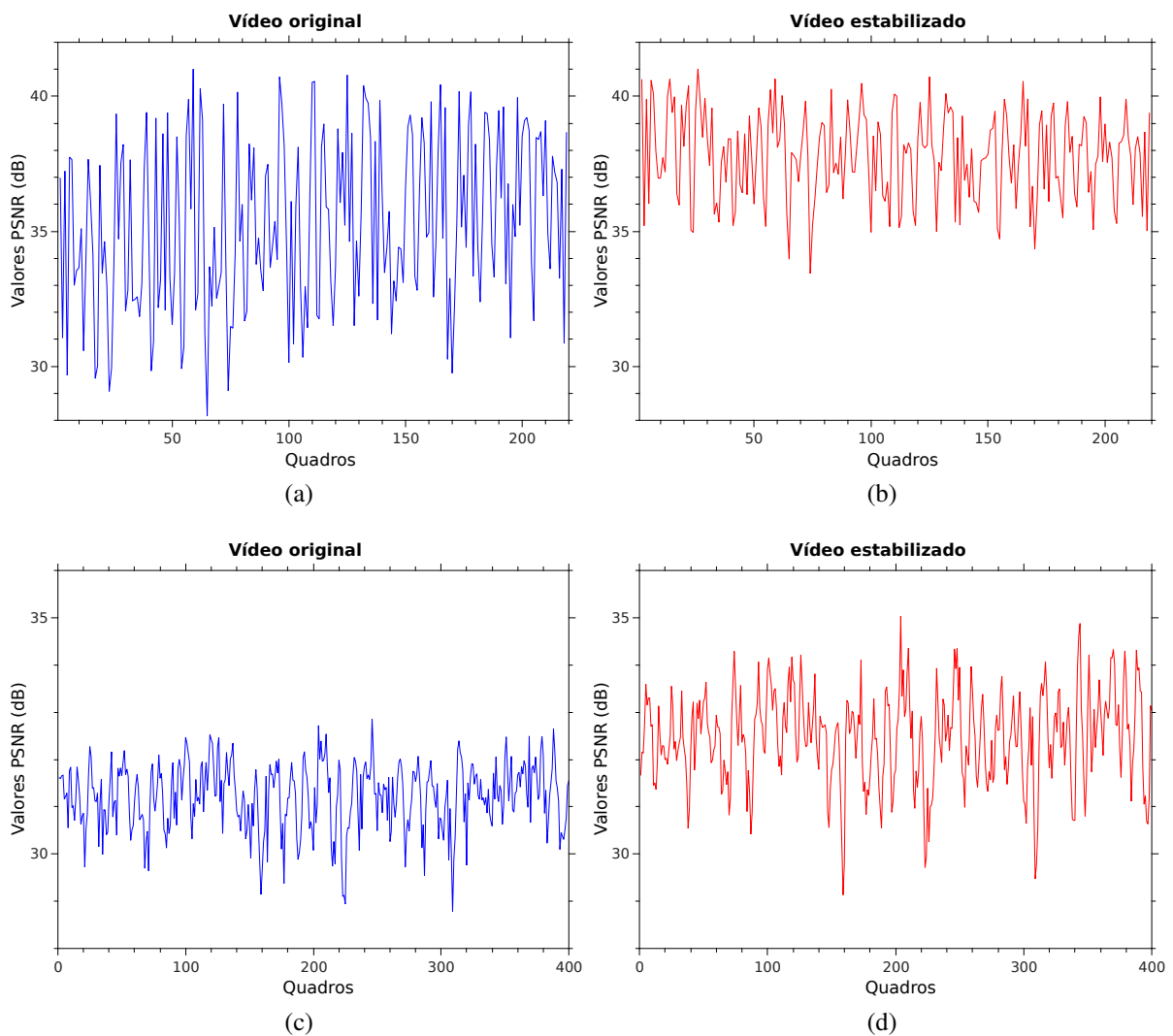


Figura 5.2: Métrica PSNR processada sobre todas as imagens residuais obtidas da subtração de pares de quadros consecutivos de ambos os vídeos. (a) e (c) valores de PSNR antes do correção; (b) e (d) valores de PSNR depois do correção das imagens.

cia do aumento das intensidades de cinza na imagem residual devido ao movimento inerente dos leucócitos nas imagens.

5.2 Resultados do processamento 2D (espacial)

Nesta seção são apresentados os resultados obtidos para o processamento 2D nos dois experimentos realizados neste trabalho: aplicação do método em imagens simuladas e em imagens reais de MI.

5.2.1 Primeiro experimento: imagens simuladas

Para a análise visual do método baseado na matriz Hessiana, duas sequências de imagens simuladas foram processadas. Na primeira sequência, que não contém a simulação de ruído, todas as células sintéticas obtiveram respostas. Conforme previsto, objetos circulares maiores e mais brilhantes apresentaram um pico maior na resposta do detector. Esses resultados podem ser observados na Figura 5.3, na qual a primeira coluna da Figura ilustra as imagens originais (conforme descrito na subseção 4.2), a segunda coluna traz os mapas resultantes da aplicação da técnica baseada na análise dos autovalores da matriz Hessiana local e, por último, a terceira coluna da Figura ilustra a mesma resposta na forma gráfica, em que os valores de intensidade de cinza da imagem resultante são reescalados para o intervalo de 0 a 255.

Nas imagens da Figura 5.3 também é possível observar que, para o primeiro quadro (primeira linha da Figura), cujo borramento Gaussiano não foi aplicado, as respostas do detector são aparentes, porém, com picos menores se comparado aos demais quadros. Essa característica ilustra a sensibilidade do filtro em relação às formas estruturais pesquisadas, isso porque o objeto apresentado nesse quadro possui maior semelhança a pratos (superfícies) do que bolhas, ou seja, as bordas dessas estruturas não são suaves como as das bolhas.

Além dessas mesmas características, a segunda sequência de imagens avaliada demonstrou que o método baseado na matriz Hessiana se comporta de maneira satisfatória na presença de ruído. Os resultados, ilustrados na Figura 5.4, apresentam respostas para quase todas as células sintéticas, tendo o método falhado na identificação de apenas uma delas (aquela de menor escala e com maior borramento). Toda essa análise demonstrou o potencial da abordagem proposta.

5.2.2 Segundo experimento: imagens reais

O desempenho global do processamento 2D para ambas as técnicas (Hessiana e TM) aplicadas na detecção de leucócitos foi calculado pelas medidas de precisão, revocação e F_1 -score. Com o cálculo dessas medidas gerou-se as curvas de precisão-revocação das Figuras 5.5 e 5.6. Cada ponto dessas curvas corresponde a um ponto de operação dos métodos utilizados, o qual é obtido fixando-se um valor de limiar (no intervalo de 0 a 255) e comparando-o aos valores de intensidade média nos quadros originais de cada região detectada, conforme descrito na seção 4.6.

Os resultados listados na Figura 5.5 referem-se à comparação feita com as duas marcações manuais disponibilizadas, 1-A e 1-B, para ambos os métodos aplicados sobre o primeiro vídeo, enquanto os resultados obtidos para o segundo vídeo, a partir de apenas uma marcação manual,

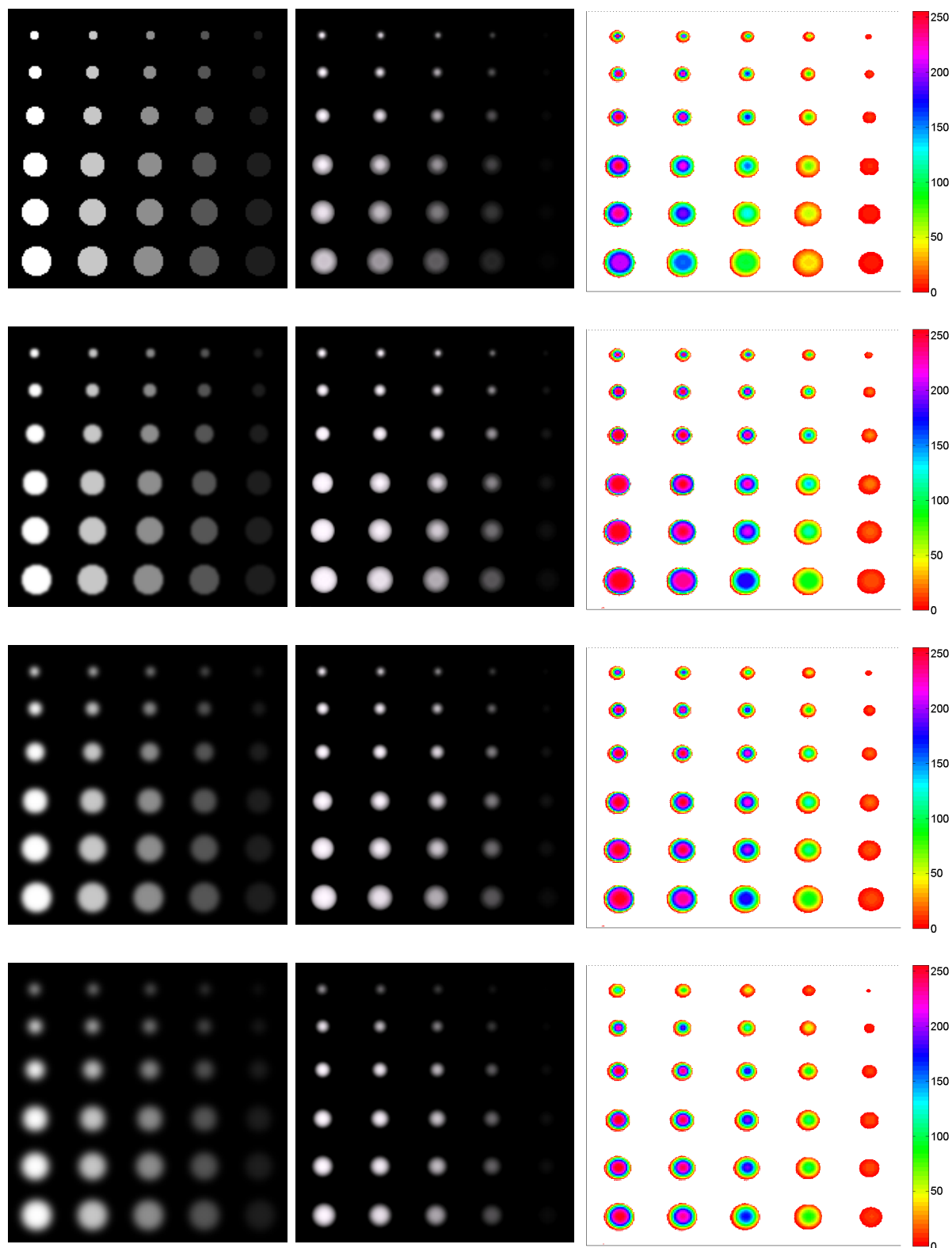


Figura 5.3: Resultados do detector baseado na matriz Hessiana para a sequência de imagens simuladas sem ruído. A primeira coluna da figura ilustra as imagens simuladas originais. Os resultados diretos do método aplicado para os quatro quadros podem ser observados na segunda coluna da figura. A terceira coluna mostra as mesmas respostas em outro esquema de cores, reescalonado no intervalo de [0 255].

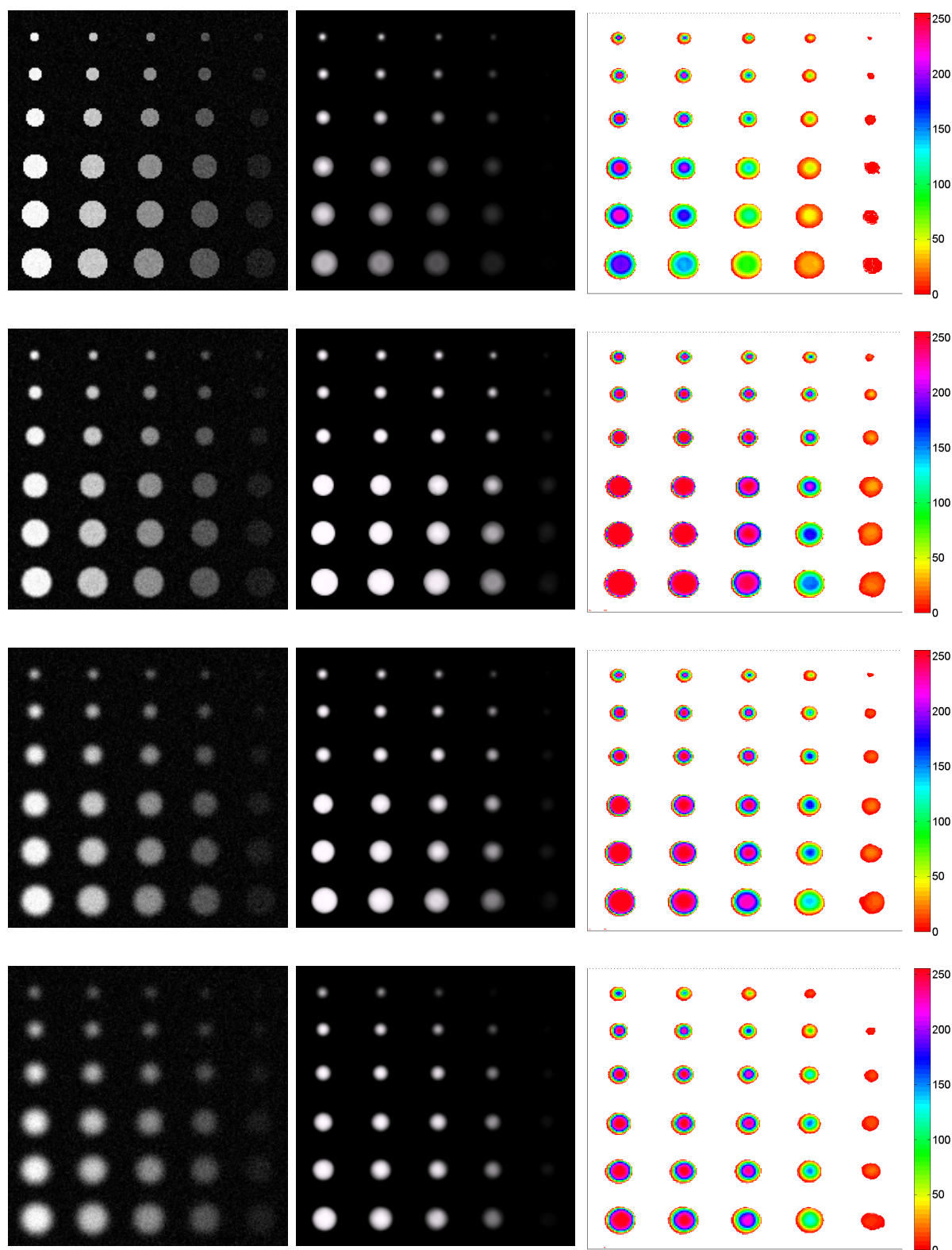


Figura 5.4: Resultados do detector baseado na matriz Hessiana para a seqüência de imagens simuladas com ruído Gaussiano. A primeira coluna da figura ilustra as imagens simuladas originais. Os resultados diretos do método aplicado para os quatro quadros podem ser observados na segunda coluna da figura. A terceira coluna mostra as mesmas respostas em outro esquema de cores, reescalado no intervalo de [0 255].

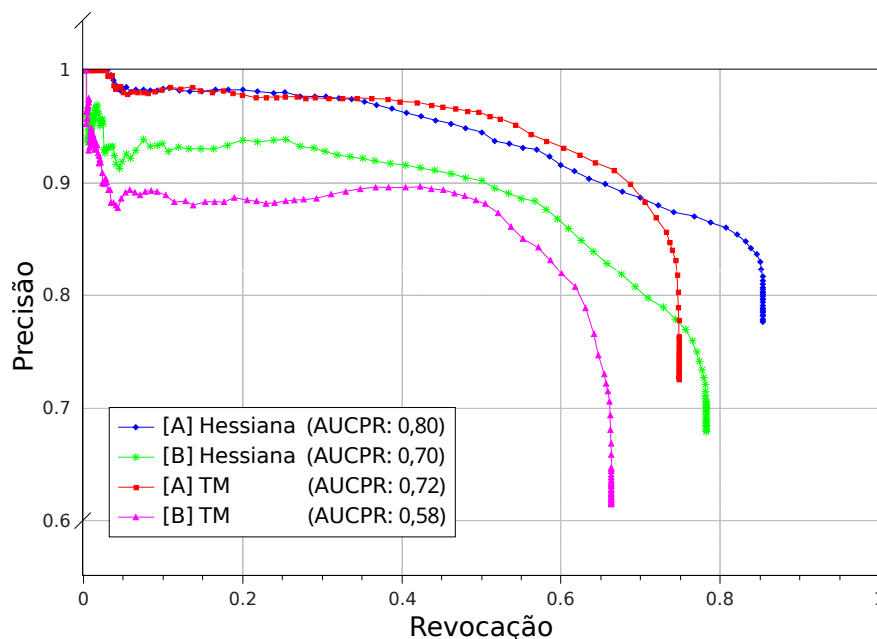


Figura 5.5: Curvas de precisão-revocação obtidas para os métodos aplicados na detecção espacial de leucócitos sobre a primeira sequência de imagens para duas marcações manuais, A e B.

podem ser observados na Figura 5.6.

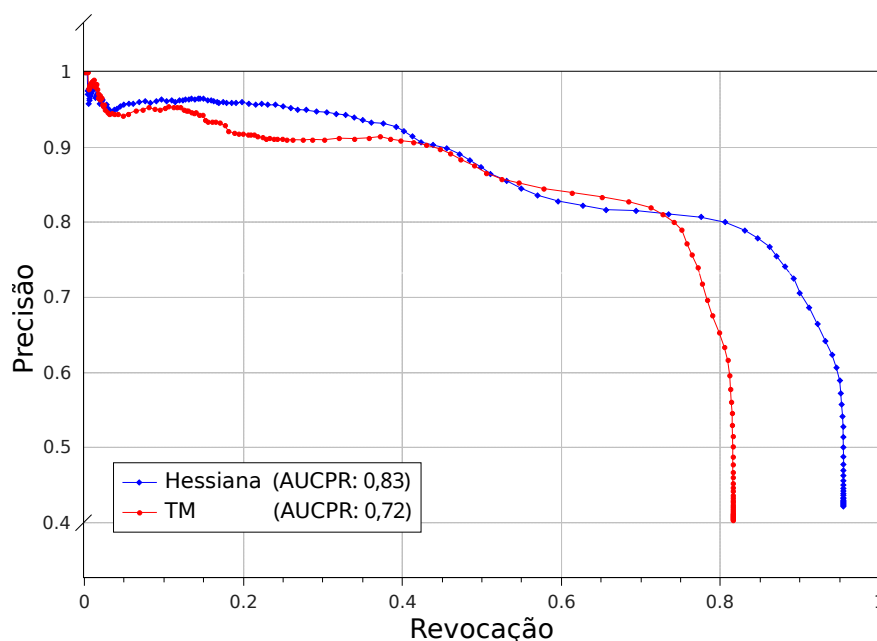


Figura 5.6: Curvas de precisão-revocação obtidas para os métodos aplicados na detecção espacial de leucócitos sobre a segunda sequência de imagens reais de MI.

Ao considerar os valores das AUCPRs encontrados nos gráficos de precisão-revocação citados, é possível notar que o método proposto para a detecção de leucócitos baseado na análise local dos autovalores da matriz Hessiana obteve um melhor desempenho em ambos os vídeos quando comparado ao método TM.

Para valores de precisão próximos a 0,9 no primeiro vídeo e entre a faixa de 0,8 a 0,9 no segundo vídeo, os valores de revocação foram muito similares. Entretanto, se forem considerados os valores de precisão menores que 0,9 e 0,8 no primeiro e segundo vídeos, respectivamente, então os valores de revocação do método baseado na análise da Hessiana foram superiores aos referentes à técnica do TM.

Além das curvas de precisão-revocação geradas, o melhor valor da medida F_1 -score foi também determinado para ambas as técnicas aplicadas sobre toda a sequência de imagens dos vídeos de MI. Os melhores resultados para cada técnica são sumarizados na Tabela 5.2. As medidas encontradas indicam que, para um ponto de operação específico (referente à um determinado valor de limiar cuja medida F_1 -score foi superior às demais), o método baseado na matriz Hessiana demonstrou um melhor resultado se comparado ao TM em todos os casos. Vale ressaltar que, para o vídeo 1, o índice de concordância (conforme subseção 4.8.4) encontrado entre as duas marcações manuais foi de $S = 0,82$.

Tabela 5.2: Valores resultantes da detecção dos leucócitos para o melhor F_1 -score encontrado em ambas as técnicas. O número total de leucócitos é 5851 e 8048 para o primeiro e segundo vídeos, respectivamente.

Vídeo	Métodos	Contagem			Precisão	Revocação	F_1 -score
		leucócitos detectados (TP)	alarmes falsos (FP)	leucócitos não detectados (FN)	TP / (TP+FP)	TP / (TP+FN)	2TP/(2TP+FP+FN)
1-A	Hessiana	4949	967	902	0,84	0,85	0,84
	TM	4285	720	1566	0,86	0,73	0,79
1-B	Hessiana	4227	1266	1361	0,77	0,76	0,76
	TM	3527	945	2061	0,79	0,63	0,70
2	Hessiana	6936	2100	1112	0,77	0,86	0,81
	TM	6049	1611	1999	0,79	0,75	0,77

Na Tabela 5.2 é possível perceber que, em ambos os vídeos, os valores de precisão para a técnica TM foram superiores e os valores de revocação foram inferiores à técnica da Hessiana, indicando que apenas os leucócitos bem definidos (ou aqueles mais similares ao *template*) puderam ser detectados. De fato, como pode ser visto na Figura 5.7, o método TM falha, principalmente, quando as células começam a sair do foco do microscópio e, conseqüentemente, geram a ilusão do aumento de escala. Essa característica é, de certa forma, contornada pelo algoritmo baseado na matriz Hessiana por ser aplicado em um contexto multiescalar, explicando, portanto, o maior número de TPs e o menor número de FNs encontrados pela técnica.

Exemplos de quadros do primeiro e segundo vídeos, resultantes da aplicação de ambas as técnicas analisadas, são ilustrados na Figura 5.7. Os quadros originais são representados na primeira linha da Figura 5.7, enquanto os leucócitos manualmente anotados podem ser vistos

como círculos azuis na segunda linha da figura. Os leucócitos detectados (TP+FP) são indicados como pequenos círculos verdes. Quadrados brancos e circunferências vermelhas indicam, respectivamente, os casos de FP e FN encontrados para as técnicas da matriz Hessiana (terceira linha da Figura 5.7) e TM (quarta linha da Figura 5.7). No caso dessas imagens, em específico, pode-se notar que o método baseado na matriz Hessiana detectou corretamente um número maior de leucócitos se comparado com a técnica TM. Os números de FP e FN são também menores para o método da Hessiana.

A abordagem proposta também foi avaliada por meio do valor médio das áreas sob as curvas, $\overline{\text{AUCPR}}$, calculado a partir das medidas de área estimadas para todos os quadros do vídeo de forma individual e com um intervalo de confiança (IC) de 95%. Nesse caso, os resultados obtidos da aplicação de ambos os métodos nos dois vídeos utilizados podem ser observados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3: Valores médios das áreas sob as curvas, $\overline{\text{AUCPR}}$ s, calculados a partir das medidas de área estimadas para todos os quadros do vídeo de forma individual e com um intervalo de confiança de 95%.

Vídeo	Técnica	$\overline{\text{AUCPR}}$	IC (95%)	Total de quadros
1-A	Hessiana	0,77	0,76 - 0,78	220
	TM	0,68	0,67 - 0,69	
1-B	Hessiana	0,67	0,66 - 0,69	
	TM	0,55	0,54 - 0,57	
2	Hessiana	0,79	0,78 - 0,80	401
	TM	0,68	0,67 - 0,69	

Novamente, os valores apresentados pela técnica baseada na matriz Hessiana se sobressaíram e indicaram um melhor desempenho perante ao TM.

5.3 Resultados do processamento 2D+t (espaço-temporal)

O método para a detecção dos caminhos dos leucócitos utilizado na etapa de processamento espaço-temporal 2D+t foi avaliado tanto de forma qualitativa quanto quantitativa neste trabalho. Através dessa detecção foi possível realizar o rastreamento celular nas imagens e, assim, analisar a dinâmica dessas células ao longo dos vídeos de MI utilizados.

O processo de avaliação do processamento 2D+t inicia-se com a definição do melhor valor de limiar a ser aplicado na etapa de binarização das imagens. Com as estruturas tubulares já realçadas pela técnica baseada na matriz Hessiana e com seus valores de intensidade resultantes já reescalados no intervalo [0 255], o processamento 2D+t foi aplicado para diferentes valores

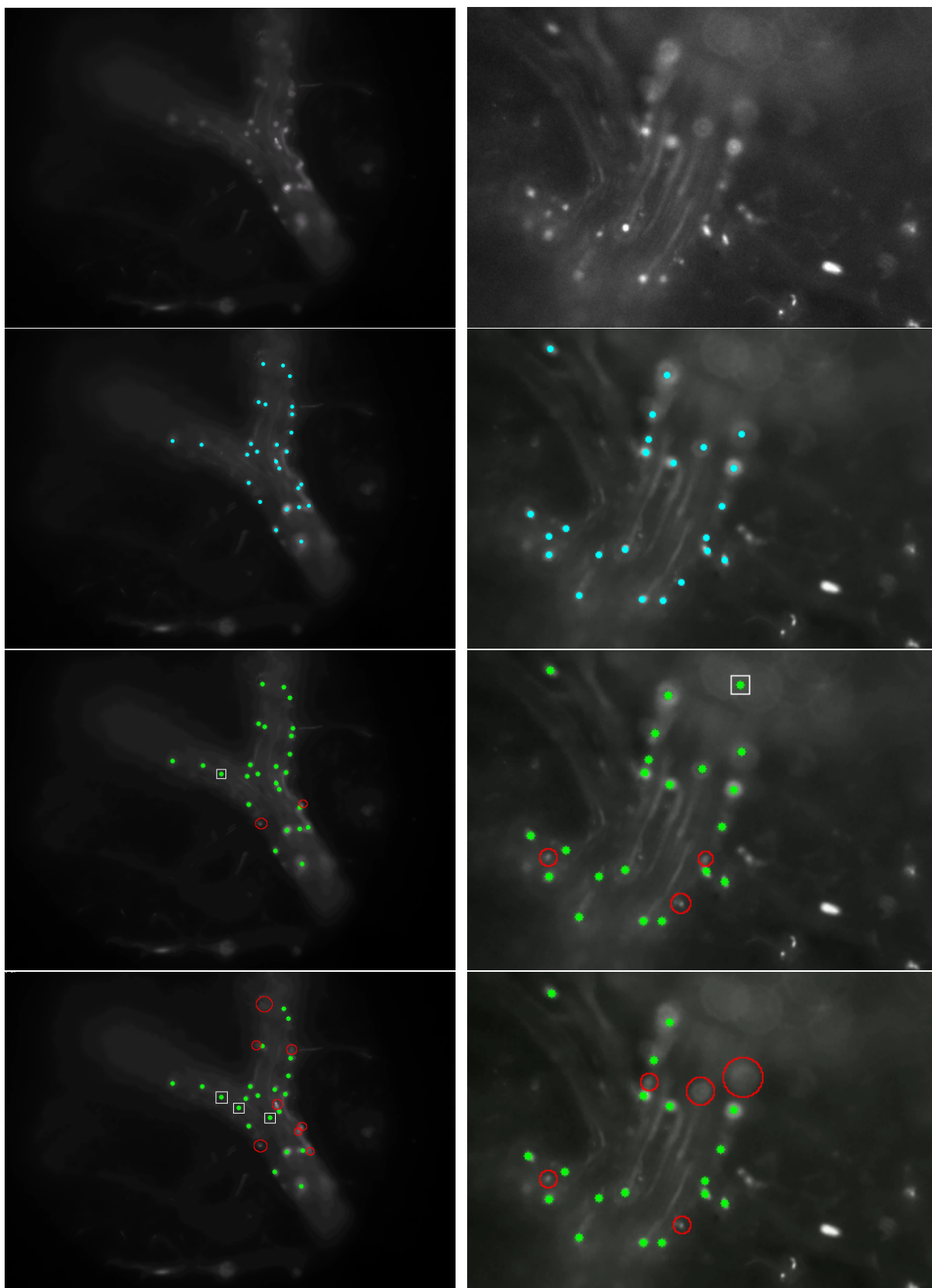


Figura 5.7: Exemplos de quadros processados para o vídeo 1 (primeira coluna) e 2 (segunda coluna). Linhas: 1) Quadros originais, 2) leucócitos manualmente anotados, 3) e 4) são, respectivamente, a saída do algoritmo baseado na matriz Hessiana e do *Template Matching*. Quadrados brancos indicam as detecções FPs, enquanto as circunferências em vermelho representam os FNs. Os leucócitos detectados (TPs e FPs) por ambas as técnicas são indicados como círculos verdes.

de limiar, variando no mesmo intervalo de 0 a 255 ao passo de uma unidade. O resultado dessa avaliação para as três marcações manuais utilizadas nos vídeos 1 e 2 (1-A, 1-B e 2) é ilustrado na Figura 5.8, em que o valor ideal é definido como aquele cuja medida F_1 -score é máxima.

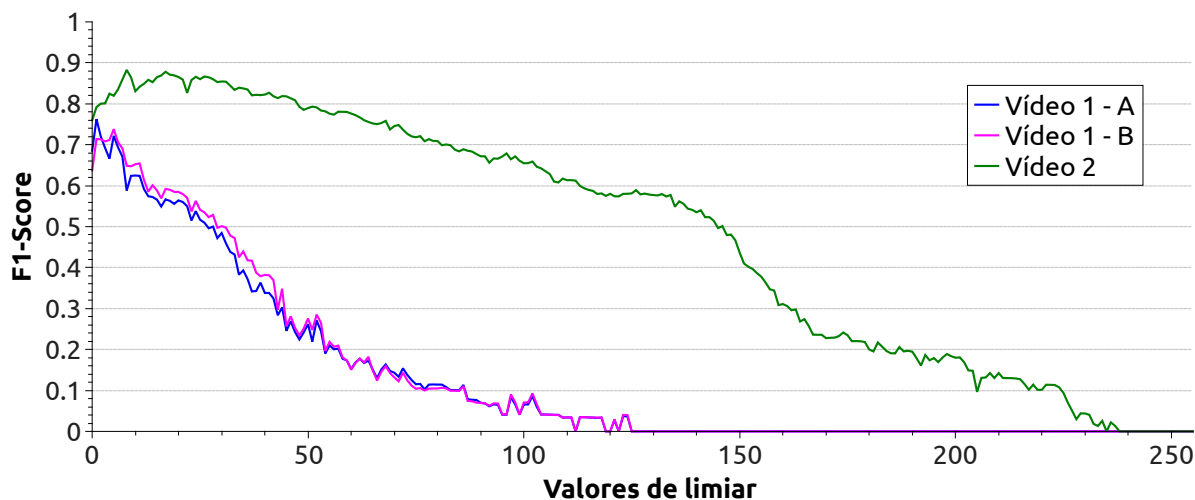


Figura 5.8: Análise dos valores de limiar aplicados na etapa de binarização das imagens.

Como pode ser observado no gráfico da Figura 5.8, os valores ideais encontrados para os limiares foram 1, 5 e 8, para os vídeos 1-A, 1-B e 2, respectivamente. Na Tabela 5.4 são apresentados os melhores resultados baseados na medida F_1 -score, obtidos a partir dos valores de limiar encontrados anteriormente.

Tabela 5.4: Valores resultantes do processamento 2D+t a partir dos limiares encontrados na etapa de binarização das imagens.

Vídeo	Contagem			Precisão	Revocação	F_1 -score
	leucócitos detectados (TP)	alarmes falsos (FP)	leucócitos não detectados (FN)	TP / (TP+FP)	TP / (TP+FN)	2TP/(2TP+FP+FN)
1-A	3604	292	1953	0,93	0,65	0,76
1-B	3237	207	2091	0,94	0,61	0,74
2	6853	861	960	0,89	0,88	0,88

É possível observar na Tabela 5.4, que os resultados para a medida F_1 -score foram todos superiores a 0,7, indicando um bom rastreamento dos leucócitos nos vídeos reais de MI. Mesmo com um número relativamente alto de células não detectadas (FN) no vídeo 1, o método foi muito preciso em sua detecção, atingindo uma média de 0,92 para a medida de precisão, considerando os três casos.

Para uma análise visual dos resultados foram geradas as imagens da Figura 5.9, as quais ilustram uma comparação entre a saída do método utilizado e as marcações manuais para cada vídeo. Os eixos verticais da figura representam o tempo (t) e os demais, representam os eixos espaciais (x e y) dos quadros dos vídeos. As linhas na cor azul são determinadas pelos pontos de

centroide corretamente identificados (TP) conforme a marcação manual em questão. As linhas na cor vermelha, entretanto, referem-se aos alarmes falsos (FP) do método.

Observando as imagens da Figura 5.9, pode-se considerar a hipótese de que os pequenos segmentos de cor vermelha encontrados entre os caminhos em azul referem-se aos pontos de conexão criados pelo algoritmo e não apenas a pontos FP. Nesse caso, esses pontos podem não ter sido classificados como TP por estarem distantes do seu respectivo caminho na marcação manual (devido ao pouco movimento ainda restante nas imagens) ou mesmo pela sua ausência na própria marcação manual (caso de FP). Pode-se dizer, portanto, que a conexão dos caminhos pelo método proposto permite prever o movimento celular mesmo quando o especialista não foi capaz de marcar (visualmente) a localização de alguns leucócitos, seja pelo efeito *photo-bleaching*, oclusão ou mesmo pelo borramento de movimento na imagem. No caso em que essa suposição seja verdadeira, um grande número de pontos considerados FP poderiam ser considerados como TP, aumentando ainda mais a medida de precisão do método.

Essa mesma hipótese também pode ser considerada quando são comparados os resultados dos processamentos 2D e 2D+t nas imagens da Figura 5.10. Porém, os pequenos segmentos em vermelho entre os caminhos azuis correspondem, agora, aos pontos de conexão que não foram detectados no processamento 2D, o que, de fato, fortalece a hipótese de que esses pontos podem não ser facilmente identificados pelo especialista.

As imagens da Figura 5.10 foram geradas comparando-se os resultados do processamento 2D+t com todos os resultados obtidos do processamento 2D. Para cada imagem, a mesma técnica 2D comparada foi utilizada na etapa de conexão dos caminhos (ver seção 4.7 para mais detalhes). O valor do índice de concordância entre as duas detecções de cada imagem também pode ser visto nas legendas da figura. Esses valores indicam uma maior concordância entre os processamentos cujo método utilizado para a detecção foi o baseado na matriz Hessiana. O valor médio do índice para todos os casos avaliados foi de $S = 0,73$.

Com o rastreamento e a estruturação dos caminhos celulares também foi possível gerar o cálculo das medidas de análise referentes ao recrutamento leucocitário para as imagens de vídeo de MI. Desta maneira, medidas como a distância, velocidade e número de células puderam ser calculadas. Portanto, para cada processamento apresentado na Tabela 5.4, as medidas encontradas foram registradas. Essas medidas são sumarizadas na Tabela 5.5.

Conforme apresentado na tabela, a principal diferença entre as duas marcações do vídeo 1 é o número de leucócitos rolantes, fazendo com que as medidas de distância percorrida sejam também diferentes. Porém, apesar dessa característica, o método proposto obteve boas respostas e mostrou-se completamente capaz de auxiliar o especialista em suas contagens manuais.

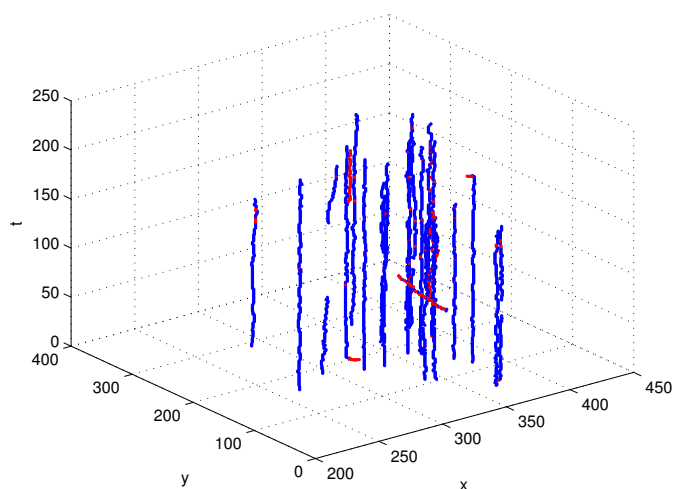
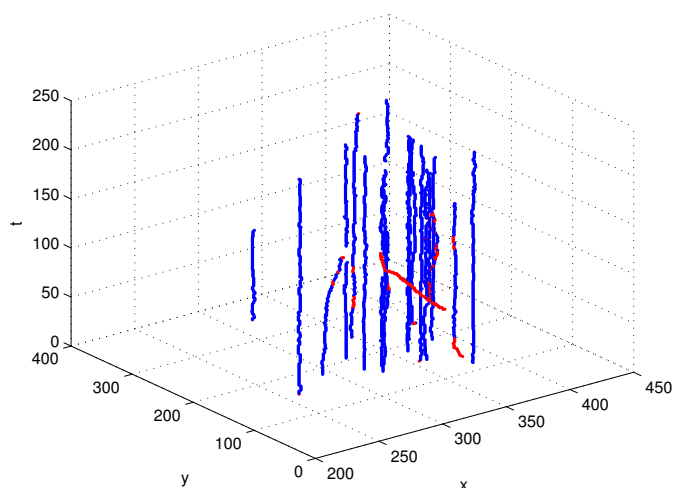
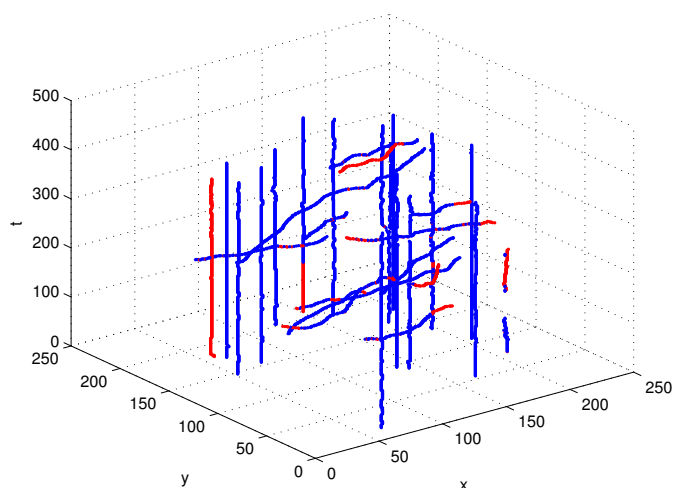
(a) Vídeo 1: 2D+t e marcação A (F_1 -score = 0,76)(b) Vídeo 1: 2D+t e marcação B (F_1 -score = 0,74)(c) Vídeo 2: 2D+t e marcação manual (F_1 -score = 0,88)

Figura 5.9: Comparações entre os resultados do processamento 2D+t e as marcações manuais: (a) 1-A, (b) 1-B, e (c) 2. As linhas azuis indicam os pontos TPs e as linhas vermelhas os FPs.

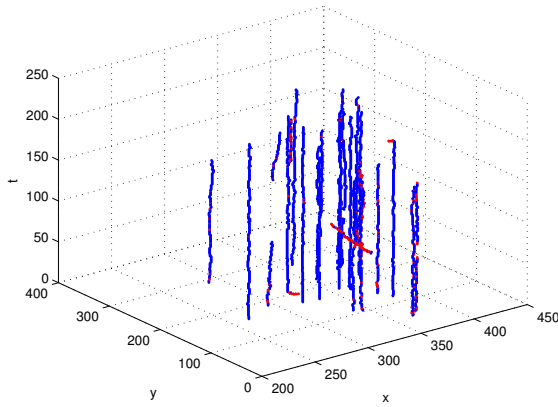
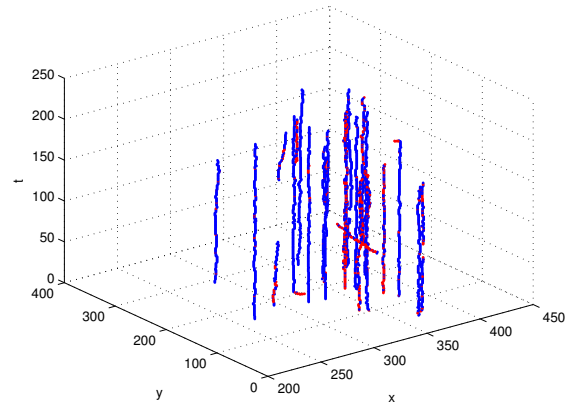
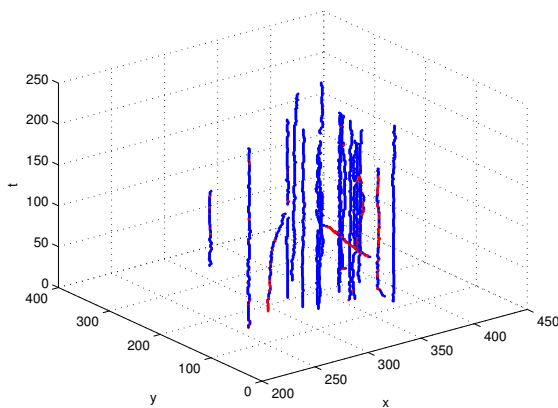
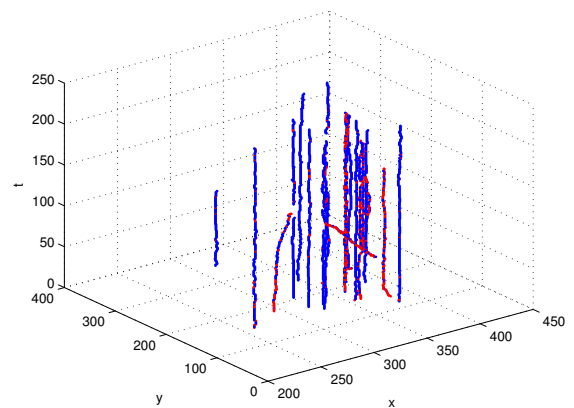
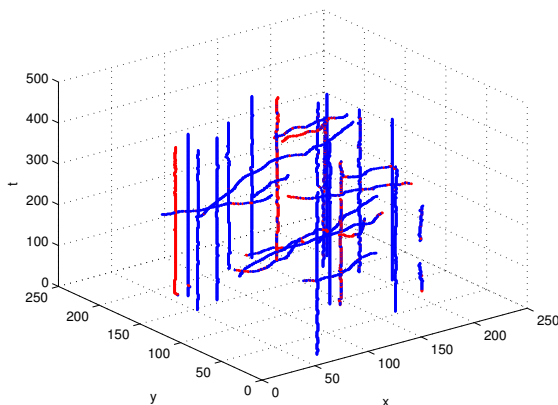
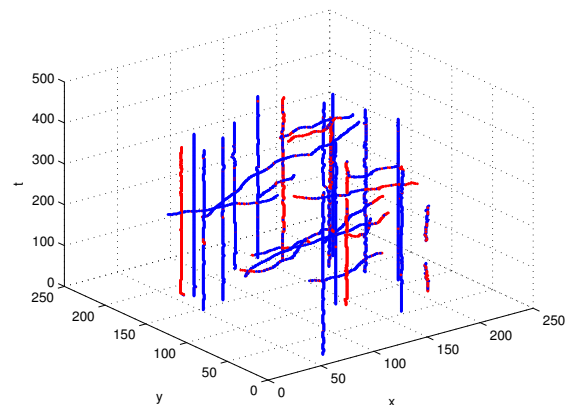
(a) Vídeo 1-A: 2D+t e Hessiana 2D ($S = 0,73$)(b) Vídeo 1-A: 2D+t e TM 2D ($S = 0,71$)(c) Vídeo 1-B: 2D+t e Hessiana 2D ($S = 0,71$)(d) Vídeo 1-B: 2D+t e TM 2D ($S = 0,69$)(e) Vídeo 2: 2D+t e Hessiana 2D ($S = 0,78$)(f) Vídeo 2: 2D+t e TM 2D ($S = 0,78$)

Figura 5.10: Comparações entre os resultados dos processamentos 2D e 2D+t. As linhas azuis indicam os pontos TPs e as linhas vermelhas os FPs.

Tabela 5.5: Medidas extraídas do rastreamento celular automático para os vídeos reais de MI utilizados.

Medida	1-A	1-B	2
Número de leucócitos aderidos	8	8	15
Número de leucócitos rolantes	23	17	19
Velocidade média ($\mu\text{m/s}$)	0,16	0,16	0,20
Distância média percorrida (μm)	15,75	16,58	27,56
Distância total percorrida (μm)	488,36	414,42	936,94

5.4 Considerações finais

Este capítulo apresentou os resultados obtidos neste trabalho de pesquisa. Esses resultados mostraram que, apesar das dificuldades inerentes da técnica de MI, os processos automáticos de estabilização, detecção e rastreamento de leucócitos são plausíveis de serem aplicados às imagens de vídeo reais, proporcionando um auxílio ao especialista. Os resultados das técnicas de correção aplicadas ao vídeo de MI foram avaliados e sugerem que o método proposto para a estabilização dos quadros é capaz de corrigir grande parte dos movimentos oriundos da respiração e batimentos cardíacos do animal, fornecendo imagens de vídeo com qualidade muito superior ao original para os métodos posteriores. Além disso, a técnica proposta para os processamentos 2D e 2D+t para a detecção e rastreamento dos leucócitos também demonstrou ótimo potencial ao conseguir identificar e rastrear corretamente grande parte das células presentes nas imagens de MI.

Capítulo 6

CONCLUSÕES FINAIS

Este capítulo sintetiza as conclusões que podem ser tiradas da revisão bibliográfica e dos resultados obtidos neste trabalho, além de apresentar as contribuições da pesquisa e as ideias para possíveis trabalhos futuros.

6.1 Conclusões

Este trabalho apresentou o desenvolvimento de um esquema computacional automático para o auxílio na detecção e rastreamento de leucócitos em imagens de vídeo de MI de experimentos *in vivo* do cérebro de camundongos. A motivação por trás desta pesquisa está na crescente demanda por medidas quantitativas mais precisas e necessárias à compreensão dos mecanismos biológicos de doenças inflamatórias. Técnicas computacionais automáticas, como as propostas neste trabalho, podem proporcionar maior agilidade e confiabilidade à tarefa de análise das imagens, diminuindo assim, falsas estatísticas referentes ao comportamento e à contagem de células, dadas as limitações existentes no trabalho puramente visual pelos especialistas.

O desenvolvimento do esquema computacional proposto foi baseado em técnicas de processamento de imagens e visão computacional, e combinou informações espaciais, obtidas do processamento 2D quadro a quadro do vídeo, e temporais, obtidas do processamento 2D+t da pilha formada pelos quadros do vídeo. Os resultados demonstraram que a combinação dessas informações minimizou grande parte dos problemas envolvidos na detecção e rastreamento de células como, por exemplo, a sobreposição e discriminação dos caminhos celulares. Dificuldades inerentes da técnica de imageamento pela MI, como o movimento involuntário do animal, foram contornadas através da aplicação de diferentes técnicas de pré-processamento. O rastreamento das células foi realizado a partir dos resultados das detecções de estruturas 3D nas

imagens espaço-temporais geradas, permitindo, assim, que medidas quantitativas referentes ao recrutamento leucocitário fossem extraídas de forma mais simples.

Além disso, conforme foi discutido no capítulo 3, apesar da existência de vários trabalhos relacionados à detecção e rastreamento de objetos em imagens de vídeo, poucos deles são aplicados a imagens de MI. Dentre os trabalhos encontrados na literatura direcionados especificamente à análises *in vivo*, nenhum é aplicado em imagens do cérebro de animais. Esse fato é relevante visto que os problemas encontrados durante a análise desse órgão (como a estabilização do animal através de aparatos mecânicos) são muito específicos e restritivos. Outro ponto que merece destaque é que, na maioria dos trabalhos encontrados na literatura, a detecção inicial das células é realizada de maneira manual, tornando os métodos ainda dependentes de especialistas. Dessa maneira, as técnicas abordadas nesta pesquisa contribuíram significativamente ao processo de análise, visto que são algoritmos completamente automáticos.

Por fim, os resultados da aplicação de todo o esquema computacional desenvolvido demonstraram-se promissores perante as marcações manuais realizadas pelos especialistas. Mesmo com as dificuldades relatadas, os processos automáticos de estabilização, detecção e rastreamento apresentados mostraram-se plausíveis de serem aplicados e utilizados em imagens de vídeo reais, permitindo o uso de medidas quantitativas mais precisas em estudos biológicos.

6.2 Contribuições

Dentre as principais contribuições desta dissertação, pode-se citar:

- A criação de um arcabouço de desenvolvimento para a detecção e rastreamento de células aplicado a imagens de MI de análises *in vivo*. O arcabouço é baseado na combinação dos processamentos 2D e 2D+t, e faz uso de diferentes técnicas para o pré- e o pós-processamento de forma modular, permitindo a fácil adaptação de outras técnicas em qualquer etapa do modelo.
- O desenvolvimento de técnicas computacionais de pré-processamento específicas para a aplicação na detecção e rastreamento de leucócitos em imagens de MI. Dentre as técnicas de pré-processamento, destacam-se aquelas direcionadas aos problemas causados pelo movimento excessivo do animal sob o microscópio.
- O desenvolvimento de técnicas computacionais de pós-processamento específicas para a aplicação na detecção e rastreamento de leucócitos em imagens de MI. Destacando-se

os algoritmos responsáveis pela discriminação e conexão dos caminhos leucocitários nas imagens 2D+t.

- O desenvolvimento de algoritmos completamente automáticos para a detecção e rastreamento de leucócitos em imagens de análises *in vivo* pela MI.
- O uso das técnicas estudadas e desenvolvidas em imagens provenientes do cérebro de camundongos, visto que o número de trabalhos computacionais direcionados ao estudo desse órgão é muito baixo (senão nulo).

6.3 Trabalhos publicados e submetidos relacionados à pesquisa

As referências listadas a seguir referem-se aos trabalhos relacionados à esta dissertação, os quais já foram publicados ou submetidos:

- Ferrari, R.J., Villa Pinto, C.H., **Gregório da Silva, B.C.**, Bernardes, D. e 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*, 53(2): 151-163, 2015.
- Villa Pinto, C.H., **Gregório da Silva, B.C.**, Freire, P.G.L., Bernardes, D., Carvalho-Tavares, J. e Ferrari, R.J. Deconvolução cega aplicada à correção de artefatos de movimento em imagens de vídeo de microscopia intravital para detecção automática de leucócitos. *Revista de Informática Teórica e Aplicada*, 22(1): 52-74, 2015.
- **Gregório da Silva, B.C.** e Ferrari, R.J. Detection of leukocytes in intravital video microscopy based on the analysis of Hessian matrix eigenvalues. *XXVIII Conference on Graphics, Patterns and Images (SIBGRAPI)*, Agosto de 2015. Salvador (BH) - Brasil
- **Gregório da Silva, B.C.**, Freire, P.G.L., Mello, R.F., Bernardes, D., Carvalho-Tavares, J. e Ferrari, R.J. Técnica de estabilização de movimento em microscopia intravital utilizando métodos de co-registro de imagens. *XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica (CBEB)*, Outubro de 2014. Uberlândia (MG) - Brasil.
- Villa Pinto, C.H., **Gregório da Silva, B.C.**, Bernardes, D., Carvalho-Tavares, J. e Ferrari, R.J. Detection of motion blur in intravital microscopy video images via analysis of oriented texture features. *XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica (CBEB)*, Outubro de 2014. Uberlândia (MG) - Brasil.

- Villa Pinto, C.H., Freire, P.G.L., **Gregório da Silva, B.C.**, Bernardes, D., Carvalho-Tavares, J. e Ferrari, R.J. Correção de artefatos de movimento em imagens de vídeo de microscopia intravital com aplicação na detecção automática de leucócitos. *XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica (CBEB)*, Outubro de 2014. Uberlândia (MG) - Brasil.
- Souza, K.E., **Gregório da Silva, B.C.**, Carvalho-Tavares, J. e Ferrari, R.J. Automatic detection of leukocytes from intravital video microscopy using the phase congruency technique. *XI Workshop de Visão Computacional (WVC)*, Outubro de 2015. São Carlos (SP) - Brasil.
- **Gregório da Silva, B.C.**, Carvalho-Tavares, J. e Ferrari, R.J. Automated technique for in vivo analysis of leukocyte recruitment of mice brain microcirculation. *23rd IEEE International Conference on Image Processing (ICIP)*, September 25 - 28, 2016. Phoenix, Arizona, USA. (submetido em 01/02/2016).

6.4 Sugestões para trabalhos futuros

Como sugestões para trabalhos futuros, pode-se citar:

- Estudo e análise da técnica de congruência de fase em substituição à técnica baseada na matriz Hessiana, visando tornar a detecção de leucócitos mais robusta às variações de intensidade de cinza das imagens, causadas pelo efeito *photobleaching*.
- A utilização das informações obtidas do processamento espaço-temporal como uma etapa de inicialização em outros métodos para a análise individual da morfologia de cada leucócito, utilizando, por exemplo, modelos deformáveis.
- O estudo e o desenvolvimento de outras técnicas para a conexão dos caminhos celulares detectados, visto que essa etapa demonstrou ser de suma importância para o sucesso do rastreamento celular.
- O estudo e o desenvolvimento de técnicas para a segmentação mais precisa do vaso sanguíneo para posterior análise do movimento de transmigração das células.

Apêndice A

DERIVAÇÃO DO ÍNDICE DE CONCORDÂNCIA

Neste trabalho, o cálculo do nível de concordância entre diferentes anotações manuais dos leucócitos pode ser visto como um estudo de confiabilidade em que um determinado número de pixels é classificado (como um leucócito ou não) por diferentes especialistas. Uma medida de confiabilidade conhecida como coeficiente kappa (κ) foi proposta para esse tipo de estudo (BARTKO, 1991; ZIJDENBOS et al., 1994). Ela é definida por

$$\kappa = \frac{p_0 - p_c}{1 - p_c}, \quad (\text{A.1})$$

em que p_0 é a porcentagem de pixels marcados com o mesmo rótulo pelos especialistas e p_c é a porcentagem de concordância ao acaso. O denominador da equação representa um fator de escala que faz com que κ resulte em um valor no intervalo $(-\infty, 1)$. $\kappa = 1$ indica o nível máximo de concordância, $\kappa = 0$ o nível de concordância referente ao acaso e $\kappa < 0$ indica que o nível de concordância é inferior ao acaso. O valor de $\kappa > 0,7$ geralmente é tido como um excelente resultado (BARTKO, 1991).

Portanto, o nível de concordância entre as anotações manuais das imagens de MI pode ser mensurado através da rotulação dos pixels. No caso deste trabalho, apenas o centroide de cada célula é rotulado como um leucócito. A Tabela A.1 representa um exemplo da contagem de pixels em concordância, ou não, entre duas diferentes anotações. Na Tabela A.1, os valores a e d indicam o número de pixels em que os especialistas concordaram, enquanto os valores b e c , indicam o número de pixels em que eles discordaram. Neste caso,

$$p_0 = \frac{a + d}{n}, \quad (\text{A.2})$$

com $n = a + b + c + d$. A porcentagem de concordância ao acaso p_c é calculada assumindo-se

Tabela A.1: Contagem do número de classificações em concordância ou não, entre dois especialistas em suas anotações manuais.

		Especialista 1		
		+	-	Total
Especialista 2	+	a	b	$a + b$
	-	c	d	$c + d$
	Total	$a + c$	$b + d$	n

que o resultado das classificações pelos especialistas são completamente independentes. Assim, como os especialistas 1 e 2 classificaram $a + c$ e $a + b$, respectivamente, como pixels de mesmo rótulo (+), a probabilidade de que um pixel seja rotulado nessa classe por ambos os especialistas é $\frac{a+b}{n} \cdot \frac{a+c}{n}$. Da mesma forma, a probabilidade de concordância para a outra classe (-) é de $\frac{b+d}{n} \cdot \frac{c+d}{n}$. Como resultado, tem-se

$$p_c = \frac{(a+b)(a+c) + (b+d)(c+d)}{n^2}. \quad (\text{A.3})$$

Substituindo as Equações (A.2) e (A.3) em (A.1):

$$\kappa = \frac{2(ad - bc)}{(a+b)(b+d) + (a+c)(c+d)}. \quad (\text{A.4})$$

Tratando-se as anotações manuais pelos especialistas como a classificação dos pixels em leucócitos ou não, a fração d pode ser vista como o número de pixels não rotulados na imagem, um número que, embora indeterminado, é muito grande se comparado com a , b e c . Assumindo então que $d \gg (a, b, c)$, a Equação (A.4) leva a

$$\lim_{d \rightarrow \infty} \kappa = \frac{2a}{2a + b + c}. \quad (\text{A.5})$$

Considerando que a é o número de pixels rotulados como leucócitos por ambos os especialistas e b e c representam o número de pixels rotulados como leucócitos por apenas um deles, é possível dizer que a Equação (4.45) é igual a (A.5) e, assim, o índice de concordância utilizado neste trabalho é um caso especial da estatística de kappa.

REFERÊNCIAS

- ACTON, S. T.; 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, 2004. v. 2, p. 1235–1238.
- ACTON, S. T.; RAY, N.; DONG, G. Tracking multiple cells by correspondence resolution in a sequential bayesian framework. In: *IEEE International Conference on Image Processing (ICIP)*. Genoa, Italy: IEEE, 2005. v. 1, p. 705–708.
- ACTON, S. T.; WETHMAR, K.; LEY, K. Automatic tracking of rolling leukocytes in vivo. *Microvascular Research*, v. 63, n. 1, p. 139–148, 2002.
- ADDISON, W. Experimental and practical researches on the structure and function of blood corpuscles; on inflammation, and on the origin and nature of tubercles in the lungs. In: *Transactions of the Provincial Medical and Surgical Association*. London, United Kingdom: .., 1843. v. 11, p. 223–306.
- ALEXANDRESCU, A. *Modern C++ Design: Generic Programming and Design Patterns Applied*. Indianapolis, IN, USA: Addison-Wesley Professional, 2001.
- AMORNPHIMOLTHAM, P.; MASEDUNSKAS, A.; WEIGERT, R. Intravital microscopy as a tool to study drug delivery in preclinical studies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 63, n. 1-2, p. 119–128, 2011.
- ANDERSON, C. M. et al. Tracking of cell surface receptors by fluorescence digital imaging microscopy using a charge-coupled device camera. *Journal of Cell Science*, v. 101, p. 415–425, 1992.
- ANDRESEN, V. et al. High-resolution intravital microscopy. *PLoS ONE*, v. 7, n. 12, p. e50915, 2012.
- AVANTS, B.; TUSTISON, N.; SONG, G. *Advanced Normalization Tools (ANTS)*. USA: University of Pennsylvania, 2009.
- BARTKO, J. J. Measurement and reliability: Statistical thinking considerations. *Schizophrenia Bulletin*, v. 17, n. 3, p. 483–489, 1991.
- BEARE, R.; LEHMANN, G. Finding regional extrema - methods and performance. *The Insight Journal*, 12 2005.
- BLACHNICKI, K. *Fluorescence Filters*. 2006. Disponível em: <<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:FluorescenceFilters.svg>>.

- BLAKE, A.; ISARD, M. *Active Contours*. London: Springer-Verlag, 1998.
- BOSE, P. *The Encoding and Fourier Descriptors of Arbitrary Curves in 3-Dimensional Space*. Dissertação (Mestrado) — University of Florida, Gainesville, USA, Dec 2000.
- CHETVERIKOV, D. Particle image velocimetry by feature tracking. In: *Computer Analysis of Images and Patterns - CAIP*. Warsaw, Poland: Springer, 2001. v. 2124, p. 325–332.
- CHETVERIKOV, D.; VERESTÓI, J. Feature point tracking for incomplete trajectories. *Computing*, v. 62, n. 4, p. 321–338, 1999.
- 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.
- CUKIERMAN, E. et al. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*, v. 294, n. 5547, p. 1708–1712, 2001.
- DIVIETRO, J. A. et al. Immobilized IL-8 triggers progressive activation of neutrophils rolling in vitro on P-selectin and intercellular adhesion molecule-1. *The Journal of Immunology*, v. 167, n. 7, p. 4017–4025, 2001.
- DONG, G.; RAY, N.; ACTON, S. T. Intravital leukocyte detection using the gradient inverse coefficient of variation. *IEEE Transaction on Medical Imaging*, v. 24, n. 7, p. 910–924, 2005.
- DUTROCHET, H. *Recherches anatomiques et physiologiques sur la structure intime des animaux et des végétaux, et sur leur motilité*. Universidade de Ghent: J.B. Baillière, 1824.
- DZYUBAK, O. P.; RITMAN, E. L. Automation of hessian-based tubularity measure response function in 3D biomedical images. *International Journal of Biomedical Imaging*, v. 2011, n. Article ID 920401, p. 16 pages, 2011.
- EDEN, E. et al. An automated method for analysis of flow characteristics of circulating particles from in vivo video microscopy. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, v. 12, n. 8, p. 1011–1024, 2005.
- EGMONT-PETERSEN, M. et al. 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.
- ELLINGER, P.; HIRT, A. Mikroskopische untersuchungen an lebenden organen i. mitteilung. methodik: Intravitalmikroskopie. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*, v. 90, p. 791–802, 1929.
- ELLINGER, P.; HIRT, A. *Handbuch der Biologischen Arbeitsmethoden*. Berlin, Germany: Urban & Schwarzenberg, 1930.
- FERRARI, R. J. et al. Automatic detection of motion blur in intravital video microscopy image sequences via directional statistics of log-Gabor energy maps. *Medical & Biological Engineering & Computing*, v. 53, n. 2, p. 151–163, 2015.
- FRANGI, A. F. et al. Multiscale vessel enhancement filtering. In: *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention - MICCAI*. Cambridge, MA, USA: Springer-Verlag, 1998. v. 1496, p. 130–137.

- FREEMAN, H. On the encoding of arbitrary geometric configurations. *Institute of Radio Engineers, trans. on Electronic Computers*, EC-10, p. 260–268, 1961.
- GAMMA, E. *Design Patterns: Elements of Reusable Object-oriented Software*. USA: Pearson Education, 2004.
- GAVINS, F. N. E.; 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, 2004.
- GELLES, J.; SCHNAPP, B. J.; SHEETZ, M. P. Tracking kinesin-driven movements with nanometer-scale precision. *Nature*, v. 331, p. 450–453, 1988.
- GHAJAR, C. M.; BISSELL, M. J. Extracellular matrix control of mammary gland morphogenesis and tumorigenesis: insights from imaging. *Histochemistry and Cell Biology*, Springer-Verlag, v. 130, n. 6, p. 1105–1118, 2008.
- GHOSH, R. N.; WEBB, W. W. Automated detection and tracking of individual and clustered cell surface low density lipoprotein receptor molecules. *Biophysical Journal*, v. 66, p. 1301–1318, 1994.
- GLASBEY, C. A. An analysis of histogram-based thresholding algorithms. *CVGIP: Graphical Models and Image Processing*, v. 55, n. 6, p. 532–537, 1993.
- GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. *Digital image processing*. Boston, MA, USA: Addison-Wesley, 1992.
- GOOBIC, A. P. et al. Biomedical application of target tracking in clutter. In: *Conference on Signals, Systems and Computers*. Pacific Grove, CA, USA: IEEE, 2001. v. 1, p. 88–92.
- GOUTTE, C.; GAUSSIÉ, E. A probabilistic interpretation of precision, recall and F-score, with implication for evaluation. In: *Advances in Information Retrieval*. Santiago de Compostela, Spain: Springer, 2005. v. 3408, p. 345–359.
- GREGÓRIO DA SILVA, B. C. et al. Técnica de estabilização de movimento em microscopia intravital utilizando métodos de co-registro de imagens. In: *XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica (CBEB)*. Uberlândia, MG, Brazil: CBEB, 2014. p. 193–196.
- GUILFORD, W. H.; GORE, R. W. The mechanics of arteriole-interstitium interaction. *Microvascular Research*, v. 50, n. 2, p. 260–287, 1995.
- HOPFIELD, J. J. Neural networks and physical systems with emergent collective computational abilities. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. USA: PNAS, 1982. v. 79, n. 8, p. 2554–2558.
- HORN, B. K. P.; SCHUNCK, B. G. Determining optical flow. *Artificial Intelligence*, v. 17, n. 1-3, p. 185–203, 1981.
- HYNES, R. O.; LANDER, A. D. Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell*, v. 68, n. 2, p. 303–322, 1992.

- JONKER, P. P. Morphological operations on 3D and 4D images: From shape primitive detection to skeletonization. *Lecture Notes in Computer Science*, v. 1953, p. 371–391, 2000.
- JOY, K. I. Bresenham's algorithm. *On-Line Computer Graphics Notes*. Computer Science Department, University of California, Davis. 1999.
- KASS, M.; WITKIN, A.; TERZOPOULOS, D. Snakes: Active contour models. *International Journal Of Computer Vision*, v. 1, n. 4, p. 321–331, 1987.
- KLEIN, S.; PLUIM, J. P. W.; STARING, M. Adaptive stochastic gradient descent optimisation for image registration. *International Journal of Computer Vision*, v. 81, n. 3, p. 227–239, 2009.
- KORHONEN, J.; JUNYONG, Y. Peak signal-to-noise ratio revisited: Is simple beautiful? In: *Workshop on Quality of Multimedia Experience (QoMEX)*. Melbourne, Australia: IEEE, 2012. p. 37–38.
- KUSUMI, A.; SAKO, Y.; YAMAMOTO, M. Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). effects of calcium-induced differentiation in cultured endothelial cells. *Biophysical Journal*, v. 65, p. 2021–2040, 1993.
- LACKIE, J. M.; CHAABANE, N.; CROCKET, K. V. A critique of the methods used to assess leucocyte behaviour. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 41, n. 6, p. 265–278, 1987.
- LEE, T. C.; KASHYAP, R. L.; CHU, C. N. Building skeleton models via 3-D medial surface axis thinning algorithms. *CVGIP: Graphical Models and Image Processing*, v. 56, n. 6, p. 462–478, 1994.
- LEEUWENHOEK, A. V.; HOOLE, S. *The Select Works of Antony Van Leeuwenhoek, Containing His Microscopical Discoveries in Many of the Works of Nature*. London: G. Sidney, 1800.
- LINDEBERG, T. Feature detection with automatic scale selection. *International Journal of Computer Vision*, v. 30, n. 2, p. 79–116, 1998.
- LUSTER, A. D.; ALON, R. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nature Immunology*, v. 6, n. 12, p. 1182–90, 2005.
- MAJER, P. The influence of the gamma-parameter on feature detection with automatic scale selection. In: *Proceedings of the Third International Conference on Scale-Space and Morphology in Computer Vision*. Vancouver, Canada: Springer, 2001. p. 245–254.
- MARTIN, R. et al. Beneficial actions of oleanolic acid in an experimental model of multiple sclerosis: a potential therapeutic role. *Biochemical Pharmacology*, v. 79, n. 2, p. 198–208, 2010.
- MASEDUNSKAS, A. et al. Intravital microscopy. *BioArchitecture*, v. 2, n. 5, p. 143–157, 2012.
- MATTES, D. et al. Nonrigid multimodality image registration. In: *Medical Imaging 2001: Image Processing*. San Diego, CA, USA: SPIE 4322, 2001. p. 1609–1620.
- MENET, S.; MARC, S. P.; MEDIONI, G. B-Snakes: implementation and application to stereo. In: *Proceedings on Image Understanding Workshop*. .: ., 1990. p. 720–726.

- MORGENTHALER, D. G. *Three-Dimensional Digital Topology: The Genus*. Maryland University. College Park. Computer Vision Lab. USA, 1980.
- MUKHERJEE, D. P.; RAY, N.; ACTON, S. T. Level set analysis for leukocyte detection and tracking. *IEEE Transactions on Image Processing*, v. 13, n. 4, p. 562–572, 2004.
- NEZ, L. I. et al. The ITK Software Guide. *Insight Software Consortium*, Kitware Inc., 2003.
- 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.
- OPENCV. *OpenCV Vision Library*. 2010. Disponível em: <<http://sourceforge.net/projects/opencvlibrary/>>.
- PALÁGYI, K. *Skeletonization*. 2015. Disponível em: <<http://www.inf.u-szeged.hu/~palagyi/skel/skel.html>>.
- PINHO, V. et al. Intravital microscopy to study leukocyte recruitment in vivo. In: *Light Microscopy - Methods in Molecular Biology*. USA: Humana Press, 2011. v. 689, cap. 6, p. 81–90.
- PITTET, M. J.; WEISSLEDER, R. Intravital imaging. *Cell*, v. 147, n. 5, p. 983–991, 2011.
- PLUIM, J. P. W.; MAINTZ, J. B. A.; VIERGEVER, M. A. Mutual-information-based registration of medical images: a survey. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, v. 22, n. 8, p. 986–1004, 2003.
- PROLONG. *ProLong antifade reagents*. 2015. Disponível em: <<http://www.lifetechnologies.com/br/en/home/life-science/cell-analysis/cellular-imaging/fluorescence-microscopy-and-immunofluorescence-if/mounting-medium-antifades/prolong-gold-antifade.html>>.
- RAY, N.; ACTON, S. T. 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. T.; 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.
- ROSENBLUM, W. I.; ZWEIFACH, W. Cerebral microcirculation in the mouse brain. *Archives of Neurology*, v. 9, p. 414–423, 1963.
- SAHOO, S.; RAY, N.; ACTON, S. T. Rolling leukocyte detection based on teardrop shape and the gradient inverse coefficient of variation. In: *International Conference on Medical Information Visualisation*. London, United Kingdom: IEEE Computer Society, 2006. p. 29–33.
- SANTOS, A. C. D. et al. CCL2 and CCL5 mediate leukocyte adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis an intravital microscopy study. *Journal of Neuroimmunology*, v. 162, n. 1-2, p. 122–129, 2005.
- SANTOS, A. C. D. et al. Kinin B2 receptor regulates chemokines CCL2 and CCL5 expression and modulates leukocyte recruitment and pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice. *Journal of Neuroinflammation*, v. 5, p. 49–58, 2008.

- SATO, Y. et al. Measuring microcirculation using spatiotemporal image analysis. In: AYACHE, N. (Ed.). *Computer Vision, Virtual Reality and Robotics in Medicine*. Nice, France: Springer, 1995. v. 905, p. 302–308.
- SATO, Y. et al. 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.
- SCHÜTZ, G. J.; SCHINDLER, H.; SCHMIDT, T. Single-molecule microscopy on model membranes reveals anomalous diffusion. *Biophysical Journal*, v. 73, n. 2, p. 1073–1080, 1997.
- STEEBER, D. A.; CAMPBELL, M. A. Optimal selectin-mediated rolling of leukocytes during inflammation in vivo requires intercellular adhesion molecule-1 expression. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA: PNAS, 1998. v. 95, n. 13, p. 7562–7567.
- SUMEN, C. et al. Intravital microscopy: Visualizing immunity in context. *Immunity*, v. 21, n. 3, p. 315–329, 2004.
- TANG, J. et al. Evaluation of intravital tracking algorithms. In: *The 2002 45th Midwest Symposium on Circuits and Systems*. Tulsa, Oklahoma: IEEE, 2002. v. 1, p. 220–223.
- 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: *Proceedings of the Sixth International Conference on Computer Vision*. Bombay, India: IEEE Computer Society, 1998. p. 839–846.
- VERESTÓY, J.; CHETVERIKOV, D. *Feature point Tracking algorithms*. 1998. Disponível em: <http://homepages.inf.ed.ac.uk/rbf/CVonline/LOCAL_COPIES/CHETVERIKOV/psmweb/psmweb.html>.
- WAGNER, R. *Erläuterungstafeln zur Physiologie und Entwicklungsgeschichte*. Leipzig: Leopold Voss, 1839.
- WEIGERT, R. et al. Intravital microscopy: a novel tool to study cell biology in living animals. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 133, n. 5, p. 481–491, 2010.
- XU, C.; PRINCE, J. L. Generalized gradient vector flow external forces for active contours. *Signal Processing*, v. 71, n. 2, p. 131–139, 1998.
- XU, C.; PRINCE, J. L. Snakes, shapes, and gradient vector flow. *IEEE Transactions on Image Processing*, v. 7, n. 3, p. 359–369, 1998.
- XU, R.; BOUDREAU, A.; BISSELL, M. J. Tissue architecture and function: dynamic reciprocity via extra-and intra-cellular matrices. *Cancer and Metastasis Reviews*, v. 28, n. 1-2, p. 167–176, 2009.
- ZIJDENBOS, A. P. et al. Morphometric analysis of white matter lesions in MR images: method and validation. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, v. 13, n. 4, 1994.