Universidade de São Paulo

Programa Interunidades de Pós-graduação em Bioinformática

DIOGO MATOS DA SILVA

Análise e reconhecimento da forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* para parasitemia automatizada em imagens com baixa densidade de pontos

São Paulo

2020

# DIOGO MATOS DA SILVA

Análise e reconhecimento da forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* para parasitemia automatizada em imagens com baixa densidade de pontos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação interunidades em Bioinformática para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Helder Takashi Imoto Nakaya Coorientador: Prof. Dr. Luciano da Fontoura Costa

São Paulo

### Agradecimentos

Agradeço à Profa. Dra. Marta de Lana, coordenadora do Laboratório de Doença de Chagas da Universidade Federal de Ouro Preto, por conceder as lâminas de esfregaço que deram início a este trabalho. E a seu orientando, Matheus Marques Milagre, pelo imenso trabalho de fotografar e anotar as imagens sem as quais este trabalho não seria possível.

Agradeço ao Prof. Dr. João Santana da Silva, coordenador do Programa de Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, e seu orientando Makon Tavares de Oliveira, por providenciarem mais lâminas coradas para o prosseguimento de nossos estudos.

Agradeço ao Prof. Dr. Helder Nakaya e ao Prof. Dr. Luciano da Fontoura Costa pela orientação que norteou todo o meu processo.

Agradeço à minha esposa, Juliana, por todo o carinho, paciência e enorme apoio que me permitiu seguir sempre em frente.

Agradeço aos meus amigos e colegas do CSBL: Thiago Hirata, Viviane Schuch, André Nicolau, Lucas Cardozo, Mindy Muñoz, Deney Araujo, Alysson Urbansky, Diógenes Lima, Patrícia Gonzales, Tiago Lubiana, Fabio Pohl, Pedro Russo, Bruna Garbes, Leandro Jimenez. As conversas produtivas e o companheirismo serão sempre lembrados.

**Resumo:** A detecção de parasitas no sangue periférico é prova definitiva de infecção de Trypanosoma cruzi em vertebrados. O acompanhamento da parasitemia de T. cruzi em camundongos infectados é necessário tanto para a manutenção da cepa estudada em animais no laboratório, quanto para se inferir a modulação da infecção por diferentes tratamentos. A análise de amostras por esfregaço sanguíneo é utilizada para estudos morfométricos, mas apresenta baixa sensibilidade quando utilizada para parasitemia manual. É preferível que a contagem seja realizada de forma automatizada com máxima sensibilidade, em menor intervalo de tempo e com menores custos. Técnicas de processamento de imagens e reconhecimento de padrões já vêm sendo utilizadas em micrografias digitais com boa resolução para impressão, a partir de 300 ppp (pontos por polegada). Propomos a aplicação dessas técnicas em imagens com baixa densidade de pontos por polegada para parasitemia da cepa Y de T. cruzi, na forma tripomastigota. Analisamos microgafias de esfregaço sanguíneo coradas com Giemsa que foram obtidas com câmeras de dispositivos móveis. As câmeras desses aparelhos são capazes de capturar imagens com 72 ppp em uma área de 4000x3000 pixels, ou 12 megapixels. Realizamos a extração de um conjunto de descritores composto por medidas geométricas, de curvatura e de cor e textura do cinetoplasto e do núcleo de 2304 parasitos. Os descritores extraídos foram separados em conjuntos de treinamento e de teste e classificados com SVM. Os resultados de precisão, sensibilidade, especificidade e área ROC do método proposto foram de 91,4%, 91,7%, 97,9% e 94,5%, respectivamente. Nossos resultados demonstram que a automatização da análise de imagens com baixa densidade de ppp é uma alternativa viável para a redução de custos e ganho de eficiência na utilização do microscópio ótico.

Palavras-chave: Trypanosoma cruzi, parasitemia, aprendizado de máquina, SVM.

Abstract: Detection of parasites in peripheral blood presents complete proof of Trypanosoma cruzi infection in vertebrates. Monitoring of T. cruzi parasitemia in infected mice is necessary for maintaining the strain studied in laboratory animals and for inferring the modulation of infection by different treatments. The analysis of blood smear samples is used for morphometric studies, but it presents low sensitivity when used for manual parasitemia. It is preferable to perform an automated couting with maximum sensitivity, in a shorter time, and with lower costs. Image processing and pattern recognition techniques have already been used in digital micrographs with good resolution for printing, from 300 dpi (dots per inch). We propose the application of these techniques in images with low density of dots per inch in the parasitemia of strain Y of *T. cruzi*, in trypomastigote form. We analyzed micrographs of blood smear stained with Giemsa obtained using mobile device cameras. Those cameras are capable of capturing images with 72 dpi in an area of 4000x3000 pixels, or 12 megapixels. We extracted a set of descriptors composed of geometric, curvature, color and texture measurements of the kinetoplast and nucleus of 2304 parasites. Those descriptors were divided into training and test sets and classified using SVM. The values of precision, sensitivity, specificity, and ROC area of the proposed method were 91.4%, 91.7, 97.9% and 94.5%, respectively. Automating image analysis with low dpi density is a viable alternative for reducing costs and gain efficiency in the use of the optical microscope.

Palavras-chave: Trypanosoma cruzi, parasitemia, machine learning, SVM.

# Lista de Figuras

Figura 1 - Suporte para acoplamento de aparelho celular à ocular do microsc	ópio
ótico	9
Figura 2 - Micrografia de campo de lâmina de sangue de camundongo infecta	ido com
Trypanosoma cruzi.	10
Figura 3 - Recorte da micrografia de um campo com parasito ao centro.	10
Figura 4 -Representações tridimensionais dos espaços RGB (à esquerda) e 0	CIELAB
(à direita).	13
Figura 5 - Imagem em tons de cinza e componentes conexos encontrados.	14
Figura 6 - Recorte de micrografia de sangue de camundongo infectado e obj	etos
segmentados.	15
Figura 7- Representação paramétrica de um contorno.	16
Figura 8 - Valores absolutos de curvatura obtidos para um núcleo (N).	18
Figura 9 - Análise da curvatura do núcleo de T. cruzi.	19
Figura 10 – Diferentes percepções de cores em diferentes fontes de luz.	19
Figura 11- Pipeline de treinamento e validação do modelo.	26
Figura 12 - Exemplos de objetos destacados e suas respectivas classes	29
Figura 13 – Resultados falsos positivos e positivo verdadeiro.	32
Figura 14 - Resultados positivos verdadeiros.	33
Figura 15 – Resultados falsos negativos.	34

# Lista de Tabelas

Tabela 1- Aferições morfométricas da cepa Y de T. cruzi adaptadas de	
(ROSSI,2006).	3
Tabela 2 – Número de objetos por classes utilizados nos conjuntos de treinament	to e
validação.	29
Tabela 3 - Média dos resultados obtidos após aplicação do método grid search co	om
5-fold no conjunto de dados de treinamento	30
Tabela 4 - Resultados da classificação sobre o conjunto de validação	31
Tabela 5 - Matriz de confusão do resultado da classificação do conjunto de dados	s de
validação.	31
Tabela 6 - Matriz de confusão da aplicação na aplicação desenvolvida para o	
método proposto.	32
Tabela 7- Comparação dos resultados de nosso método com outros trabalhos.	36

# Sumário

1	۱۸ 1.1	ITRODUÇÃO1 <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de chagas1
	1.2	Parasitemia <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> 1
	1.3	Morfometria2
	1.4	Percepção visual e pontos por polegada3
	1.5	Análise e classificação de imagens digitais4
2	0 2.1	BJETIVOS7 Objetivo principal7
	2.2	Objetivos específicos7
3	N 3.1	IATERIAIS E MÉTODOS
	3.2	Coloração8
	3.3	Aquisição de imagens8
	3.4	Isolamento de parasitos9
	3.5	Identificação manual dos objetos de interesse10
	3.6	Pré-processamento das imagens11
	3.7	Representação de formas por medidas geométricas15
	3.8	Análise por curvatura17
	3.9	Matriz de coocorrência19
	3.10	Momentos invariantes de Hu21
	3.11	Espaço de atributos23
	3.12	Classificação24
	3.13	Redução de dimensionalidade26
4	R 4.1	ESULTADOS
	4.2	Redução de dimensionalidade
	4.3	Classificação
5 6 Re	D C eferên	ISCUSSÃO

# 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 *Trypanosoma cruzi* e a doença de chagas

Em 1909 Carlos Chagas apresentou um trabalho com a descrição completa da doença que levou seu nome. A Doença de Chagas é uma infecção causada pelo protozoário parasita *Trypanosoma cruzi* (também descrito por Chagas em 1908) (CHAGAS,19009). Os vetores são insetos da subfamília *Triatominae* que, ao picarem hospedeiros vertebrados, eliminam tripomastigotas próximo ao local da picada. Os protozoários entram no hospedeiro através da ferida ou através das mucosas. Uma vez dentro do hospedeiro, os tripomastigotas invadem células e diferenciam-se na forma intracelular, amastigota. Na forma amastigota, o protozoário multiplica-se por divisão binária. Diferencia-se para a forma tripomastigota e é liberado na corrente sanguínea onde buscará mais células para invadir, em um ciclo infectante contínuo (CHAGAS,1913). Existem cerca de 10 milhões de pessoas infectadas no mundo pelo *T. cruzi*, a maior parte na América Latina (CASTRO,2012). Em 2010 a estimativa era de 5.7 milhões de pessoas infectadas na América Latina. Em estimativas apresentadas no II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015, haveria entre 1,9 e 4,6 milhões de pessoas infectadas no Brasil (DIAS *et al*, 2015).

### 1.2 Parasitemia in vivo e in vitro

São muitas as tentativas de se obter uma droga contra *T. cruzi* (ANDRADE,2011). O foco principal destes trabalhos é tentar eliminar o protozoário parasita do organismo, nem sempre com sucesso. A contagem de parasitos presentes na corrente sanguínea, ou parasitemia, pode indicar o grau de eficácia de um fármaco em fase de testes.

A detecção de parasitas no sangue periférico é prova cabal de infecção de *Trypanosoma cruzi* (ARAÚJO-JORGE e CASTO,2000). O acompanhamento de parasitemia de camundongos infectado é feito pelo método de Pizzi-Brener (BRENER,1962). Nesse método toma-se 5 µl de sangue do camundongo que é depositado sobre a lâmina. Com auxílio do microscópio, com a objetiva de 40x, conta-se o número de parasitas móveis em cinquenta campos aleatoriamente observados, cobrindo toda a área da lamínula. Com o movimento do flagelo o parasito pode se deslocar rapidamente no sangue. Um parasitologista experiente pode estimar rapidamente a contagem de cada campo. Um observador inexperiente terá

dificuldades em acompanhar os movimentos do parasito e poderá apresentar uma maior margem de erro. Esse método de exame de sangue a fresco só pode ser realizado em experimentos controlados, não sendo possível distinguir a forma do parasito em movimento na objetiva de 40x. É o método quantitativo de avaliação da parasitemia indicado na literatura para contagem manual, sendo amplamente utilizado na fase aguda da doença (ALMEIDA e SANTILIANO,2012).

Outro método parasitológico direto se dá pela análise de lâminas de esfregaço sanguíneo coradas. A contagem manual de parasitos em lâminas coradas apresenta baixa sensibilidade em comparação a outros métodos parasitológicos (ALMEIDA; SANTILIANO; 2012), sendo preferível que esse procedimento seja automatizado. Essa técnica geralmente é empregada para análise morfométrica e qualitativa do parasito (presença/ausência). O material genético do cinetoplasto, região rica em DNA mitocondrial (kDNA), pode representar até 30% do DNA celular total, às vezes ultrapassando o total representado pelo núcleo (SOUZA,2009). Com a aplicação do método Giemsa o cinetoplasto e o núcleo apresentam maior contraste com o fundo luminoso do microscópio.

Segundo DEFENDI (2016) a sensibilidade do método Pizzi-Brener é de 80 a 90% (G), enquanto que a análise manual de lâminas coradas apresenta 60% de sensibilidade.

### 1.3 Morfometria

As análises morfológica e morfométrica de organismos é de enorme importância para sua correta classificação taxonômica. Análises morfométricas de uma variedade de cepas de *T. cruzi* vêm sendo realizados desde meados do século XX. Com base nesses trabalhos podemos validar a corretude das aferições aqui propostas para o trabalho de classificação e reconhecimento da cepa Y.

As três principais formas do Trypanosoma cruzi são (CHAGAS,1913):

- Amastigota forma intracelular, sem flagelo, encontrada no hospedeiro vertebrado.
- Epimastigota forma flagelada encontrada apenas no vetor.
- Tripomastigota forma flagelada e infectante para os vertebrados.

Esse protozoário, na fase extracelular, aparece na forma tripomastigota que circula na corrente sanguínea. Essa forma, como analisada e descrita por Brener, apresenta forma delgada com cinetoplasto bastante afastado da extremidade posterior, núcleo de localização mediana e alongado, flagelo curto e comprimento total de 22,6 µm (BRENER,1963). Apresenta membrana ondulante em toda a extensão lateral do parasito. Esse estágio evolutivo está presente na fase aguda da Doença de Chagas, constituindo a forma infectante para os vertebrados.

Em (ROSSI, 2006) foram identificadas e mensuradas três formas da cepa Y e algumas medidas estão reproduzidas na Tabela 1. As formas foram caracterizadas quanto à largura em três padrões distintos: finas, intermediárias e largas. Em relação ao comprimento foram classificadas entre os padrões: curtas, intermediárias e longas. O núcleo e o cinetoplasto também foram medidos e classificados em relação à área em três padrões distintos: pequenas, intermediárias e grandes. Os valores são dados em µm para largura, comprimento e comprimento do flagelo livre e µm<sup>2</sup> para as medidas de área.

Tabela 1- Aferições morfométricas da cepa Y de T. cruzi adaptadas de (ROSSI,2006).

Largura	Comprimento	Flagelo	Area do Cinetoplasto	Area do Núcleo	Indice Nuclear
0,6 – 1,3	13,3 — 19,5	4,0 – 7,1	0,2-0,6	0,7 – 2,1	0,5 – 1,0
1,4 – 2,1	19,6 – 24,7	7,2 – 10,3	0,7 – 1,1	2,2 – 3,1	1,1 – 1,8
2,2 – 5,5	24,8 - 43,8	10,4 – 24,8	1,2 – 2,6	3,2-6,7	1,9 – 3,5

### 1.4 Percepção visual e pontos por polegada

Na obra Sensation and Perception (GOLDSTEIN,2009) são apresentados diversos estudos e experimentos psicofísicos que demonstram, entre outros temas, diversas facetas de nossa capacidade de percepção visual. Os neurobiologistas David Hubel e Torsten Wiewsel realizaram os famosos experimentos com gatos que cresceram em ambientes onde só lhes eram apresentadas linhas horizontais ou verticais. A partir de certo tempo de vida, os gatos perdiam a capacidade de distinguir linhas na direção a qual não haviam sido expostos (HUBEL;WIEWSEL,1961). Esses e outros trabalhos vêm sendo utilizados para se desenvolver técnicas de visão artificial em um paralelo com o que é encontrado na literatura sobre visão natural.

A impressão de imagens com tinta, em boa qualidade, no geral é realizada em 300 ppp, ou pontos por polegada. Uma pessoa com boa acuidade visual e em condições ideais de iluminação não conseguirá distinguirá os pontos de tinta a mais de 23 cm de distância do papel. Se a mesma imagem fosse impressa a 72 dpi, uma pessoa com boa visão precisaria observá-la a 99 cm de distância para deixar de distinguir os pontos. As imagens registradas com o uso de aparelhos celulares, sendo mais voltadas para uso na Web, são em sua maioria geradas em 72 ppp. Nessa densidade de pontos por polegada, aplicar técnicas de reconhecimento de padrões em micrografias pode ser um grande desafio.

Atualmente, os aparelhos antes voltados apenas para telefonia, são computadores de bolso e se tornaram ferramentas fundamentais para a vida contemporânea (COSTA,2004). Na atualidade, tais aparelhos podem ser vistos corriqueiramente. Segundo dados<sup>1</sup> da Agência Nacional de Telecomunicações, o Brasil registou 234,37 milhões de linhas móveis em operação no mês de agosto de 2018. Nesse mesmo ano, a população total projetada para o país era de 208,5 milhões seegundo estimativas<sup>2</sup> do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Assim, há mais de um telefone móvel em operação por habitante. Esses aparelhos atualmente contam com ótimas câmeras para publicações na Web em 72 ppp, mas insuficientes para uma impressão em papel. Se o tamanho da impressão for reduzido, ganha-se em densidade de pontos por polegada, mas perde-se parte da ampliação do microscópio.

## 1.5 Análise e classificação de imagens digitais

A classificação dos organismos é um ponto fundamental na Biologia. Dada uma nova amostra, deve-se identificar qual sua classificação taxonômica. A classificação deve ser realizada de modo a maximizar a similaridade entre os objetos de uma mesma classe e minimizar a similaridade entre objetos de classes distintas (COSTA; CESAR,2009).

<sup>1</sup> http://www.anatel.gov.br/dados/acessos-telefonia-movel, visitado em 18 de outubro de 2018.

<sup>2</sup> https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-

noticias/releases/21837-projecao-da-populacao-2018-numero-de-habitantes-do-pais-deveparar-de-crescer-em-2047, visitado em 18 de outubro de 2018.

Tema recorrente de obras de ficção futurista nas décadas anteriores, atualmente tecnologias voltadas para reconhecimento de padrões em imagens podem ser encontradas nas mais diversas aplicações. O acelerado desenvolvimento de novas tecnologias para computação permitiu com que técnicas de processamento de imagens possam ser executadas em um curto espaço de tempo (SHOTON,2011).

Na Biologia, a análise de imagens digitais vem sendo amplamente utilizada nas últimas décadas e suas aplicações incluem a mensuração de DNA em células tumorais, análise de cromossomos e, entre outras, em imagens de microscopia (WU *et al*, 2008), (RANZATO, 2007). Entre os maiores desafios encontrados na área estão a segmentação dos objetos e a escolha do espaço de características. Para o primeiro problema são propostas diversas abordagens como limiarização, geração de *superpixels*, operadores morfológicos, entre outras (GONZALES, 2009). O segundo problema é abordado por análise combinatória do espaço de características ou por sua transformação em um espaço reduzido, de forma a otimizar a performance dos classificadores.

Outros trabalhos sobre o reconhecimento digital de *Trypanosoma cruzi* podem ser encontrados na literatura. Esses trabalhos podem ser direcionados para as formas intracelular (MOON *et al*, 2014) e extracelular (UC-CETINA *et al.*, 2013) do parasito. O trabalho aqui apresentado se diferencia dos demais por propor o uso de imagens com baixa densidade de *pixels* por polegada. Essas imagens podem ser obtidas com câmeras de dispositivos móveis de uso cotidiano. Essas câmeras são próprias para publicações na Web, mas apresentam pouca nitidez quando impressas. Outro diferencial se dá pela análise morfométrica do cinetoplasto e do núcleo da forma tripomastigota, sendo as medidas utilizadas em conjunto com outros descritores.

A Doença de Chagas é endêmica em 21 países da América Latina. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), como consequência das migrações, da urbanização e da intensificação do turismo nas últimas décadas a doença deixou de ser um problema rural e latino-americano. Ela se instalou nas periferias das cidades na América do Norte, Europa, Ásia e Oceania, tornando-se um problema global de saúde pública. Devido ao fato de que a doença afeta comunidades em situação de pobreza e que os recursos para fomentar projetos de pesquisa e estratégicas de

controle são escassos, a Organização Mundial da Saúde enquadrou esta enfermidade no grupo de doenças negligenciadas. Por afetar principalmente localidades com escassez de recursos, este trabalho torna-se necessário pois apresenta uma proposta de diminuir custos de equipamento e, também, aumentar a produtividade dos núcleos de pesquisa.

# 2 OBJETIVOS

# 2.1 Objetivo principal

Apresentar uma metodologia para reconhecimento automatizado da cepa Y do protozoário parasita *Trypanosoma cruzi* em micrografias digitais com baixa densidade de pontos por polegada.

# 2.2 Objetivos específicos

- a) Delimitar um conjunto robusto de técnicas de processamento, descritores e classificadores para a automatização de parasitemia por técnica de esfregaço sanguíneo.
- b) Validar o uso de imagens com baixa densidade de pontos por polegada na tarefa de reconhecimento de padrões de formas microscópicas.
- c) Comparar a acurácia do método proposto com outros trabalhos de automatização de reconhecimento de padrões em imagens de microscopia.

# **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### 3.1 Amostras de parasitas

A preparação das lâminas e obtenção das micrografias foram realizadas no Laboratório de Doença de Chagas da Universidade Federal de Ouro Preto, coordenado pela Dr. Marta de Lana.

Amostras de sangue foram coletadas de camundongos infectados com a cepa Y do parasito *Trypanosoma cruzi*. Essa cepa foi escolhida por apresentar picos de parasitemia no intervalo de 7 dias a partir da infecção e com perfil de crescimento conhecido (PINTO,1999). Os camundongos infectados tinham idade entre 4 e 5 semanas. Nesta idade os camundongos ainda não apresentam o sistema imunológico completamente formado, o que impede que o combate ao parasito seja mais intenso.

#### 3.2 Coloração

As amostras de sangue coletadas foram preparadas em lâminas com o método de coloração Giemsa (VALLADA,1999). Essa técnica permite a visualização do parasito com objetiva de imersão. As regiões que tendem a ser ricas em ligação adenina-timina ficam mais escuras. Em contraste, as regiões que tendem a ser mais ricas em ligações citosina-guanina incorporam menos coloração Giemsa e aparecem mais claras.

#### 3.3 Aquisição de imagens

O estudo preliminar foi realizado com 70 imagens geradas da combinação de microscópio óptico (Nikon Eclipse E200) e câmeras de aparelhos celulares. No microscópio ótico foram utilizadas a lente ocular de 10x e a lente objetiva de imersão de 100x. A ampliação total oferecida por um microscópio é correspondente ao aumento da objetiva multiplicado pelo aumento da ocular. Com este par de lentes obtemos uma ampliação total de 1000x. Os aparelhos celulares utilizados estavam equipados com câmeras de 12 *megapixels* (4000x3000 px) e resolução de 72 ppp, imprópria para uma boa qualidade de impressão em papel.

Nessas configurações as imagens obtidas apresentam resolução linear de 2,835 *pixels* / um. A medida lateral de um *pixel* corresponde, então, a 0,35278 mm, aproximadamente. Com a ampliação ótica de 1000x temos que a medida da lateral de um pixel se aproxima de 0,35278 µm.

O celular é acoplado ao microscópio com o uso de um suporte como na Figura 1. Desse modo, a câmera pode ficar estabilizada e manter o foco no campo observado pela ocular. O foco é configurado através do software da câmera do aparelho e fixado em modo macro. As demais configurações são deixadas em modo automático, sendo este o modo padrão das configurações de captura desses aparelhos.

Figura 1 - Suporte para acoplamento de aparelho celular à ocular do microscópio ótico



# 3.4 Isolamento de parasitos

O recorte (*cropping*) dos parasitos presentes nas micrografias foi realizado manualmente. Neste procedimento utiliza-se softwares para edição de imagens, como o Gimp. O recorte é realizado com a forma quadrada de 400 *pixels* de lateral. As regiões da imagem contendo parasitos foram identificadas por um parasitologista como apresentado na Figura 2. Na figura os quadrados vermelhos indicam regiões contendo um parasito.

Figura 2 - Micrografia de campo de lâmina de sangue de camundongo infectado com Trypanosoma cruzi. Os quadrados vermelhos indicam regiões com a presença de um parasito.



**Figura 3 - Recorte da micrografia de um campo com parasito ao centro**. Barra de referência para 10µm. Cinetoplasto (K) e o núcleo (N) do parasito apresentam grande contraste em relação ao fundo com a aplicação do método de coloração Giemsa



As micrografias contendo os campos completos foram armazenadas em formato JPEG, seguindo o padrão de nomeclatura *field*[NNN]*count*[X], onde NNN é um número de identificação único de uma micrografia e X indica o número de parasitos contados no campo registrado.

# 3.5 Identificação manual dos objetos de interesse

Dois alunos de doutorado treinados e experientes em parasitemia de *T. cruzi* foram responsáveis por indicar a posição correta dos objetos de interesse nas micrografias. Cada parasito foi subdividido em dois objetos distintos, cinetoplasto e núcleo.

Utilizando software desenvolvido por nós, a posição dos dois objetos de interesse foi indicada pelas coordenadas obtidas em eventos de clique com o botão direito do mouse. O botão esquerdo é utilizado para arrastar a imagem permitindo seu livre deslocamento na tela do computador, facilitando o reconhecimento da localização dos objetos pelos parasitologistas.

As coordenadas extraídas foram armazenadas em um banco de dados, sendo identificadas pelo número do campo e respectivo objeto apontado, cinetoplasto ou núcleo. Desse modo, os dados extraídos e armazenados foram: número de identificação única do campo; estrutura presente nas coordenadas indicadas, cinetoplasto ou núcleo; e coordenadas dos eixos X e Y registradas ao clique do mouse. A correta identificação dos pontos de interesse e a extração de suas coordenadas são de suma importância para o controle de eficácia do método proposto.

### 3.6 Pré-processamento das imagens

### 3.6.1 Espaços de cores CIEL\*a\*b\*

O espaço de cores RGB é um espaço genérico, podendo ser implementado de diversas formas. O modelo que vem sendo mais utilizado é a implementação de 8 bits, ou 256 níveis discretos por canal. Seus valores são, em geral, convertidos para o espaço de cores específico do dispositivo de exibição.

CIEL\*a\*b\*, ou CIELAB, (Figura 4) é o espaço de cores especificado pela Comissão Internacional de Iluminação (em francês, *Commission Internationale de l'éclairage,* de onde vem a as iniciais CIE). Esse espaço de cores foi projetado para abranger o maior número as cores que um ser humano com boa acuidade visual pode perceber. É um espaço tridimensional no qual os pontos são representados por número reais, permitindo uma quantidade virtualmente infinita de representações de cores. Nesse espaço a distância entre dois pontos é euclidiana.

A conversão do espaço de cores RGB para o espaço CIELAB não pode ser feita diretamente, sendo necessário que o espaço RGB seja antes convertido para o

espaço XYZ, base utilizada na criação de diversos espaços de cores (SCHANDA,2007). A implementação sRGB é a mais utilizada atualmente e foi estabelecida na norma IEC 61966-2-1:1999 pela Comissão Eletrotécnica Internacional como padrão para equipamentos e sistemas multimídia, o que inclui câmeras digitais. Essa mesma norma estabelece as matrizes de valores a serem utilizados na conversão de sRGB para XYX, uma transformação linear. De forma semelhante, da transformação do espaço XYZ podemos obter o espaço CIELAB.

A seguir, compilamos a sequência de cálculos utilizadas para as transformações. O primeiro passo para a conversão se dá pela correção de gama dos valores de R<sub>srgb</sub>, G<sub>srgb</sub> e B<sub>srgb</sub> que devem estar dentro do intervalo [0,1]. A correção é dada por:

$$C_{
m linear} = \left\{ egin{array}{ll} rac{C_{
m srgb}}{12.92}, & C_{
m srgb} \leq 0.04045 \ \left(rac{C_{
m srgb}+a}{1+a}
ight)^{2.4}, & C_{
m srgb} > 0.04045 \ \end{array} 
ight.$$

A seguir aplica-se a multiplicação matricial dos valores lineares para se obter XYZ:

$$\begin{bmatrix} X \\ Y \\ Z \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0.4124 & 0.3576 & 0.1805 \\ 0.2126 & 0.7152 & 0.0722 \\ 0.0193 & 0.1192 & 0.9505 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} R_{\text{linear}} \\ G_{\text{linear}} \\ B_{\text{linear}} \end{bmatrix}_{(2)}$$

A transformação da matriz  $[X Y Z]^T$  para CIELAB pode ser obtida por:

$$egin{aligned} L^{\star} &= 116 \; f\!\left(rac{Y}{Y_{
m n}}
ight) - 16 \ a^{\star} &= 500 \left(f\!\left(rac{X}{X_{
m n}}
ight) - f\!\left(rac{Y}{Y_{
m n}}
ight)
ight) \ b^{\star} &= 200 \left(f\!\left(rac{Y}{Y_{
m n}}
ight) - f\!\left(rac{Z}{Z_{
m n}}
ight)
ight) \ (3) \end{aligned}$$

onde :

$$f(t) = egin{cases} \sqrt[3]{t} & ext{set} imes \delta^3 \ rac{t}{3\delta^2} + rac{4}{29} & ext{caso contrário} \ \end{array}$$
 (4)

 $\operatorname{com} \delta = \frac{6}{29}$ .

**Figura 4 -Representações tridimensionais dos espaços RGB (à esquerda) e CIELAB (à direita).** O segundo é preferível para aplicações que envolvam a análise da imagem em termos de seus valores cromáticos. Fonte da imagem: https://en.wikipedia.ogr/wiki/CIELAB\_color\_space.



Os valores Xn, Yn e Zn são os valores do ponto branco referencial. Sob o iluminante D65 (utilizado em sRGB) com normalização Y = 100, estes valores são, 95.047, 100.000 e 108.883, respectivamente.

# 3.6.2 Limiarização

A limiarização é o processo mais simples para segmentação de imagens (BHARGAVI, 2014). Dada uma imagem em níveis de cinza, esta técnica pode ser aplicada para se criar uma imagem binária na qual os objetos estarão separados do fundo da imagem. Após a limiarização, pode-se aplicar um algoritmo de rotulação de componentes conexos.

Na Figura 5 apresentamos os componentes conexos obtidos em um teste realizado com limiarização global. Nesse teste foi utilizada a média dos valores dos componentes R, G e B para a criação da imagem em tons de cinza.

Figura 5 - Imagem em tons de cinza e componentes conexos encontrados. À direita os componentes conexos são representados por cores distintas, obtidos após aplicação de limiarização global na imagem à esquerda.



Mesmo no espaço CIELAB, não pudemos separar os objetos corretamente com a aplicação da técnica de limiarização global. Não sendo possível distinguir os parasitos sobrepondo células de sangue ou outros artefatos. Por isso, utilizamos a técnica de limiarização adaptativa que mostrou bons resultados no processamento de documentos de imagem degradados (PAI *et al.*, 2010). Com a aplicação desta técnica conseguimos separar o cinetoplasto e o núcleo corados, mesmo quando estavam sobrepondo outros objetos.

Na limiarização adaptativa, ao contrário da global, o limiar é calculado na vizinhança de um *pixel.* O tamanho de tal vizinhança varia por aplicação, sendo utilizada uma vizinhança de 10 *pixels* neste trabalho. Para calcular o valor de limiar T(x,y), onde (x,y) são as coordenadas do *pixel*, segue-se os seguintes passos para cada *pixel*:

- 1 Uma área quadrada de lado N com o pixel ao centro é criada.
- 2 É calculada a média dos valores encontrados nessa área

3 – Dado um valor de corte C no intervalo [0,1], a binarização do pixel ocorrerá por:

$$T(x,y) = \begin{cases} 1, & \text{se } \frac{p(x,y)}{\mu} < C \\ 0, & \text{caso contrário} \end{cases}$$

Na Figura 6 apresentamos a segmentação das formas do cinetoplasto e do núcleo corados. Foi utilizada técnica de limiarização adaptativa em relação à média 14

com C = 0.5 nos três componentes, L\*, b\* e a\*, resultando em três imagens binárias. O resultado final é a imagem obtida pela união das três anteriores.

**Figura 6 - Recorte de micrografia de sangue de camundongo infectado e objetos segmentados.** À direita, resultado da segmentação obtida após aplicação de limiarização adaptativa na imagem da esquerda. O cinetoplasto do parasito está indicado por K e o núcleo por N.



# 3.7 Representação de formas por medidas geométricas

# 3.7.1 Perímetro e área

O contorno externo da forma pode ser extraído com o uso do algoritmo *Countour Following* apresentado na obra *Shape Analysis and Classification* (COSTA; CÉSAR, 2009). O resultado obtido é uma representação paramétrica do contorno e seus pontos são identificados pelas coordenadas x(t) e y(t) (Figura 7). Com o contorno representado como um sinal de valor complexo u(n) = x(n) + jy(n), com j =  $\sqrt{-1}$  e n = 0, ..., N – 1, o comprimento do arco pode ser estimado com a seguinte fórmula extraída da referida obra:

 $\sum_{0}^{N-1} |u(n) - u(n-1)|$  (6)

Para o cálculo da área podemos aplicar uma versão discretizada do teorema de Green que diz que uma área compreendida por um arco fechado no plano x-, y- é dada pela integral do contorno (GONZALES,2009):

$$A = \frac{1}{2} \int (x dy - y dx)$$
(7)

Essa equação pode ser discretizada (CASTLEMAN, 1996) como:

$$A = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{N_b} [x_i (y_{i+1} - y_i) - y_i (x_{i+1} - x_i)]$$
(8)

onde N<sub>b</sub> é o número total de pontos do contorno.

Sejam a área e o perímetro denotados por A e P, respectivamente, alguns descritores de complexidade da forma podem ser extraídos entre os quais:

- Razão entre área e perímetro: <sup>A</sup>/<sub>p</sub> (9)
- Circularidade:  $\frac{P^2}{A}$  (10)
- Razão de espessura:  $4\pi \frac{A}{P^2}$  (11)

# 3.7.2 Centroide

A partir da representação paramétrica do contorno do objeto, como na Figura 7, podemos calcular seu centroide. Dado o centro de massa M de um contorno representado por um sinal complexo u(n), o centroide ser calculado pelo valor médio de todos os pontos de u(n) (COSTA e CESAR,2009). O valor médio dado por M =  $z_1$  +j $z_2$  é um número complexo e ( $z_1$ ,  $z_2$ ) são as coordenadas do centroide.

A partir das coordenadas do centroide podemos mensurar as seguintes características: distâncias máxima, mínima e média entre o centroide e os pontos do contorno; histograma das distâncias entre o centroide e os pontos do contorno.

**Figura 7- Representação paramétrica de um contorno.** À esquerda, imagem binária do gato de Attneave (ATTNEAVE,1954). A imagem do gato é aqui adaptada para ilustrar o processamento da imagem em relação a seu contorno. A representação é dada pelos sinais x (vermelho) e y (azul) em função do parâmetro t (gráfico à direita).



### 3.7.3 Eixos maior e menor

O eixo maior de uma forma pode ser definido pelo par de pontos mais distantes pertencentes ao objeto. O comprimento do eixo maior será dado pela distância desses pontos. O eixo menor é aquele perpendicular ao eixo maior. Os eixos maior e menor, também denominados eixos principais, podem ter seus comprimentos estimados com base no conceito de autovalores (COSTA e CÉSAR, 2009).

Os componentes do contorno paramétrico, x(t) e y(t), são utilizados para se criar uma matriz bidimensional da qual é calculada a matriz de covariância K. A partir da obtenção dos autovetores de K pode-se calcular seus autovalores associados e o eixo maior será definido pelo autovetor associado ao maior autovalor. O segundo maior autovalor nos dará o autovetor associado ao eixo menor. O comprimento do eixo menor pode ser estimado pelo produto do comprimento do eixo maior e a razão entre os autovalores associados aos eixos menor e maior, respectivamente.

Das estimativas de comprimento dos eixos podem ser derivados outros descritores. A razão entre os comprimentos do eixo maior e menor, também denominada razão de aspecto, e a razão entre o comprimento do eixo maior e o perímetro da forma, são dois exemplos de descritores.

#### 3.8 Análise por curvatura

No trabalho de COSTA e CESAR (2009) alguns experimentos da percepção visual do contorno de formas são brevemente discutidos. Nesses trabalhos são observados pontos de curvatura mais utilizados por pessoas no reconhecimento de formas. Os resultados destes experimentos psicofísicos demonstraram que os pontos de maior curvatura deveriam concentrar mais informação. Na literatura, a curvatura é amplamente empregada na representação das diferentes formas geométricas (MOKHTARIA,1992), (BARONI,1992), (DUDEK,1997), (CESAR JUNIOR e COSTA,1998).

Do histograma das curvaturas podemos estimar alguns descritores como média, mediana, variância, entropia, momentos, etc. As quantidades e posições dos pontos de máxima e mínima curvatura, assim como os pontos de inflexão encontradas no contorno, podem ser utilizadas como descritores de forma. Um outro descritor interessante é a energia de dobramento (*bending energy*). Essa medida se baseia na teoria da elasticidade e quantifica a energia necessária para transformar um contorno fechado em uma circunferência de mesmo perímetro.

Sejam os sinais x(t) e y(t) a representação paramétrica do contorno fechado, podemos utilizá-los para estimar os valores de curvatura. Seja o contorno paramétrico representado por c(t) = (x(t),y(t)), a curvatura k(c) de c(t) (mostrada em valor absoluto na Figura 8) pode ser definida pela equação:

$$k(t) = \frac{x'(t)y''(t) - x''(t)y'(t)}{(x'(t)^2 + y''(t)^2)^{2/3}}$$
(12)

A primeira derivada dos sinais x(t) e y(t), x'(t) e y'(t), e a segunda derivada x''(t) e y''(t), respectivamente, podem ser facilmente calculadas utilizando as propriedades da transformada de Fourier (COSTA e CESAR JUNIOR,2009). Dada a natureza discreta dos sinais, a transformada deve ser calculada em termos do par formado pela transformada discreta de Fourier (DFT) e sua inversa.

$$F_{n} \equiv \sum_{k=0}^{N-1} f_{k} e^{-2\pi i n k/N}.$$
(13)
$$f_{k} = \frac{1}{N} \sum_{n=0}^{N-1} F_{n} e^{2\pi i k n/N}.$$
(14)





A versão rápida da transformada discreta de Fourier (FFT – Fast Fourier *Transform*) e de sua inversa (IFFT) podem ser encontradas em diversas bibliotecas matemáticas para as principais linguages de programação atuais, como Java, C++, Python e MATLAB®.

Convolvendo o sinal (t) do contorno com um banco de filtros gaussianos  $G_{\frac{1}{a}}(f)$ , indexado em função do parâmetro de escala  $\alpha$ , podemos gerar o *cuvergram*, um descritor multiescalar de curvatura. Neste trabalho empregamos o Algoritmo *Fourier-Based Curvature Estimation* (COSTA e CÉSAR JÚNIOR, 2009), aplicado para se estimar as curvaturas com base nas propriedades da transformada de Fourier. Diversas outras considerações e detalhes de implementação, como o efeito de encolhimento (*shrinking*), devem ser observados para a correta implementação desse algoritmo.





### 3.9 Matriz de coocorrência

Com a coloração dos objetos com o método Giemsa, podemos obter diversos descritores de textura. Esses descritores podem ser obtidos pelo cálculo de estatísticas no espaço de cores CIEL\*a\*b\*. Em diferentes intensidades de luz e cores das lâmpadas, a coloração Giemsa será percebida de maneiras distintas pela nossa visão (Figura 10). Não é suficiente, portanto, extrair descritores diretamente sobre os valores de intensidade de cinza dos campos. Podemos, entretanto, em conjunto com os descritores de cor, analisar as similaridades entre as mesmas coordenadas (i,j) das matrizes de coocorrência dos componentes de cor normalizados.

Figura 10 – Diferentes percepções de cores em diferentes fontes de luz. À esquerda, micrografia obtida com câmera afixada à ocular de microscópio com fundo de luz branca; à direita, micrografia

obtida com fundo de luz amarelada. Em diferentes cores de luz pode-se observar alguma diferença em relação à percepção das cores



A matriz de coocorrência de cores, CCM (*Colour Co-occurrence Matrix*) (*PALM,2004*), pode ser calculada pelo número de vezes em que os *pixels* localizados nas mesmas coordenadas de dois componentes de cor distintos aparecem juntos. Para dois componentes de cor de tamanhos m e n, pode-se calcular a CCM<sub>m,n</sub>(i,j) pela equação:

$$CCM_{m,n}(i,j) = \sum_{x} \sum_{y} \begin{cases} 1, \text{ se } m(x,y) = i e \\ 0, \text{ caso contrário} \end{cases}$$
(15)

Para o espaço de cores CIEL\*a\*b\* são calculados seis matrizes de coocorrência CCML\*,L\*, CCMa\*,a\*, CCMb\*,b\*, CCML\*,a\*, CCML\*,b e CCMa\*b\*. As matrizes de coocorrência são sensíveis à resolução espacial e devem, portanto, ser normalizadas antes que se possa usá-las para outros cálculos. Abaixo estão algumas medidas estatísticas extraídas da literatura (GUI,2013).

Entropia (ENT): a medida da quantidade de informação contida em uma textura. Reflete o grau de complexidade e desordem da textura. O grau de complexidade e o valor de entropia são diretamente proporcionais.

ENT =  $-\sum_{1=1}^{L} \sum_{j=1}^{L} p(i,j) log\{p(i,j)\}$  (16)

*Inverse Diference Moment* (IDM): a medida direta da homogeneidade local de uma imagem digital. Quanto maior seu valor, mais uniforme será a imagem correspondente e vice-versa.

$$IDM = \sum_{i=1}^{L} \sum_{j=1}^{L} \frac{p(i,j)}{1+|i-j^2|}$$
(17)

Angular Second Moment (ASM): reflete as irregularidades da textura, sendo a soma quadrática de cada elemento na matriz de coocorrência. Uma imagem com textura mais irregular apresentará maior energia, enquanto uma textura mais suave significará menor energia.

ASM = 
$$\sum_{i=1}^{L} \sum_{j=1}^{L} (p(i,j))^2$$
 (18)

Constraste (CON): está relacionado à definição da imagem e o grau de profundidade dos sulcos da textura. Quanto mais profundo o sulco, maior o contraste apresentado na imagem e melhor a sua acuidade visual. Em oposição, nos sulcos mais rasos será percebido pouco contraste.

$$CON = \sum_{k=0}^{L-1} k^2 \left\{ \sum_{|i-j|=k} p(i,j) \right\} (19)$$

Correlação (COR): medida do grau de similaridade dos elementos da matriz de coocorrência na direção da linha ou da coluna. Reflete a correlação da textura local de uma imagem. Quanto maior o valor de correlação, mais semelhante e uniforme será a textura. Ao contrário, quando os elementos da matriz têm grande variação, seu valor será menor.

$$COR = \frac{\sum_{1=1}^{L} \sum_{j=1}^{L} (ij)p(i,j) - \mu_{x}\mu_{y}}{\sigma_{x}}, (20)$$

onde  $\mu_x$ ,  $\mu_y$ ,  $\sigma_x$ ,  $\sigma_y$ , são as médias e desvios de  $p_x$  e  $p_y$ , respectivamente.  $p_x(i)$  é a iésima entrada na matriz de probabilidade marginal obtida pela soma das colunas de p(i,j). Da forma análoga podemos obter  $p_y(j)$ .

### 3.10 Momentos invariantes de Hu

A técnica de momentos é uma das muitas utilizadas para extração de características de uma imagem. Os momentos e as funções derivadas destes caracterizam-se por valores calculados a partir da imagem segmentada e descrevem a distribuição espacial dos pontos contidos na região segmentada. Os momentos regulares são definidos pela seguinte fórmula:

$$m_{pq} = \sum_{1}^{nx} \sum_{1}^{ny} x^{p} y^{q} f(x, y)$$

Nessa fórmula  $m_{pq}$  é o momento de ordem (p+q) da função intensidade f(x,y) onde nx e ny representam respectivamente a largura e a altura da imagem digital. Uma imagem binária terá valores da função f(x,y) iguais a 0 ou 1. A partir dos momentos regulares podemos definir algumas medidas importantes sobre os objetos de interesse, e que são úteis na identificação de diferentes formas, por exemplo, os momentos regulares de ordem 0 e 1 são usados para o cálculo do baricentro ou centro de massa do objeto, através das seguintes fórmulas:

$$x_c = \frac{m_{10}}{m_{00}}; y_c = \frac{m_{01}}{m_{00}}$$

Com a informação obtida dos baricentros obtemos o que chamamos de momentos centrais que são definidos para imagens digitais pela fórmula:

$$u_{pq} = \sum_{1}^{nx} \sum_{1}^{ny} (x - x_c)^p (y - y_c)^q f(x, y)$$

Finalmente existem os momentos centrais normalizados representados por n<sub>pq</sub> e definidos pela seguinte fórmula:

$$n_{pq} = \frac{u_{pq}}{m_{00}^{\frac{(p+q)}{2}+1}}$$

Publicados pela primeira vez em 1962 (HU, 1962), momentos invariantes foram aplicados em diversos trabalhos de reconhecimento de padrões em imagens devido às suas propriedades invariantes em relação à escala, rotação e translação de imagens (HUANG, LENG, 2010). Estes momentos são representados por sete equações chamadas momentos Hu ou momentos invariantes, sendo estas:

$$\begin{split} &I_1 = n_{20} + n_{02} \\ &I_2 = (n_{20} - n_{02})^2 + (2n_{11})^2 \\ &I_3 = (n_{30} - 3n_{12})^2 + (3n_{21} - n_{03})^2 \\ &I_4 = (n_{30} + n_{12})^2 + (n_{21} + n_{03})^2 \\ &I_5 = (n_{30} - 3n_{12})(n_{30} + n_{12})[(n_{30} + n_{12})^2 - 3(n_{21} + n_{03})^2] \\ &+ (3n_{21} - n_{03})(n_{21} + n_{03})[3(n_{30} + n_{12})^2 - (n_{21} + n_{03})^2] \\ &I_6 = (n_{20} - n_{02})[(n_{30} + n_{12})^2 - (n_{21} + n_{03})^2] + 4n_{11}(n_{30} + n_{12})(n_{21} + n_{03}) \\ &I_7 = (3n_{21} - n_{03})(n_{30} + n_{12})[(n_{30} + n_{12})^2 - 3(n_{21} + n_{03})^2] \\ &+ (n_{30} - 3n_{12})(n_{21} + n_{03})[3(n_{30} + n_{12})^2 - (n_{21} + n_{03})^2] \end{split}$$

# 3.11 Espaço de atributos

A classificação é sempre realizada em respeito aos descritores dos objetos de interesse. Neste trabalho foram utilizados os seguintes conjuntos de descritores para as estruturas cinetoplasto e núcleo presentes no parasito:

Descritores geométricos:

- Eixo maior
- Eixo menor
- Área
- Perímetro
- Circularidade
- Razão de espessura
- Razão de aspecto
- Distância máxima do centroide para o contorno
- Distância mínima do centroide para o contorno
- Distância média do centroide para o contorno
- Razão entre perímetro e eixo maior
- Simetria bilateral

Momentos Invariantes de Hu:

1° ao 7°

Descritores de cor

- Média
- Mediana
- Moda
- Amplitude
- Variância

Descritores da curvatura

- Entropia
- Energia de dobramento
- Desvio padrão
- Variância

Descritores de textura

- Entropia
- Angular Second Moment
- Constraste
- Inverse Differencial Moment
- Correlação

Os descritores de textura são obtidos para as combinações (L\*L\*), (a\*a\*), (b\*b\*), (L\*a\*), (L\*b\*), (a\*b\*), exceto para as medidas de IDM que não são calculadas para os três primeiros pares. O conjunto de descritores utilizados forma um espaço 48-dimensional.

# 3.12 Classificação

Em reconhecimento de padrões, as duas principais aproximações para classificação automatizada são a supervisionada e a não-supervisionada (WU *et al.*,2009). A primeira se distingue da segunda por se valer de dados de amostras das classes obtidos previamente. Neste trabalho abordamos o problema de classificação com o conjunto de métodos de aprendizado supervisionado SVM (*Support Vector Machines*).

Escolhemos o SVM pelo fato deste apresentar boa performance na generalização de pequenos conjuntos de dados. O SVM vem sendo amplamente utilizado em diversos problemas de classificação, apresentando resultados consideráveis. (LI,2018), (CHEN,2018), (LIN,2018).

No SVM cada item é representado por um ponto num espaço n-dimensional, onde n é o número de descritores e seus valores são as coordenadas do ponto, inclusive sua classe. O classificador busca o hiperplano ótimo que separará os pontos pertencentes a classes distintas. Nos classificadores SVM é utilizada uma função *kernel* para representar a multiplicação escalar dos pontos mapeada em um espaço de atributos de maior dimensão. É importante frisar que os dados obtidos para os descritores, por apresentarem diferentes ordens de magnitude, devem ser estandardizados anteriormente à aplicação do classificador.

O método SVM apresenta como principal desvantagem a incapacidade de extrapolar classes desconhecidas. Dado um ponto o espaço de descritores, este será identificado como pertencente ou à classe A, ou à B, mesmo estando muito distante dos pontos incluídos nestas classes. A abordagem para esse caso é utilizar amostras de objetos não pertencentes às classes de interesse agrupados sob uma mesma classe, ou em diversos agrupamentos utilizando a técnica de k-vizinhos. Neste estudo definimos as classes dos objetos de interesse e agrupamos os demais sob um mesmo rótulo de 'Desconhecido' para a aplicação do SVM.

Em AMANCIO et al. (2014) é realizado um estudo comparativo de diferentes classificadores disponíveis no software WEKA (FRANK, 2016), onde é demonstrada a pouca acurácia dos classificadores para os valores definidos por falta. Neste trabalho utilizamos o WEKA para realizar a modelagem com SVM.

O kernel RBF (*Radial Basis Function*), definido por exp(-gamma\*|u-v|<sup>2</sup>) mapeia os descritores em espaços de dimensões mais elevadas e pode ser utilizado nos casos em que a relação entre as classes não é linear, sendo no geral uma boa primeira opção (HSU, 2003). Além disso, o *kernel* linear é um caso especial do *kernel* RBF (KEERTHI, LIN, 2003) e o *kernel* sigmóide se comporta como o RBF para certos parâmetros (LIN, LIN, 2003).

Há dois parâmetros para se definir para o *kernel* RBF: C e γ. Não é possível saber de antemão quais valores C e γ utilizar para um dado problema. Como o objetivo de encontrar os melhores valores para esses parâmetros, aplicamos a técnica de *grid search* com o parâmetro C variando no intervalo [2<sup>-5</sup>, 2<sup>-4</sup>, ..., 2<sup>15</sup>] e o parâmetro γ variando dentro do intervalo [2<sup>-15</sup>, 2<sup>-14</sup>, ..., 2<sup>3</sup>] (HSU, 2003).

A busca foi realizada com método denominado k-fold consiste em dividir o conjunto de treinamento em k subconjuntos mutuamente exclusivos de mesmo tamanho  $\frac{n}{k}$ , onde n é o tamanho do conjunto original. Um subconjunto é utilizado para testes e os demais k-1 subconjuntos são utilizados para estimação dos parâmetros e cálculo da acurácia do modelo. O processo é repetido k vezes alternando os subconjuntos de teste em uma fila circular (KOHAVI,1995). Dado o reduzido número de amostras obtidas para este trabalho, utilizamos 5-fold para no processo de treinamento. Após encontrar os melhores parâmetros para o modelo é realizada a validação utilizando-se o conjunto de testes. O pipeline da extração dos descritores da imagem até o estágio de validação é apresentado na Figura 11.





# 3.13 Redução de dimensionalidade

#### 3.13.1 PCA

A redução do número de descritores tem um papel importante quando trabalhamos com grandes conjuntos de dados. A redução pode de fato aumentar a velocidade de execução do treinamento do algoritmo classificador, evitar o sobreajuste (*overfitting*) do modelo ao conjunto de treinamento e também levar a melhores resultados de classificação graças à redução de ruído no conjunto de dados (VAN DER MAATEN, 2009).

A Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis* – PCA) (PEARSON,1901) é uma das ferramentas mais fundamentais na redução de dimensionalidade para extração efetiva de descritores em conjuntos de dados de grandes dimensões (HYVÄRINEN, 1999) (JOLIFFE, 2006). Dado um conjunto de dados, aplica-se o seguinte algoritmo (GEORGE, 2012):

- Dados os valores obtidos para os descritores em colunas, onde cada coluna representa uma dimensão dos dados de entrada.
- Calcula-se a média de cada dimensão e subtrai-se dos valores das respectivas colunas.
- Calcula-se a matriz de covariância C da matriz dos dados de entrada.
- Calcula-se os autovalores e autovetores correspondentes para a matriz de covariância. Os componentes principais são calculados resolvendo-se o problema de encontrar os autovalores da matriz de covariância C.
- Para encontrar os componentes principais, escolha os autovetores correspondentes aos K maiores autovalores, onde K << N e N é o número de dimensões dos dados de entrada.

O passo de redução de dimensionalidade mantém apenas os termos correspondentes aos K maiores autovalores. Desse modo, obtém-se um novo vetor de descritores que consiste em autovetores dos componentes principais. O conjunto de dados final é obtido pela multiplicação da matriz transposta de autovetores com a matriz dos dados de entrada centralizados pela média.

# 3.13.2 Correlation-based feature selection

CFS (HALL, 1998) é um algoritmo que classifica subgrupos de descritores em uma ordem hierárquica baseando-se em uma função heurística de avaliação. O algoritmo avalia o valor de mérito dos subconjuntos de descritores baseando-se em sua capacidade preditiva aliada ao grau de redundância entre eles. Subgrupos de descritores que estão altamente correlacionados a uma classe enquanto apresentam baixa intercorrelação são preferíveis. A função de avaliação é dada pela equação:

$$M_S = \frac{k\overline{r_{cf}}}{\sqrt{k + k(k-1)\overline{r_{ff}}}}$$

Onde, M<sub>s</sub> representa o mérito heurístico de um subconjunto S contendo k descritores, T<sub>cf</sub> é a média da correlação entre descritores e classes e T<sub>ff</sub> é a média da intercorrelação dos descritores com outros descritores. Os descritores são escolhidos com base em um valor de corte para o valor de mérito obtido pela aplicação do CFS.

# 4 RESULTADOS

### 4.1 Segmentação e classes

Para este trabalho obtivemos um total de 702 micrografias de campos de microscopia. Desse total, 630 foram utilizadas para o processo de treinamento e 72 para a validação do modelo treinado.

Com os resultados obtidos com a limiarização foram definidas 6 classes de objetos, a saber:

- 1. Cinetoplasto
- 2. Cinetoplasto com corpo celular
- 3. Núcleo
- 4. Núcleo com corpo celular
- 5. T. cruzi
- 6. Desconhecido

Na Figura 12 são apresentadas as classes definidas de acordo com as características da segmentação obtida. As classes Cinetoplasto e Núcleo apresentam como característica o fato de apenas as respectivas estruturas estarem segmentadas. Para essas duas classes, apenas a estrutura destacada pela aplicação da técnica Giemsa pode ser observada no objeto segmentado. Cinetoplasto com corpo celular e Núcleo com corpo celular são classes que apresentam áreas segmentadas que extrapolam a coloração Giemsa para as respectivas estruturas. A classe *T. cruzi* foi utilizada para indicar os objetos que contém ambas as estruturas, cinetoplasto e núcleo, em uma única área dada pela segmentação da imagem. Qualquer outro objeto segmentado que não faça parte das classes descritas nesse parágrafo foi identificado pela classe Desconhecido. Essa última classe tem a função de auxiliar na definição do hiperplano que separa as classes de interesse de outros objetos que podem ser encontrados no campo. Amostras aleatórias de objetos da classe Desconhecido foram

utilizados na definição do modelo do classificador. Na Tabela 2 apresentamos as quantidades de objetos por classe para os conjuntos de treinamento de validação.

**Figura 12 - Exemplos de objetos destacados e suas respectivas classes**. À esquerda, recorte de campo de microscopia contendo parasito *T. cruzi*. À direita, objetos segmentados com destaque em amarelo ou vermelho para as classes de interesse.



Tabela 2 - Número de objetos por classes utilizados nos conjuntos de treinamento e validação.

Classe	Treinamento	Validação
Cinetoplasto	1905	374
Cinetoplasto com corpo celular	284	60
Núcleo	1427	306
Núcleo com corpo celular	645	109
T. cruzi	111	23
Desconhecido	1000	834

### 4.2 Redução de dimensionalidade

Com a aplicação da Análise de Componentes Principais, o conjunto de dados teve o número de dimensões reduzido de 49 para 12. A aplicação do algoritmo CSF reduziu o número de descritores para 20. Os descritores selecionados por CSF foram: entropia(a\*,a\*), contraste(L\*,b\*), eixo maior, área, perímetro, circularidade, razão de aspecto, razão entre eixo maior e perímetro, distâncias máxima, mínima e média entre perímetro e centroide, simetria bilateral, cor média, amplitude de cor, 1º, 2º, 3º, 4º, 6º e 7º momentos invariantes de Hu.

O ganho em performance é notável na aplicação de *grid search* para a busca do melhor conjunto de parâmetros apresentada a seguir. O conjunto de dados original com 49 dimensões levou 63 horas para terminar a execução do *grid search*. Com os 20 descritores selecionados por CSF, o tempo caiu para 5 horas e 25 minutos, enquanto no conjunto no qual foi aplicado PCA o tempo foi de 40 minutos. Esses tempos foram registrados em um computador de mesa com configurações modestas, mas servem para demonstrar que há ganho de performance real ao se trabalhar os dados com dimensionalidade reduzida.

### 4.3 Classificação

O resultado da busca pelo melhor conjunto de parâmetros por *grid search* é apresentado na Tabela 3. Podemos observar que no conjunto de treinamento sem redução de dimensionalidade foram obtidos os melhores resultados de classificação.

A validação do modelo é feita sobre o conjunto de dados de teste, os resultados são apresentados na Tabela 4. O modelo treinado sobre os dados sem redução de dimensionalidade e com aplicação do PCA apresentam sinais de que foram sobreajustados, os resultados demonstram que o modelo não conseguiu generalizar para além do conjunto de treinamento. O modelo treinado no conjunto de dados com dimensionalidade reduzida pela aplicação do algoritmo CFS apresentou resultados melhores que os da etapa de treinamento.

Tabela 3 - Média dos resultados obtidos após aplicação do método *grid search* com 5-fold no conjunto de dados de treinamento

Redução de	С	Y	Precisão	Sensibilidade	F-score	ROC
dimensionalidade						

(número de dimensões)						
,						
Nenhuma (49)	4	0.25	0.94	0.94	0.939	0.963
CFS (20)	64	0.03125	0.886	0.888	0.885	0.927
PCA (12)	4	0.25	0.929	0.929	0.928	0.957

Tabela 4 - Resultados da classificação sobre o conjunto de validação

Redução de dimensionalidade (número de dimensões)	С	Ŷ	Precisão	Sensibilidade	F-score	ROC
Nenhuma (49)	4	0.25	0.17	0.249	0.146	0.523
CFS (20)	64	0.03125	0.905	0.896	0.898	0.939
PCA (12)	4	0.25	0.660	0.264	0.173	0.535

A matriz de confusão obtida para o modelo com redução por CSF é apresentada na Tabela 5. A divisão das classes cinetoplasto e núcleo com e sem corpo celular pode ser ignorada na aplicação prática. Afinal, é indiferente saber se o cinetoplasto e o núcleo foram segmentados em conjunto ao corpo celular. Dado que se encontre um cinetoplasto e um núcleo numa mesma vizinhança da imagem podemos inferir que nessa região se encontra um parasito. A matriz de confusão desconsiderando o corpo celular é apresentada na Tabela 6.

Cinetoplasto	Cinetoplasto com corpo	Núcleo	Núcleo com corpo	T. cruzi	Desconhecido	
32	7	6	15	0	0	Cinetoplasto com corpo
1	358	0	15	0	0	Cinetoplasto
0	1	85	21	2	0	Núcleo com corpo
3	14	40	249	0	0	Núcleo
0	0	3	0	20	0	T. cruzi

Tabela 5 - Matriz de confusão do resultado da classificação do conjunto de dados de validação.

4	22	12	11	0	785	Desconhecido
---	----	----	----	---	-----	--------------

Cinetoplasto	Núcleo	T. cruzi	Desconhecido	
398	36	0	0	Cinetoplasto
18	395	2	0	Núcleo
0	3	20	0	T. cruzi
26	33	0	785	Desconhecido

Tabela 6 - Matriz de confusão da aplicação na aplicação desenvolvida para o método proposto.

Dessa forma, os valores percentuais médios de precisão, sensibilidade, especificidade e área ROC do nosso método, na prova de conceito desenvolvida, são de 91,4%, 91,7%, 97,9% e 94,5% respectivamente.

Nas Figuras 13, 14, e 15 apresentamos amostras dos resultados da aplicação desenvolvida como prova de conceito. Os objetos encontrados foram rotulados como: núcleo (N), cinetoplasto (K), núcleo com corpo (NB), cinetoplasto com corpo (KB) e *T. cruzi* (T). Os rótulos são indicados pelas letras em verde na imagem. Estas figuras foram escolhidas por apresentar os dois problemas que a aplicação encontra na tarefa de reconhecimento. O primeiro é a incidência de falsos positivos em grandes áreas cobertas pela coloração com Giemsa. Estas áreas são, em geral, leucócitos. O segundo problema, de falsos negativos, ocorre em sua maioria em áreas da imagem que ficaram fora de foco. O foco, muitas vezes, fica prejudicado nas proximidades das extremidades do campo microscópico.

Figura 13 – Resultados falsos positivos e positivo verdadeiro. As letras verdes indicam a classe do objeto encontrado. Resultados falsos negativos para um cinetoplasto (K) e dois núcleos (N) no canto superior esquerdo. À direita, resultado positivo verdadeiro para cinetoplasto e núcleo.



**Figura 14 - Resultados positivos verdadeiros.** Foram corretamente localizados cinetoplasto (K), núcleo com corpo (KB) e *T. cruzi* (T).



**Figura 15 – Resultados falsos negativos.** Exemplos de resultados falsos negativos localizados ao centro e acima na imagem, e falso positivo abaixo.



# 5 DISCUSSÃO

Segundo POOSTCHI (2018), o desenvolvimento de sistemas de análise de imagens e métodos de aprendizado de máquina podem melhorar o processo de diagnóstico de doenças como a malária. A popularidade do protozoário causador da malária como objeto de estudo é notável. Atualmente, podemos encontrar conjuntos de imagens anotadas de células infectadas com malária em sites especializados como o Kaggle (kaggle.com<sup>3</sup>). Numerosos também são os trabalhos no reconhecimento de outras estruturas microscópicas, entre elas células sanguíneas (ACEVEDO, 2019), células nervosas (CESAR JR, COSTA, 1998) e outras. Estes estudos são importantes, principalmente, para que possamos aumentar a qualidade do diagnóstico e diminuir o tempo para a realização destes. A maior dificuldade ao realizar este tipo de estudo se dá pela obtenção e anotação das imagens. Atualmente, as técnicas mais utilizadas na tarefa de reconhecimento de imagens se valem da utilização de deep learning (SHMIDHUBER, 2015). Porém, para se construir um modelo eficaz com a utilização dessas técnicas, são necessários enormes conjuntos de dados, onde a performance do modelo aumenta em proporção logarítmica ao volume de imagens (SUN, 2017). Obter e anotar essa quantidade de amostras é a principal barreira para se aplicar essas técnicas em uma doença negligenciada como a Doença de Chagas.

Há uma grande variedade de estudos disponíveis sobre o reconhecimento de objetos em campos de micrografia com a utilização de câmeras específicas para o trabalho. Os resultados destes trabalhos demostram que é possível utilizar imagens com baixa densidade de pontos por polegada na tarefa de reconhecimentos de formas microscópicas, porém ainda são necessárias algumas melhorias para que se consiga atingir 100% de precisão.

Para validar os resultados do método proposto, comparamos nossos resultados com os de outros trabalhos de análise de micrografias de lâminas coradas. Para realizar a comparação utilizamos quatro estudos. Três desses trabalhos abrangem o reconhecimento de protozoários do gênero *Plasmodium*, por ser o objeto presente no maior número de estudos. O primeiro, de ROSADO *et al.* (2016), foi escolhido por utilizar imagens de *smartphones*. O segundo trabalho, de Oliveira (2014), utiliza o

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Visitado em 30/09/2019.

conjunto de técnicas para reconhecimento facial proposto por Viola e Jones (2004) e imagens capturadas com dispositivos móveis.

O terceiro trabalho foi escolhido por também se tratar do reconhecimento de parasitos *T. cruzi* na forma tripomastigota (UC-CETINA *et al*, 2015). Este último também utiliza as técnicas de imagem integral de Viola e Jones a combinação de AdaBoost e SVM na etapa de classificação. O quarto trabalho, de SAVKARE e NAROTE (2012), apresentou bons resultados obtidos com a utilização de câmera especializada para microscopia

Para fins de comparação, dado nosso reduzido número de amostras, optamos por não utilizar trabalhos onde foram aplicadas as técnicas de *deep learning*. Os resultados dos estudos são apresentados na Tabela 7. Nessa tabela apresentamos os resultados ordenados por sensibilidade e agrupados pelo tipo de dispositivo de captura utilizado.

Trabalho	Parasito	Método	Dispositivo de captura de imagem	Sensibilidade	Especificidade
Nosso método	T. cruzi	SVM	Smartphone	91,4%	97,9%
ROSADO et al., 2016	P. falciparum	SVM	Smartphone	80,5%	93,8%
OLIVEIRA, 2014	P. falciparum	Adaboost	Smartphone	59%	95%
UC-CETINA et al., 2015	T. cruzi	AdaBoost + SVM	Câmera acoplada	100%	93,25%
SAVKARE E NAROTE, 2012	Plasmodium spp.	SVM	Câmera acoplada	96,26%	99,09%

Tabela 7- Comparação dos resultados de nosso método com outros trabalhos.

Obtivemos uma taxa de sensibilidade maior do que os outros dois trabalhos com parasitos do gênero *Plasmodium* nos quais também foram utilizadas câmeras de dispositivos móveis. Apesar de nosso trabalho apresentar uma alta especificidade, a sensibilidade do método ficou aquém do trabalho desenvolvido por UC-CETINA *et al* (2015) com o uso de câmera acoplada ao microscópio.

Como pode ser observado na Tabela 7, a utilização de câmeras de dispositivos móveis diminui a especificidade dos resultados de predição. A baixa definição afeta principalmente a localização dos contornos dos objetos. Em imagens com maior

densidade de pontos por polegada a nitidez é maior. Os diferentes objetos da imagem podem ser visualmente distinguidos com maior facilidade. A baixa resolução afeta os resultados ainda mais em imagens de campos com pouca ou nenhuma separação entre as células sanguíneas. Dessa forma, a qualidade do esfregaço afeta diretamente os resultados do classificador. Em regiões com alta aglomeração de células vermelhas há uma maior taxa de falsos positivos.

As técnicas de aprendizado de máquina já utilizadas na automatização de leitura de lâminas vão de árvores de decisão, AdaBoost, SVM até às técnicas de *deep learning* (YANG *et al*,2019). No trabalho de YANG *et al* (2019) são enumeradas vinte e nove metodologias de classificação utilizadas para ou identificação de parasitos, ou discriminação de células infectadas e não infectadas, em lâminas de esfregaço sanguíneo. Ainda segundo os autores, a comparação da performance dos diversos trabalhos se torna complicada. Não há um conjunto de imagens para que se use de base de avaliação dos resultados. Os conjuntos utilizados têm proveniências distintas e os parâmetros de captura das imagens variam entre os diversos trabalhos.

O número de amostras é outro fator de grande influência nos resultados. No trabalho de BEVILACQUA (2012) é realizada a comparação da performance de sete classificadores quanto ao número de amostras e ao número de descritores discretos e contínuos. Os conjuntos de dados utilizados são compostos 200, 500, 1000, 3000 e 5000 objetos. Os resultados do trabalho mostram que os conjuntos de 3000 e 5000 objetos são os que apresentam a melhor performance para os classificadores SVM e k-NN. Deste modo, acreditamos que os resultados de nosso trabalho podem ser melhorados com a obtenção de maior número de amostras por classe.

Outras possíveis aplicações do método proposto são a automatização da análise de outros tripanossomatídeos, como os do gênero *Leishmania*. Além da identificação da presença de parasitos, seria interessante classifica-los em relação à cepa. Além disso, com o estudo dos descritores apropriados, seria possível abranger as distintas formas morfológicas. Como trabalhos futuros propomos o estudo da aplicação de técnicas de *deep learning*, dando continuidade ao trabalho com tripanossomatídeos. Já foi demonstrado um aumento significativo de performance para a análise de *Plasmodium* (YANG,2019) em relação aos métodos clássicos, como o SVM. Seria

também de grande interesse analisar propostas de automação para captura de micrografias com dispositivos móveis. Assim, seria possível gerar conjuntos de dados maiores com ganho de tempo e redução de custos para os mais diversos tipos de análise de micrografias.

# 6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, apresentamos um conjunto de métodos utilizados na tarefa de reconhecimento automatizado de parasitos *T. cruzi* na forma tripomastigota em campos de microscopia. Nossos experimentos mostraram que o conjunto de técnicas de processamento, descritores e classificadores utilizados são capazes de reconhecer os parasitos nas imagens com 91,4% e 91,7% de precisão e sensibilidade, respectivamente.

Nosso método apresentou melhores resultados de sensibilidade e especificidade comparados aos de análise de imagens de protozoários do gênero *Plasmodium* com a utilização de *smartphones*, o parasito mais estudado por técnicas de reconhecimento de imagens microscópicas. Porém, está aquém da precisão atingida no reconhecimento de tripomastigotos de *T. cruzi* no qual se utiliza câmeras especializadas acopladas ao microscópio.

Os resultados obtidos apresentam 30% de aumento de sensibilidade quando comparado aos resultados esperados da análise manual de lâminas coradas com Giemsa. Comparados à sensibilidade entre 80 e 90% esperada do método Pizzi-Brener, o padrão ouro para a parasitemia de *T. cruzi* na forma tripomastigota, nossos resultados demonstram que o método proposto é uma alternativa viável.

# Referências

ACEVEDO, A. *et al*, Recognition of peripheral blood cell images using convolutional neural networks. Computational Methods Programs Biomed, v. 180, 2019.

ALMEIDA, B. R., SANTILIANO, F. C. Levantamento dos métodos de diagnóstico para a Doença de Chagas. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, 2012, vol. 8, p. 1586-1603.

AMANCIO, D. R. et al A Systematic Comparison of Supervised Classifiers. PLOS ONE. 2014, v. 9.

ANDRADE, I. M. Avaliação in vivo das atividades anti-*Trypanosoma de derivados nitorimidazólicos,.* Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2011

ATTNEAVE, F. Some informational aspects of visual perception. Psychological Review, 1954, v. 61(3), p. 183-193

BARONI, Maurizio, BARLETTA, Giuseppe, *Digital curvature estimation for left ventricular shape analysis,* Image and Vision Computing, 1992, v. 10(7), p. 485-494.

BEVILACQUA, Vitoantonio et al. Comparison of data-merging methods with SVM attribute selection and classification in breast cancer gene expression. In BMC Bioinformatics BioMed Central, 2012, p. 1-15.

BHARGAVI, K.; JYOTHI, S. *A survey on threshold based segmentation technique in image processing*. International Journal of Innovative Research and Development, , 2014, v. 3.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infrected with Trypanosoma cruzi. Rev. Inst. Med. Trop, São Paulo, 1962 v. 4, p 389-396.

BRENER, Z. CHIARI, E. - Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de Trypanosoma cruzi. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, 1963, v. 5, p. 220-224.

CASTAÑÓN, César Armando Beltrán, Análise e reconhecimento digital de formas biológicas para o diagnóstico automático de parasitas do gênero *Eimeria*, Tese (Doutorado em Bioinformática) – Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006. CASTLEMAN, K. R. Digital Image Processing, Prentice Hall, Englewood Cliffs, 1996.

CASTRO, M. F. de. Avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* in vitro e in vivo de derivados de vitamina K. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, 2012.

CESAR JR, Roberto Marcondes, COSTA, Luciano da Fountoura, *Neural cell classification by Waveletes and multiscale curvature*, Biol. Cyber, 1998, v. 79, p. 347-360.

CHAGAS, C. Nova Tripanosomiaze Humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp. ajente etiológico de uma nova entidade mórbida do homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1, 159-2018.

CHAGAS, C. Revisão do cyclo evolutivo do *Trypanosoma Cruzi*. Brazil-Médico, 1913, v. 27.

CHEN, Yanxiang Chen, et al, *Accurate seat belt detection in road surveillance images based on CNN and SVM,* Neurocomputing, 2018, v.274, p. 80-87,

COSTA, Luciano da Fountoura e CESAR JUNIOR, Roberto Marcondes, *Shape Classification and Analysis: Theory and Practice* (2nd ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, USA, 2009.

COSTA, Ana Maria N., Impactos psicológicos do uso de celulares: uma pesquisa exploratória com jovens brasileiros. Psicologia: Teoria e Pesquisa, 2004, v. 20, p.165-174.

DEFENDI, G. L. *Trypanosomiasis Workup.* Drugs and Diseases, Medscape, 2016 [acesso 9 jan 2019]. Disponível em <u>https://emedicine.medscape.com/article/1000389-workup</u>.

DIAS, J. C. P. et al *Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015.* Il Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília, 2015, v. 25.

DUDEK, Gregory, TSOTSOS, John K., *Shape Representation and Recognition from Multiscale Curvature*, Computer Vision and Image Understanding, 1997, v. 68(2), p. 170-189. FRANK, Mark A. Hall, and WITTEN, Ian H. *Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques*, Morgan Kaufmann, Fourth Edition, 2016.

GEORGE, A. Anomaly Detection based on Machine Learning: Dimensionality Reduction using PCA and Classification using SVM, International Journal of Computer Applications, 2012, v. 47, n. 21, 2012

GUI, W. et al, Color co-occurrence matrix based froth image texture extraction for mineral flotation, Minerals Engineering, 2013, v. 46, p. 60-67.

GONZALES, R C. Digital Image Processing, Pearson Education, 2009.

HSU, Chih-Wei et al. *A practical guide to support vector classification*, 2003 [acesso 1 jun 2019]. Disponível em <u>https://www.csie.ntu.edu.tw/~cjlin/papers/guide/guide.pdf</u>

HU, Ming-Kuei, *Visual pattern recognition by moment invariants*. Information Theory, IRE Transactions, 1962, v. 8, p. 179-187.

HUANG, Z. and LENG, J. *Analysis of Hu's moment invariants on image scaling and rotation*. 2<sup>nd</sup> International Conference on Computer Engineering and Technology, Chengdu, 2010, v. 7, p. 476-480.

HUBEL, David H.; WIESEL, Torsten N. *Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex*. The Journal of Physiology, 1962, v. 160, p. 106-154.

HYVÄRINEN, A. Survey on independent component analysis. Neural Computing Surveys, 1999, v. 2, p. 94–128.

International Electrotechnical Conmision, IEC 61966-1-1:1999 Multimedia systems and equipment - Colour measurement and management - Part 2-1: Colour management - Default RGB colour space – sRGB, International Standard, 1999.

JOLIFFE, I. *Principal Component Analysis*. Springer Science & Business Media, Nova lorque, 2006.

ARAÚJO-JORGE, T. C. A., e CASTRO, S. L. Doença de chagas: manual para experimentação animal. Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2000.

KOHAVI, R. *A study of cross-validation and bootstrap for accuracy estimation and model selection*. In: International joint Conference on artificial intelligence. [S.I.: s.n.], 1995. v. 14, p. 1137–1145.

KROPF, Simone Petraglia; SA, Magali Romero. *The discovery of Trypanosoma cruzi and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil.* Hist. cienc. saude-Manguinhos, Rio de Janeiro , 2009, v. 16(1), p. 13-34.

LI, Q. Li and X. Wang, "Image Classification Based on SIFT and SVM," in IEEE/ACIS 17th International Conference on Computer and Information Science (ICIS), Singapura, 2018, p. 762-765.

LIN, Dongyun Lin, *Biomedical image classification based on a cascade of an SVM with a reject option and subspace analysis.* Computers in Biology and Medicine, 2018, v. 96, p. 128-140.

MOKHTARIAN, Farzin, MACKWORTH, A. K., "A theory of multiscale, curvature-based shape representation for planar curves" in IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 1992, v. 14, p. 789-805.

MOON, S. et al An image-based algorithm for precise and accurate high throughput assessment of drug activity against the human parasite Trypanosoma cruzi, PLOS ONE, 2014, v. 9(2).

OLIVEIRA, A. D. et al Malaria system: a new tool for automatic diagnosis of malária in mobile devices, 7th World Congress Medicine 2.0, 2014.

OMS – Organização Mundial da Saúde. *Chagas disease (American trypanosomiasis),* [acesso em 5 jun 2020]. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/chagasdisease

PAI, Yu-Ting et al. Adaptive thresholding algorithm: Efficient computation technique based on intelligent block detection for degraded document images, Pattern Recognition, 2010, v. 43(9), p. 3177-3187.

PALM, C. Color texture classification by integrative co-ocurrence matrices. Pattern Recognition, 2004, v. 35, p. 965-976.

PEARSON, K. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. The London, Edinburgh and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science, Sixth Series, 1901, v. 2, p. 559–572.

PINTO, Pedro Luiz Silva *et al. Life cycle of Trypanosoma cruzi (y strain) in mice*. Rev. Hosp. Clin., São Paulo, 1999, v. 54, p. 141-146.

POOSTCHI, M. *et al. Image analysis and machine learning for detecting malaria*, Translational Research, 2018, v. 194, p. 36-55.

RANZATO, M. et al. Automatic recognition of biological particles in microscopic images, Pattern Recognition Letters, 2007, v. 28(1), p. 31-39.

ROSADO, L. *et al.* Automated detection of malária parasites on thick blood smears via mobile devices. Proc Comput Sci, 2016, v. 90, p. 138-144.

ROSSI, L. R. L. Estudo biométrico de formas epimastigotas e tripomastigotas de quatro cepas de *Trypanosoma cruzi*, Chagas 1909 (*Kinetoplastidae*, *Trypanosomatidae*). Dissertação (Mestrado em Ciência) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Araraquara, 2007.

SAVKARE, S.S. NAROTE, S.P. Automatic System for Classification of Erythrocytes Infected with Malaria and Identification of Parasite's Life Stage. Procedia Technology, 2012, v. 6, p. 405-410.

SOUZA, Wanderley de. *Structural organization of Trypanosoma cruzi.* Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro , 2009, v. 104(1), p. 89-100.

SCHANDA, J. Colorimetry: Understanding the CIE System. John Wiley & Sons, 2007.

SCHIMDHUBER, J Deep Learning in Neural Networks: An Overview. Neural Networks, 2015, v. 61, p. 85-117.

SHOTTON, J. et al., Real-time human pose recognition in parts from single depth images. CVPR 2011, Colorado Springs, CO, USA, 2011, p. 1297-1304.

SUN, Chen *et al. Revisiting unreasonable effectiveness on data in deep learning era.* The IEEE International on Computer Vision (ICCV), 2017, p. 843-852. UC-CETINA, V. et al. Chagas Parasites detection trhough Gaussian Discriminant Analysis, Abstraction & Application, 2013, v. 8, p. 6-17.

UC-CETINA, V. *et al. Chagas Parasite Detection in Blood Images Using Adaboost.* Computational and Mathematical Methods in Medicine, 2015, v. 2015.

VALLADA, E. P. Manual de Técnicas Hematológicas. Atheneu, São Paulo, 1999.

VAN DER MAATEN, Laurens; POSTMA, Eric; VAN DEN HERIK, Jaap. *Dimensionality reduction: a comparative.* J Mach Learn Res, 2009, v. 10, p. 66-71.

VIOLA, P. JONES, M. J. *Robust real-time face detection.* Int. J. Comput. Vision, 2004, v. 57, p. 137-154.

WU, Q. et al. Microscope Image Processing 1st ed. Academic Press, Orlando, FL, USA, 2009

YANG, F. et al. Deep learning for smartphone-based malaria parasite detection in thick blood smears. IEEE Journal of Biomedicine and Health Informatics, 2019, v. 24(5), p. 1427-1438.