



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação

ANA CAROLINA BORGES MONTEIRO

PROPOSTA DE UMA METODOLOGIA DE SEGMENTAÇÃO DE IMAGENS PARA
DETECCÃO E CONTAGEM DE HEMÁCIAS E LEUCÓCITOS ATRAVÉS DO
ALGORÍTMO WT-MO

CAMPINAS

2019

ANA CAROLINA BORGES MONTEIRO

PROPOSTA DE UMA METODOLOGIA DE SEGMENTAÇÃO DE IMAGENS
PARA DETECÇÃO E CONTAGEM DE HEMÁCIAS E LEUCÓCITOS ATRAVÉS DO
ALGORÍTMO WT-MO

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia
Elétrica e de Computação da Universidade Estadual
de Campinas como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do título de Mestra em Engenharia
Elétrica, na área de Telecomunicações e Telemática.

Orientador: Prof. Dr. Yuzo Iano

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DE DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA ANA
CAROLINA BORGES MONTEIRO, E
ORIENTADA PELO PROF. DRº. YUZO
IANO.

CAMPINAS
2019

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): 166026/2018-2

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8631-6617>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

M764p Monteiro, Ana Carolina Borges, 1994-
Proposta de uma metodologia de segmentação de imagens para detecção e contagem de hemácias e leucócitos através do algoritmo WT-MO (Watershed Transform and Morphological Operations) / Ana Carolina Borges Monteiro. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Yuzo Iano.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação.

1. Hematologia. 2. Informática médica. 3. Biologia celular. 4. Processamento de imagem assistida por computador. 5. Engenharia biomédica. I. Iano, Yuzo, 1950-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Proposal of a methodology of image segmentation for detection and counting of erythrocytes and leukocytes through WT-MO Algorithm (Watershed Transform and Morphological Operations)

Palavras-chave em inglês:

Hematology

Medical informatics

Cell biology

Computer aided image processing

Biomedical engineering

Área de concentração: Telecomunicações e Telemática

Titulação: Mestra em Engenharia Elétrica

Banca examinadora:

Yuzo Iano [Orientador]

Vânia Vieira Estrela

Ricardo Barroso Leite

Data de defesa: 12-07-2019

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Elétrica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-8631-6617>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1406703945164185>

COMISSÃO JULGADORA - DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Candidato: Ana Carolina Borges Monteiro

RA: 190955

Data da Defesa: 12 de Julho de 2019

Título da Tese: “Proposta de uma Metodologia de Segmentação de Imagens para Detecção e Contagem de Hemácias e Leucócitos Através do Algoritmo WT-MO” (Proposal of a Methodology of Image Segmentation for Detection and Counting of Erythrocytes and Leucocytes Through WT-MO Algorithm)

Banca:

Prof. Dr. Yuzo Iano (Presidente, FEEC/UNICAMP)

Prof. Dr. Vânia Vieira Estrela

Prof. Dr. Ricardo Barroso Leite

A ata de defesa, com as respectivas assinaturas dos membros da Comissão Julgadora, encontra-se no SIGA (Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese) e na Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da vida, pelas oportunidades e pessoas que colocou em minha vida, possibilitando a minha chegada até aqui. Agradeço enormemente a minha família que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos e que sempre me apoiou e aconselhou.

Agradeço meus pais Luiz Paulo e Sandra pela educação e pelo amor sempre recebidos, em especial agradeço a minha mãe Sandra, que sempre me incentivou a aprender cada vez mais, me ensinou o valor do conhecimento, o valor da perseverança e a dar sempre o melhor de mim. Agradeço meus avós Maria e Luís pelo amor, pelo carinho e principalmente pelos conselhos de vida, os quais sempre carrego comigo.

Agradeço muito ao meu orientador Prof^o Yuzo Iano, pela oportunidade dada para que eu pudesse realizar esse sonho. Agradeço – o por ter acreditado em mim, pelos ensinamentos, pelos conselhos e sugestões sempre de grande peso e valor, e da mesma forma agradeço pela amizade firmada.

Aos alunos do LCV agradeço pela boa acolhida no laboratório. Agradeço, principalmente, ao meu namorado Reinaldo pelo companheirismo, cumplicidade, ajudas nos momentos de tempestade e por todos os sentimentos compartilhados entre nós.

Agradeço o Departamento de Comunicações (DECOM), a Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação (FEEC), o Laboratório de Comunicações Visuais (LCV) e a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pelo apoio no desenvolvimento da minha dissertação de mestrado.

Agradeço também ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) - processo: 166026/2018-2 - pelo apoio no desenvolvimento da minha pesquisa e dissertação de mestrado.

Enfim, agradeço a vida por tudo aquilo que passei até aqui, pois cada passo, cada lição aprendida me fez chegar onde cheguei e me fizeram ser quem eu sou hoje.

Muito obrigada a todos!

*“Não existe caminho para a felicidade,
a felicidade é o caminho”
(Mahatma Gandhi)*

RESUMO

A avaliação do sangue humano é um importante método diagnóstico para a detecção de doenças. A análise dos eritrócitos/hemácias contidos no sangue contribui para a detecção de anemias e leucemias, enquanto a análise dos leucócitos possibilita diagnósticos de inflamações e/ou infecções. O sangue é analisado através do hemograma, o qual é dependente de metodologias automatizadas e/ou manuais. A dependência das áreas médicas de novas tecnologias, conduz o presente estudo ao objetivo de desenvolver algoritmos de segmentação de imagens que atendam aos critérios de eficiência e confiabilidade para detecção e contagem de células sanguíneas e que sejam capazes de determinar os índices hematimétricos. Os algoritmos foram desenvolvidos através do *software MATLAB*[®], sendo o processamento de imagens baseado na transformada *Watershed*, Transformada *Hough*, operações morfológicas e detecção por coloração. Para as simulações dos algoritmos foram utilizadas 30 imagens de campos de microscopia contendo 6453 hemácias e 187 leucócitos. Os resultados demonstraram que o algoritmo baseado na junção da transformada *Watershed* com as operações morfológicas (WT-MO) apresenta alta sensibilidade (93%), especificidade (96%) e acurácia (95%) quando comparada com a metodologia manual. As simulações do algoritmo *WT-MO* realizadas em máquinas físicas distintas apresentou média de Tempo de Execução (1,25 – 1,75 segundos) e Tempo de Processamento (1,27 - 2,20 segundos) mais satisfatórios quando comparados aos tempos de execução (2,81 – 6,41segundos) e processamento (5,32 – 8,08 segundos) do algoritmo baseado na Transformada *Hough* e detecção por coloração (HT-CD). Portanto, o algoritmo WT-MO é uma técnica precisa, confiável e de baixo custo, podendo ser aplicada como uma terceira metodologia mais acessível para a realização do hemograma em populações de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento.

Palavras chaves: Hemácias, Leucócitos, Transformada *Watershed*, Operações Morfológicas, Transformada *Hough*, Índices hematimétricos, Esfregaço Sanguíneo.

ABSTRACT

The evaluation of human blood is an important diagnostic method for the detection of diseases. The analysis of the erythrocytes contained in the blood contributes to the detection of anemia and leukemia, while the leukocyte analysis allows the diagnosis of inflammation and/or infections. The blood is analyzed by the blood count, which is dependent on automated and/or manual methodologies. The dependence of medical areas on new technologies leads the present study to the development of image segmentation algorithms that meet the criteria of efficiency and reliability for detection and counting of red blood cells and that are capable of determining the hematimetric indices. The algorithms were developed through the *MATLAB* software, being the image processing based on the Watershed transform, Hough transform, morphological operations and color detection. For the simulations of the algorithms, 30 images of fields of microscopy containing 6453 red blood cells and 187 leukocytes were used. The results showed that the algorithm based on the junction of the Watershed transform with the morphological operations (WT – MO) shows high sensitivity (93%), specificity (96%) and accuracy (95%) when compared with the manual methodology. The simulations of the WT-MO carried out in distinct physical machines presented a more satisfactory Average Execution Time (1.25 - 1.75 seconds) and Processing Time (1.27 - 2.20 seconds) when compared to the (2.81 - 6.41 seconds) and processing (5.32 - 8.08 seconds) of the algorithm based on the Hough Transform and color detection (HT-CD). Therefore, the algorithm WT-MO is an accurate, reliable and low-cost technique and can be applied as a third most accessible methodology to perform the hemogram in populations of underdeveloped and developing countries.

Keywords: Erythrocytes, Leukocytes, Watershed Transform, Morphological Operations, Hough Transform, Hematimetric indices, Blood smear.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fases do ciclo celular	28
Figura 2 - Fases da mitose celular.....	29
Figura 3– Representação de cromossomos diploides e haploides	30
Figura 4 – Processo de síntese, maturação e liberação das células sanguíneas.	40
Figura 5 - Captação de imagens através do microscópio óptico.....	42
Figura 6- Esfregaço sanguíneo sem corante	49
Figura 7 - Etapas para a determinação do hematócrito.....	50
Figura 8 - Matriz	60
Figura 9 - Etapas do processo de operações morfológicas	62
Figura 10 - Representação da lógica da Transformada Watershed baseada na observação da natureza.....	63
Figura 11 - Lógica utilizada para a criação do algoritmo com base na Transformada Watershed e Operações Morfológicas (Algoritmo WT-MO).....	78
Figura 12- Hemácias rotuladas pela Transformada Watershed	80
Figura 13- Detecção e Contagem de Leucócitos por meio de Operações Morfológicas.....	81
Figura 14- Contagem de leucócitos e hemácias através do algoritmo WT-MO.....	82
Figura 15 - Lógica utilizada para a criação do algoritmo com base na Transformada Watershed e Operações Morfológicas (Algoritmo WT-MO).....	83
Figura 16 - Transformada Hough empregada na detecção de hemácias	84
Figura 17- Detecção de leucócitos por coloração	85
Figura 18 - Função "tic toc".....	88
Figura 19 - Função "Cputime".....	88
Figura 20- Comparação da contagem de hemácias pelo método manual com a Transformada Watershed	89
Figura 21-Comparação da contagem de hemácias pelo método manual com a Transformada Hough.....	90
Figura 22-Comparação da contagem de leucócitos pelo método manual com o processo de operações morfológicas	90
Figura 23- Comparação da contagem de leucócitos pelo método manual com o algoritmo de detecção por coloração.....	91
Figura 24 - Curva ROC da contagem de hemácias Transformada Watershed	95
Figura 25- Curva ROC da contagem de hemácias através do algoritmo HT-CD.....	96
Figura 26 - Curva ROC da contagem de leucócitos através do algoritmo WT – MO.....	97
Figura 27-Curva ROC da contagem de leucócitos através do algoritmo HT-CD	98
Figura 28 - Tempo de Execução dos algoritmos WT-MO e HT-CD em Processador Intel Dual Core.....	100
Figura 29 - Tempo de Execução dos algoritmos WT-MO e HT-CD em Processador Intel Quad Core.....	100
Figura 30 - Tempo de Execução dos algoritmos WT-MO e HT-CD em Processador Intel Core i3	100
Figura 31-Tempo de Execução dos algoritmos WT-MO e HT-CD em Processador Intel Core i5	101
Figura 32- Tempo Processamento dos algoritmos WT-MO e HT-CD em Processador Intel Dual Core.....	102
Figura 33- Tempo de Processamento dos algoritmos WT-MO e HT-CD em Processador Intel Quad Core.....	103
Figura 34 - Tempo de Processamento dos algoritmos WT-MO e HT-CD em Processador Intel	

Core i3.....	103
Figura 35-Tempo de Processamento dos algoritmos WT-MO e HT-CD em Processador Intel Core i5.....	104
Figura 36 - Análise de simulações da Transformada Watershed em Processador Intel Core i5	106
Figura 37- Análise de simulações do algoritmo WT - MO em Processador Intel Core i3	106
Figura 38 - Execuções de amostras morfológicamente distintas utilizando o algoritmo WT-MO em Processador Intel Core i5.	107
Figura 39 - Execuções de amostras morfológicamente distintas utilizando o algoritmo WT-MO em Processador Intel Core i3	107
Figura 40 - Comparação do algoritmo de determinação de VCM com equipamento hematológico.....	109
Figura 41- Comparação do algoritmo de determinação de HCM com equipamento hematológico.....	110
Figura 42 -Comparação do algoritmo de determinação de CHCM com equipamento hematológico.....	110
Figura 43- Comando "help" para VCM.	111
Figura 44 - Comando "help" para HCM	111
Figura 45- Comando "help" para CHCM	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atuação de citocinas na formação de hemácias e leucócitos.	32
Tabela 2 - Valores de referência de contagem total de eritrócitos, concentração de hemoglobina e determinação de hematócrito.	45
Tabela 3 - Valores de referência dos índices hematimétricos.....	45
Tabela 4 - Valores de referência de WBC relativo para crianças e adolescentes	48
Tabela 5 - Valores de referência de WBC relativo e WBC absoluto para adultos.	48
Tabela 6 - Acurácia dos algoritmos na contagem de células sanguíneas	91
Tabela 7 –Matriz de confusão.....	93
Tabela 8 – Parâmetros da Curva ROC na contagem de hemácias através do algoritmo WT-MO	95
Tabela 9 - Parâmetros da Curva ROC na contagem de hemácias utilizando o algoritmo HT-CD	96
Tabela 10 - Média de Tempo de Processamento dos algoritmos em plataformas de <i>hardware</i> distintas	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RNA	Ácido Ribonucleico
DNA	Ácido Dexorribonucleico
ATP	Adenosina Trifosfato
RE	Reticulo Endoplasmático
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
REL	Retículo Endoplasmático Liso
pH	Potencial Hidrogeniônico
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
H ₂ O	Água
O ₂	Oxigênio
Fase G	do inglês "Gap"
Fase S	Fase de Síntese de DNA
Fase M	Fase de Mitose
IL	Interleucinas
Ig	Imunoglobulinas (IG)
UFC	Unidade Formadoras de Colônias
G-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos
M – CSF	Fator Estimulador de Colônias de Monócitos
RBC	do inglês "Red Blood Cells"
WBC	do inglês " <i>White Blood Cells</i> "
IgG	Imunoglobulina G
IgE	Imunoglobulina E
NK	do inglês " <i>Natural Killer</i> "
AN	Abertura Numérica
LR	Límite de Resolução
λ	Lâmbda
EDTA	do inglês " <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> "
Hb	Hemoglobina
Htc	Hematócrito
VCM	Volume Corpuscular Médio

HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
CHCM	Concentração de hemoglobina Corpuscular Média
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
<i>Rpm</i>	Rotações por Minuto
EM	Espectro Eletromagnético
CPU	Unidade de Processamento Central
COBOL	<i>Common Business- Oriented Language</i>
FORTRAN	Formula Translator
CAT	Tomografia Computacional Axial
CT	Tomografia Computadorizada
ROC	do inglês “ <i>Receiver Operating Characteristic Curve</i> ”
AROC	Área da Curva ROC
VPP	Verdadeiro Preditivo Positivo
VPN	Verdadeiro Preditivo Negativo
WT – MO	(do inglês “ <i>Watershed Transform and Morphological Operations</i> ”)
HT – CD	(do inglês “ <i>Hough Transform and Color Detection</i> ”)
VCM	Volume Corpuscular Médio
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Motivação	17
1.2	Objetivos.....	17
1.3	Estrutura da dissertação	18
2	FUNDAMENTOS TEÓRICOS	20
2.1	Células: origem e classificações	20
2.1.1	Citoplasma.....	23
2.1.2	Membrana plasmática	24
2.1.3	Citoesqueleto	24
2.1.4	Mitocôndrias.....	25
2.1.5	Ribossomos	25
2.1.6	Retículo endoplasmático	25
2.1.7	Complexo de Golgi	26
2.1.8	Lisossomos	26
2.1.9	Peroxisomas	26
2.1.10	Núcleo celular.....	27
2.1.11	O Ciclo Celular.....	27
2.1.12	Mitose.....	28
2.1.13	Meiose	29
2.2	As células sanguíneas.....	30
2.2.1	Hematopoese	31
2.2.2	Eritrócitos	33
2.2.3	Leucócitos	34
2.2.4	Neutrófilos.....	35
2.2.5	Eosinófilos.....	36
2.2.6	Basófilos.....	37
2.2.7	Monócitos.....	37
2.2.8	Linfócitos	38
2.3	Microscópio óptico: revisão histórica.....	40
2.3.1	Estrutura e funcionamento do microscópio óptico.....	41
2.4	Hemograma	43
2.4.1	Eritrograma.....	44
2.4.2	Hemoglobina e Hematócrito	44
2.4.3	Índices Hematimétricos	45
2.4.4	Leucograma	46
2.5	Hemograma Manual.....	48
2.5.1	Contagem manual de eritrócitos.....	49

2.5.1.1	Determinação do hematócrito	50
2.5.1.2	Concentração de Hemoglobina	51
2.5.1.3	Determinação dos Índices Hematimétricos.....	51
2.6	Leucograma manual.....	52
2.6.1	Contagem total de leucócitos	52
2.6.1.1	Contagem diferencial de leucócitos	52
2.7	Hemograma automatizado	53
2.8	Processamento de Imagens.....	55
2.9	As Origens do Processamento de Imagens Digitais	56
2.10	<i>Software Matlab</i>	58
2.10.1	Imagem Digital.....	59
2.10.2	Operações morfológicas	60
2.10.3	Transformada <i>Watershed</i>	62
2.10.4	Transformada <i>Hough</i>	64
2.11	Síntese do capítulo 2	65
3	PESQUISA BIBLIOGRÁFICA.....	67
3.1	67
3.1.1	Ano 1999.....	67
3.1.2	Ano 2000	67
3.1.3	Ano 2001	68
3.1.4	Ano 2002	68
3.1.5	Ano 2003	68
3.1.6	Ano 2004	69
3.1.7	Ano 2005	69
3.1.8	Ano 2006	69
3.1.9	Ano 2007	70
3.1.10	Ano 2008	70
3.1.11	Ano 2009	70
3.1.12	Ano 2010	71
3.1.13	Ano 2011	71
3.1.14	Ano 2012	72
3.1.15	Ano 2013	72
3.1.16	Ano 2014	73
3.1.17	Ano 2015	73
3.1.18	Ano 2016	74
3.1.19	Ano 2017	74
3.1.20	Ano 2018.....	75
3.2	Síntese do capítulo 3	75
4	METODOLOGIA PROPOSTA	77

4.1	Segmentação de imagem pelo algoritmo WT-MO	77
4.1.1	Contagem de hemácias pelo algoritmo WT-MO	79
4.1.2	Contagem de leucócitos pelo algoritmo WT-MO	80
4.2	Segmentação de imagem pelo algoritmo HT-CD	83
4.2.1	Contagem de eritrócitos pelo algoritmo HT-CD	84
4.2.2	Contagem de leucócitos pelo algoritmo HT-CD	85
4.3	Síntese do capítulo 4	85
5	RESULTADOS	87
5.1	Simulações	87
5.1.1	Função “tic toc”	88
5.1.2	Função “cputime”	88
5.1.3	Deteção e contagem de hemácias e leucócitos	89
5.1.4	Análise de sensibilidade e especificidade dos algoritmos WT-MO e HT-CD.....	92
5.1.5	Análise de Tempo de Execução	99
5.1.6	Análise de Tempo de Processamento	102
5.1.7	Análise de tempo da primeira simulação do algoritmo WT-MO.....	105
5.1.8	Determinação de Índices Hematimétricos pelo algoritmo WT- MO	109
5.1.9	Síntese do Capítulo 5.....	111
6	CONCLUSÕES.....	113
7	TRABALHOS FUTUROS.....	114
	REFERÊNCIAS	115
	ANEXOS.....	123
	LISTA DE PUBLICAÇÕES.....	123
	ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS E ANAIS DE CONGRESSOS.....	123
	ARTIGOS E CAPÍTULOS ACEITOS EM PERIÓDICOS E ANAIS DE CONGRESSOS	126

1 INTRODUÇÃO

1.1 Motivação

As áreas médicas estão em constante expansão por meio de novas descobertas e desenvolvimento de novos equipamentos que visam o fornecimento de resultados de forma mais rápida, prática e confiável. Nesse contexto, o hemograma é o exame laboratorial mais requisitado na rotina hospitalar e laboratorial, pois proporciona uma visão geral das células sanguíneas. As células sanguíneas fornecem informações importantes sobre o estado de saúde dos pacientes, podendo indicar ou suspeitar de: anemias, leucemias, policitemias, hemorragias, trombozes, infecções virais, infecções parasitárias, infecções bacterianas, alergias, inflamações, entre outros.

Considerando a ampla aplicabilidade do hemograma é indispensável considerar a metodologia desse exame: metodologia manual e metodologia automatizada. Essas técnicas são aplicadas de acordo com a demanda diária de exames e o custo benefício. Embora a técnica automatizada apresente alta acurácia, o alto custo para a implementação de equipamentos hematológicos é uma barreira para laboratórios de pequeno porte. Entretanto, é importante ressaltar, que mesmo com a aquisição da metodologia automatizada é indispensável o uso da metodologia manual.

Face ao exposto, o presente trabalho visa apresentar uma terceira opção para a realização do hemograma, apresentando baixo custo e alta acurácia. Para isso, foram desenvolvidos algoritmos de segmentação de imagens que visam a detecção e contagem de eritrócitos e leucócitos, além da determinação de índices hematimétricos, os quais são parte importante do hemograma.

1.2 Objetivos

- Desenvolver algoritmos com base em técnicas de segmentação de imagens visando a detecção de eritrócitos e leucócitos em imagens digitais de esfregaço sanguíneo;

- Comparar os resultados obtidos com a metodologia manual e, posteriormente, com trabalhos anteriores que utilizam técnicas de processamento de imagem para a detecção de células sanguíneas;

- Comparar os desempenhos das técnicas de processamento de imagens utilizadas,

através da determinação de acurácia, sensibilidade e especificidade de cada uma delas;

- Desenvolver algoritmos capazes de determinar os índices hematimétricos;
- Comparar os resultados dos algoritmos de determinação de índices hematimétricos com os resultados obtidos por equipamentos convencionais de hematologia,
- Analisar o desempenho dos algoritmos desenvolvidos, por meio de análises de Tempo de Execução e Tempo de Processamento através de simulações realizadas em *hardwares* com diferentes configurações.

1.3 Estrutura da dissertação

Nesse primeiro capítulo é dada uma introdução ao trabalho, expondo a motivação, os objetivos e a estrutura dessa dissertação.

No segundo capítulo é explicado o surgimento das células e os princípios celulares básicos. Em seguida, é abordada a origem das células sanguíneas com ênfase na síntese e função de eritrócitos e leucócitos, demonstrando a importância dessas células no diagnóstico de diversas doenças através da realização do hemograma. Posteriormente, é demonstrado o funcionamento das técnicas de processamento de imagens e seu potencial para a detecção de células sanguíneas, sendo introduzidos os conceitos e as características das metodologias de segmentação de imagens.

No capítulo 3 é abordada a pesquisa bibliográfica e a revisão da literatura referente aos últimos dezenove anos, onde através da análise de publicações científicas é demonstrado o uso e a aplicabilidade das técnicas de processamento de imagens nas áreas médicas.

No capítulo 4 é abordada a proposta do presente estudo, com base no desenvolvimento de métodos de processamento de imagens baseados no uso da Transformada *Watershed*, Operações Morfológicas, Transformada *Hough* e algoritmo de detecção de coloração.

No capítulo 5 são apresentados os resultados obtidos de acordo com a implementação da proposta, sendo alcançados através de análises de Tempo de Processamento, Tempo de Execução, acurácia, sensibilidade e especificidade, visando a afirmação do potencial da proposta.

Finalmente, no capítulo 6, é apresentada a conclusão do estudo, sendo sucedido pelo capítulo 7, onde são demonstrados os trabalhos futuros, os quais são caracterizados como as possibilidades de continuidade do presente trabalho.

Por fim, o capítulo 8 contém as referências bibliográficas utilizadas para a elaboração desse estudo.

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 Células: origem e classificações

A primeira forma de vida datada na Terra tem aproximadamente 3,5 bilhões de anos [1]. Essa célula apareceu sobre a Terra sob condições muito específicas de radiação, temperatura e composição química. A constituição atmosférica desse período, era a base de vapor d'água, metano, amônia, sulfeto de hidrogênio, e gás carbônico. Havia também, abundância na disponibilidade de água, a qual era rica em moléculas inorgânicas e gases que formavam a atmosfera. Essa água era denominada de caldo primordial [2].

Dessa forma, através da radiação ultravioleta e do calor provenientes do Sol, e da ação de descargas elétricas oriundas de constantes tempestades, houve a combinação química das moléculas dissolvidas no caldo primordial, resultando no surgimento dos primeiros compostos contendo carbono, o qual compõe grande parte da composição química do corpo humano. Teorias afirmam que outras substâncias como proteínas e ácidos nucleicos, consideradas relativamente complexas, surgiram espontaneamente [2].

Essa síntese de seres vivos sem a participação de outros organismos vivos é denominada de prebiótica, sendo comprovada experimentalmente em laboratórios. Em meio a esse contexto, é admitido que o favorecimento do acúmulo gradual de compostos de carbono, foi devido a três circunstâncias primordiais: (1) a grande variedade de nichos na superfície da Terra, favoreceu a formação de moléculas que de certa forma foram mantidas próximas umas das outras; (2) o período longo, de cerca de 2 bilhões de anos, auxiliou a formação da síntese prebiótica no caldo primordial; (3) a ausência de oxigênio na atmosfera, protegeu as moléculas neoformadas do processo de oxidação. Atualmente, devido as alterações climáticas e atmosféricas é impossível que a síntese prebiótica ocorra espontaneamente [2].

Os polímeros de aminoácidos e de nucleotídeos, provavelmente, surgiram no caldo primordial, contribuindo para o surgimento das primeiras moléculas de aminoácidos e proteínas. Considerando que somente os ácidos nucleicos tem a capacidade de autoduplicação, experimentos em laboratórios demonstraram que simples moléculas de ácido ribonucleico (RNA) tem a capacidade de evoluir para moléculas mais complexas, sem a necessidade da atuação de enzimas. Dessa maneira,

é considerada que a evolução foi originada por meio de uma molécula de RNA [2].

As primeiras células a surgirem na face da Terra eram procariontes (bactérias e algas azuis) e heterotróficas, ou seja, eram incapazes de sintetizar compostos ricos em energia, sendo dependentes de moléculas presentes no ambiente. Dessa maneira, o processo evolutivo, teria sido interrompido quando houve o declínio da disponibilidade de compostos de carbono [2].

Com o decorrer do tempo, houve o aparecimento das primeiras células procariontes autotróficas, ou seja, aquelas capazes de produzirem moléculas complexas por meio da energia solar e de substâncias simples. O surgimento desse tipo celular capaz de utilizar a energia solar para a formação de reações químicas, com consequente produção de energia e liberação de oxigênio, originou o processo de fotossíntese [33]. Consequentemente, a liberação do oxigênio pela fotossíntese, resultou no acúmulo desse gás na atmosfera, favorecendo a formação da camada de ozônio. Esse processo permitiu o aparecimento das células aeróbicas, entretanto não extinguiu as células anaeróbicas, pois essas ficaram restritas a nichos com ausência de oxigênio [1] [2].

A importância das células foi realmente conhecida e difundida somente a partir do ano de 1830. Matthias Schleiden, em 1838, notou em suas observações que mesmo havendo diferenças estruturais em diversos tecidos, as plantas eram constituídas de células e que o embrião da planta era originado por uma única célula. Em 1839, Theodor Schwann, por meio de análises de células vegetais e animais, publicou um artigo sobre as bases celulares da vida animal, e propôs dois princípios celulares básicos: (1) todos os organismos vivos são compostos de uma ou mais células e (2) a célula é a unidade estrutural da vida [3].

Entretanto, devido à grande importância científica de Schleiden e Schwann, a teoria errônea de ambos relacionada ao surgimento de células a partir de materiais não biológicos, perdurou por muitos anos. Essa teoria apenas foi substituída após muitos trabalhos de outros biólogos comprovarem, que as células são incapazes de surgirem por geração espontânea ou por meio de materiais não biológicos. Em 1855, Rudolf Virchow, através de seus experimentos, originou o terceiro princípio celular: as células surgem apenas por divisão de uma célula pré-existente [4]. Dessa forma, as células são capazes de desenvolver com autonomia diversas funções básicas relacionadas a sua reprodução, crescimento e função biológica específica [3] [5].

A teoria celular mais recente surgiu por volta de 1970, afirmando que as

células eucariontes eram células resultantes da evolução gradual das células procariontes. Por meio, dos trabalhos realizados por Lynn Margulis, foi constatado que as células eucariontes são o resultado de invaginações de células procariontes e consequente simbiose entre elas. Essa teoria é denominada de endossimbiose [4].

Evidências sugerem que as organelas envolvidas nas transformações energéticas, tais como os cloroplastos e as mitocôndrias, são derivadas da fagocitose de bactérias que conseguiram escapar dos mecanismos de digestão intracelular e estabeleceram uma relação de simbiose entre si. Esse fato pode ser comprovado através da presença de moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA) de cadeia circular em mitocôndrias, pois esse tipo de material genético é claramente observado em bactérias [33]. Sendo assim, todas as formas de vida hoje existentes, desde as bactérias até os seres humanos evoluíram de uma mesma célula primitiva [1].

Atualmente, as células são descritas como unidades funcionais e estruturais definidas como a menor parte que compõe um organismo vivo. As células que compõem um organismo vivo são todas iguais, com a mesma carga genética, entretanto devido ao processo natural de diferenciação celular, apresentam variações de forma e desempenho de acordo com a função que exercem no organismo. Essa divisão de tarefas entre as células é uma estratégia para a economia de energia e aumento da eficiência na realização de funções biológicas [1].

Assim, as células que apresentam a mesma função biológica se agrupam e formam um tecido e que por sua vez formam os órgãos (cérebro, pulmões, intestinos, coração). Um agrupamento de órgãos origina um sistema (sistema neurológico, sistema respiratório, sistema digestivo, sistema cardiovascular). O conjunto de sistemas originam os organismos, tais como: plantas, insetos, parasitas e até o corpo humano. Todo esse processo deve ocorrer de forma extremamente precisa e harmônica. Caso contrário as alterações serão muito drásticas a ponto de serem incompatíveis com a vida [1].

As células são organismos susceptíveis a mudanças do ambiente em que estão. Segundo a teoria de Darwin, com o decorrer do tempo, pode haver alterações climáticas e/ou escassez de nutrientes, consequentemente, tais fatores estimulam alterações fisiológicas aos organismos [5]. Dessa forma, somente os organismos que conseguem se adaptar são capazes de sobreviver [6].

O corpo humano possui cerca de 100 trilhões de células, sendo constituído principalmente por: carbono, oxigênio, hidrogênio, cálcio, fósforo e nitrogênio [1]

[5]. Cerca de 70% do organismo humano é formado por hidrogênio e oxigênio, os quais são responsáveis pela formação de água. Os outros 30% são responsáveis pela constituição de compostos a base de carbono, os quais são denominados de compostos orgânicos [5].

A classificação celular é feita em dois tipos distintos: procariontes e eucariontes. As células procariontes (do grego, *pro* = primeiro; *cario*= núcleo) são pequenas (1 – 5 µm), apresentam parede celular, responsável pela proteção mecânica, e possuem material genético disperso pelo citoplasma, ou seja, não apresentam envoltório nuclear [2] [7]. Essas células abrangem as bactérias e as algas azuis, sendo formadas por apenas uma única célula, ou seja, são classificadas como unicelulares [2] [7] [8].

As células eucariontes (do grego, *eu* = verdadeiro; *cario* = núcleo), possuem material genético mais complexo, sendo formado por DNA e RNA, os quais estão organizados no citoplasma por meio do envoltório celular. As células eucariontes, são responsáveis pela formação de organismos mais complexos, ou seja, aqueles formados por mais de uma célula (organismos pluricelulares). Dentre esses organismos, é possível citar: os animais vertebrados e invertebrados e as plantas. Além disso, o citoplasma das células eucariontes apresenta compartimentos que possuem diferentes moléculas responsáveis pela execução de funções especializadas [2] [7].

Essas células apresentam uma estrutura mais complexa, sendo composta por diversas estruturas tais como: membrana celular, envoltório nuclear, núcleo, citoplasma, peroxissomas, lisossomos, retículo endoplasmático, mitocôndria, complexo de Golgi, citoesqueleto, membrana plasmática e depósito citoplasmático [2] [7].

2.1.1 Citoplasma

O citoplasma consiste na porção intracelular, onde o espaço entre as estruturas celulares é preenchido pela matriz citoplasmática também denominada por citosol ou hialoplasma. O citosol contém uma grande variedade de moléculas tais como: íons, aminoácidos, água, precursores de ácidos nucleicos, e diferentes tipos de enzimas [5].

Essas enzimas apresentam funções distintas como: catalisação de reações metabólicas intermediárias, degradação ou síntese de hidratos de carbono, de ácidos graxos, de aminoácidos e de outras moléculas [2] [5] [7]. Além disso, o citoplasma pode armazenar substâncias diversas tais como: glicogênio, melanina e gotículas de

gordura [2] [7].

2.1.2 Membrana plasmática

A membrana plasmática é a porção mais externa do citoplasma, sendo responsável por separar o meio intracelular do meio extracelular [2] [7]. Atualmente, o modelo mais aceito para a descrição das funções e organização da membrana plasmática é denominado de modelo mosaico fluido. Nesse modelo é constatado que a membrana plasmática possui uma espessura de cerca de 7 a 10nm e é constituída por estrutura trilaminar, sendo formada por lipídios, glicose e proteínas, assumindo o formato de bicamada fosfolipídica [5].

A bicamada fosfolipídica é formada por duas porções: uma polar (hidrofílica) e outra apolar (hidrofóbica). Dessa forma, os grupamentos polares estão localizados na superfície da membrana, enquanto os grupamentos apolares estão direcionados para a parte central da membrana. Já, as proteínas da membrana plasmática atuam na passagem de moléculas, de receptores hormonais e de receptores de moléculas sinalizadoras, sendo assim classificadas em dois tipos distintos: proteínas integrais e proteínas periféricas [2] [7].

As proteínas periféricas apresentam baixa adesão podendo ser facilmente extraídas. Por sua vez, as proteínas integrais são aquelas fortemente aderidas à membrana plasmática, podendo até mesmo transpassar a membrana. Quando isso ocorre essas proteínas são denominadas de proteínas transmembranas. A passagem de substâncias entre o meio externo e interno, tais como: os íons sódio, potássio e cálcio é permitida através de canais formados pelas proteínas integrais. Esse processo pode ser realizado por difusão passiva (sem gasto de energia) ou por transporte ativo (com gasto de energia) [2] [7].

2.1.3 Citoesqueleto

O citoesqueleto é uma estrutura formada por filamentos denominados de microtúbulos ou microfilamentos, ambas estruturas podem ser agrupadas ou separadas rapidamente no citosol. Os microtúbulos são filamentos tubulares com 25nm de diâmetro, constituídos pela proteína tubulina. Os microfilamentos, por sua vez, são formados pela proteína actina e medem 7nm de diâmetro. Ambas as estruturas são

responsáveis por conferir formato, organização, rigidez, motilidade (por cílios ou flagelos) e transporte intracelular as células [5].

2.1.4 Mitocôndrias

A mitocôndria é constituída por corpúsculos de formato alongado ou esférico, formados por duas membranas: interna e externa. Ambas as membranas são resultantes de invaginações da membrana externa. Essas membranas possuem várias enzimas, sendo algumas responsáveis pelo processo de fosforização oxidativa, através da molécula de glicose e ácidos graxos para a formação de adenosina trifosfato (ATP) [2] [5] [7]. A energia na forma de ATP possibilita a realização de atividades celulares como: secreção, multiplicação, movimentação, entre outros. Além disso, as mitocôndrias são responsáveis pelo processo de respiração intracelular [2] [7].

2.1.5 Ribossomos

Os ribossomos são compostos por cerca de 80 tipos de proteínas e por quatro tipos de RNA ribossomal (ou ribossômico) e são sintetizados no nucléolo da célula. As proteínas são sintetizadas no citoplasma e por meio de poros nucleares são transportadas até o núcleo, onde se associam ao RNA ribossomal. Ao final do processo os ribossomos retornam ao citoplasma e exercem suas respectivas funções [2] [7].

2.1.6 Retículo endoplasmático

O retículo endoplasmático (RE) está presente em células eucariontes, sendo constituído por uma rede de túbulos e vesículas achatadas que se intercomunicam. O RE é classificado em dois tipos: retículo endoplasmático rugoso (RER) e retículo endoplasmático liso (REL). O RER é constituído por partículas densas, denominadas de ribossomas, que são abundantes em ribonucleoproteínas, as quais são capazes de produzir proteínas [2].

O REL é uma estrutura celular mais desenvolvida em tipos celulares específicos, tais como: células hepáticas, músculos estriados e células secretoras de hormônios esteroides. Nos músculos estriados, os retículos são denominados de retículos sarcoplasmáticos, sendo responsáveis pela estocagem do íon cálcio [7].

2.1.7 Complexo de Golgi

O complexo de Golgi também é denominado por Aparelho de Golgi. Sua estrutura é formada por vesículas achatadas ou esféricas com tamanho e números variáveis. A função do complexo de Golgi é armazenar as substâncias sintetizadas pelo RE e realizar as transformações pós transcricionais desses produtos. Posteriormente, o complexo de Golgi realiza a secreção dessas substâncias [5].

2.1.8 Lisossomos

Os lisossomos possuem tamanho variável entre 0,5 – 3,0 μm de diâmetro e são responsáveis pela degradação intracelular de moléculas, através de mais de 40 enzimas hidrolíticas. Essas enzimas são sintetizadas pelo RER e possuem atividade máxima na presença de potencial Hidrogeniônico (pH) igual a 5,0. São responsáveis pela digestão intracelular, ou seja, fagocitam partículas ou outras organelas intracelulares [2] [7].

Essa destruição é um processo fisiológico natural que garante o bom funcionamento celular e regula as quantidades de substâncias de acordo com a necessidade da célula. Dessa forma, os lisossomos estão presentes em todas as células, sendo mais abundantes em células fagocitárias sanguíneas e teciduais, como os neutrófilos e os macrófagos, os quais serão apresentados nas sessões 2.2.4 e 2.2.7, respectivamente [2] [5] [7].

2.1.9 Peroxissomas

Os peroxissomas possuem enzimas oxidativas responsáveis pela transferência de átomos de hidrogênio provenientes de substratos de oxigênio, gerando água como produto final da reação. Essas estruturas, também são responsáveis por grande parte da enzima catalase celular, responsável pela conversão de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio (O_2). Essa função é de grande importância, pois o acúmulo de H_2O_2 causa danos celulares [2] [7].

2.1.10 Núcleo celular

O núcleo é o local de controle de todas as atividades celulares. Essa região da célula é responsável por conter os cromossomos e o genoma celular, possuindo todas as ferramentas necessárias para a duplicação do DNA. É também responsável pela síntese de RNA. Entretanto, o núcleo é incapaz de sintetizar proteínas, pois é dependente de substâncias provenientes do citoplasma [2] [5] [7].

Geralmente, o núcleo apresenta forma arredondada, medindo entre 5 a 10µm e possui afinidade pelo corante hematoxilina. Sua morfologia basicamente é composta por envoltório nuclear, cromatina e nucléolo. O envoltório nuclear é responsável pela troca de substâncias entre o núcleo e o citosol. A cromatina é classificada em dois tipos: heterocromatina e eucromatina. A heterocromatina tem o aspecto de grânulos grosseiros e é apresentada na forma inativa, pois nela há a dupla hélice de DNA compactada, impedindo a transcrição de genes. Por sua vez, a eucromatina também denominada de cromatina ativa, tem aspecto claro e granuloso [1] [2].

Dessa forma, a cromatina é formada por filamentos helicoidais de DNA associados a proteínas denominadas de histonas, as quais são classificadas em 5 tipos: H1, H2A, H2B, H3 e H4. A associação da molécula de DNA com as histonas formam os nucleossomos, enquanto isso as proteínas não histônicas exercem funções de regulação da atividade gênica ou enzimática e condensação do DNA. Por sua vez, os filamentos de nucleossomos são agrupados em estruturas mais complexas e formam os cromossomos. No interior do núcleo é encontrado o nucléolo: uma estrutura de formato esférico que armazena RNA. Entretanto, essa estrutura é apenas visível, em microscopia óptica, quando o núcleo está na fase de interfase, a qual será apresentada na sessão 2.1.11 [1] [2] [7].

2.1.11 O Ciclo Celular

Quando há reprodução sexuada há dois tipos distintos de divisão celular: a mitose e a meiose. A mitose ocorre em todas células do corpo (células somáticas), tendo como finalidade a multiplicação celular com conseqüente desenvolvimento e reparos em tecidos. A meiose é um processo de divisão celular exclusivo das linhagens germinativas, ou seja, ocorre apenas nos gametas femininos e masculinos [1] [9].

O desenvolvimento do corpo humano é a conseqüência da multiplicação

celular e consecutivas divisões celulares que ocorrem ao longo da vida [1]. O ciclo celular é formado por uma sequência de eventos que tem início com o surgimento da célula e termina com a divisão celular (mitose ou meiose). As células que não estão em fase de mitose são denominadas de células em interfase. Entretanto, até o momento pouco se sabe sobre os fatores desencadeantes da mitose [3].

Dessa forma, a divisão celular consiste em quatro estágios distintos: G1, S, G2 e M. G é a abreviatura para intervalo (do inglês “*Gap*”), S consiste na abreviação de síntese de DNA e M representa a fase de mitose (Figura 1). A fase G1 tem duração média de 8 horas e não apresenta mudanças visíveis ao microscópio óptico, apenas apresenta o aumento da concentração de substâncias no citoplasma para auxiliar no futuro processo de duplicação do DNA. A fase S, também dura aproximadamente 8 horas, e consiste na duplicação dos cromossomos, resultando na duplicação do volume inicial do núcleo. Já, a fase G2 dura apenas 4 horas e é responsável pelo acúmulo de substâncias necessárias para a divisão mitótica, sendo esse processo visível a microscopia óptica. Por sua vez, a fase M dura em média 2 horas, envolvendo fases bem definidas e visíveis a microscopia [3].

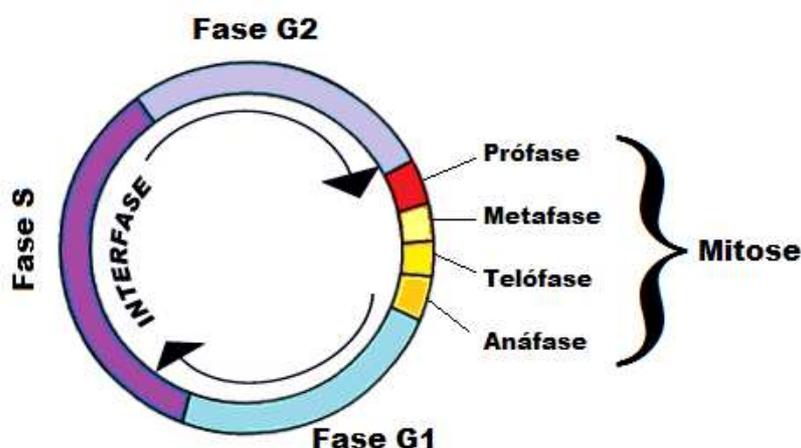


Figura 1 - Fases do ciclo celular

2.1.12 Mitose

A mitose é um processo de divisão celular responsável pelo crescimento de um organismo através da formação de células filhas com a mesma quantidade de cromossomos e a mesma informação genética da célula - mãe [1]. O processo de mitose é facilmente visível em microscopia e consistem nas fases de: prófase, metáfase,

anáfase, e telófase, as quais são apresentadas na Figura 2 [3].

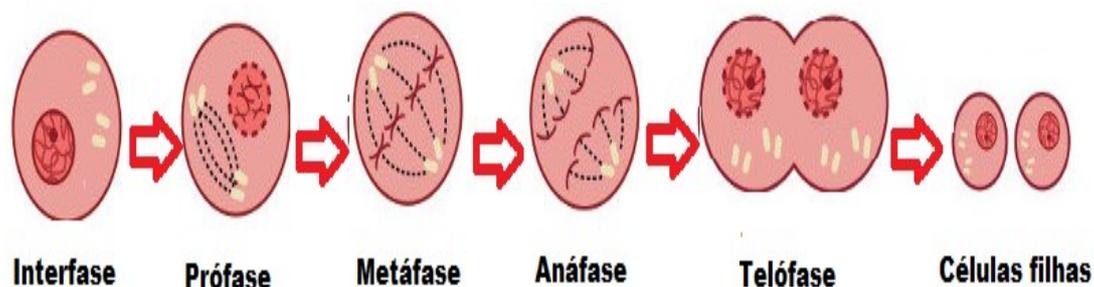


Figura 2 - Fases da mitose celular

A prófase é iniciada através da condensação da molécula de DNA com a finalidade da geração de cromossomos. Esses cromossomos estão em um estado de duplicação resultante da fase S do ciclo celular. A prófase é finalizada por meio do desaparecimento da membrana celular com posterior alinhamento dos cromossomos condensados. Na metáfase os cromossomos duplicados são distribuídos ao longo da placa equatorial da célula e ligados uns aos outros por meio dos centríolos, formando uma rede de microtúbulos [1] [9].

Durante a anáfase, as duplas-hélices de cromossomos são separadas em cromossomos simples, denominados de cromátides, que realizam a migração para os polos da célula. Por sua vez, a telófase é a fase final do processo, onde os cromossomos estão agrupados nos polos das células. Há o desaparecimento dos centríolos e das redes de microtúbulos. A membrana inicia o processo de invaginação, resultando pouco tempo depois no surgimento de duas células. Posteriormente, a membrana nuclear é reconstituída e há a homogeneização do núcleo, e dependendo da necessidade da célula pode haver o surgimento de um ou mais nucléolos [1] [9].

2.1.13 Meiose

A espécie humana possui dois tipos de cromossomos sexuais o X e o Y. Quando o cromossomo é apresentado na forma de XX o indivíduo é do sexo feminino e quando apresenta cromossomos na forma de XY, o indivíduo é do sexo masculino. Dessa forma, os seres humanos possuem 23 pares de cromossomos, sendo que os espermatozoides são constituídos por 22 cromossomos autossômicos e mais um

cromossomo sexual (X ou Y), enquanto que os óvulos apresentam 22 cromossomos autossômicos e sempre um cromossomo sexual somente do tipo X. Assim, é possível observar que a definição de sexo é dada pelo homem [1].

As células somáticas humanas são caracterizadas pela presença de 23 pares de cromossomos ou 46 cromossomos, ou seja, todas as células somáticas são diploides (*diploos* = duplo). Os cromossomos diploides são sempre representados por $2n$ (espécie humana $2n = 46$ cromossomos). Por sua vez, os gametas (óvulos e espermatozoides) são denominados de haploides (*haploos* = simples), ou seja, apresentam apenas um cromossomo de cada par de cromossomos homólogos, sendo representado por n (na espécie humana $n = 23$), conforme apresentado na Figura 3 [1] [9].

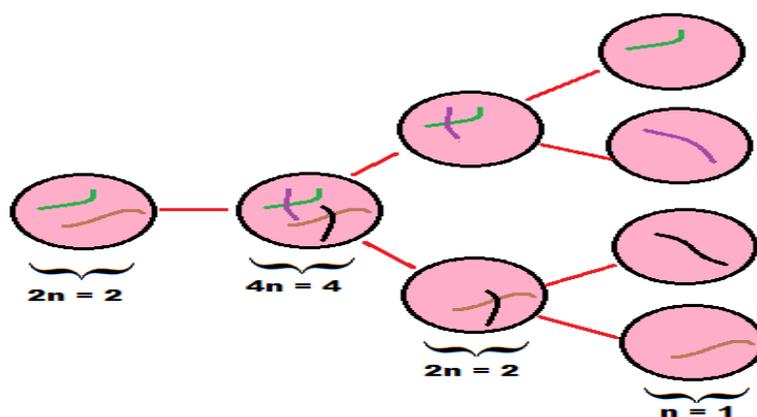


Figura 3– Representação de cromossomos diploides e haploides

Após a fecundação, é iniciado o processo de formação embrionária. Pesquisas realizadas no ano de 1988, por James Thomson e colaboradores, revelaram a existência de células embrionárias, responsáveis pela formação de todas as células do corpo desde células neuronais até as células sanguíneas. Tais diferenciações são totalmente dependentes de estímulos corpóreos adequados, com interleucinas (IL) e mediadores químicos específicos, os quais determinam qual dos tecidos será formado [4].

2.2 As células sanguíneas

O sangue humano é constituído por aproximadamente 55% de plasma e 45% de células sanguíneas, sendo seu volume total representado por aproximadamente 7% do peso corporal do indivíduo. Sua função consiste na condução de gases e nutrientes

aos tecidos, auxílio na excreção de metabólitos, distribuição hormonal, passagem de mensagens químicas entre órgãos distantes, regulação e manutenção da temperatura corpórea, equilíbrio ácido básico e equilíbrio osmótico [2] [7].

O plasma é uma solução aquosa formada por moléculas de diferentes pesos moleculares, sendo responsável pelo transporte de substâncias, tais como: água, proteínas plasmáticas, sais inorgânicos, aminoácidos, hormônios, glicose, albumina, imunoglobulinas (IG), componentes da cascata de coagulação sanguínea, entre outros.

Por sua vez, as células sanguíneas que compõem o sangue são: eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Essas células são responsáveis: pela homeostase do organismo, transporte de gases, defesa do organismo contra agentes etiológicos distintos, reparo tecidual e coagulação sanguínea. Entretanto, tais observações somente puderam ocorrer por meio da invenção de instrumentos capazes de visualizar as células [7].

2.2.1 Hematopoese

Durante a fase embrionária, o saco vitelínico é responsável pela formação das primeiras células sanguíneas, posteriormente durante o desenvolvimento fetal, essa função é transferida para o fígado e o baço. Durante a vida adulta, o interior da medula óssea é composto por um tecido hematopoiético (ou hematopoese), que reside no interior dos ossos longos e no esqueleto axial. No interior da medula óssea, há uma rede de sinusóides venosas ao redor de uma arteríola e de veias centrais, que permeiam as células em desenvolvimento. Todas as células sanguíneas são originadas a partir de células tronco da medula óssea. Dessa forma, a medula óssea apresenta um microambiente adequado para o desenvolvimento de células hematopoiéticas e para a proliferação de células primitivas e das células progenitoras [10] [11] [12].

A hematopoese é o processo responsável pela formação das células sanguíneas no interior da medula óssea, a partir de uma célula mãe denominada *stem cell*. Essa célula pluripotente origina as diferentes linhagens celulares sanguíneas: eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Esse fenômeno é dependente de uma série de ações e respostas que conduzem aos processos de duplicação, diferenciação e maturação, resultando na produção e liberação de células maduras na corrente sanguínea [13] [14].

A *stem cell* é uma célula capaz de realizar a autoduplicação, originando

células filhas. As células filhas são as Unidade Formadoras de Colônias (UFC), pois possuem as informações genéticas necessárias para a formação de uma série celular. O processo de hematopoese é caracterizado pela participação de fatores reguladores e estimuladores tais como: citocinas, eritropoetina (regulador de eritropoiese), trombopoetina (regulador de trombocitopoese), Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos (G-CSF), Fator Estimulador de Colônias de Monócitos (M-CSF), Fator Estimulante de Colônia de Macrófago (M-CSF), IL – 3 (fator estimulante de múltiplas colônias) e as interleucinas IL-2, IL- 4 e IL-6 [12] [13] [15].

As citocinas são glicoproteínas que atuam em baixas concentrações sobre receptores, produzindo sinais que controlam o ciclo celular, maturação e funções celulares. Geralmente, são responsáveis pela regulação de mais de um a linhagem celular e mostram efeito aditivo e sinérgico com outros fatores de crescimento, modulando a expressão de genes reguladores produtores de citocinas [12] [13], conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Atuação de citocinas na formação de hemácias e leucócitos.

Citocina	Origem	Alvo	Principais efeitos
IL - 1α	Macrófagos e linfócitos	Linfócitos, macrófagos e endotélio	Co – estimulação de linfócitos, ativação de fagócitos e das moléculas de adesão endotelial
IL - 1β	Células epiteliais e astrócitos	Outros	Síntese de prostaglandina
IL – 2	Células T	Células T, células EM e células B	Aumento e ativação da célula T, ativação das células EN e divisão
IL – 3	Células T e epitélio tímico	Células tronco	Fator hematopoiético de multi linhagens
IL – 4	Células Ta2 e estroma medular	Células B	Ativação, divisão e promove inversão de classes IgC1 e IgE
IL – 5	Células Ta2	Eosinófilos e células B	Desenvolvimento e diferenciação

IL – 6	Macrófagos, endotélio e células	Células B, células T e hepatócitos	Crescimento de linfócitos, diferenciação de células B e síntese de proteínas de fase
	Ta2		Aguda
IL – 7	Estroma da medula óssea	Células pré – T e células pré – B	Divisão
IL – 8	Fibroblastos, monócitos e endotélio	Monócitos, células T e neutrófilos	Ativação e quimiotaxia
IL – 9	Células TCD4	Células T e mastócitos	Divisão e promove desenvolvimento
IL – 10	Células Ta2 maduras	Células Ta1	Inibe a síntese de citocinas
IL – 11	Estroma da medula óssea	Células tronco e plasmócitos	Divisão e proliferação
IL – 12	Macrófagos	Células Ta0 e células EM	Desenvolvimento das células Ta1 e ativação
IL – 13	Células Ta2	Células B e macrófagos	Divisão, diferenciação e produção de citocinas
IL – 14	Células T	Células B	Proliferação de Ig
IL – 15	Monócitos	Células T e células B	Divisão
IL – 16	Células TCD8 ⁺	Células TCD4 ⁺	Quimiotaxia
IL – 17	Células T	Diversas células	Pró – inflamatório

2.2.2 Eritrócitos

Os eritrócitos são também denominados de glóbulos vermelhos, hemácias ou RBC (do inglês “*Red Blood Cells*”). São células anucleadas, com formato de disco bicôncavo, formadas por um tetrâmetro (duas cadeias α e duas cadeias β) responsável pelo transporte de oxigênio através de quatro moléculas de ferro [15] [29]. Quando os eritrócitos chegam aos pulmões, moléculas de oxigênio são ligadas a molécula de

ferro, gerando a oxi-hemoglobina. Essa ligação é desfeita apenas quando os eritrócitos chegam aos tecidos, onde a pressão do oxigênio é menor. Nos tecidos, os eritrócitos depositam o oxigênio e retiram o gás carbônico, através da ligação de carbo-hemoglobina. Dessa forma, o gás carbônico ou é levado diretamente aos pulmões ou é dissolvido no plasma [13] [16] [17].

Os eritrócitos são originados na medula óssea, sendo formados através dos processos de maturação celular das seguintes células: proeritroblasto, eritroblasto basófilo, eritroblasto policromático, eritroblasto ortocromático e reticulócito. Por meio da diferenciação da célula pluripotencial (*Stem cell*) e estímulos de eritropoietina, são originados os proeritroblastos [13] [18] [19].

As fases finais do processo de maturação são caracterizadas pela formação dos reticulócitos, os quais são também denominados por hemácias jovens. Os reticulócitos possuem mitocôndrias, formato irregular e várias organelas remanescentes em seu interior. A característica mais marcante da maturação celular é a saída dos reticulócitos da medula óssea para a corrente sanguínea, onde em até 72 horas, ocorre a expulsão do seu núcleo celular, originando os eritrócitos [13] [19] [20].

2.2.3 Leucócitos

Os leucócitos são as células de defesa do organismo, constituindo a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa. São também denominados de células brancas, glóbulos brancos ou WBC (do inglês “*White Blood Cells*”) e são classificados em 2 classes distintas: leucócitos granulócitos e leucócitos agranulócitos. Os leucócitos granulocíticos são as células de defesa que apresentam grânulos dispersos no citoplasma, os quais possuem ação anti-inflamatória e antimicrobiana. Além da presença dos grânulos citoplasmáticos, essas células apresentam número variável de lóbulos, sendo denominados de polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos). Os leucócitos agranulócitos são aqueles que não apresentam grânulos visíveis em microscopia óptica, e possuem apenas um lóbulo, sendo denominadas de monomorfonucleares. Os leucócitos agranulócitos são os monócitos e linfócitos [13] [15] [21].

Durante a hematopoese as células destinadas a formarem a série granulocítica (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) sintetizam proteínas e grânulos citoplasmáticos. Os grânulos primários, possuem coloração azuofílica e são responsáveis pela

conversão das células precursoras denominadas de mieloblastos, em promielócitos. Posteriormente, há o aparecimento dos grânulos específicos, responsáveis pela progressão para mielócitos de tipo: neutrófilo, eosinófilos e basófilos [13] [19] [22].

Após a determinação da linhagem granulocítica, as células seguintes são indivisíveis por mitose (sessão 2.1.12), sendo caracterizadas pela presença de núcleo segmentado, capacidade de motilidade, fagocitose e destruição microbiana. Dependendo da linhagem, os leucócitos maduros são capazes de aderir e atravessar a parede das vênulas, com a finalidade de realizar a defesa e reconstrução de tecidos [13] [19] [22].

2.2.4 Neutrófilos

Após a determinação da produção da linhagem de neutrófilos, a sequência de maturação celular é: mieloblasto, promielócito, mielócito, metamielócito, neutrófilo bastonete e neutrófilo segmentado (Figura 4), sendo a produção de neutrófilos estimulada pelo G – CSF. Um ser humano adulto produz mais que 1×10^{11} neutrófilos por dia, sendo assim os neutrófilos representam cerca de 70% das células sanguíneas. Além disso, após deixar o interior da medula óssea cada neutrófilo sobrevive em média 6 horas na circulação sanguínea [12] [13] [19].

Até a fase de metamielócito, as células estão contidas no interior da medula óssea, entretanto a partir da fase de neutrófilo bastonete há a liberação das células na corrente sanguínea. Os neutrófilos bastonetes, medem cerca de $12\mu\text{m}$, com núcleo em forma de ferradura ou bastão, permanecendo nesse estágio até sofrerem a segmentação dos lóbulos. Quando encontradas em abundância na corrente sanguínea essas células indicam a presença de infecção e/ou inflamação aguda [12] [13] [19].

Os neutrófilos segmentados, por sua vez, são caracterizados pelo formato esférico com diâmetro aproximado de 12 a $15\mu\text{m}$ e o núcleo é segmentado de 3 a 5 lóbulos conectados. Os neutrófilos maduros possuem grânulos primários e secundários, contudo os grânulos secundários são mais numerosos, cerca de duas vezes mais que os grânulos primários. Os grânulos primários, são azuofílicos, apresentam peroxidase positiva e medem cerca de 500nm . Esses grânulos são constituídos por grande quantidade de enzimas lisossomais (lizossoma, elastase, proteinase 3 – e α - antitripsina) e fatores bactericidas antes conhecidos como proteínas catiônicas (defensinas, fatores bactericidas e proteína bactericida incrementadora de

permeabilidade). Por sua vez, os grânulos secundários são menores, medindo cerca de 200nm e contém lactoferrina, lisozima e proteína ligada a B12 e outras proteínas [12] [13] [15] [19].

Classificados como células fagocíticas, os neutrófilos têm como função primária identificar, ingerir e destruir microorganismos. As respostas de defesa do hospedeiro consistem em etapas sequenciais de reconhecimento e ativação dos fagócitos e destruição dos microrganismos. Os neutrófilos passam menos de 48 horas na circulação sanguínea antes de migrarem para os tecidos, sendo as primeiras células a chegarem aos locais de infecção e/ou inflamação. Dessa forma, através de contato direto com secreção de proteínas, e da presença de receptores para anticorpos e complementos, essas células são capazes de recrutar e mediar outras células de linhagens diferentes para o local da inflamação e/ou infecção. Após a atuação de defesa essas células sofrem morte celular programada (apoptose) [12] [13] [22].

2.2.5 Eosinófilos

As fases de maturação dos eosinófilos seguem uma linha similar a dos neutrófilos, sendo descrita através dos seguintes estágios: mieloblasto eosinófilo, promielocito, mielocito e eosinófilo maduro, (Figura 4) os quais sofrem a ação de G-CSF, IL-3 e IL-5, responsáveis maturação dos eosinófilos) [12] [13] [22].

Os eosinófilos maduros representam cerca de 2 a 3% dos leucócitos e atuam na imunidade inata e adquirida, estando presentes nos revestimentos das mucosas dos tratos respiratório, gastrointestinal e genito-urinário, podendo aumentar em número em razão do recrutamento dessas células do sangue em condições inflamatórias e/ou infecciosas. Classificados como células granulocíticas, os eosinófilos apresentam grânulos citoplasmáticos que contêm enzimas responsáveis por danificar as paredes celulares de parasitas, ou atuar contra respostas alérgicas. Esses grânulos contêm proteínas básicas que se ligam a corantes ácidos como a eosina [12] [13] [22] [24].

Os grânulos eosinofílicos e seus precursores mielóides são abundantes em peroxidases e enzimas lisossomais, contudo a peroxidase dos eosinófilos é geneticamente diferente dos neutrófilos, conferindo menor ação bactericida quando comparada aos neutrófilos. Dessa forma, a função celular dos eosinófilos é diretamente ligada ao armazenamento das proteínas, tais como: proteína básica maior,

proteína catiônica eosinofílica e neurotoxina derivada do eosinófilo [12] [13] [20].

As proteínas básicas maiores representam mais da metade das proteínas dos grânulos e possuem atividade citotóxica contra infecções parasitárias. Também induzem a liberação de histamina por parte de basófilos e mastócitos, tal processo atua na regulação negativa de processos alérgicos e inflamatórios. As outras proteínas básicas podem provocar a formação de poros transmembranares capazes de causar danos tissulares [11] [12] [13].

2.2.6 Basófilos

Os basófilos são células granulocíticas que atuam na imunidade inata e adquirida. Seus grânulos são preenchidos por vários mediadores inflamatórios e antimicrobianos, sendo assim responsáveis pelas respostas imunes contra reações alérgicas [11] [12] [13].

Apesar das semelhanças estruturais e funcionais com os mastócitos, os basófilos são originados por outras células progenitoras: promielócito, mielócito basófilo, metamielócito basófilo, bastonete basófilo e basófilo (Figura 4). Todo o processo de desenvolvimento e maturação ocorre no interior da medula óssea, sendo apenas o basófilo maduro liberado na corrente sanguínea [12] [13] [19].

Essas células representam menos de 1% dos leucócitos no sangue. Os grânulos dos basófilos são abundantes e densos, capazes de impedir a visualização completa do núcleo em microscópio óptico e apresentam afinidade por corantes básicos. Além disso, são capazes de sintetizar vários mediadores. Embora não estejam normalmente presentes nos tecidos, os basófilos podem ser recrutados para alguns sítios inflamatórios. Assim como os mastócitos, os basófilos expressam receptores para imunoglobulina G (IgG) e imunoglobulina E (IgE) e podem ser estimulados pela ligação do antígeno a IgE presente em sua superfície [12] [13] [15] [22].

2.2.7 Monócitos

Os monócitos são classificados como células agranulocíticas, originadas da seguinte linhagem: monoblasto, pró monócito, monócitos e macrófagos (Figura 4). As funções dos monócitos são a remoção de células mortas ou senescentes, remoção de partículas estranhas, processamento e apresentação de antígenos nas reações

imunológicas e participação nas reações inflamatórias agudas e crônicas. Apresentam, também um importante papel na formação na placa de ateroma (relacionada a aterosclerose) e na destruição tanto de micro-organismos como de células neoplásicas e enxertos [12] [22] [25].

Os monócitos são caracterizados por adquirir sua maturidade funcional nos tecidos na forma de macrófagos. Há duas possibilidades após a saída dos monócitos da medula: ou as células são alojadas no compartimento marginal dos vasos sanguíneos (aderidos as células endoteliais) ou são liberadas na corrente sanguínea [11] [25] [28].

Essas células são os maiores leucócitos, medem de 15 – 20 μ m de diâmetro, entretanto são responsáveis por formar apenas uma pequena porção da população total de células sanguíneas. O núcleo dos monócitos é eucromático (sessão 2.1.11), sendo relativamente grande e irregular, possuindo a característica de invaginação em um de seus lados. Próximo a essa invaginação nuclear, essa célula contém um complexo de Golgi proeminente e vesículas. Os monócitos são células ativamente fagocíticas, contendo numerosos lisossomos. São também são altamente móveis e com um citoesqueleto bem desenvolvido. Por sua vez, o citoplasma apresenta coloração clara [22] [25] [28].

2.2.8 Linfócitos

Os linfócitos são o segundo tipo mais numeroso de leucócitos em indivíduos na idade adulta, enquanto que durante a infância são o tipo leucócito sanguíneo mais numeroso. São formados através da seguinte linhagem: célula indiferenciada linfoide, linfoblasto, pró-linfócito, linfócito médio, linfócito pequeno e plasmócito (Figura 4) [26] [27] [28].

A maioria dos linfócitos circulantes apresenta tamanho pequeno de 6 – 8 μ m de diâmetro e volume citoplasmático aumentado. Muitas vezes, essa alteração ocorre em decorrência de estimulação antigênica. Essas células são encontradas nos tecidos extravasculares (incluindo o tecido linfoide), sendo classificado como o único leucócito que retorna a circulação. A duração de vida dos linfócitos varia de alguns dias a muitos anos. Os linfócitos de vida longa desempenham um papel importante na manutenção da memória imunológica [27] [28].

Os linfócitos sanguíneos são uma coleção heterogênea, principalmente, de células B e T, e consistem diferentes subconjuntos e estágios de atividade e maturidade. Cerca de 85% de todos os linfócitos circulantes no sangue são células T. Doenças de

imunodeficiência primária podem ocasionar danos moleculares de linfócitos T e B. Incluída como os linfócitos estão as Células Matadoras Naturais (do inglês “*Natural Killer*” – NK). As células NK são morfológicamente semelhantes as células T [26] [28].

Os linfócitos B e os linfócitos T, apresentam um núcleo arredondado e com coloração densa, rodeado por um citoplasma escasso, o qual dificilmente é visível em microscopia óptica. No microscópio eletrônico, poucas organelas citoplasmáticas podem ser vistas, a não ser um pequeno número de mitocôndrias, ribossomos isolados, escassos perfis de RE e ocasionais lisossomos. Essas células se tornam móveis quando entram em contato com superfícies sólidas e podem passar entre células endoteliais para sair ou reentrar no sistema vascular. Dessa forma, migram extensamente dentro dos vários tecidos, incluindo os epitélios [28] [29].

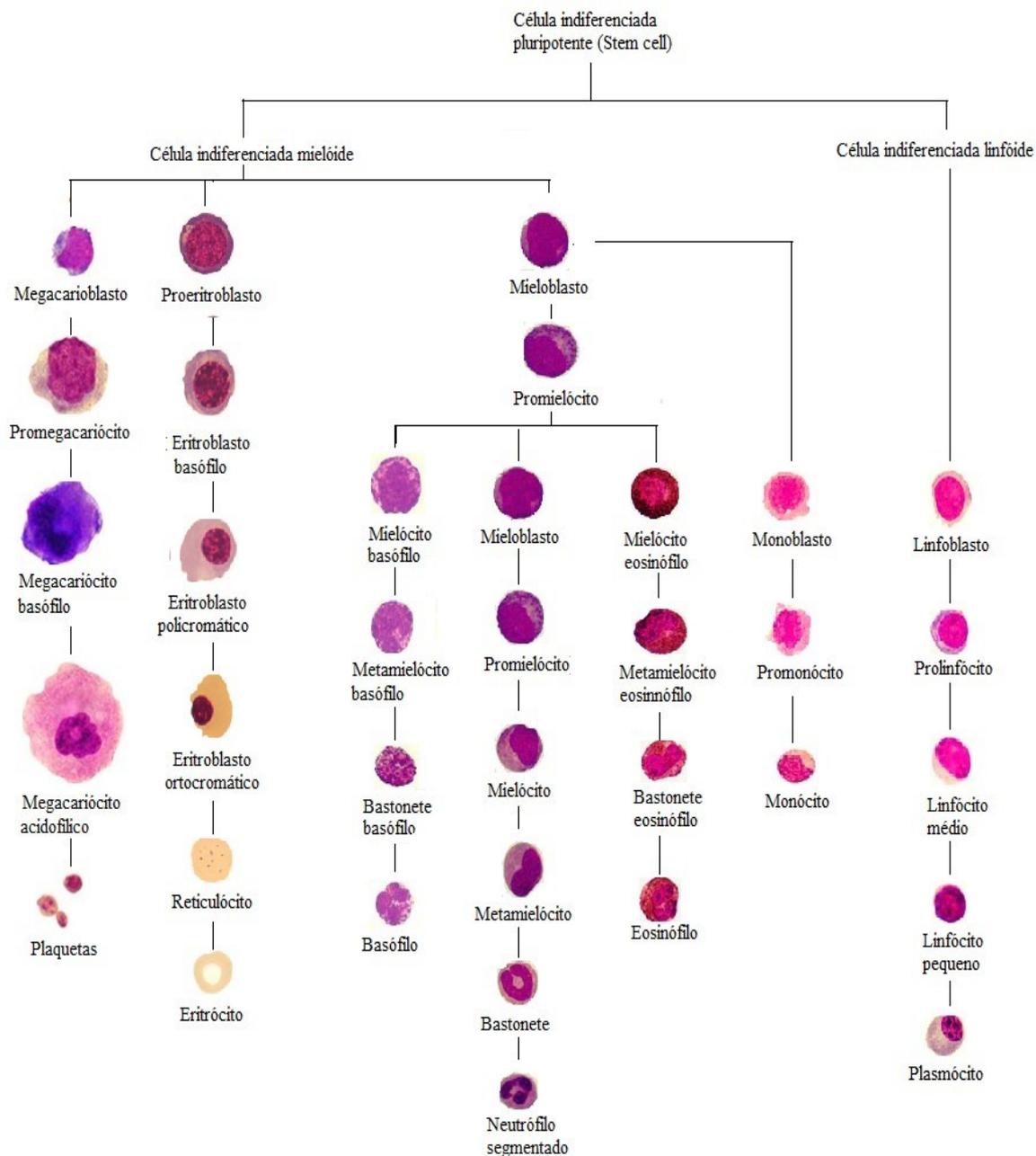


Figura 4 – Processo de síntese, maturação e liberação das células sanguíneas.

2.3 Microscópio óptico: revisão histórica

A primeira noção de microscopia, surgiu por volta do ano de 1595, por meio dos trabalhos do holandês Zacharias Janssen, um fabricante de óculos que através da união de duas lentes em um mesmo eixo, notou a presença de pequenas estruturas em objetos. Posteriormente, no ano de 1665, Robert Hooke, utilizando uma lente ocular e a uma lente objetiva construiu o primeiro microscópio. Esse trabalho originou o livro

Micrographia, onde foram descritos diferentes seres vivos observados sobre a microscopia [4].

Durante 50 anos, o holandês Anton van Leeuwenhock, abrasou lentes e construiu microscópios de alta qualidade para sua época. Dessa maneira, Leeuwenhock foi o primeiro a descrever as várias formas de bactérias em uma gota de água de um lago, sendo suas descobertas constantemente enviadas para a *Royal Society* de Londres. Posteriormente, através de raspados de seus próprios dentes e água proveniente da lavagem de uma pimenta, Leeuwenhock descreveu a presença de estruturas bacterianas. A *Royal Society*, após a análise das cartas, enviou Robert Hooke, que confirmou a veracidade das observações feitas por ele [4].

2.3.1 Estrutura e funcionamento do microscópio óptico

O microscópio tem sido aprimorado ao longo dos anos e sendo utilizado como uma poderosa ferramenta, principalmente para análises nos campos da biologia e medicina [26]. Atualmente, os microscópios são instrumentos mais complexos, entretanto seguem a mesma lógica de utilização de lentes associadas para a ampliação de imagens. Os microscópios são formados por duas partes: a mecânica e a óptica [3] [10].

A parte mecânica é responsável pela sustentação e regulação do instrumento. É formada por uma coluna, que sustenta a estrutura do microscópio; um tubo para a união das lentes objetivas oculares; macrômetro e micrométrico responsáveis pela aproximação e foco entre a lente objetiva e a amostra; e um *charriot* responsável pela movimentação da lâmina contendo a amostra [3] [30].

A parte óptica do microscópio é formada por uma lâmpada de halogênio, um condensador, um diafragma, lentes objetivas e lentes oculares. A lâmpada de halogênio atua como fonte de luz, enquanto o condensador tem como finalidade projetar um feixe de luz sobre a amostra que está sendo analisada. O diafragma permite o controle da luminosidade e a obtenção de um contraste adequado. Após atravessar a amostra esse feixe luminoso, penetra na lente objetiva. A lente objetiva, por sua vez, é responsável por projetar uma imagem aumentada no plano focal da ocular, que novamente amplia a mesma imagem (Figura 5). Assim, a ampliação da imagem é o produto entre o aumento das lentes objetivas associado ao aumento das lentes oculares. Portanto, quando utilizada uma objetiva de 40x e uma ocular de 10x, o

resultado é uma ampliação em 400x [3] [30].

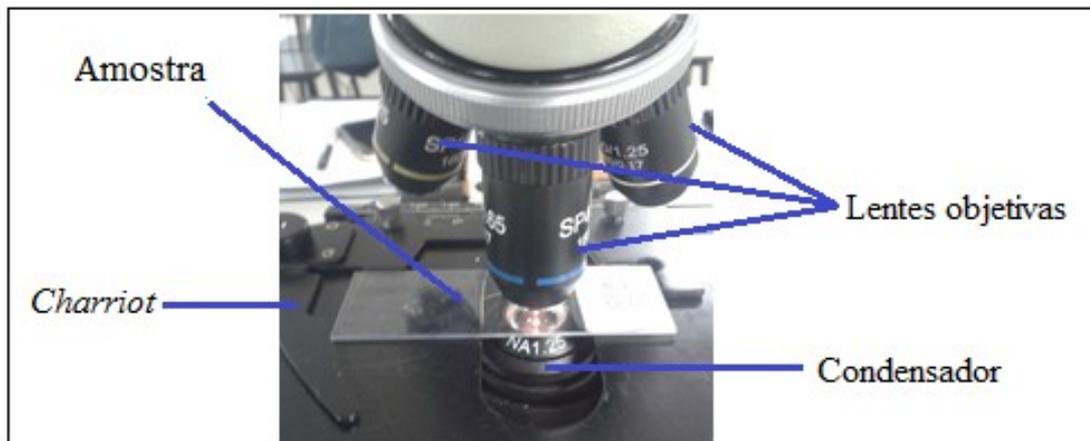


Figura 5 - Captação de imagens através do microscópio óptico

Os olhos humanos são capazes de detectar variações de intensidade e de comprimento de ondas de luz. Essa capacidade humana tem sido ampliada por meio dos avanços no campo da microscopia, que permitiram o aumento da resolução como a utilização de técnicas que compensam a transparência das células. Os componentes celulares são geralmente transparentes, com exceção de alguns pigmentos citoplasmáticos capazes de absorver certos comprimentos de onda de luz. As células vivas apresentam baixa absorção desses comprimentos de onda, pois possuem alta concentração de água, por isso mesmo quando desidratadas esse problema persiste. Para compensar essa limitação são empregados corantes que coram seletivamente as diferentes estruturas celulares. Esses corantes são constituídos por compostos capazes de absorver comprimentos de onda específicos [30].

Os detalhes observados na imagem são fornecidos pelo limite de resolução do microscópio óptico e não pela sua capacidade de aumentar o tamanho das imagens. Assim, o poder de resolução de um sistema óptico está em sua capacidade de detectar detalhes, sendo expresso pelo limite de resolução, o qual é determinado pela menor distância existente entre dois pontos [3]. A capacidade de aumento apenas tem valor, quando é acompanhada por um aumento paralelo do poder resolutivo. Assim, o limite de resolução é dependente da lente objetiva, sendo as lentes oculares incapazes de acrescentarem detalhes. A função das lentes oculares é restrita ao aumento de tamanho da imagem fornecida anteriormente pela lente objetiva [3] [30].

O limite de resolução é dependente: da abertura numérica (AN) das lentes

objetivas e do comprimento de onda da luz aplicada. Por sua vez, o limite de resolução (LR) da lente objetiva é dado pela equação (1):

$$LR = \frac{k \times \lambda}{AN} \quad (1)$$

onde k é uma constante estimada em segundos, sendo numericamente representada por 0,61 e λ (lâmbida) é o comprimento de onda da luz empregada. Devido a maior sensibilidade dos olhos humanos ao comprimento de onda de faixa do verde-amarelo, no cálculo do limite de resolução é empregado o valor de $0,55\mu\text{m}$. Por meio, dessa fórmula é notável que o limite de resolução é diretamente proporcional ao comprimento de onda da luz utilizada, e é também inversamente proporcional a abertura numérica da lente objetiva [2][3] [30].

2.4 Hemograma

O hemograma é um exame laboratorial altamente requisitado na rotina médica, pois fornece diretamente o diagnóstico de patologias ou é utilizado como indicativo para a detecção de diversas doenças. Esse exame é formado pelo eritrograma, leucograma e plaquetograma, os quais avaliam a quantidade e a morfologias dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas, respectivamente [29].

Independente da metodologia utilizada para a realização do hemograma, esse exame deve ser realizado a partir da coleta de 4 ml de sangue venoso coletado em tubo contendo anticoagulante EDTA (do inglês “*Ethylenediamine tetraacetic acid*”) ou heparina, podendo ser coletado com ou sem jejum do paciente. As amostras devem evitar a presença de hemólise (eritrócitos rompidos causando uma contagem menor na quantidade total de hemácias), lipemia (presença de gordura na forma de triglicérides a qual dificulta a leitura de resultados por métodos colorimétricos), coágulos (resultam em contagens inferiores de plaquetas), uso de antibióticos, anti-inflamatórios e antialérgicos horas antes do exame (diminuem a quantidade de leucócitos, podendo mascarar quadros infecciosos ou alérgicos) e evitar fumar 2 horas antes de exame (alteração nas taxa de hemoglobina, hematócrito e índices hematimétricos) [20] [29] [31] [32].

2.4.1 Eritrograma

O eritrograma é a parte do hemograma responsável pela avaliação do número total de eritrócitos (RBC), hemoglobina (Hb), hematócrito (Htc) e os índices hematimétricos: Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM). A contagem total de eritrócitos é utilizada para a detecção de desordens hematológicas. Diminuições no número de hemácias são denominadas de eritropenia, sendo um forte indicativo da presença de anemias ou perda de sangue. Por outro lado, a eritrocitose, é caracterizada pelo aumento da produção de eritrócitos, seja por fatores genéticos ou externos, sendo responsáveis pelo aparecimento das policitemias [18] [29] [31] [33].

As anemias podem ser classificadas tanto de origem genética (anemia falciforme, talassemias, anemia esferocitose, entre outras) quanto por *deficit* alimentar (anemia ferropriva, anemia megablastica, entre outras). Ambos os tipos inspiram cuidados e acompanhamento médico, pois as anemias alimentares causam indisposição, diminuição no rendimento no trabalho, palidez e vertigem. Por sua vez, as anemias genéticas necessitam de cuidados durante a vida toda, pois são responsáveis por crises de dor, internações hospitalares e necessidade de transfusões sanguíneas periódicas. Alguns tipos de policitemia são de origem genética e assim como as anemias genéticas, necessitam de cuidados contínuos, pois é caracterizada pela produção exacerbada de eritrócitos, causando danos ao organismo tais como: infarto e acidentes vasculares encefálicos[14] [25] [29] [33] [34].

2.4.2 Hemoglobina e Hematócrito

A hemoglobina é uma proteína presente no interior dos eritrócitos, sendo responsável pela pigmentação avermelhada das células e pelo transporte O₂ e CO₂ aos tecidos, por meio da associação desses gases a moléculas de ferro. O hematócrito, por sua vez, expressa em porcentagem a quantidade de células sanguíneas presentes no plasma [25] [33] [34]. Os valores de referência aplicados a contagem de eritrócitos (RBC), Hb e Htc são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de referência de contagem total de eritrócitos, concentração de hemoglobina e determinação de hematócrito.

Pacientes	RBC (x 10⁶/mm³)	Hb (g/dl)	Htc (%)
Recém nascido	4,0 – 5,6	13,5 – 19,6	44 – 62
Crianças (3 meses)	4,5 – 4,7	9,5 – 12,5	32 – 44
Crianças (1 ano)	4,0 – 4,7	11,0 – 13,0	36 – 44
Crianças (10 – 12 anos)	4,5 – 4,7	11,5 – 14,8	37 – 44
Gestantes	3,9 - 5,6	11,5 – 16,0	34 – 47
Mulheres	4,0 – 5,6	12 – 16,5	35 – 47
Homens	4,5 – 6,5	13,5 – 18	40 – 54

2.4.3 Índices Hematimétricos

Os índices hematimétricos são dependentes dos valores de Hb, Htc e RBC, tendo como função avaliar a coloração e o tamanho dos eritrócitos. O tamanho dos eritrócitos é avaliado através do VCM, o qual classifica essas células em normocíticas, microcíticas e macrocíticas. As hemácias normocíticas são aquelas que apresentam tamanho normal, enquanto as microcíticas apresentam tamanho menor e as macrocíticas apresentam volume maior que os expressos pelos valores de referência (Tabela 3). Tanto o HCM quanto o CHCM, são responsáveis pela avaliação da coloração dos eritrócitos de acordo com os parâmetros: coloração normal, coloração insuficiente ou coloração exacerbada, sendo classificadas em normocrômicas, hipocrômicas e hiperocrômicas, respectivamente [29] [33] [34] [35].

Tabela 3 - Valores de referência dos índices hematimétricos.

Paciente	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)
Crianças (3 meses)	83 – 110	24 – 34	27 – 34
Crianças (1 ano)	77 – 101	23 – 31	28 – 33
Crianças (10 – 12 anos)	77 – 95	24 – 30	30 – 33
Mulheres	81 – 101	27 – 34	31,5 – 36
Homens	82 – 101	27 – 34	31,5 – 36

É importante ressaltar que a diminuição de apenas um parâmetro não é suficiente para a conclusão de um diagnóstico de anemia ou leucemia. A confirmação dessas patologias depende de exames bioquímicos ou cito-químicos para a conclusão adequada do subtipo de desordem hematológica encontrada. Entretanto, a suspeita dessas patologias muitas vezes é detectada através do hemograma, o qual geralmente apresenta alterações em mais de um dos parâmetros analisados [10] [14] [33] [34]. Pacientes saudáveis apresentam contagem de RBC dentro dos valores de referência, sendo os eritrócitos classificados com normocíticos e normocrômicos. Entretanto, pacientes com anemia ferropriva, por exemplo, apresentam uma redução na contagem total de RBC associada a hemácias microcíticas e hipocrômicas [29].

2.4.4 Leucograma

O leucograma é a parte do hemograma com a função de avaliar os leucócitos granulócitos e agranulócitos (sessão 2.2.3), através da avaliação quantitativa da contagem total e pela contagem diferencial dos leucócitos. A contagem total de WBC indica ou descarta a presença de inflamações e/ou infecções de diversas origens. A diminuição na contagem total de leucócitos é denominada de leucopenia e ocorre em casos de pacientes em tratamento oncológico ou em casos de sedentarismo. Por sua vez, a leucocitose é representada pelo aumento na quantidade de leucócitos, devido a presença de: alergias; infecções parasitárias, virais ou bacterianas, ou leucemias [14] [33] [34] [36] [28].

A contagem diferencial dos leucócitos, avalia a quantidade de cada um dos leucócitos: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos. Os neutrófilos são as células sanguíneas mais abundantes, representando cerca de 70% do total de células sanguíneas circulantes. O aumento quantitativo dos neutrófilos é denominado de neutrofilia, indicando a presença de infecções bacterianas agudas. Entretanto, a neutrofilia também está presente em exames de pacientes com queimaduras, infarto do miocárdio, período pós-operatório, *stress*, uso de glicocorticoides e realização de exercícios físicos intensos [16] [17] [25].

A neutrofilia é dividida em dois tipos: neutrofilia com desvio a esquerda e neutrofilia com desvio a direita. O desvio a esquerda é uma condição presente em casos de infecções agudas, quando há a liberação de grande quantidade de neutrófilos

bastonetes na corrente sanguínea. Por sua vez, o desvio a direita, é caracterizado pela presença de neutrófilos segmentados ou hipersegmentados (mais de 5 lóbulos), sendo indicativo de infecções crônicas. A diminuição da quantidade de neutrófilos é denominada de neutropenia e pode indicar, infiltração medular, imunossupressão pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), alcoolismo, *deficit* alimentar, exposição à radiação ou uso de drogas citotóxicas [10] [11] [23] [31].

Os eosinófilos são células que atuam principalmente nos intestinos, no epitélio e no sistema respiratório. Dessa forma, a eosinofilia é caracterizada pelo aumento numérico dessas células, sendo indicativo de infecções intestinais por helmintos (esquistossomose, ancilostomose, ascaridíase, entre outras), dermatites, dermatoses, leucemia mielóide aguda, leucemia mieloide crônica, anemia perniciosa ou processos alérgicos respiratórios. Entretanto, a diminuição (eosinofilia) ou a ausência dos eosinófilos na corrente sanguínea, é algo normal. Dessa forma, a eosinopenia geralmente é decorrente da administração de hormônios adrenocorticotróficos ou corticoides [8] [32] [38].

Os basófilos são células pouco presentes na corrente sanguínea, entretanto desempenham importante função durante as reações alérgicas por meio da liberação de IgE e histaminas. A basofilia é um processo onde há maior número de basófilos circulantes, sendo indicativo de reações alérgicas ou presença de leucemias. A basopenia, por sua vez, não é classificada como um processo patológico [17] [22] [38].

Já, os monócitos estão amplamente relacionados a processos de fagocitose. Dessa forma, o aumento na produção e liberação dessas células é denominada de monocitose. Esse aumento é sugestivo de reparos em tecidos ou indica a presença de infecções crônicas. Entretanto, a monopenia é indicativo da diminuição da produção e liberação dos monócitos, sendo muitas vezes associada ao estilo de vida do paciente que se expõe ao *stress*. Todos os leucócitos, apresentam variações em suas quantidades de acordo com a idade do paciente [15] [16] [21].

Os linfócitos são células sanguíneas atuantes em processos de infecções virais. O aumento no número dessas células na corrente sanguínea (linfocitose) é diretamente relacionado a presença de patologias virais tais como: hepatites, HIV, rubéola, entre outras [11] [37]. A diminuição na quantidade de linfócitos (linfopenia) pode ser interpretada como HIV em fase crônica, *stress* agudo ou presença de cirrose hepática. É importante ressaltar que a linfocitose é uma condição

normal durante a infância. Assim como os linfócitos, outras células sanguíneas sofrem alterações em suas quantidades de acordo com a fase da vida, conforme apresentado nas Tabela 4 e Tabela 5.

Tabela 4 - Valores de referência de WBC relativo para crianças e adolescentes

Idade	Neutrófilos	Eosinófilos	Basófilos	Linfócitos	Monócitos
< 1 mês	61,0%	3,0%	0,5%	27,5%	7,5%
1 mês	44,5%	2,5%	0,5%	45,5%	7,0%
6 meses	28,5%	2,5%	0,5%	62,0%	5,5%
1 ano	30,0%	2,5%	0,5%	61,5%	4,5%
1 a 5 anos	45,0%	2,5%	0,5%	48,0%	4,0%
>12 anos	54,0%	2,5%	0,5%	37,0%	5,0%

Tabela 5 - Valores de referência de WBC relativo e WBC absoluto para adultos.

WBC total (4000 –11000/mm³)	WBC Relativo (%)	WBC Absoluto (leucócitos/ mm³)
Blastos	0,0 %	0,0
Mielócitos	0,0 %	0,0
Promielócitos	0,0 %	0,0
Metamielócitos	0,0 %	0,0
Neutrófilos segmentados	45,0 -74,0 %	1.700 – 8.000
Neutrófilos bastonetes	0,0 - 4,0 %	00 – 440
Eosinófilos	1,0-5,0 %	50 – 550
Basófilos	0,0 -2,0 %	00 – 100
Linfócitos	20,0-50,0 %	900 – 2.900
Linfócitos atípicos	0,0-0,3 %	00 – 330
Monócitos	2,0-10,0 %	300 – 900

2.5 Hemograma Manual

O hemograma manual é exame totalmente dependente da atuação humana aliada ao uso de equipamentos não automatizados. É um exame mais barato, porém

mais demorado e menos confiável, pois depende de contagens e cálculos realizados pelos profissionais da saúde. É considerado uma boa alternativa para laboratórios de pequeno porte, onde a demanda de exames é pequena e o custo com a aquisição com equipamentos hematológicos e reagentes não condiz com o custo benefício do processo [29].

2.5.1 Contagem manual de eritrócitos

A contagem total de eritrócitos em câmara de *Neubauer* é realizada por meio de uma diluição de 1:200, onde em um tubo de ensaio são depositados 20µl de sangue total em 4ml Líquido de *Hayen* (citrato de sódio diluído em solução fisiológica) com posterior homogeneização. Posteriormente, parte dessa solução é transferida para a câmara de *Neubauer*, a qual é recoberta por uma lamínula de vidro e analisada sob microscopia óptica, onde os eritrócitos serão contados sob a lente objetiva com aumento de 400x [25] [35] [37].

É necessária também a confecção de um esfregaço sanguíneo, através do deslizamento de poucos microlitros de sangue sobre uma lâmina de vidro e posterior uso de corantes, que possibilitam a visualização das estruturas celulares (Figura 6). Esses corantes tem a função de corar as estruturas nucleares e citoplasmáticas das células sanguíneas. Existe uma grande variedade de corantes, entretanto os mais utilizados para esfregaços sanguíneos são o *Leishman* e o panótico. Somente a porção final da lâmina é utilizada para a realização das contagens, pois as porções anteriores apresentam células aglomeradas e/ou sobrepostas, impedindo uma contagem confiável. Esse esfregaço sanguíneo é utilizado para analisar a morfologia e coloração das hemácias [17] [23] [39] [34].



Figura 6- Esfregaço sanguíneo sem corante

As análises quantitativas e morfológicas das células sanguíneas são parâmetros

fundamentais para a detecção de anemias, pois a grande maioria delas resulta em anisocitose (variação de formato), como por exemplo: anemia falciforme (hemácias no formato de foice), anemia esferocitose (hemácias com formato redondo), eliptose hereditária (hemácias alongadas), entre outras. Por meio, do esfregaço sanguíneo é possível também identificar parasitas sanguíneos em fase aguda, tais como: leishmaniose, chagas e malária, entre outros. É importante ressaltar que é necessária apenas a confecção de um único esfregaço sanguíneo durante todo o processo de análise do hemograma manual, sendo a mesma lâmina utilizada para as análises de hemácias, leucócitos e plaquetas [16] [17] [25] [31].

2.5.1.1 Determinação do hematócrito

A determinação do Htc consiste no preenchimento de 2/3 de um capilar de vidro com sangue total. Posteriormente, uma das extremidades do capilar deve se vedada através de fontes de calor ou uso de massa, visando o impedimento do escape do sangue. Esse capilar deve ser colocado em centrífuga de micro hematócrito em rotação de 1500 *rpm* (rotações por minuto) durante 5 minutos. Após a centrifugação há a separação do sangue total em 2 fases: uma mais clara, formada por plasma, e outra mais densa, formada pela sedimentação das células sanguíneas. Para a leitura do resultado é necessário medir em milímetros o tamanho do sedimento formado no fundo do capilar [11] [16] [37]. A Figura 7, ilustra as etapas necessárias para a determinação do hematócrito por metodologia manual.

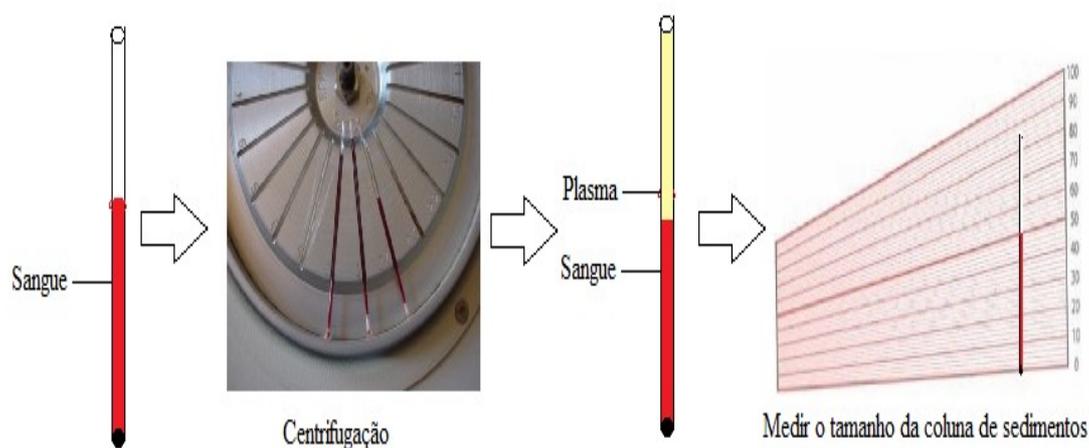


Figura 7 - Etapas para a determinação do hematócrito

2.5.1.2 Concentração de Hemoglobina

A Hb, por sua vez, pode ser determinada através do equipamento denominado espectrofotômetro. Diversas metodologias estão disponíveis no mercado para a quantificação da hemoglobina, apresentando variações tanto no tempo gasto para a realização do exame quanto na quantidade de amostra necessária e reagentes utilizados durante o processo. A metodologia mais utilizada para a dosagem de hemoglobina é o método da cianometemoglobina, a qual utiliza o líquido de *Drabkin*. Esse líquido pode ser composto por ferrocianeto de potássio (K_3FeCN_6) cianeto de potássio (KCN) ou fosfato de potássio anidro (KH_2PO_4) [29] [33].

Ao entrar em contato com o líquido de *Drabkin*, as hemácias são hemolisadas, havendo a liberação da Hb livre, que por sua vez é convertida em metemoglobina (ferro hemoglobínico na forma férrica). Por ação do cianeto de potássio, a metemoglobina é transformada em cianometemoglobina, um composto estável que absorve luz em 540nm. A concentração de hemoglobina da amostra é calculada a partir de um padrão comercial de hemoglobina, pré-determinada pelo fabricante [23] [29] [33] [39].

2.5.1.3 Determinação dos Índices Hematimétricos

Os índices hematimétricos por sua vez, são determinados por meio de fórmulas matemáticas dependentes dos valores obtidos de RBC total, Hb e Htc [11] [16] [31]. A Equação 2 é utilizada para a determinação do VCM:

$$VCM = \frac{HTC \times 10}{RBC} \quad (2)$$

, onde o Htc, representa o valor do hematócrito obtido pela centrifugação do sangue total, e RBC indica a contagem total de hemácias obtida por equipamentos automatizados ou por contagem manual em câmara de *Neubauer*. O resultado é expresso entre 80 – 90 fl, os quais indicam a ausência de patologias [11] [16] [31]. Na Equação 3 é apresentada a determinação do HCM:

$$HCM = \frac{Hb \times 10}{RBC} \quad (3)$$

onde Hb, indica a concentração de hemoglobina e RBC é a contagem total de hemácias. O valor de referência é dado entre 26 a 34 picogramas. O CHCM, através da Equação 4:

$$CHCM = \frac{Hb \times 100}{Htc} \quad (4)$$

onde Hb, representa a hemoglobina e Htc o hematócrito [11] [16] [31]. O valor de referência é expresso de 31, 5 – 36 g/dL.

2.6 Leucograma manual

A contagem de WBC é realizada através de contagem total e contagem diferencial, as quais são contagens com metodologias distintas, porém complementares. É importante ressaltar que as contagens são expressas em valores absolutos e relativos [33].

2.6.1 Contagem total de leucócitos

A contagem total de WBC é realizada na câmara de *Neubauer*, através de uma diluição de 1:20, onde em um tubo de ensaio são depositados 0,4 ml de líquido de *Turk* e 20 µl de sangue total. O líquido de *Turk*, pode ser constituído por ácido acético glacial a 2% ou ácido clorídrico a 1%, os quais podem ser corados com azul de metileno ou violeta genciana com a finalidade de diferenciá-lo do líquido de *Hayer* [17] [33].

2.6.1.1 Contagem diferencial de leucócitos

A contagem diferencial de leucócitos é realizada através do esfregaço sanguíneo previamente confeccionado para a avaliação dos eritrócitos. Nesse processo devem ser contados 100 leucócitos presentes na porção final da lâmina de esfregaço sanguíneo. É necessário anotar manualmente, quantos subtipos de leucócitos foram contados por campo. Ao atingir o total de 100 células contadas, o profissional deve encerrar a identificação e contagem dos leucócitos e realizar os cálculos de WBC relativo e WBC absoluto (valor expresso em porcentagem) [17] [26] [33].

2.7 Hemograma automatizado

A automação do hemograma implica em maior agilidade na realização dos exames e na liberação dos laudos, entretanto são uma metodologia mais cara quando comparada a metodologia manual. Na década de 1950, a *Coulter Eletronic, Inc* introduziu o princípio de impedância para as contagens de células [17] [29].

O princípio da impedância é baseado no fato das células, más condutoras de eletricidade estarem diluídas em uma solução condutora de eletricidade. Essa suspensão de células é pesada por meio de um orifício com diâmetro em torno de 100 μm , onde há a passagem de uma corrente elétrica. Essa corrente elétrica é originada a partir de 2 eletrodos: um localizado no lado interno do orifício e carregado positivamente, e outro localizado no lado externo do orifício, carregado negativamente. Dessa maneira, cada vez, que a célula passa através do orifício interrompe a corrente elétrica e há uma alteração na condutância, conseqüentemente cada interrupção é contada como uma partícula [17].

O princípio da impedância, com o passar dos anos, foi capacitado com contadores capazes de medir o volume celular. Tal evolução, foi o resultado da correlação da proporcionalidade da magnitude da interrupção da corrente elétrica (pulsos) com o volume celular. Dessa forma, foi observado que pulsos pequenos correspondiam a volumes pequenos, enquanto pulsos grandes eram resultantes de volumes maiores [29].

A partir dessa correlação entre a magnitude da corrente elétrica com o volume celular, foi criado um novo conceito denominado de conceito de limiar (*threshold*). O conceito limiar é responsável pela classificação das células de acordo com seu volume, assim permitindo a detecção do volume globular. O volume globular corresponde ao hematócrito realizado no hemograma manual, entretanto recebe esse nome pois é realizado sem a necessidade de microcentrifugação. Tanto o princípio da impedância quanto o conceito do limiar são responsáveis pela introdução de aparelhos multiparâmetros no mercado. Esses aparelhos, são capazes de realizar contagens celulares simultâneas usando canais separados para as contagens [17] [29].

Na década de 1960 a técnica de condutividade foi desenvolvida, tendo como base a corrente eletromagnética de alta frequência, a qual é responsável por fornecer informações a respeito do volume celular, o tamanho do núcleo e o conteúdo

citoplasmático de granulações. Posteriormente, em 1970 foram introduzidas as técnicas de dispersão de raio laser (*laser light scatter*) e do foco hidrodinâmico (*hydrodynamic fluid*). Ambas as técnicas preservam os núcleos e as granulações dos leucócitos, retraindo apenas a membrana citoplasmática. Essas técnicas são baseadas nos princípios de difração, refração e reflexão da luz emitida [17].

Entretanto, nessas técnicas as hemácias são indetectáveis. Para solucionar esse problema os eritrócitos começaram a ser quantificadas por meio de citometria de fluxo e foco hidrodinâmico, onde essas células são contadas uma a uma, através de um capilar extremamente fino. As hemácias, então, são submetidas um feixe de laser, onde a dispersão da luz é analisada em diferentes ângulos de desvio. Nesse contexto, a zero grau é indicado o tamanho celular, a dez graus há indicação da estrutura interna e a 90 graus ocorre a identificação de leucócitos e suas características de lobularidade e seu conteúdo de granulações [17].

Atualmente, há uma grande quantidade de aparelhos multiparâmetros, que utilizam as técnicas de impedância, da condutividade e da dispersão da luz emitida. Essas tecnologias podem ainda ser associadas as características citoquímicas das células (como a mieloperoxidase) e a utilização de reagentes que realizam a análise de determinados tipos celulares. Entretanto, antes de adquirir um aparelho hematológico é necessário levar em consideração os seguintes parâmetros:

- Aparelho de automação *versus* tipo de paciente atendido;
- Número de hemogramas por dia x amostras/ tempo gasto pelo aparelho;
- Custo de cada hemograma;
- Controle de qualidade;
- Assistência técnica;
- Interfaceamento,
- Capacitação dos funcionários.

Entretanto, mesmo com a aquisição de equipamentos hematológicos, o hemograma manual não é uma prática dispensada, sendo recomendada para a confirmação de laudos hematológicos de pacientes pediátricos, pacientes com mais

de 75 anos de idade, pacientes oncológicos, pacientes com suspeita de leucemia ou policitemia, pacientes com leucocitose e pacientes em estado grave (principalmente em estado de internação em Unidade de Terapia Intensiva - UTI) [29].

2.8 Processamento de Imagens

A visão é o sentido humano mais avançado atuando diretamente na percepção humana. Os humanos são limitados a banda visual do espectro eletromagnético (EM), enquanto as máquinas projetadas para exibição de imagens cobrem quase todo espectro EM. Dessa maneira, as máquinas podem operar na geração de imagens por fontes que os humanos não são acostumados a associar com imagens, como por exemplo: ultrassom, microscópio eletrônico e imagens geradas por computador. Assim o processamento de imagens digitais engloba um amplo e variado campo de aplicações [40].

Uma imagem pode ser definida como uma função bidimensional, $f(x, y)$, onde x e y são as coordenadas do plano espacial, e a amplitude de f em qualquer par de coordenadas (x, y) é denominada de intensidade de escala de cinza. Quando x , y e os valores de amplitude de f são todos finitos são chamados de imagem digital. A imagem digital é composta por um número finito de elementos, onde cada um tem sua própria localização e seu próprio valor, sendo denominados por *pixels* [40] [41].

Dessa maneira, o interesse por métodos de processamento de imagens digitais é proveniente de duas principais áreas de aplicação (1) melhoramento de informação pictórica para interpretação humana e (2) processamento de dados de imagens para estocagem, transmissão e representação para percepção de máquina autônomas [40].

Os processos computadorizados são classificados em 3 tipos: baixo, médio e alto. O baixo nível de processamento envolve operações primitivas como o pré-processamento, com a finalidade de reduzir de ruídos, aprimorar contraste e nitidez da imagem, sendo caracterizado pelo fato de que ambas as entradas e saídas estão na própria imagem. O processamento de médio nível em imagens envolve tarefas como: segmentação (dividir uma imagem em regiões ou objetos), descrição dos objetos para redução na forma adequada para processamento computacional e classificação (reconhecimento) de objetos individuais. O processamento de nível médio é caracterizado pelo fato de que as entradas geralmente estão na imagem, enquanto suas saídas são os atributos extraídos dessas imagens (por exemplo: bordas,

contornos e identificação individual de objetos). Por sua vez, o alto nível envolve em um conjunto de reconhecimento de objetos semelhantes, englobando desde a análise de imagem até funções cognitivas normalmente associadas a visão [40] [41].

Entretanto, não há uma concordância geral na literatura a respeito de onde o processamento de imagens termina e outros relatos de áreas, como análises de imagens e visão computacional começam. Essa diferenciação, muitas vezes, é feita através da definição de processamento de imagem como uma disciplina onde ambas as entradas do processo são imagens [40] [41].

2.9 As Origens do Processamento de Imagens Digitais

A primeira aplicação de imagens digitais foi realizada pela indústria de jornais, através do envio de imagens por meio de um cabo submarino entre Londres e Nova York. A introdução do sistema de transmissão de imagens pelo cabo *Bartlane* no início de 1920, teve como vantagem a redução do tempo de mais de uma semana para apenas 3 horas. Após atravessarem o Atlântico, as imagens eram recebidas por um equipamento especializado, o qual era responsável pela reconstrução e impressão da imagem [40] [41].

Contudo, foram relatados alguns problemas iniciais na qualidade visual da imagem digital, relacionados a procedimentos de impressão e distribuição da intensidade de níveis de cor. Por esse motivo, o método de impressão usado foi encerrado no começo da década de 1920, sendo substituído por uma técnica baseada na reprodução de fotografias feitas em fitas perfuradas na recepção terminal do telegrafo [40].

Em 1929, o sistema *Bartlene* foi melhorado para codificar imagens em 15 níveis distintos de cinza. Durante esse período, houve a introdução ao sistema para o desenvolvimento de uma placa de filme via feixes de luz, que era modulado pela fita de imagem codificada. Tal fato melhorou consideravelmente o processo [40].

Os exemplos citados envolvem somente imagens digitais e não consideram o processamento de imagem digital, pois os computadores ainda não haviam sido inventados. Dessa forma, é possível constatar que a história do processamento de imagens digitais é dependente do desenvolvimento de computadores digitais e tecnologias que suportassem a inclusão da estocagem de dados, apresentação e transmissão [40].

Por meio da invenção do ábaco há mais de 500 anos na Ásia menor, surgiu o fundamento para a invenção dos computadores atuais, os quais começaram a ser desenvolvidos nos últimos 200 anos. Entretanto, apenas em 1940, foram criados os 2 conceitos principais para o desenvolvimento do computador moderno digital: (1) uma memória para segurar um programa armazenado e seus dados e (2) ramificação computacional. Essas duas ideias são a fundação da unidade de processamento central (CPU). Começando com Von Neumann, foram uma série de avanços chaves que conduziram aos computadores atuais capazes de realizarem processamento de imagens digitais [40] [41] [42].

Brevemente, esses avanços podem ser resumidos como os seguintes: (1) a invenção do transistor por *Bell Laboratories* em 1948; (2) o desenvolvimento em 1950 e 1960 de programações de linguagens de alto nível *COBOL* (*Common Business - Oriented Language*) and *FORTRAN* (*FORmula TRANslation*); (3) a invenção de um circuito integrado por *Texas Instruments* em 1958; (4) o desenvolvimento de sistemas operacionais no começo de 1960; (5) o desenvolvimento do microprocessador (um único *chip* consiste em uma unidade de processamento central, memória e controles de entrada e saída) pela *Intel* no início de 1970; (6) introdução dos computadores pessoais em 1981; e (7) progressiva diminuição dos componentes (1970 – 1980). Atualmente, com esses avanços são desenvolvidos em áreas de estocagem em massa e sistema de apresentação, os quais são requisitos fundamentais para o processamento de imagens [40] [41] [42].

Os primeiros computadores capazes de executar tarefas de processamento de imagens significativos foram criados no início de 1960. Um trabalho utilizando técnicas computacionais para o melhoramento de imagens adquiridas por uma sonda espacial começou com o *Jet Propulsion Laboratory* (Pasadena, Califórnia) em 1964, quando imagens da lua foram transmitidas pela *Ranger 7* e foram, posteriormente, processadas por um computador, com a finalidade de corrigir vários tipos de distorção da imagem herdadas na borda da televisão e da câmera [40].

Em paralelo com as aplicações espaciais, as técnicas de processamento de imagens começaram a ser utilizadas em imagens médicas, observações remotas, recursos terrestres e astronomia. No início da década de 1970, foi inventada a tomógrafa computacional axial (CAT) também denominada de tomografia computadorizada (CT) que é um dos mais importantes eventos na aplicação de processamento de imagens de diagnósticos médicos. A CAT é um processo em que

um anel de detectores rodeia um objeto (ou paciente) e uma fonte de Raio X conectada ao anel detector, o qual é rotacionado sobre o objeto. Os raios X, por sua vez, passam através do objeto e são coletados pelos detectores do anel. A tomografia consiste em algoritmos que usam os dados obtidos para construir uma imagem que represente uma porção através do objeto em 3D [40] [43] [44].

A tomografia foi inventada por Sir Godfrey N. Hounsfield e Professor Allan M. Cormack, que ganharam o prêmio Nobel de medicina em 1979 pela invenção. É importante ressaltar que o Raio X foi descoberto em 1895, por Wilhem Conrad Roentgen, que recebeu o prêmio Nobel de física em 1901. A partir de invenções como essas, 100 anos depois conduziram a mais ativa aplicação nas áreas de processamento de imagens dos dias atuais [43] [44] [45].

Outro exemplo é observado a partir dos principais usos de imagens com base nos raios gama utilizados na medicina nuclear. A abordagem consiste em injetar no paciente, um isótopo radioativo que emite raios gama e observar seu decaimento. As imagens são produzidas pela coleta da emissão dos raios gama pelos detectores. O princípio é o mesmo que o raio X e a tomografia [46] [47] [48].

A angiografia é outra grande aplicação na área chamada de melhoramento radiográfico. Esse procedimento é usado para obtenção de imagens dos vasos sanguíneos. Um pequeno tubo flexível, denominado de cateter é inserido dentro de uma artéria ou veia da virilha. O cateter é colocado no vaso sanguíneo e guiado até o local de interesse, onde um raio X de médio contraste é injetado. Esse contraste melhora os vasos sanguíneos e possibilita a visualização de qualquer irregularidade e/ou bloqueio [40] [50].

2.10 Software Matlab

Matlab é definido como uma poderosa técnica de ambiente computacional e linguagem de programação de alto nível e ambiente interativo para computação numérica, visualização e programação. É capaz de analisar dados, desenvolver algoritmos, criar modelos e aplicações, construir ferramentas matemáticas capazes de explorar múltiplas abordagens e pesquisar uma solução mais rápida do que palminhas ou linguagens tradicionais de programação, como C/C++ ou *Java*. Pode ser utilizado para processamento de vídeo e imagem, sistemas de controle, testes e

mensurações, finanças computacionais e biologia computacional. Além disso, é uma ferramenta de fácil uso [51] [52].

Matlab é uma abreviação de “*Matrix laboratorial*”. Enquanto outras linguagens computacionais trabalham, principalmente, como números um de cada vez, o *Matlab* é capaz de operar em todas as matrizes e comandos. Todas as variáveis do *Matlab* são comandos multidirecionais, independentemente do tipo de dados sob análise. Uma matriz é um comando com 2 dimensões frequentemente utilizada para álgebra linear [51] [52] [53].

A aplicabilidade do *Matlab* em processamento de imagens digitais é uma extensiva configuração de funções de processamento de arranjos multidimensionais de cada imagem (arranjos numéricos bidimensionais). Essas funções e as expressividades da linguagem do *Matlab* produzem fáceis operações de processamento de imagens para escrever de maneira compacta e clara, assim fornecendo uma prototipagem de *software* ideal para a solução de problemas de processamento de imagens [40] [41] [51].

2.10.1 Imagem Digital

Uma imagem pode ser definida como uma função bidimensional $f(x, y)$, onde x e y são coordenadas espaciais, e a amplitude de f para qualquer par de coordenadas é chamada de intensidade de imagem. O termo escala de cinza é empregado frequentemente para referir a intensidade de imagens monocromáticas. A intensidade do nível de cada *pixel* é uma informação essencial que forma a imagem. Os valores da intensidade do *pixel* são também utilizados para a realização de operações como segmentação ou filtragem. Além disso, é possível utilizar a intensidade para extrair informações, como por exemplo, número de células em uma imagem [52] [54] [55].

A intensidade do nível da escala de cinza descreve quão brilhante ou escuro o *pixel* corresponde na sua posição apresentada. Há muitas formas que a intensidade de cada *pixel* é registrada. Um *pixel* pode ser representado por 0 ou 1, onde 0 indica que o *pixel* possui baixa intensidade (ou preto em muitos casos) e 1 descreve o *pixel* com alta intensidade (ou branco) [52] [54] [55].

Imagens coloridas são formadas pela combinação de imagens individuais. No sistema de cor RGB (do inglês “*Red, Green and Blue*”) uma imagem colorida consiste

em 3 imagens monocromáticas individuais, referidas como imagens primárias ou componentes vermelho, verde e azul. Por essa razão, muitas técnicas desenvolvidas para imagens monocromáticas podem ser estendidas a imagens coloridas pelo processamento dos 3 componentes de imagens individualmente [40] [52] [57].

Além disso, uma imagem pode ser contínua com respeito as coordenadas x e y e também na amplitude. A conversão de tal imagem para a forma digital requer que as coordenadas, bem como a amplitude sejam digitalizadas. A digitalização dos valores das coordenadas é chamada de *sampling*, a digitalização da amplitude é chamada de *quantization* [40] [52] [57].

O resultado da amostragem e quantização é uma matriz de números reais. São utilizadas 2 formas principais para representar as imagens digitais. É assumido que a imagem $f(x, y)$ é uma amostra que resulta na imagem tem M linhas e N colunas, conforme apresentado na Figura 8. A imagem original é definida por ser $(x, y) = (0,0)$. Os próximos valores de coordenadas ao longo da primeira linha da imagem são $(x, y) = (0,1)$. A notação $(0,1)$ é usada para significar a segunda amostra ao longo da primeira linha [40] [52].

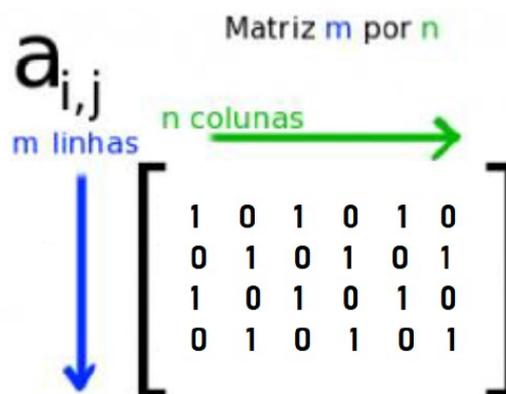


Figura 8 - Matriz

Figura 8 - Matriz

2.10.2 Operações morfológicas

O processamento digital de imagens é uma área totalmente dependente da morfologia matemática, pois utiliza conceitos derivados de geometria e álgebra, tais como: reticulados completos, teoria dos conjuntos, convexidade, distância e translação. Operações morfológicas constituem um amplo conjunto de operações de processamento

de imagem com base na forma das imagens binárias [58] [59] [60].

Como dito anteriormente, uma imagem pode ser definida como $f(x, y)$. Neste contexto, seja f função que defina uma imagem em escala de cinza definida em, $\mathfrak{R}^2 \rightarrow \mathfrak{R}$. Assim, B seja um elemento de estruturação planar tal que $B \subseteq \mathfrak{R}^2$ e ψ seja um operador de imagem que transforme uma imagem em tons de cinza em outra imagem de acordo com a técnica de operações morfológicas, a qual consiste nos seguintes passos: dilatação; erosão; abertura; fechamento e reconstrução [58] [59] [60].

A dilatação consiste em adicionar *pixels* às bordas dos objetos em uma imagem com o objetivo de reparar quebras ou possíveis elementos intrusos na imagem. A erosão, por sua vez, consiste na remoção de *pixels* das bordas, sendo empregada para dividir objetos vinculados ou remover extrusões. Erosão e dilatação são responsáveis por substituírem o valor da imagem f em um *pixel* (x, y) pelo ínfimo (supremo) dos valores de f sobre um elemento estruturante B (B' - reflexo de B em torno da origem), que resulta em encolhimento/expansão da imagem [58] [59] [60]. A erosão e a dilatação são apresentadas nas Equações 5 e 6:

$$\psi_{erosion}(f) = \underset{(\varepsilon, \eta) \subseteq B}{\Lambda} f(x + \varepsilon, y + \eta) = (f \ominus B), \text{ e} \quad (5)$$

$$\psi_{dilation}(f) = \underset{(\varepsilon, \eta) \subseteq B}{\Lambda} f(x - \varepsilon, y - \eta) = (f \oplus B). \quad (6)$$

Essas equações têm a função de desfazer os efeitos da erosão (dilatação) pela aplicação da operação de dilatação (erosão) associada. A abertura é aplicada para a eliminação de saliências e / ou contornos [60]. Matematicamente é definida pela Equação 7:

$$\psi_{open}(f, a) = \underset{t \in \mathfrak{R}}{\Lambda} \{(x, y) \in \bigcup \{F_s(t) : |F_s(t)| \geq a\}\}, \quad (7)$$

onde, $F_s(t)$ representa uma seção transversal da intensidade da imagem f . O $F_s(t) | s = 1; 2; 3$ são granulações da seção transversal $F(t)$ da imagem f . Além disso, a é considerado o nível de limiar. Por sua vez, o fechamento é utilizado para mesclar espaços longos e finos, eliminar pequenos furos, preencher espaços e suavizar os contornos. A reconstrução

é responsável por extrair informações relevantes referentes às formas presentes na imagem [58] [59] [60].

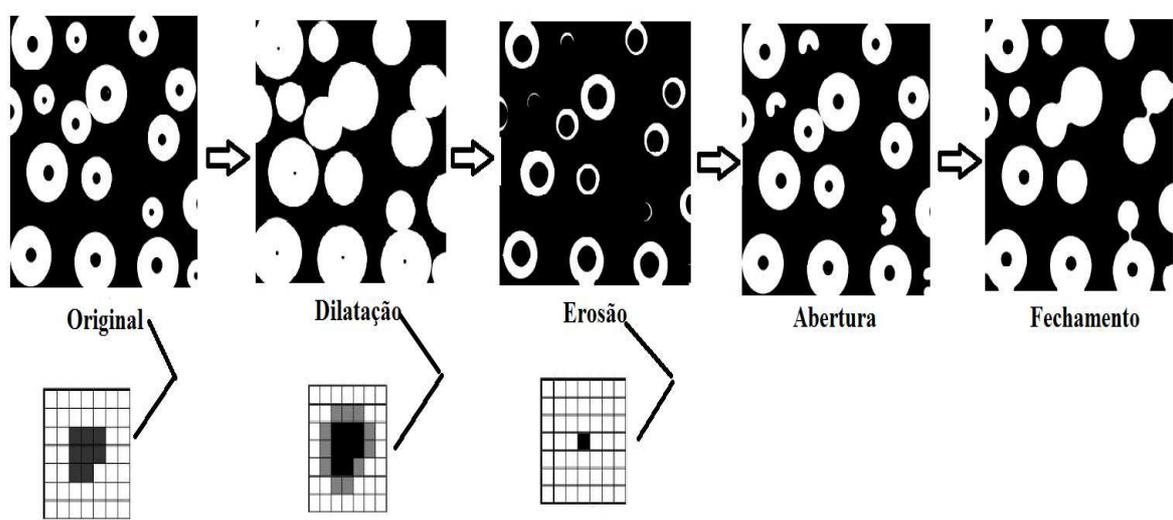


Figura 9 - Etapas do processo de operações morfológicas

2.10.3 Transformada *Watershed*

A ideia intuitiva da transformada *Watershed* é proveniente da geografia: paisagem de relevos de topografia responsáveis pela formação de bacias hidrográficas, sendo essas divididas em linhas de domínio visando a atração da água da chuva sobre uma região. Uma abordagem alternativa é imaginar uma paisagem sendo imersa em um lago, com buracos perfurados em mínimos locais [61] [62] [63] [64].

Dessa forma, as bacias hidrográficas enchem com água começando no local mínimo, até que a água encontra barreiras. Quando o nível de água está no pico mais alto na paisagem o processo é cessado. Como resultado, a paisagem é fracionada em regiões ou bacias separadas por barragens chamadas de linhas de bacia hidrografia, conforme apresentado na Figura 10 [61] [62] [63] [64].

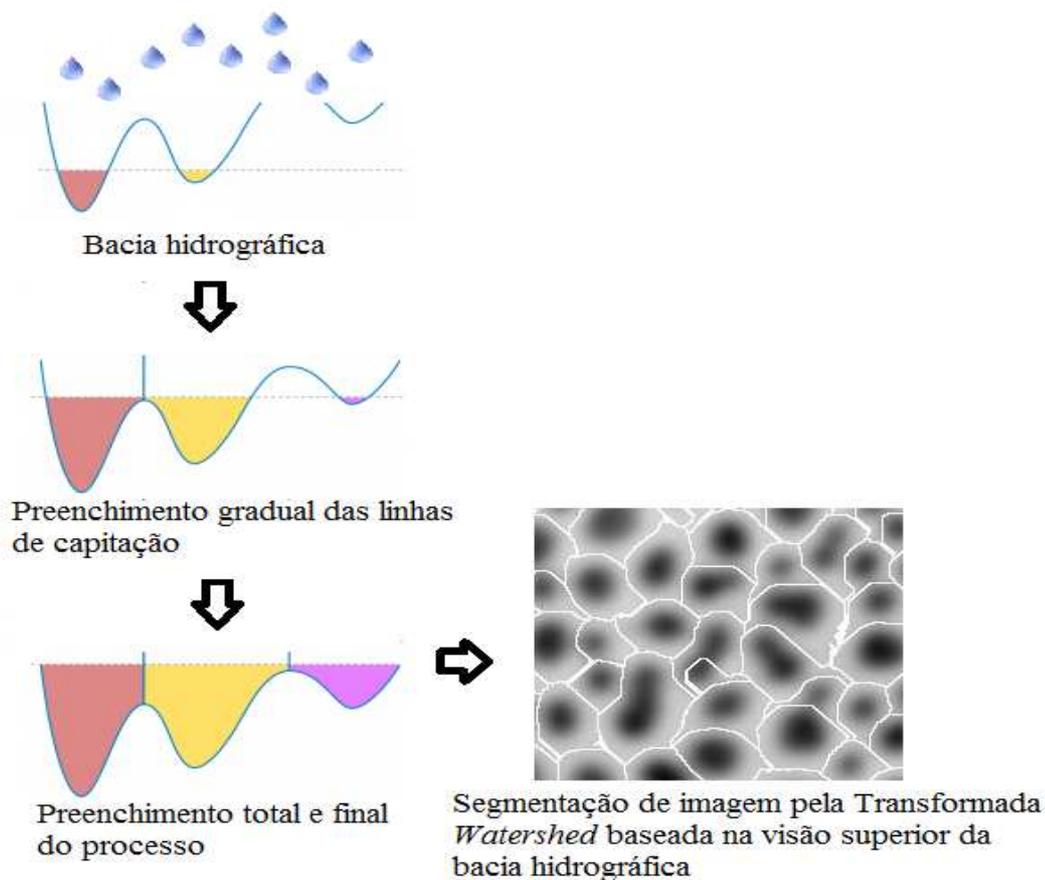


Figura 10 - Representação da lógica da Transformada *Watershed* baseada na observação da natureza

Este conceito foi estudado há muito tempo para definições de linhas de divisão de água, sendo o conceito introduzido na ciência de imagens digitais por Digabel e Lantuéjoul, e mais tarde, já denominada de transformada *Watershed* foi utilizada por Beucher e Lantuéjoul com o mesmo objetivo de identificar regiões em uma superfície, com a finalidade de detectar seus contornos. Estas propostas introdutórias, juntamente com o trabalho em segmentação morfológica de Meyer e Beucher, estabeleceram o uso da transformada *Watershed* [61] [62] [63] [64].

As principais vantagens da segmentação pela transformada *Watershed* são: (1) os resultados são regiões conectadas como limites fechados de um único tipo de *pixel*, diferentemente da abordagem tradicional que, geralmente, apresenta bordas com contornos desconectados; (2) as regiões de contorno aderem bem aos limites reais do objeto e (3) a combinação de regiões produzidas pela segmentação pela Transformada *Watershed* é igual a imagem toda [61] [62] [63] [64].

Através dessas analogias a transformada *Watershed* propõe uma abordagem morfológica para o problema de segmentação de imagens, interpretando-as como

superfícies, onde cada *pixel* corresponde a uma posição e os níveis de cinza que determinam as altitudes. A partir desta noção, é possível identificar “bacias hidrográficas”, definidas por mínimos regionais e suas regiões de domínio [61] [62].

Dessa maneira, considerando as características morfológicas distintas entre leucócitos e hemácias previamente descritas em sessões anteriores, a transformada *Watershed* atua na detecção, rotulação e contagem das hemácias contidas na imagem [61] [62].

Dessa forma, é possível a diferenciação celular relacionada ao tamanho e reconhecimento da mesma intensidade de coloração celular, onde as células são agrupadas e rotuladas, e por fim contadas segundo o algoritmo descrito no capítulo 4.

2.10.4 Transformada *Hough*

A Transformada *Hough* foi introduzido por P.V.C. Hough em 1962, sob a forma de uma patente. Sua aplicação teve como base a física de partículas, visando detectar as linhas e arcos nas fotografias obtidas em câmaras de nuvens. A transformada *Hough* é classificado na faixa intermediária da hierarquia de processamento de imagens. Essa metodologia é aplicada a imagens previamente tratadas e livres de detalhes irrelevantes. Sendo assim, esse método é dependente de processos de: filtragem, limite e detecção de borda. O método atribui um rótulo lógico a um objeto que, até então, existia apenas como uma coleção de *pixels*. Portanto, pode ser classificado como um procedimento de segmentação [65] [66] [67].

A ideia por trás do método é simples: as formas paramétricas em uma imagem são detectadas através de pontos acumulados no espaço de parâmetros. Dessa maneira, se uma forma particular estiver presente na imagem, o mapeamento de todos os seus pontos no espaço de parâmetros deve ser agrupado com base nos valores determinados como parâmetros que correspondem a essa forma. Essa abordagem mapeia elementos distribuídos e disjuntos da imagem em um ponto de acumulação localizado. Tal característica fornece ao mesmo tempo benefícios e desvantagens ao método. Formas parcialmente ocluídas ainda são detectadas na evidência de suas partes visíveis, ou seja, todos os segmentos do mesmo círculo contribuem para a detecção desse círculo, independentemente das lacunas entre eles. Por outro lado, as informações locais inerentes aos pontos da forma, como a adjacência, são perdidas. Dessa forma, os pontos finais de arcos circulares e segmentos de linha devem ser determinados em uma etapa subsequente

A carga computacional do método aumenta rapidamente com o número de parâmetros que definem a forma detectada. O número de parâmetros são distintos de acordo com a forma: linhas têm dois parâmetros, círculos três e elipses têm cinco. O método *Hough* foi aplicado a todos eles, mas a elipse provavelmente está no seu limite máximo de praticidade. Sua maior força reside na visão especializada, como controle de qualidade de fabricação, análise de fotografias aéreas e análise de dados em física de partículas [65] [66] [67].

2.11 Síntese do capítulo 2

Nesse capítulo é possível compreender que as células são as unidades fundamentais da vida na Terra, tendo sofrido inúmeras modificações desde seu surgimento. Essas modificações permitiram a evolução dos seres vivos até a forma e função que possuem atualmente. Essa evolução foi decorrente da especialização de grupos celulares para exercerem funções específicas visando a garantia do equilíbrio da vida dos organismos. Dentre essas evoluções houve o surgimento das células sanguíneas, as quais são divididas em três tipos básicos: hemácias, leucócitos e plaquetas, que são responsáveis pelo transporte de gases pelo organismo, defesa contra antígenos, coagulação sanguínea, entre outras funções.

Dentro dessa importância através de estudos sobre morfologia celular foi possível o desenvolvimento de instrumentos capazes de visualizar estruturas tão pequenas quanto as células. O primeiro instrumento desenvolvido foi o microscópio óptico, o qual é capaz de ampliar o tamanho de uma imagem em até 1000 vezes através da junção de lentes oculares e objetivas. A partir disso, o estudo das células começou a ser aprofundado, conduzindo ao descobrimento de inúmeras patologias sanguíneas, tais como: anemia genética, anemia por déficit alimentar, policitemias, leucemias, infecções virais, parasitárias e bacterianas, entre outros.

Com o passar do tempo, o estudo das células sanguíneas deixou de ser restrito a apenas a observação da morfologia das células e passou a contar com o desenvolvimento de exames mais específicos, mas que não dispensam a utilização da microscopia convencional. Esse exame responsável pela análise das células sanguíneas é denominado hemograma. Atualmente, esse método diagnóstico exame pode ser realizado através de metodologias manuais ou metodologias automatizadas. As metodologias manuais são mais indicadas para laboratórios com baixa demanda de exames, pois apresentam um

baixo custo e um tempo maior para a obtenção dos resultados. Por sua vez, as metodologias automatizadas, consomem menos tempo. Contudo apresentam um custo elevado, referente a aquisição do equipamento hematológico e de seus reagentes. A aquisição de um equipamento hematológico não dispensa o uso da metodologia manual, pois essa ainda é indicada em casos específicos, tais como: pacientes pediátricos, idosos, em tratamento a base de quimioterapia e indivíduos internados em Unidade de Terapia Intensiva.

Assim, com o passar dos anos, novas tecnologias têm sido desenvolvidas no ramo da Engenharia, sendo de grande utilidade nas áreas médicas, tais como: raio x e tomografia. Esses exames são baseados na captura de imagens do corpo do paciente, facilitando assim o diagnóstico por imagem de diversas doenças.

Através da relevância do tema, algoritmos desenvolvidos no *software Matlab*, muitas vezes tendo como foco a resolução de problemas nas áreas de Engenharia, como a Transformada *Watershed*, Transformada *Hough* e operações morfológicas com a finalidade inicial de segmentar imagens, através da rotulação de *pixels* e detecção de objetos circulares. Atualmente podem ser aplicados nas características morfológicas das células sanguíneas, podendo ser uma alternativa para a criação de novos métodos para a realização do hemograma, que dispensem o custo da aquisição de reagentes específicos e consumam menos Tempo de Execução e Processamento da metodologia, sem a perda da qualidade e confiabilidade.

3 PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

O desenvolvimento desse capítulo foi realizada com base em uma pesquisa bibliográfica, abrangendo publicações desde o ano de 1999 até 2018, apresentando um total de 35 artigos científicos referentes ao tema abordado, como a finalidade de proporcionar melhor entendimento sobre as técnicas desenvolvidas para a detecção e contagem de células sanguíneas, com base em metodologias de segmentação de imagens digitais de esfregaço sanguíneo humano.

3.1 Uso de Metodologias de Contagem e Detecção de Células Sanguíneas

3.1.1 Ano 1999

Osion, propôs técnicas para uma performance rápida e precisa de detecção de células sanguíneas. Para isso utilizou uma Transformada *Hough*, onde a localização do erro podia ser propagada eficientemente dentro de parâmetro de espaço. Esse trabalho primeiramente revisou a definição formal de *Hough* Transform e posteriormente modificou - o para permitir um tratamento na localização do erro [68].

3.1.2 Ano 2000

Soltanzade realizou um estudo relacionado a segmentação de células e núcleos celulares utilizando marcadores de membranas. A segmentação de núcleos celulares individuais de imagens de microscópio geralmente envolve marcação de volume dos núcleos com um marcador de DNA. No entanto, essa metodologia muitas vezes apresenta falhas quando aplicada a aglomerados de núcleos, pois a distinção das bordas nucleares torna-se de difícil identificação nessas condições. Dessa maneira, esse trabalho apresentou uma metodologia que solucionou tal limitação e permitiu a segmentação de células inteiras [69].

Essa segmentação foi realizada, por meio, da identificação de cada núcleo e/ou célula, sendo os limites expandidos até atingir a célula como um todo. Esse processo contou com o auxílio do emprego de coloração, utilizando gradiente de curvatura e técnicas de fluxo. O algoritmo desenvolvido foi testado em objetos

gerados por computador visando avaliar sua robustez contra o ruído e posterior aplicação às células em cultura. Em todos os casos apresentados, o algoritmo obteve resultados de precisão consideráveis [69].

3.1.3 Ano 2001

Adiga e Chaudhuri trabalharam na segmentação de imagens histopatológicas tridimensionais. Para isso, foi utilizado um método de segmentação baseado em regiões específicas envolvendo o algoritmo *Watershed* e a técnica de fusão baseada em regras. Dessa forma, implementaram um novo método visando contornar a incapacidade de marcação automática dos mínimos regionais em pequenos objetos isolados. O pequeno fragmento das células teciduais foram identificados com base em algumas regras heurísticas. Assim, a fusão baseada em regras forneceu mais de 90% de segmentação [70].

3.1.4 Ano 2002

Walsh e Raftery, desenvolveram um trabalho relacionado a detecção de curva precisa e eficiente em imagens enfatizando a importância da transformada *Hough*. Nesse trabalho foi investigado o uso de técnicas de agrupamento visando a identificação simultânea de múltiplas curvas na imagem. Também foram utilizados argumentos probabilísticos para o desenvolvimento das condições de parada do algoritmo. Foi utilizada uma imagem de esfregaço sanguíneo contendo 26 hemácias, sendo contadas 23 células pelo algoritmo em um Tempo de Processamento superior a 4 minutos [71].

3.1.5 Ano 2003

Ji Y. Xie introduziu a transformada *Hough* randomizada objetivando melhorar a curva de detecção de precisão e robustez, bem como a eficiência computacional. Melhoramentos de robustez e precisão foram alcançados pela propagação analítica dos erros com *pixels* de imagens para estimar os parâmetros da curva. Para isso esses erros foram empregados para determinar a contribuição de *pixels* no arranjo

acumulado. A eficiência computacional foi alcançada pelo mapeamento de um conjunto de pontos próximos de certos locais selecionados para o parâmetro de espaço [72].

3.1.6 Ano 2004

Jiaqiang Song concluiu que a transformada *Hough* é reconhecida como uma poderosa ferramenta para extração de elementos gráficos para imagens devido a sua visão global e robustez no ruído ou degradação do ambiente. Entretanto, a aplicação da transformada *Hough* foi limitada a imagens de tamanho pequeno, pois o pico de detecção e a linha de verificação consumiram muito mais tempo para imagens de tamanho grande [73].

3.1.7 Ano 2005

Baggett e colaboradores realizaram um estudo voltado a segmentação de células em tecidos sólidos, visando compreender as estruturas celulares e moleculares, ao quais são a base do desenvolvimento e da função dos tecidos. Para isso foi desenvolvido um *software* que por meio segmentação imagens microscópicas bidimensionais encontrava a membrana celular em melhor estado de conservação. As amostras foram marcadas na superfície celular por fluorescência, de modo que, as membranas se tornaram mais brilhantes do que as demais estruturas celulares. O algoritmo desenvolvido exigiu que o usuário marcasse dois pontos por célula, um aproximadamente no centro e outro na borda. [74].

3.1.8 Ano 2006

Wu e colaboradores desenvolveram seu estudo utilizando *Otsu* baseada em histograma circular para a segmentação de leucócitos. Dessa forma, afirmaram que para a detecção de células sanguíneas, a detecção de borda por esse método é fraca, pois nem todos os limites são bem determinados, sendo difícil obter todas as informações de borda e localizar as células com acurácia satisfatória[75].

Sukesh e Kumar, discutiram uma abordagem de segmentação de imagens coloridas de células sanguíneas. As imagens em cores são uma fonte de informação

muito rica, porque fornecem uma descrição melhor de uma cena em comparação com imagens de escala de cinza. Dois algoritmos foram propostos, aplicados a escala de cinza e em imagens coloridas, onde as regiões obtidas foram preenchidas com tons diferentes dependendo dos limiares. O número de limiares também foi otimizado nesse trabalho [76].

Por sua vez, Khoo Boon e colaboradores, realizaram comparações entre a segmentação da imagem através de estudos relacionados a: limiar de nível de cinza, a correspondência de padrões, operadores morfológicos, operadores de filtragem, método de gradiente, operadores de detecção de borda, de cores RGB, correspondência de cores, tonalidade, saturação e coloração das hemácias. Como resultado observaram que não há um único método que possa ser considerado bom para a segmentação de células sanguíneas [77].

3.1.9 Ano 2007

Kharma e colaboradores realizaram um trabalho baseado na segmentação automática de células provenientes de imagens microscópicas utilizando a detecção de elipse. Para isso, desenvolveram um método de extração automática das células de imagens microscópicas, sendo o processo dividido em 2 etapas. A primeira etapa empregou um determinado limite para identificar e marcar objetos em um primeiro plano. A segunda etapa do método aplicou um algoritmo de detecção de elipse para identificar células de maneira rápida e confiável [78].

3.1.10 Ano 2008

Marcin Smereka modificou a Transformada *Hough*, propondo uma melhora na detecção de objetos circulares de baixo contraste. A Transformada *Hough* original e suas numerosas modificações foram discutidas e comparadas, concluindo que todas podem ser melhoradas nos critérios de eficiência e complexidade computacional de algoritmos [79].

3.1.11 Ano 2009

Siyu Guo declarou que a Transformada *Hough* tem sido um método

frequentemente aplicado para detectar linhas em imagens. Entretanto, quando aplicada a transformada *Hough* e algoritmos derivados de imagens do mundo real, a técnica frequentemente sofre uma degradação considerável na performance. Especialmente na taxa de detecção, pois o amplo montante de pontos fornece um complexo plano de fundo ou textura [80].

No mesmo ano, Guitao e colaboradores propuseram a transformada *Hough* como metodologia para a detecção e extração de hemácias em microscopia de urina. Para isso utilizaram as características geométricas para detectar o centro circular da imagem [81].

3.1.12 Ano 2010

Roy A. Diamayuga e colaboradores utilizaram um histograma para distinguir os núcleos dos citoplasmas de leucócitos do restante das células das imagens [80]. Por sua vez, Soltanzadeh, por meio de três experimentos com células sanguíneas, propôs uma técnica baseada na extração de características morfológicas. Dessa forma, através da massa central de cada célula encontrou a distância de cada *pixel* em um ponto central [82].

3.1.13 Ano 2011

Kareem e colaboradores descreveram em seu trabalho uma nova metodologia para identificar o número total de hemácias bem como a sua localização em lâminas coradas com corante *Giemsa*. O método utiliza o conhecimento básico relacionado a estrutura e brilho dos componentes, pois o corante *Giemsa* é capaz de corar a amostra e auxiliar na detecção da localização das células na imagem [83]. Por sua vez, SaVkere e Narote, realizaram um estudo, cujo foco era a detecção de hemácias infectadas pelo parasita intracelular *Plasmodium falciparum*, que é o agente etiológico da malária [84].

No mesmo ano, em seus estudos Berg e seus colaboradores propuseram a segmentação de hemácias em uma imagem de um esfregaço sanguíneo. Dessa maneira, essa técnica teve um melhor resultado de segmentação com menor quantidade de hemácias. Em imagens com alta concentração de células os resultados apresentaram baixa acurácia [85].

3.1.14 Ano 2012

Arivu e colaboradores realizaram a contagem de hemácias e leucócitos através da diferenciação das características morfológicas distintas que essas células apresentam entre si, conforme descrito previamente no capítulo 3. A contagem de hemácias foi realizada através dos seguintes passos: conversão para a escala de cinza; segmentação; remoção de ruídos e remoção de elementos da borda e contagem pelo algoritmo. Por sua vez, a contagem de leucócitos foi proveniente de outros passos como: conversão da imagem em imagem binária, redução do ruído, preenchimento dos espaços e remoção das células com bordas pouco definidas. O resultado apresentado demonstrou 75-80% de acurácia na contagem de células [36].

Nasrul Humaimi realizou uma pesquisa, cujo objetivo foi desenvolver um sistema de visão computacional capaz de detectar e estimar o número de hemácias e leucócitos em uma amostra de imagem. Durante o processo de contagem o algoritmo utilizado, teve sua atuação com base nas características morfológicas das hemácias. Os resultados foram obtidos através do processamento de 10 imagens de hemácias e apresentaram alta acurácia quando comparado ao método manual [86].

3.1.15 Ano 2013

Mahmood e colaboradores através de imagens obtidas de sangue periférico disposto em um esfregaço sanguíneo, realizaram a contagem automática de hemácias de 10 imagens. Para isso, foi empregada a metodologia da transformada *Hough*, onde os resultados obtidos foram comparados com a metodologia manual convencional e obteve uma acurácia de 91,87% [87].

No mesmo ano, Mohammed realizou um estudo 140 imagens com células sanguíneas relacionadas a Leucemia Linfocítica Aguda. Para isso, um algoritmo foi empregado para a conversão da imagem em RGB para escala de cinza. Em seguida, a segmentação dos núcleos das células foi realizada através da abordagem *Otsu's*, o qual é um método de delimitação de escala de cinza. Dessa forma, os núcleos foram detectados por meio de sua coloração mais escura quando comparados aos componentes ao redor. Os resultados apresentaram alta acurácia na detecção de um tipo específico de leucócito denominado de linfócitos [88].

Putuzu e Di Ruberto declararam que a contagem e análise de células sanguíneas

permitem a avaliação e diagnósticos de um vasto número de doenças. Esse estudo apresentou um método complementar para a identificação de leucócitos em imagens de microscopia. A proposta do método foi, primeiramente, individualizar os leucócitos para que, subsequentemente, os núcleos e os citoplasmas fossem extraídos. Todo o trabalho foi desenvolvido usando o ambiente do *Matlab*, em particular a *Toolbox* de processamento de imagens [89].

Por sua vez, Gaganjit, realizou um estudo com leucócitos, onde o parâmetro de detecção de células foi, por meio, do tamanho do raio. Já Venkatalakshmi e colaboradores utilizaram a transformada *Hough* realizou a detecção de hemácias [90].

3.1.16 Ano 2014

Mogra e colaboradores [92] e Kaur e colaboradores [93] realizaram estudos comparativos entre as metodologias *K-Means* e transformada *Hough* na extração e contagem de hemácias e leucócitos. O algoritmo *K-Means* é uma técnica simples, que pode ser utilizada para observações de aglomerados dentro de grupos de observações relatadas sem qualquer conhecimento de suas relações. O processamento da imagem através da metodologia *K-means* consiste em: entrada da imagem com aglomerados; equalização de histograma, segmentação de imagem, extração de célula sanguínea e contagem [92].

Sumeet Chourasiya e G Usha Rani, por meio do uso das transformadas *Watershed* e *Hough* conseguiram reduzir o ruído e ao mesmo tempo melhorar a imagem. Dessa maneira, foi concluído que a acurácia do algoritmo utilizado é depende da câmera usada e do tamanho dos objetos a serem capturados [93].

3.1.17 Ano 2015

Nasreen e colaboradores realizaram um estudo através de um microscópio digital interfaceado para o computador, onde as imagens de células sanguíneas foram obtidas no formato de imagens digitais, estando a entrada da imagem no formato RBG. Posteriormente, essa imagem foi convertida para escala de cinza. Em seguida, a filtragem mediana foi aplicada para a remoção de ruídos provenientes do momento da captura das imagens [94].

Além disso, a entrada da imagem foi melhorada visando facilitar a

segmentação. Por sua vez, a segmentação da imagem foi realizada por meio de contornos cinzas. Para isso foi empregada a função “*Graytresh*” no *Matlab*. Essa função utiliza o método *Ostu's*, que escolhe um limite para minimizar as classes de variância de *pixels* pretos e brancos. A detecção das células sanguíneas foi realizada pela transformada *Hough*, a qual teve a função de encontrar círculos em imagens. Como resultado, essa metodologia foi capaz de contar 334 hemácias [94].

3.1.18 Ano 2016

Sahastrabuddhe e colaboradores realizaram um estudo com 5 pacientes, onde houve a captura de imagens digitais de hemácias e leucócitos presentes em esfregaços sanguíneos desses indivíduos. A segmentação da imagem foi realizada através da transformada circular *Hough*. O resultado foi expresso através da contagem mais alta encontrada. Através de operações morfológicas, esse estudo também realizou a contagem de leucócitos. Os resultados obtidos durante a contagem foram comparados aos resultados da metodologia manual e apresentaram uma acurácia de 90% e um Tempo de Processamento de 4 a 6 segundos [95].

Bhagavathi e colaboradores desenvolveram um trabalho referente a um sistema automático para a detecção e contagem de hemácias e leucócitos utilizando a metodologia *Fuzzy Logic*. Nesse estudo, a imagem RGB obtida foi convertida para a escala de cinza e os pontos na imagem foram detectados. A contagem foi realizada através dos centros dos círculos, onde foram determinados os raios de cada célula. Outro ponto utilizado para a diferenciação das células sanguíneas foi baseado na presença ou ausência de núcleos celulares. [96].

3.1.19 Ano 2017

Xipeng e colaboradores realizaram a segmentação celular automatizada de imagens contendo células de câncer de mama, através da aplicação de estratégias de *Deep Learning* foram analisadas imagens em estado normal e patológico. Neste trabalho foi apresentado um método automatizado de segmentação de núcleos que trabalhou com imagens histopatológicas de câncer de mama coradas com hematoxilina e eosina. Inicialmente, foram removidos o fundo da imagem para acentuar os núcleos das imagens patológicas. Posteriormente, houve a segmentação dos núcleos das células e emprego da técnica de operações morfológicas, visando o melhoramento do desempenho da

segmentação e redução dos erros. Essa metodologia atingiu cerca de 92,45% de precisão na segmentação em *pixels* [98].

No mesmo ano Ghane e colaboradores, desenvolveram um estudo referente a segmentação de leucócitos a partir de imagens de microscopia. Para este propósito, foi apresentada uma nova combinação de algoritmos de limiarização, agrupamento *k-means* e de Transformada *Watershed* modificadas. O estudo possui 3 estágios: (1) segmentação de leucócitos a partir de uma imagem microscópica, (2) extração de núcleos da imagem celular e (3) separação de células e núcleos sobrepostos. Os resultados da avaliação do método proposto mostraram acurácia de 92,07% [99].

3.1.20 Ano 2018

Shahin e colaboradores desenvolveram novo algoritmo de segmentação para leucócitos em imagens de esfregaços sanguíneos. Para isso, foi proposto mensurar a similaridade entre diferentes componentes de cor da imagem. Duas metodologias de segmentação foram propostas: um para a segmentação do núcleo e outro para o citoplasma. Os resultados foram obtidos através de conjuntos de dados públicos com diferentes resoluções, sendo avaliados o desempenho do sistema com base em medições qualitativas e quantitativas. Os resultados quantitativos indicam taxas de alta acurácia no desempenho de segmentação [99].

3.2 Síntese do capítulo 3

Este capítulo forneceu uma pesquisa histórica bibliográfica, reafirmando o uso das metodologias de processamento digital de imagem em estudo (Transformadas *Watershed* e *Hough*) em vários cenários de aplicação aqui apresentados.

O processamento de imagens digitais é um campo de estudo interdisciplinar com ampla aplicabilidade. A detecção e contagem de células sanguíneas tem sido realizada através de diversos métodos de segmentação de imagem tais como Método de *Otsu's*, *K-means*, Transformada *Watershed*, operações morfológicas e Transformada *Hough*. Nota-se que o processamento de imagens para a detecção de células sanguíneas tem ganhado força nos últimos 10 anos. As metodologias e os resultados apresentados nos trabalhos científicos anteriores, tem dados distintos uns dos outros variando principalmente quanto a acurácia.

A Transformada *Hough* foi a mais utilizada sendo combinada com diversos métodos de filtragem, diminuição de ruídos e melhoramentos de imagens antes ou durante a segmentação das imagens de células sanguíneas. A segunda metodologia mais utilizada foi a Transformada *Watershed*, tendo seu foco principal na detecção de hemácias.

Com base nesses dados notou-se que cada tipo de metodologia apresenta um tipo de benefício na detecção de células sanguíneas. Desse modo, foi notável que essas técnicas têm importância no mundo real assim como na área de conhecimento e pesquisa deste trabalho, a Engenharia e a Biomedicina, onde por meio de uma abordagem e lógica diferente do que se foi utilizado anteriormente, é possível a criação de algoritmos de detecção de hemácias e leucócitos através da segmentação de imagens de esfregaços sanguíneos com melhor performance.

4 METODOLOGIA PROPOSTA

Os experimentos foram conduzidos através de imagens digitais de esfregaços sanguíneos corados com panótico e analisados sobre microscópio óptico sob as lentes objetivas de 40x e 100x, resultando em um aumento da imagem de 400 e 1000 vezes, respectivamente. Posteriormente, por meio de uma câmera acoplada ao microscópio óptico foram adquiridas imagens digitais dos campos da lâmina contendo hemácias e leucócitos em tamanho, cores e quantidades diferentes. Essas imagens foram adquiridas na *web* por meio de plataformas *open aces*.

As imagens, por sua vez, foram transferidas para ambiente de simulação do *software Matlab*, versão 8.3 de 64 bits (2014a). Essa ferramenta foi escolhida, pois já é consolidada no meio científico, tendo seus blocos já testados e validados.

No *software Matlab*, foram desenvolvidos algoritmos capazes de realizar contagens de hemácias e leucócitos através de imagens digitais de esfregaço sanguíneo e determinar os índices hematimétricos VCM, HCM e CHCM. Os algoritmos desenvolvidos têm como base o uso de técnicas de processamento de imagem digitais. A detecção e contagem de leucócitos foi realizado através dos processos de Operações Morfológicas e detecção de objetos por coloração, enquanto que a contagem e detecção de hemácias foram realizadas através da transformada *Watershed* e da transformada *Hough*. O processo de contagem e diferenciação dessas células são realizados com base nas características morfológicas distintas apresentadas entre hemácias e leucócitos, conforme apresentado no capítulo 3.

4.1 Segmentação de imagem pelo algoritmo WT-MO

A segmentação de imagem é um processo essencial para a tarefa de análise de imagens. Existem muitas técnicas para a descrição e reconhecimento da visualização correta de objetos presentes em imagens digitais, sendo a compreensão da imagem um processo altamente depende do resultado do processamento de segmentação [88] [100]. Existem muitas metodologias de segmentação de imagem, contudo o foco desse estudo são as transformada *Watershed* e Operações Morfológicas, as quais tem como função detectar e contar hemácias e leucócitos, respectivamente.

O algoritmo desenvolvido tem como ênfase o processo de segmentação de imagens digitais através da união das metodologias transformada *Watershed* e operações

morfológicas, as quais quando unidas originam o algoritmo WT-MO (do inglês “*Watershed Transformed and Morphological Operations*”).

Nesse contexto, a detecção e contagem de eritrócitos e leucócitos presentes em imagens digitais de esfregaço sanguíneo foram realizadas da seguinte maneira: os eritrócitos foram detectados e contados através da transformada *Watershed*, enquanto a contagem dos leucócitos foi resultante do processo de Operações morfológicas. Os processos de contagem e diferenciação destas células são realizados com base nas características morfológicas das células sanguíneas. A lógica do algoritmo é mostrada na Figura 11.

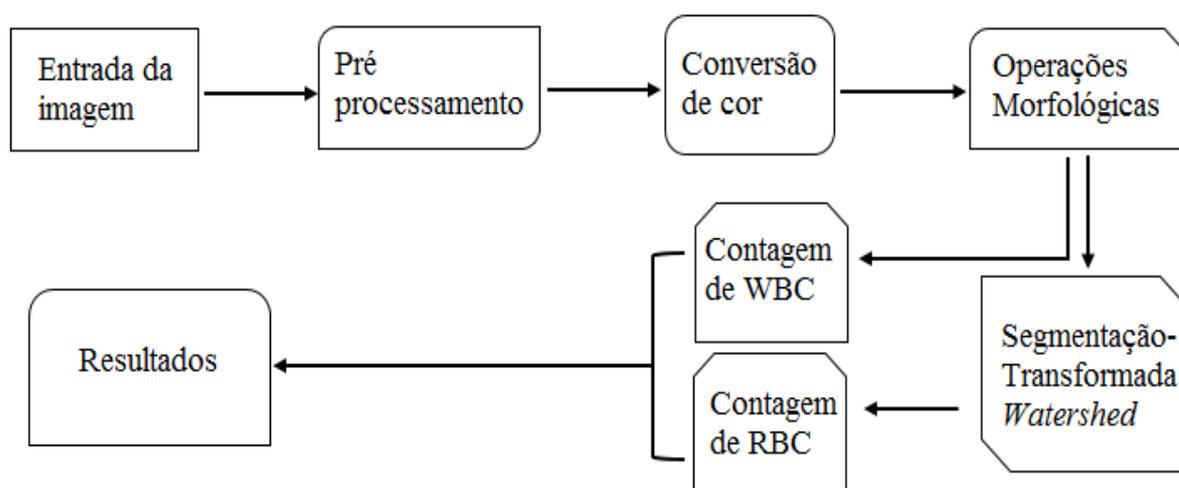


Figura 11 - Lógica utilizada para a criação do algoritmo com base na Transformada *Watershed* e Operações Morfológicas (Algoritmo WT-MO)

Inicialmente, houve a captura de imagens de campos de microscopia óptica contendo células sanguíneas coradas com panótico. Esses campos possuem imagens de eritrócitos e leucócitos em estado não patológico. Essas imagens foram adquiridas no formato digital ‘*png*’, ‘*jpg*’ ou ‘*jpeg*’ e posteriormente foram transferidas para o *software Matlab*.

No ambiente de simulação do *software Matlab*, a utilização da Transformada *Watershed* propõe uma abordagem para o problema de segmentação de imagem e pode ser aplicada em muitas áreas do conhecimento. Essa técnica interpreta as imagens, onde cada *pixel* corresponde a uma posição na escala de cinza relativa a cada um desses *pixels* determinando suas altitudes, sendo uma poderosa ferramenta para resolver os problemas abordados nesse trabalho. A Transformada *Watershed*

atua através do processamento, cálculo e reconhecimento das distâncias entre os núcleos, evitando possíveis contagens errôneas de células sobrepostas.

O processamento de imagens envolve muitos passos com filtragem e tratamento da imagem, em termos de qualidade para os próximos passos do algoritmo, a conversão de imagens RGB para escala de cinza e escala binária, tem como objetivo resolver os problemas de iluminação, normalmente, encontrados durante a captura das imagens em microscopia óptica.

A etapa de operações morfológicas foi utilizada com a finalidade de segmentar os leucócitos presentes nas imagens digitais de esfregaço sanguíneo. Este processo tem como base os conceitos de tamanho, forma, estrutura e conectividade dos objetos na imagem. As operações morfológicas foram desenvolvidas e aplicadas seguindo as etapas de: dilatação, erosão binária, abertura, fechamento e reconstrução da imagem [58] [59] [60].

A dilatação consiste em adicionar *pixels* às bordas dos objetos em uma imagem, visando reparar quebras na imagem. A erosão consiste em remover os *pixels* das bordas da imagem, sendo usada para dividir objetos. A abertura é aplicada para suavizar contornos. O fechamento é usado para mesclar intervalos e preencher espaços. A reconstrução é responsável por extrair informações relevantes da imagem [58] [59] [60].

Posteriormente, a imagem passa pela contagem de eritrócitos, onde as células são segmentadas e contadas através da Transformada *Watershed*. Nesse etapa cada eritrócito contado recebe um número de acordo com a sua contagem pelo algoritmo WT-MO. Por fim, os resultados das contagens são liberados separadamente. A seguir, serão abordadas as metodologias de contagens de células sanguíneas através do algoritmo WT-MO.

4.1.1 Contagem de hemácias pelo algoritmo WT-MO

No processo de segmentação de imagem, a técnica morfológica é a mais usada, pois a morfologia matemática oferece uma poderosa ferramenta para a segmentação de imagens, sendo empregada para descrever o formato da região, tais como os limites, esqueleto e textura.

O processo de segmentação consiste no ato de fracionar uma imagem em grupos de *pixels* conectados espacialmente de forma homogênea. Com base nessas características a Transformada *Watershed* foi escolhida como ferramenta de segmentação de imagens, responsável pela detecção e contagens de eritrócitos presentes nas imagens

digitas de esfregaços sanguíneos.

A segmentação de imagens pela Transformada *Watershed* é empregada como um processo de rotulação de *pixel*, onde todos os *pixels* pertencentes a mesma região homogênea são marcados com o mesmo rótulo, conforme apresentado na Figura 12. A definição de homogeneidade de uma região da imagem apresenta um conceito particular do processo de segmentação, pois cada imagem apresenta seu próprio padrão de *pixels*.

Considerando que os eritrócitos presentes nas imagens analisadas estavam em estado não patológico, ou seja, apresentavam coloração e tamanhos homogêneos, a Transformada *Watershed* demonstrou uma boa atuação na rotulação de conjuntos de *pixels* que representam essas células sanguíneas.

Para a rotulação das hemácias o *pixel* é assumido como uma variável diretamente relacionada às características morfológicas das células em análise. Nesse caso, a rotulação considera o tamanho e a coloração dos eritrócitos. Conforme os *pixels* são agrupados de acordo com suas características, o algoritmo WT-MO realiza a contagem e a rotulação de cada célula presente na imagem. A rotulação consiste em inserir um número em cima de cada célula de acordo com a ordem de contagem estabelecida pelo algoritmo, conforme apresentado na Figura 12.

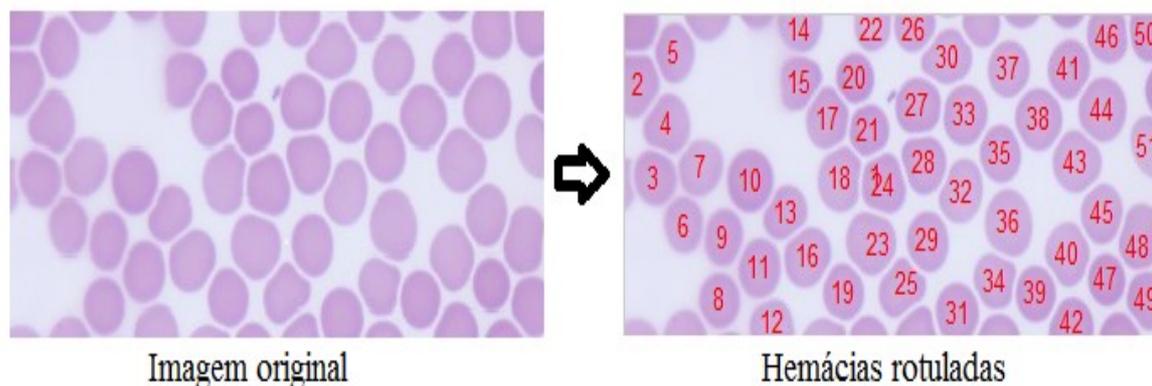


Figura 12- Hemácias rotuladas pela Transformada *Watershed*

4.1.2 Contagem de leucócitos pelo algoritmo WT-MO

As operações morfológicas constituem um amplo conjunto de operações de processamento de imagens com base na forma das imagens binárias. A remoção de leucócitos da imagem é um processo importante para a detecção e contagem das células sanguíneas. Considerando a semelhança morfológica dos leucócitos e eritrócitos,

referindo-se à forma arredondada, era possível que o algoritmo WT- MO realizasse uma contagem errônea. Outro fator que poderia causar uma falha na contagem seria o tamanho das células sanguíneas, pois um eritrócito mede cerca de 7- 8 μm de diâmetro, enquanto um linfócito (sessão 2.2.8) liberado recentemente pela medula óssea mede até de 8 μm .

Além da forma e do diâmetro, a quantidade de células produzidas e liberadas pela medula óssea também justifica a escolha de Operações Morfológicas como ferramenta de segmentação de imagens. Os eritrócitos são expressos na ordem de 10^6 , enquanto os leucócitos são expressos em 10^3 [19]. A menor quantidade de leucócitos facilita a ação das Operações morfológicas em sua remoção da imagem digital. Consequentemente, essa ação interfere positivamente nos resultados de acurácia do algoritmo desenvolvido. Tais resultados são apresentados no capítulo 5.

A técnica de operações morfológicas é aplicada ao elemento estrutural na entrada de uma imagem criando uma saída do mesmo tamanho, como mostrado na Figura 13. Desta forma, os valores dos *pixels* na saída da imagem são baseados na comparação deles entre si, correspondentes aos *pixels* da imagem e *pixels* adjacentes. O número de *pixels* adicionados ou removidos dos objetos em uma imagem depende do tamanho e formato do elemento estrutural empregado para processar a imagem.

Portanto, todo esse processo envolve 2 imagens e um elemento estrutural. As duas imagens: uma atua como ponto de partida para a transformação e outra age como uma máscara que restringe a transformação da imagem. Finalmente, a reconstrução morfológica visa restaurar as formas originais do objeto que permanece após o processo de erosão. Este processo é aplicado na detecção e contagem de leucócitos pelo algoritmo WT-MO, como mostra a Figura 13.

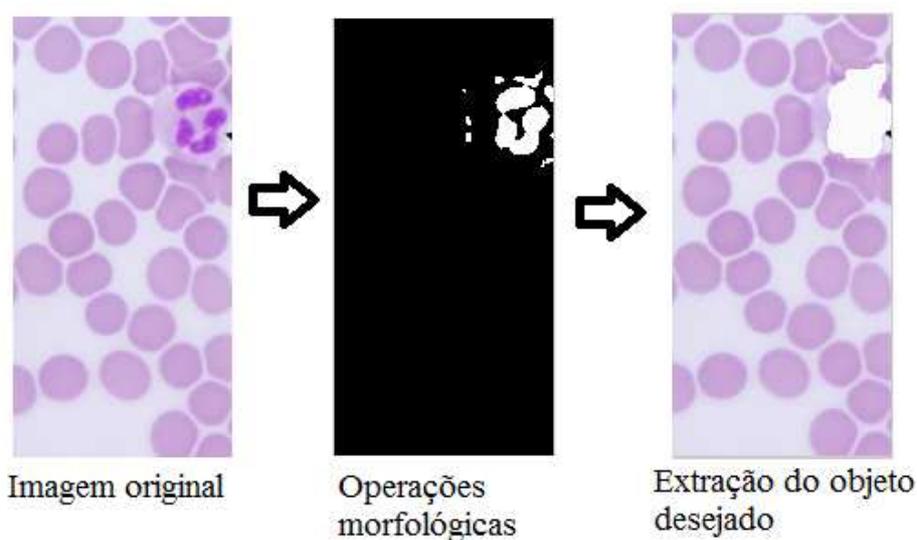


Figura 13- Detecção e Contagem de Leucócitos por meio de Operações Morfológicas

Dessa forma, a detecção e contagem de eritrócitos e leucócitos presentes em uma imagem digital de esfregaço sanguíneo ocorre de forma simultânea, sendo realizada a união de Transformada *Watershed* e operações morfológicas para a formação do algoritmo WT-MO, conforme apresentado na Figura 14. Essa ação visou facilitar o processo de contagem, onde com apenas um comando as células são quantificadas simultaneamente e separadamente.

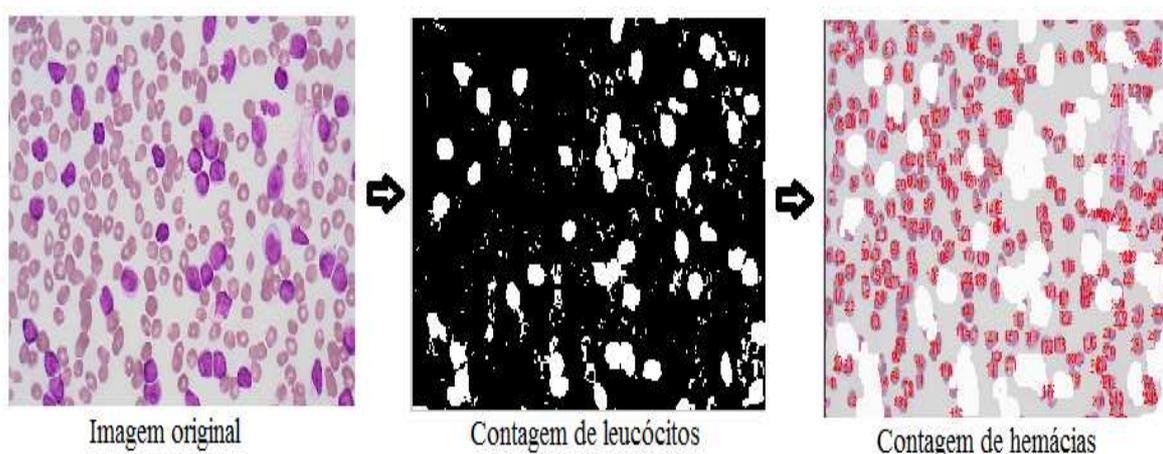


Figura 14- Contagem de leucócitos e hemácias através do algoritmo WT-MO.

O mesmo processo de detecção e contagem de hemácias e leucócitos foi realizado através de Transformada *Hough* e do algoritmo de detecção por coloração (, originando o algoritmo HT-CD (do inglês “*Hough Transform and Color Detection*”) (Figura 15). É importante ressaltar que a escolha da Transformada *Hough* é decorrente de sua ampla aplicação em trabalhos encontrados na literatura, conforme pode ser visto no capítulo 3. Dessa forma, o algoritmo HT-CD será utilizado como um parâmetro comparativo dos resultados obtidos através do algoritmo WT-MO.

Através das características morfológicas das células sanguíneas (sessão 2.2.1), o algoritmo HT-CD realizou os processos de reconhecimento dos núcleos celulares, diferenciação do tamanho dos *pixels* e intensidade de cor presentes em cada tipo celular analisado. Seguindo a lógica da segmentação e processamento de imagem, o algoritmo HT-CD foi executado, com objetivos de acurácia e custo computacional. Posteriormente, os algoritmos WT-MO e HT-CD desenvolvidos para a detecção de hemácias e leucócitos foram comparados entre si, a fim de identificar qual metodologia é mais viável e apresenta melhor desempenho para a rotina de um

laboratório de análises clínicas.

4.2 Segmentação de imagem pelo algoritmo HT-CD

Como visto no capítulo 3, a Transformada *Hough* é uma das metodologias mais utilizadas para a detecção e contagem de células sanguíneas. Nesse contexto, o algoritmo HT-CD foi desenvolvido com base na união da Transformada *Hough* com algoritmo de detecção de coloração, conforme apresentado na Figura 16. Esse algoritmo será utilizado com um parâmetro comparativo com o algoritmo WT-MO apresentado na sessão 4.1.

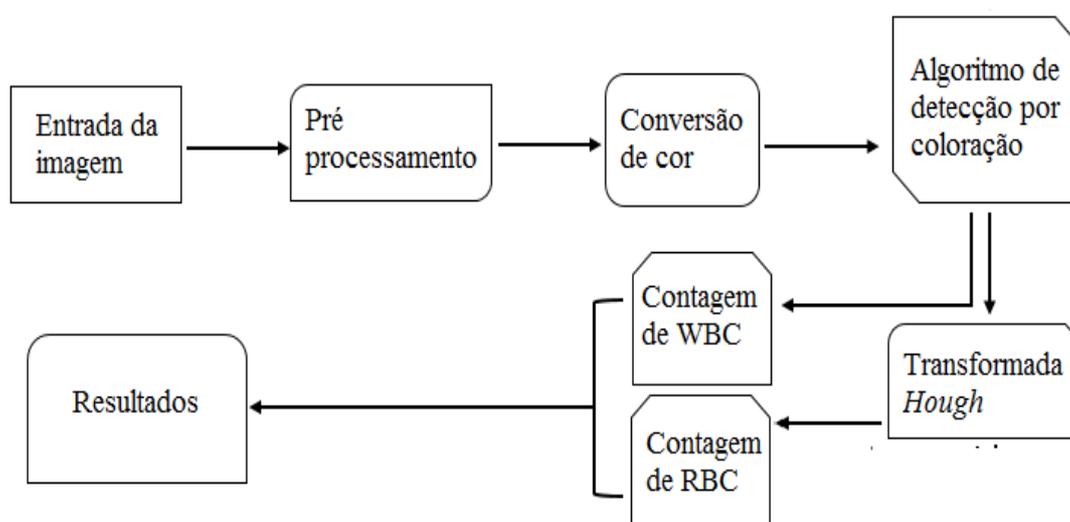


Figura 15 - Lógica utilizada para a criação do algoritmo com base na Transformada Watershed e Operações Morfológicas (Algoritmo WT-MO)

A metodologia HT-CD necessita da captura de imagens de campos de microscopia ópticas contendo células sanguíneas coradas com panótico. Esses campos possuem imagens de eritrócitos e leucócitos em estado não patológico. Essas imagens devem ser adquiridas no formato digital '*png*', '*jpg*' ou '*jpeg*' e posteriormente devem ser transferidas para o *software* Matlab. Essas imagens também foram adquiridas em plataformas de acesso *open access*.

Considerando a existência de 3 planos de cores (RGB) responsáveis por conterem as informações referentes a cor da imagem, o componente de cor verde foi extraído da imagem por conter o valor máximo necessário para esse tipo de segmentação. Devido a

característica morfológica das hemácias de possuírem formato de disco bicôncavo (sessão 2.3), a Transformada *Hough* é aplicada visando a detecção de objetos circulares nas imagens.

Posteriormente, a imagem é submetida ao algoritmo de detecção de coloração. Essa ferramenta visa realizar a detecção e contagem de leucócitos, os quais são detectados e contados através de sua coloração azuofílica (sessão 2.3). Por fim, os resultados das contagens de eritrócitos e leucócitos são liberados separadamente. A seguir, serão abordadas as metodologias de contagens de células sanguíneas através de do algoritmo HT-CD.

4.2.1 Contagem de eritrócitos pelo algoritmo HT-CD

A Transformada *Hough* é responsável por detectar pontos de borda em cada circunferência e desenhar um círculo com esse ponto possuindo origem e raio. Utiliza também uma matriz tridimensional, sendo as primeiras duas dimensões responsáveis por representar as coordenadas da matriz, a qual aumenta a cada vez que um círculo é desenhado ao redor dos raios sobre cada ponto de borda. Um acumulador mantém a contagem adequada [65] [66] [67].

Essa metodologia pode ser aplicada de forma isolada, ou ser acompanhada por processos de filtragem e melhoramento da imagem antes da contagem de objetos circulares. O presente estudo, visa apenas avaliar a Transformada *Hough* sem a adição de outros componentes, analisando apenas sua capacidade de detectar e contar hemácias, marcando-as com um círculo ao redor (Figura 16).

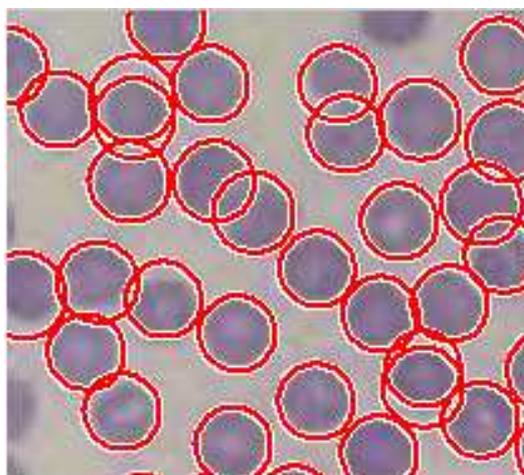


Figura 16 - Transformada *Hough* empregada na detecção de hemácias

4.2.2 Contagem de leucócitos pelo algoritmo HT-CD

A detecção por coloração foi empregada com a finalidade de evitar contagens errôneas de células sanguíneas, pois os eritrócitos e os leucócitos possuem formato circular, podendo facilmente serem contadas sem distinção pela Transformada *Hough*. Dessa forma, a coloração azul dos núcleos dos leucócitos pode ser facilmente separada da imagem por meio do processo de separação de coloração RGB, evitando que leucócitos sejam contados como eritrócitos.

Como visto anteriormente, uma imagem digital é definida por meio das coordenadas x, y . Dessa maneira, o algoritmo de detecção por coloração marca os leucócitos como o sinal “+”, o qual indica o centro de cada forma detectada, conforme apresentado na Figura 17.

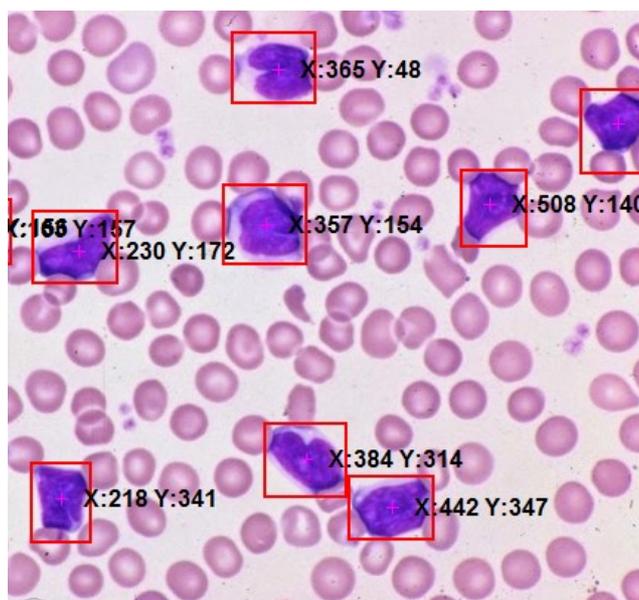


Figura 17- Detecção de leucócitos por coloração

4.3 Síntese do capítulo 4

Com base na aquisição de imagens digitais de esfregaços sanguíneos contendo hemácias e leucócitos foram desenvolvidos 2 algoritmos como metodologias distintas para a detecção dessas células. Todos os algoritmos desenvolvidos têm como base as diferenças morfológicas de coloração e tamanho das células sanguíneas.

O primeiro algoritmo foi desenvolvido com base na união da Transformada *Watershed* e o processo de operações morfológicas, assim originando a

metodologia híbrida WT-MO. A Transformada *Watershed* atua na detecção e contagem de hemácias através do processo de rotulação numéricas das células. Essa identificação ocorre pelo reconhecimento de grupos de variáveis com coloração e tamanhos semelhantes ao de hemácias. Por sua vez, as operações morfológicas mostraram uma metodologia mais eficaz para a detecção e contagem dos leucócitos, os quais são retirados da imagem final, com a finalidade de evitar contagens errôneas de células.

O desenvolvimento do segundo algoritmo ocorreu através da junção das metodologias da Transformada *Hough* com um algoritmo de detecção de objetos com coloração azul, assim originando o algoritmo híbrido HT-CD. A Transformada *Hough* atua através da detecção de objetos circulares, marcando-os com um círculo ao seu redor. Considerando que os leucócitos possuem núcleos de coloração azul/roxo, essas células podem ser facilmente detectadas por coloração. O emprego desses algoritmos dificulta que leucócitos sejam contados com hemácias, pois ambas as células possuem formato esférico.

O algoritmo com a HT-CD foi desenvolvido com a finalidade de comparação com a metodologia WT-MO, pois como abordado no capítulo 2 a Transformada *Hough* foi, segundo registros históricos e acadêmicos, a metodologia mais utilizada na temática a qual este trabalho aborda.

5 RESULTADOS

Os resultados das contagens totais de hemácias quantificadas pelas Transformada *Watershed* e Transformada *Hough* e as contagens totais de leucócitos através de operações morfológicas e algoritmo de detecção de coloração, serão apresentados através de avaliações dos algoritmos WT-MO e HT-CD, nos parâmetros de Tempo de Processamento e Tempo de Execução. Para isso, foram realizadas execuções de cada comando em máquinas físicas com diferentes configurações de *hardware*, consistindo em um processador *Intel Dual Core*, com memória RAM de 2GB, um processador *Intel Quad Core*, com 6GB de memória RAM, um processador *Intel Core i3*, com memória RAM de 4GB e um processador *Intel Core i5* com memória RAM de 8GB,

Dessa forma, os comandos “tic toc” foram utilizados via linha de comando do *Matlab prompt*, o qual é responsável pela mensuração do tempo gasto por cada um dos algoritmos durante sua execução. Esse tempo é expresso em segundos. Também houve o emprego do comando “*cputime*”, que atua através do tempo total gasto pela CPU para a execução (em segundos) dos algoritmos desde o momento que foram iniciados.

A função “tic toc” mensura o tempo consumido pelos algoritmos WT-MO e HT-CD, ou seja é responsável por medir o tempo de execução. A função “*cputime*” calcula o seu tempo computacional. Então, juntos apresentam a performance e a eficiência dos algoritmos, pois é durante a primeira execução que as variáveis são alocadas e a memória reservada para a execução do mesmo são referidas.

5.1 Simulações

As análises foram conduzidas através da seleção de 30 imagens de campos de microscopia contendo 6453 hemácias e 187 leucócitos. Ambos os campos foram submetidos a contagens manuais por um profissional biomédico, com posterior contagens pelos algoritmos WT-MO e HT-CD, de detecção e contagem de células sanguíneas. Posteriormente, os valores obtidos foram comparados entre si para a determinação da acurácia das metodologias. Para a obtenção dos resultados desse estudo foram realizadas 368 simulações. Outros parâmetros analisados foram o tempo de execução e tempo de processamento, os quais foram analisados pelas funções “tic toc” e “*cputime*”.

5.1.1 Função “tic toc”

Os comandos “tic toc” foram utilizados via linha de comando no *prompt* do *Matlab*, sendo responsáveis por mensurar o tempo execução de cada uma das amostras analisadas, ou seja, quantificam o tempo que a imagem necessita para realizar uma simulação.

A função “tic” inicia um cronômetro, visando medir o desempenho, sendo responsável por registrar o tempo interno da execução do comando “tic” – e exibindo o tempo decorrido com a função “toc”. Essa função é responsável por mensurar o tempo decorrido a partir do temporizador do cronômetro iniciado pela função “tic”, e juntamente contabiliza o tempo interno da execução do comando “toc”, exibindo o tempo decorrido desde a última chamada pela função “tic” que não apresenta saída, em segundos [101] [102] [103]. A função é apresentada na Figura 18.

```
tic;  
rbc  
time=toc;
```

Figura 18 - Função “tic toc”

5.1.2 Função “cputime”

O comando “cputime” tem como função retornar o tempo total da CPU (em segundos) utilizado pela aplicação em uso no *Matlab* desde o momento em que foi iniciado. Dessa forma, esse comando é responsável por expressar o Tempo de Processamento de cada amostra analisada. Entretanto, é aconselhável medir o tempo do algoritmo usando “tic toc” [101] [102] [103]. A sintaxe dessa função pode ser vista na Figura 19.

```
t = cputime;  
sim('modelo', tempo simulação)  
e = cputime-t
```

Figura 19 - Função “Cputime”

5.1.3 Detecção e contagem de hemácias e leucócitos

Para a realização das contagens de eritrócitos e leucócitos foram utilizadas 30 imagens digitais de esfregaços sanguíneos corados com panótico. A diferença na proporção das células contada é explicada no capítulo 2. As imagens digitais foram, primeiramente, submetidas a metodologia tradicional de contagem manual por um profissional biomédico. Posteriormente, essas imagens foram enviadas ao *software Matlab*, onde as hemácias foram detectadas e contadas pela Transformada *Watershed* (Figura 20) e pela Transformada *Hough* (Figura 21). Os leucócitos foram quantificados através dos de operações morfológicas (Figura 22) e por algoritmo de detecção de coloração (Figura 23). Os resultados obtidos foram comparados com as metodologias manuais.

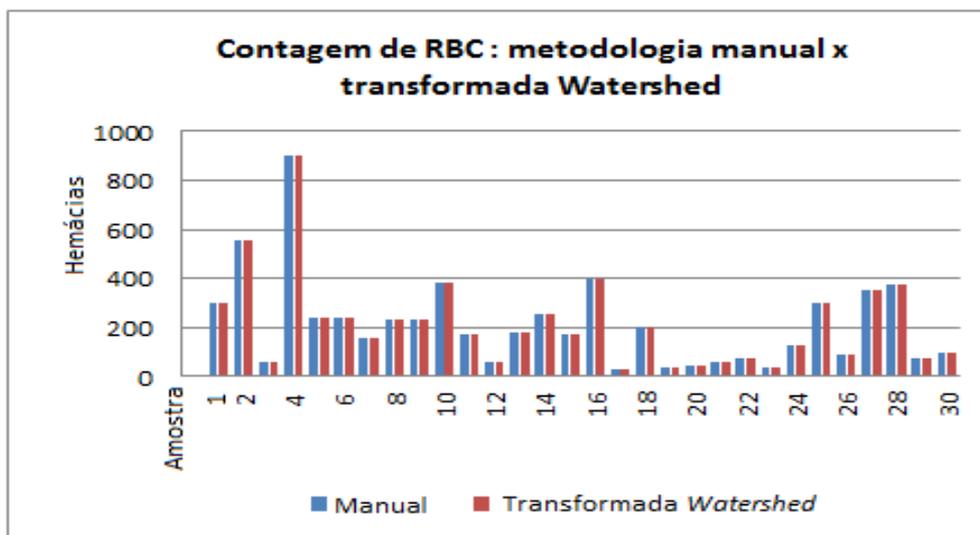


Figura 20- Comparação da contagem de hemácias pelo método manual com a Transformada Watershed

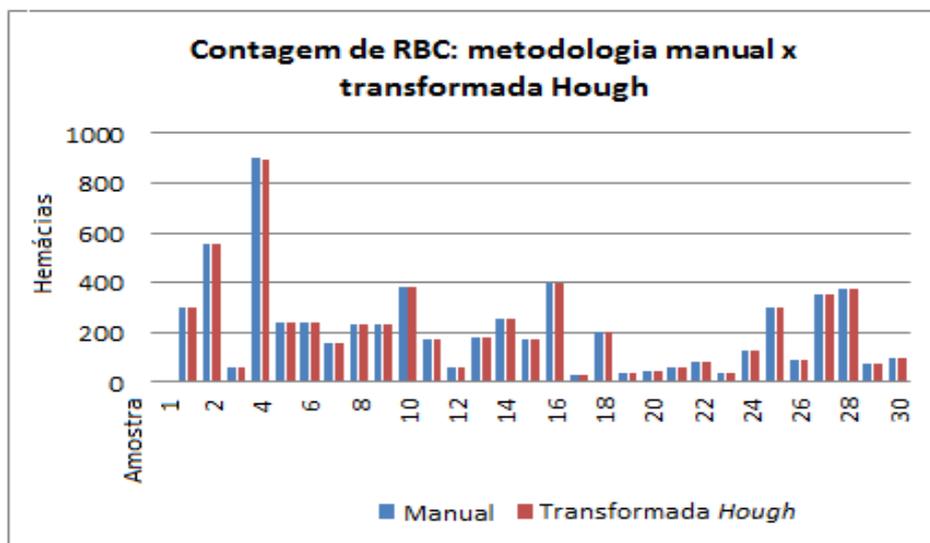


Figura 21-Comparação da contagem de hemácias pelo método manual com a Transformada Hough.

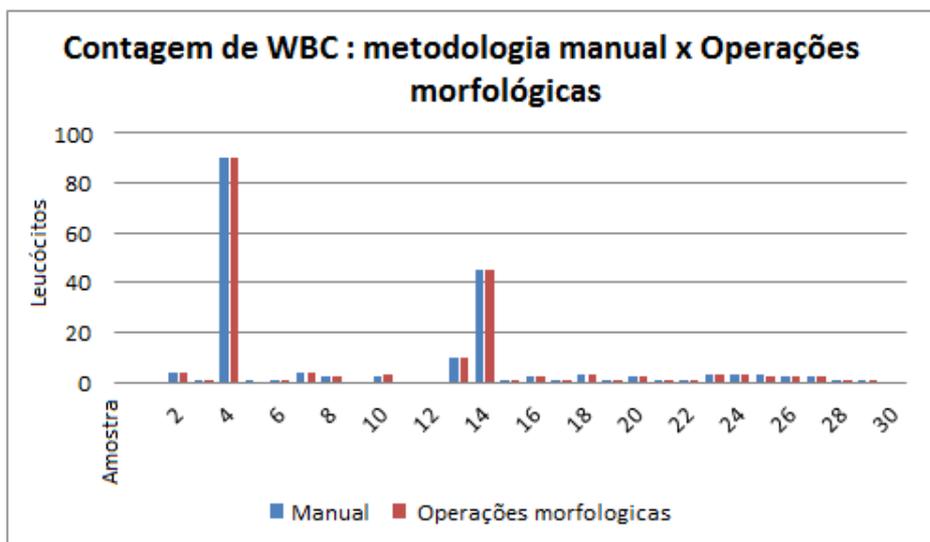


Figura 22-Comparação da contagem de leucócitos pelo método manual com o processo de operações morfológicas

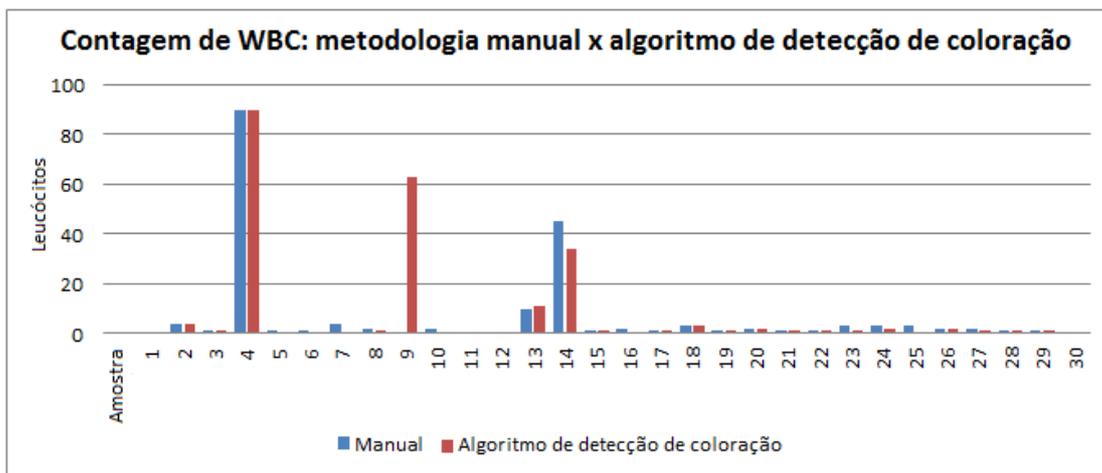


Figura 23- Comparação da contagem de leucócitos pelo método manual com o algoritmo de detecção por coloração

Os algoritmos WT-MO e HT-CD quando comparados com a metodologia manual, demonstraram que a metodologia WT-MO, apresenta uma acurácia maior que o algoritmo HT-CD em relação a contagem de eritrócitos e leucócitos, conforme expresso na Tabela 6.

Tabela 6 - Acurácia dos algoritmos na contagem de células sanguíneas

Acurácia		
Algoritmo	Hemácias	Leucócitos
WT – MO	95,00%	98,30%
HT – CD	78,30%	71,66%

É importante considerar que laboratórios de análises clínicas com baixa demanda de exames por dia ou aqueles que não podem adquirir equipamentos hematológicos devido ao seu alto custo, podem utilizar o algoritmo WT-MO de segmentação de imagens como um método alternativo de diagnóstico hematológico. A rotina laboratorial diária, muitas vezes requer combinar várias atividades ao mesmo tempo. Neste contexto, o processo de contagem manual de células em esfregaços sanguíneo, quando realizado repetidamente, torna-se cansativo e pode levar a erros nas contagens. Tal contagem errônea conduz a um resultado errôneo, o qual pode desencadear um tratamento incorreto para o paciente. O uso da metodologia WT-MO pode ser visto como uma importante ferramenta tanto para o profissional da saúde quanto para o paciente.

Ao adquirir a metodologia WT-MO, o profissional da área da saúde tem como benefício o baixo custo da metodologia, pois essa dispensa a necessidade da aquisição de equipamentos hematológicos automatizados que necessitam de reagentes específicos para o seu funcionamento, sendo necessária apenas a aquisição de um computador ou *notebook* para a tarefa. Além disso, as contagens de células sanguíneas através de processamento digital de imagens, torna o processo menos exaustivo. Laboratórios de maior porte, e com maior demanda de exames por dia, que justificam a aquisição de um equipamento automatizado de hematologia de alto custo, podem utilizar a metodologia WT-MO, como um método confirmatório de exames mais alterados liberados pelos equipamentos convencionais, assim conferindo maior confiabilidade aos laudos médicos emitidos.

Do ponto de visto de paciente, há também a redução no custo final de serviço, pois grande parte do ônus do exame é referente ao tipo de metodologia empregada. Outro benefício importante aos pacientes é a maior confiabilidade e velocidade conferida aos hemogramas, pois esses poderão ser realizados por uma metodologia que evita falhas nas contagens e nos cálculos. A rapidez como que um exame hematológico é emitido é fundamental para a detecção e indicação do tratamento mais adequado ao indivíduo. Nesse contexto, pode-se citar o exemplo de pessoas diagnosticadas com leucocitose (aumento quantitativo de leucócitos, o qual indica a presença de algum tipo de infecção e/ou inflamação), quando esse diagnóstico é feito de forma precoce, o paciente pode ser submetido mais rapidamente a doses de antibióticos, impedindo a progressão e possíveis complicações decorrentes das infecções.

Além disso, quando comparados os resultados obtidos dessa pesquisa com os trabalhos de Arivu [36], Mahmood [86], Xipeng [88] e Ghane [89] a metodologia WT-MO também apresenta uma acurácia elevada, mostrando melhora e eficiência na precisão dos resultados de 20%, 3,13%, 2,55% e 2,93%, respectivamente. Dessa maneira, o algoritmo WT-MO desenvolvido nesse trabalho é uma alternativa viável para a realização de contagem de eritrócitos e leucócitos em laboratórios de análises clínicas, pois a acurácia e confiabilidade dos testes são critérios indispensáveis.

5.1.4 Análise de sensibilidade e especificidade dos algoritmos WT-MO e HT-CD

O desenvolvimento de sistemas, métodos ou testes que envolvem a detecção, diagnósticos ou previsão de resultados, apresenta a necessidade de validação de seus

resultados de forma a quantificar seu poder discriminativo e identificar um procedimento ou método como adequado ou inadequado para determinado tipo de análise. Entretanto, a simples quantificação de acertos em um grupo de teste não reflete adequadamente a eficiência de um sistema, pois a quantificação é dependente da qualidade e da distribuição dos dados neste grupo de teste [104].

Dessa forma, quando o teste apresenta variáveis de resposta binária (1 se o indivíduo for evento e 0 caso contrário) é necessário escolher uma regra de predição que determine onde o indivíduo deverá ser enquadrado (ponto de corte). No caso desse trabalho, a classificação tem como base os valores obtidos durante as contagens manuais de hemácias e leucócitos. Uma forma bastante utilizada para determinar o ponto de corte é através da Curva ROC (*Receiver Operating Characteristic Curve*). A curva ROC plota $P(\hat{Y} = 1|Y = 1)$ (chamado de sensibilidade) versus $1 - P(\hat{Y} = 0|Y = 0)$ (chamado de especificidade) para todos os possíveis pontos de corte entre 0 e 1 [105] [106].

Após a determinação do ponto de corte, é necessário avaliar o poder de discriminação do modelo, isto é, discriminar os eventos dos não eventos. Para isso, foram criadas as métricas: Acurácia, Sensibilidade, Especificidade, Verdadeiro Preditivo Positivo e Verdadeiro Preditivo Negativo. Todas essas métricas são dependentes da matriz de confusão, a qual é representada através da Tabela 7 de contingência em que na linha está o valor previsto e na coluna o valor observado (valor verdadeiro) [104] [105] [106].

Tabela 7 –Matriz de confusão

		Valor verdadeiro (valor observado)	
Valor		Y = 1	Y= 0
preditivo		VP(Verdadeiro Positivo)	FP (Falso Postivo)
		FN (Falso Negativo)	VN (Verdadeiro Negativo)

Sendo:

- Verdadeiro Positivo: o teste é positivo em pacientes doentes, no caso desse trabalho são as células contadas corretamente pelos algoritmos em comparação com as contagens manuais;
- Verdadeiro Negativo: o teste é negativo em paciente saudáveis, no caso desse trabalho são as imagens com ausência de leucócitos tanto nas contagens manuais quanto nas contagens por algoritmos;

- Falso Positivo: o teste é positivo em pacientes saudáveis, nesse caso são células contadas a mais em relação a contagem manual,
- Falso Negativo: o teste é negativo em pacientes doentes, nesse caso são leucócitos contados pelos algoritmos, sendo que na contagem manual esses leucócitos são inexistentes.

Dessa forma, a sensibilidade é dada como probabilidade de um indivíduo avaliado como doente ter seu teste alterado (positivo), ou seja, apresenta alto índice de verdadeiro positivo. A especificidade é caracterizada como a possibilidade de um paciente avaliado como sadio ter seu teste normal (negativo) para determinada patologia. Dessa forma, a especificidade é formada por altos valores de verdadeiro negativo.

Nesse contexto, para a identificação desses parâmetros foram criadas 4 matrizes binárias: (1) matriz para eritrócitos quantificados pelo transformada *Watershed*; (2) matriz para leucócitos quantificados por operações morfológicas; (3) matriz para eritrócitos quantificados pela transformada *Hough* e (4) matriz para leucócitos quantificados pelo algoritmo de detecção por coloração. Posteriormente, essas matrizes foram transferidas para o *software Matlab*, onde houve a expressão dos valores de: Sensibilidade, Especificidade, AROC (área da curva ROC), VPP – Verdadeiro Preditivo Positivo -(é a probabilidade de um indivíduo avaliado e com resultado positivo ser realmente doente.) e VPN – Verdadeiro Preditivo Negativo – (probabilidade de um indivíduo avaliado e com resultado negativo ser realmente normal) [104] [105].

A curva ROC da Transformada *Watershed* é apresentada na Figura 24 sendo complementada pela Tabela 8, onde são apresentados os demais valores fornecidos pela função utilizada. O mesmo acontece na Figura 25, onde é expressa a curva ROC de Transformada *Hough* e complementada pela Tabela 9.

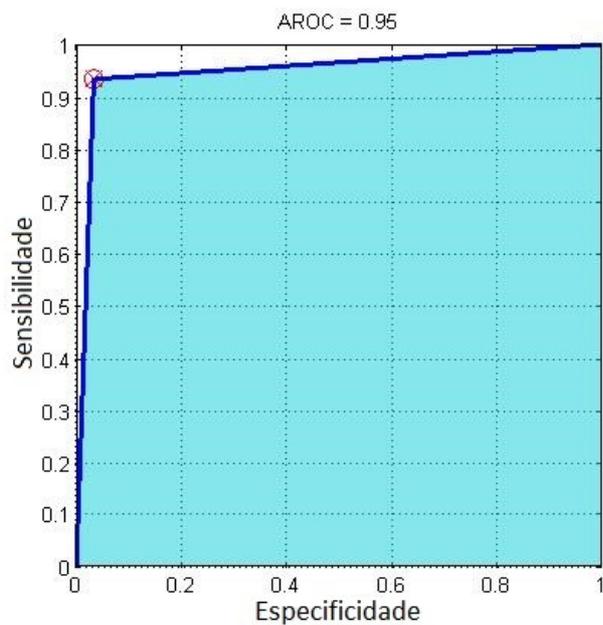


Figura 24 - Curva ROC da contagem de hemácias Transformada Watershed

Tabela 8 – Parâmetros da Curva ROC na contagem de hemácias através do algoritmo WT-MO

Parâmetros da Curva ROC	
Eritrócitos WT-MO	
Distância	0,074
Threshold	0,5
Sensibilidade	0,93
Especificidade	0,96
AROC	0,95
Acurácia	95,00%
PPV	96,60%
NPV	93,54%

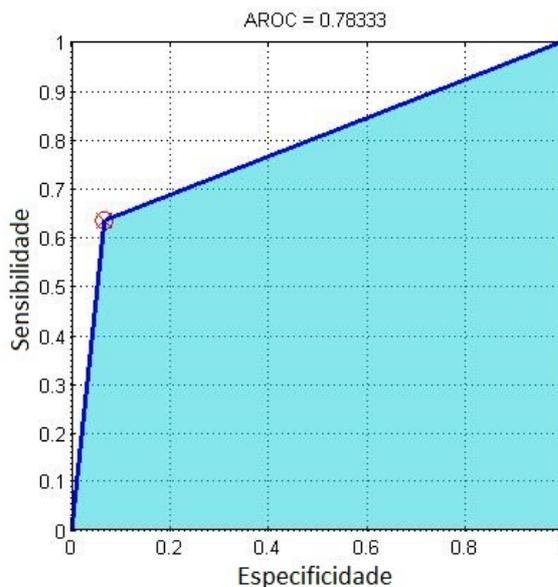


Figura 25- Curva ROC da contagem de hemácias através do algoritmo HT-CD

Tabela 9 - Parâmetros da Curva ROC na contagem de hemácias utilizando o algoritmo HT-CD

Parâmetros da Curva ROC	
Eritrócitos HT-CD	
Distância	0,37
Threshold	0,5
Sensibilidade	0,63
Especificidade	0,93
AROC	0,78
Acurácia	78,30%
PPV	90,47%
NPV	71,79%

Dessa forma, o algoritmo WT-MO apresenta acurácia (16,7%), sensibilidade (30%) e especificidade (3%) maiores do que os valores obtidos pelo algoritmo HT-CD. Assim, o algoritmo WT-MO é um método mais eficaz para a determinação de valores verdadeiros positivo para a contagem de hemácias, sendo então mais adequado para a rotina laboratorial. Dessa forma, o algoritmo WT-MO possui alta sensibilidade para a detecção e contagem de hemácias quando comparado com a metodologia HT- CD.

O mesmo processo foi realizado para a análise dos leucócitos. Dessa forma, a curva ROC do processo de operações morfológicas é apresentada na Figura 26 sendo

complementada pela Tabela 10, onde são apresentados os demais valores fornecidos pela função utilizada. O mesmo acontece na Figura 27, onde é expressa a curva ROC do algoritmo de detecção por coloração e complementada pela Tabela 11.

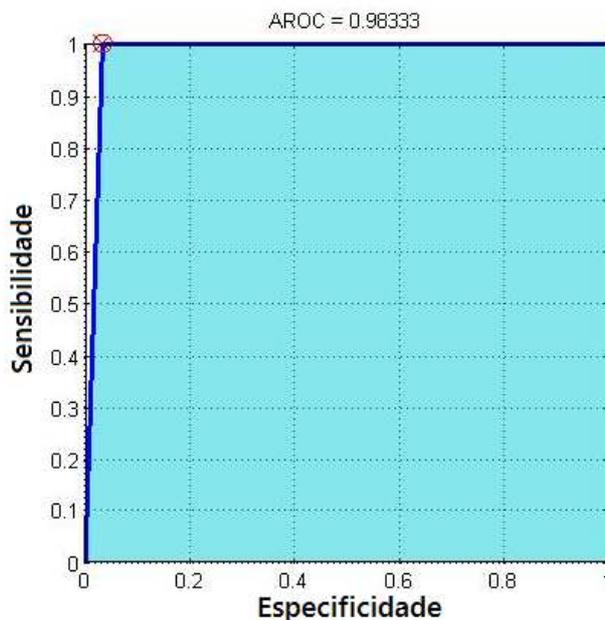


Figura 26 - Curva ROC da contagem de leucócitos através do algoritmo WT – MO

Parâmetros da Curva ROC	
Leucócitos WT-MO	
Distância	0.033
Threshold	0.5
Sensibilidade	0,99
Especificidade	0.96
AROC	0.98
Acurácia	98.3%
PPV	96,70%
NPV	99,99%

Tabela 10 – Parâmetros da Curva ROC na contagem de leucócitos através do algoritmo WT-MO

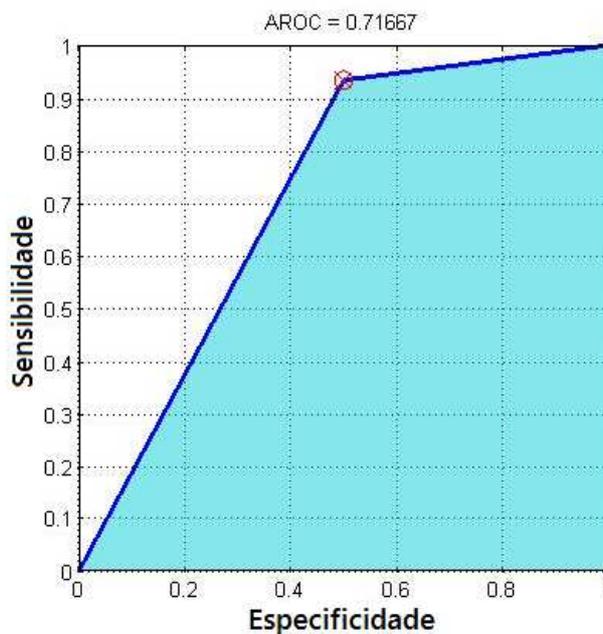


Figura 27-Curva ROC da contagem de leucócitos através do algoritmo HT-CD

Tabela 11 – Parâmetros da Curva ROC na contagem de leucócitos através do algoritmo HT-CD

Parâmetros da Curva ROC	
Leucócitos HT- CD	
Distância	0,504
Threshold	0,5
Sensibilidade	0,933
Especificidade	0,5
AROC	0,716
Acurácia	71,66%
PPV	65,11%
NPV	88,23%

Através de análises comparativas entre os algoritmos desenvolvidos notou-se que a acurácia, sensibilidade e especificidade do algoritmo WT-MO para a contagem de leucócitos, são respectivamente: 26,7%, 3% e 95,5% maiores quando comparados com os mesmos valores obtidos pelo algoritmo HT-CD. Podendo ser visto como uma ferramenta eficaz na detecção e contagem dessas células. Nesse contexto de comparação o algoritmo WT- MO apresenta maior especificidade na contagem de leucócitos, ou seja, apresenta maior distribuições de dados referentes a verdadeiro negativo.

5.1.5 Análise de Tempo de Execução

Uma das desvantagens da metodologia automatizada atualmente disponível é a necessidade de equipamentos que, frequentemente, apresentam alto custo de aquisição, interfaceamento e manutenção. Além disso, esses dispositivos requerem reagentes específicos para sua operação, ou seja, tornam o usuário restrito a compras sempre da mesma empresa.

Visando reduzir os custos com a aquisição de equipamentos e, conseqüentemente, reduzir o valor do produto final, o algoritmo WT-MO é capaz de fornecer uma alternativa com maior viabilidade econômica quando comparado as metodologias atuais. Dessa forma, com a redução do preço final do serviço, é possível alcançar mais amplamente as populações dos países sub - desenvolvidos e em desenvolvimento, onde a renda dos indivíduos, muitas vezes, é incompatível como os custos médicos.

Considerando a necessidade de acessibilidade à saúde para todas as pessoas, o processo de contagem de células do sangue pelo algoritmo WT-MO foi realizado em *hardwares* com diferentes configurações: (1) processador *Dual Core*, com memória RAM de 2GB, (2) processador *Quad Core*, com 6GB de memória RAM, (3) processador *Intel Core i3*, com memória RAM de 4GB e (4) processador *Intel Core i5* com memória RAM de 8GB.

Esses equipamentos foram escolhidos por serem os mais utilizados atualmente e por proporcionarem mais opções aos usuários que escolherem realizar as contagens de células sanguíneas, através dos métodos de processamento de imagens, propostos no presente estudo. Para verificar a aplicabilidade dos algoritmos WT-MO e HT-CD em diferentes cenários, foram analisados o tempo de execução e o tempo de processamento das imagens digitais de esfregaço sanguíneos submetidas a esses algoritmos de segmentação de imagens.

Para a avaliação de desempenho dos algoritmos WT-MO e HT-CD foi utilizado o comando “*tic toc*” (via *prompt* do *software Matlab*). Os resultados das simulações de tempo de execução de cada uma das imagens, foram comparados entre si, sendo expressos por meio de contagens simultâneas hemácias e leucócitos (Figuras 28, 29, 30 e 31).

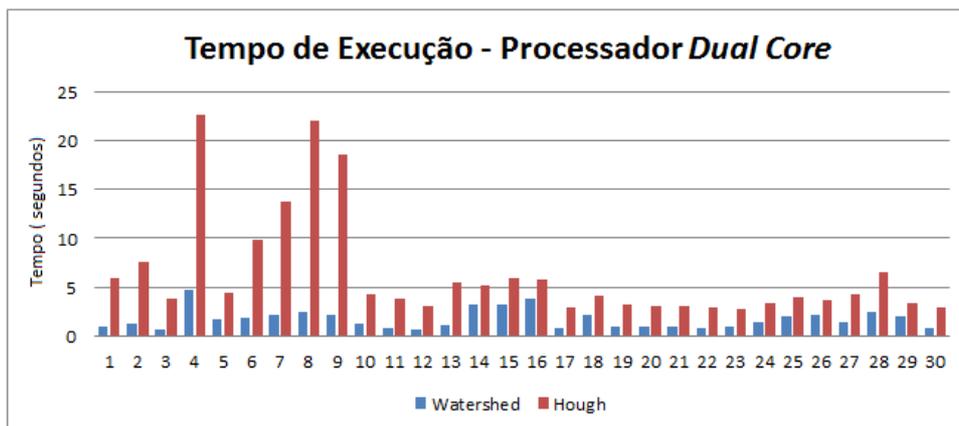


Figura 28 - Tempo de Execução dos algoritmos WT-MO e HT-CD em Processador Intel Dual Core

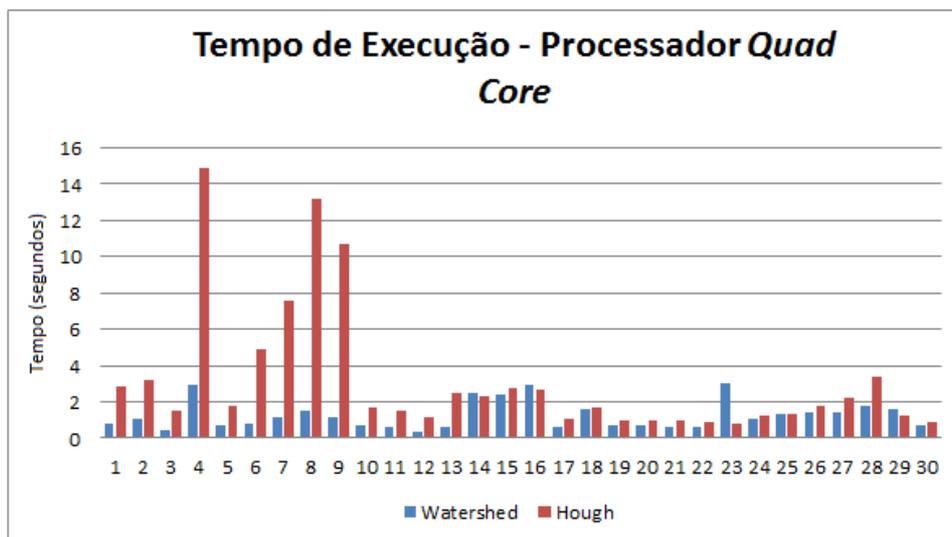


Figura 29 - Tempo de Execução dos algoritmos WT-MO e HT-CD em Processador Intel Quad Core

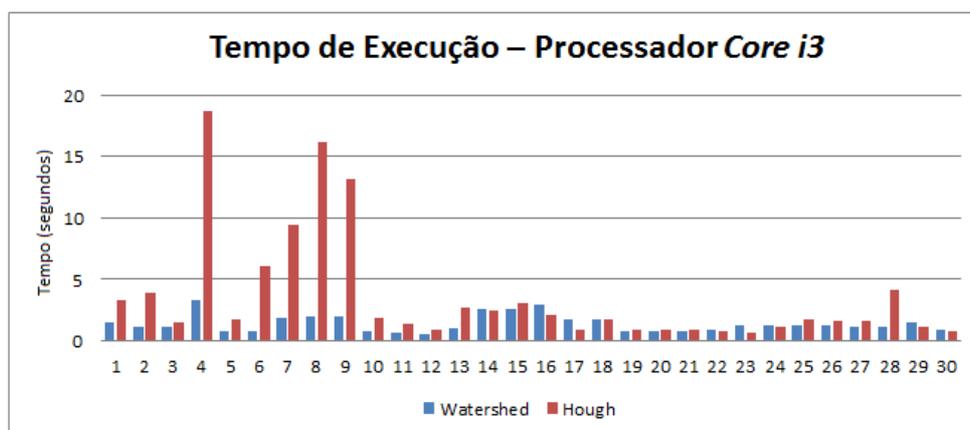


Figura 30 - Tempo de Execução dos algoritmos WT-MO e HT-CD em Processador Intel Core i3

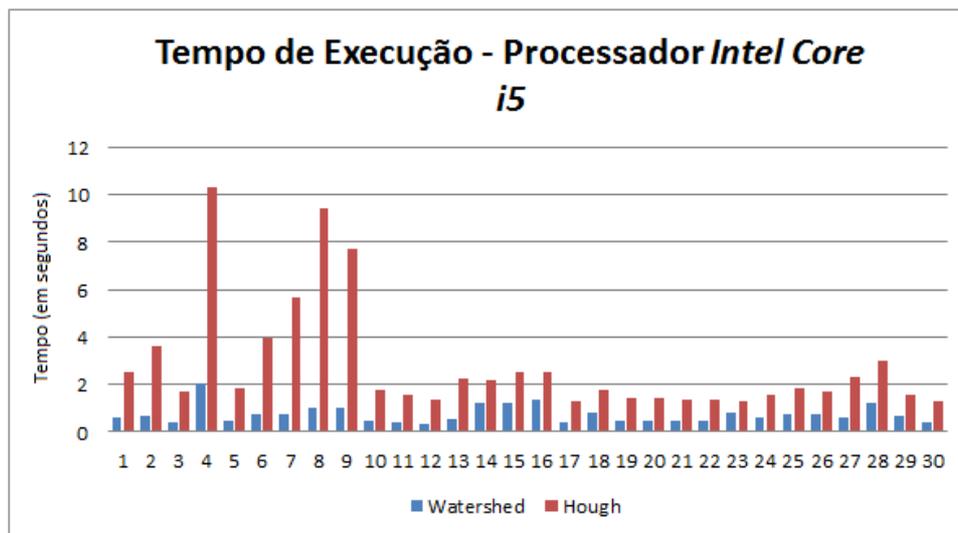


Figura 31-Tempo de Execução dos algoritmos WT-MO e HT-CD em Processador Intel Core i5

Com base nos dados apresentados nas Figuras 28, 29, 30 e 31 pode-se notar que o Tempo de Execução apresentado pelo algoritmo WT-CD foi mais satisfatório que o tempo apresentado pelo algoritmo HT-CD. A seguir, na Tabela 12, é apresentada a comparação das médias dos valores obtidos, os quais demonstram que a metodologia WT-MO apresenta um menor Tempo de Execução para cada amostra analisada.

Tabela 12 – Média de Tempo de Execução dos algoritmos em plataformas de *hardware* distintas

Média de Tempo de Execução		
Processador	WT - MO	HT - CD
Intel Dual Core - 2GB de memória RAM	1,75''	6,41''
Intel Quad Core - 6GB de memória RAM	1,25''	3,15''
Intel Core i3 - 4GB de memória RAM	1,44''	3,57''
Intel Core i5 - 8GB de memória RAM	1,27''	2,81''

É importante ressaltar que em ambientes hospitalares, o tempo é uma variável extremamente relevante, pois quanto mais rápido o resultado do exame é obtido, mais rápido o paciente pode ser encaminhado para tratamento ou exames complementares. Nos casos de pacientes com leucocitose (número de leucócitos acima dos valores de referência), mesmo que o hemograma tenha sido realizado em um equipamento hematológico, recomenda-se que esses laudos sejam confirmados com a realização de um

esfregaço sanguíneo e a contagem manual das células. O algoritmo de segmentação de imagens WT-MO pode ser usado como um método diagnóstico complementar, com a liberação de resultados mais rápida do que os liberados por metodologias manuais.

5.1.6 Análise de Tempo de Processamento

Mantendo a utilização das quatro plataformas de *hardware* citadas anteriormente na sessão 5.1.5, foram realizadas simulações para quantificação do Tempo de Processamento de cada uma das imagens analisadas, através da função “cputime”. Os resultados foram alcançados a partir da comparação dos tempos (em segundos) obtidos por meio de simulações dos algoritmos *WT-MO* e *HT-CD*, conforme apresentados nas Figuras 32, 33, 34 e 35.

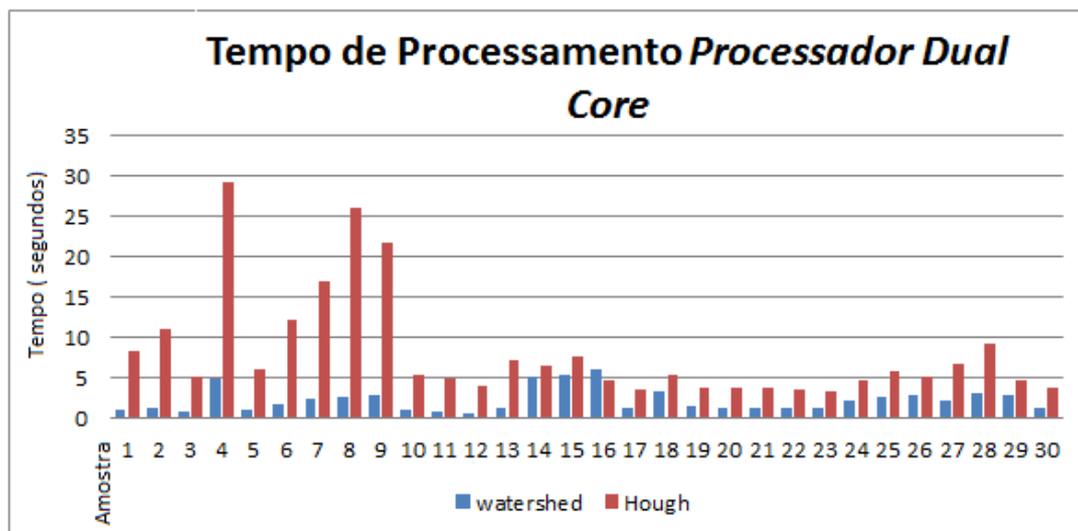


Figura 32- Tempo Processamento dos algoritmos *WT-MO* e *HT-CD* em Processador Intel Dual Core

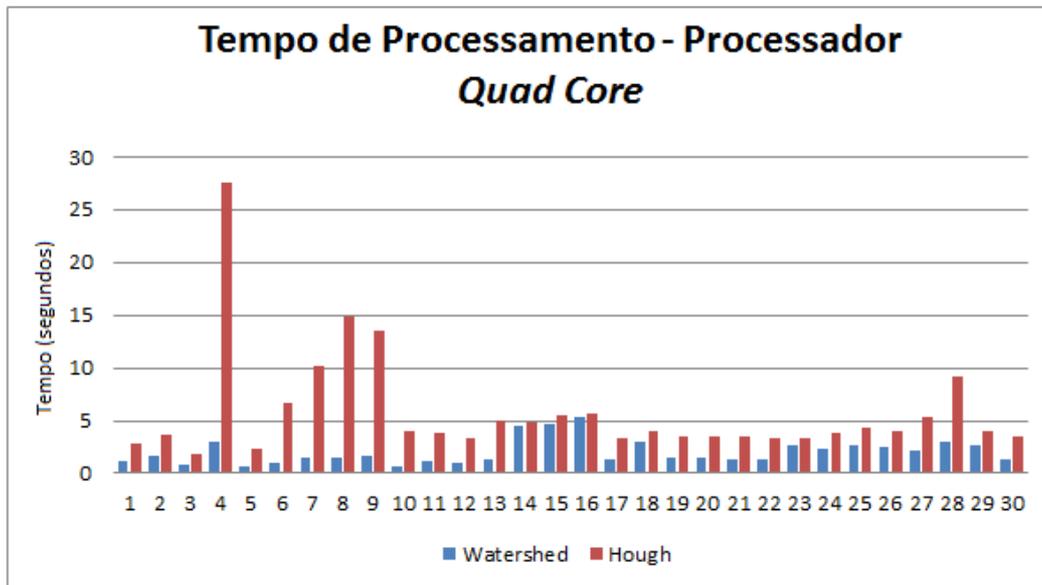


Figura 33- Tempo de Processamento dos algoritmos WT-MO e HT-CD em Processador Intel Quad Core

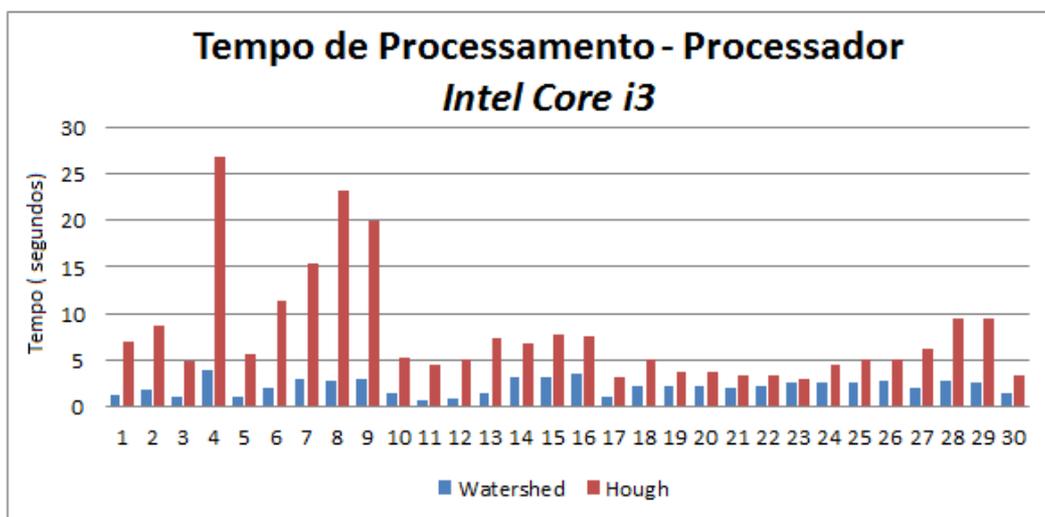


Figura 34 - Tempo de Processamento dos algoritmos WT-MO e HT-CD em Processador Intel Core i3

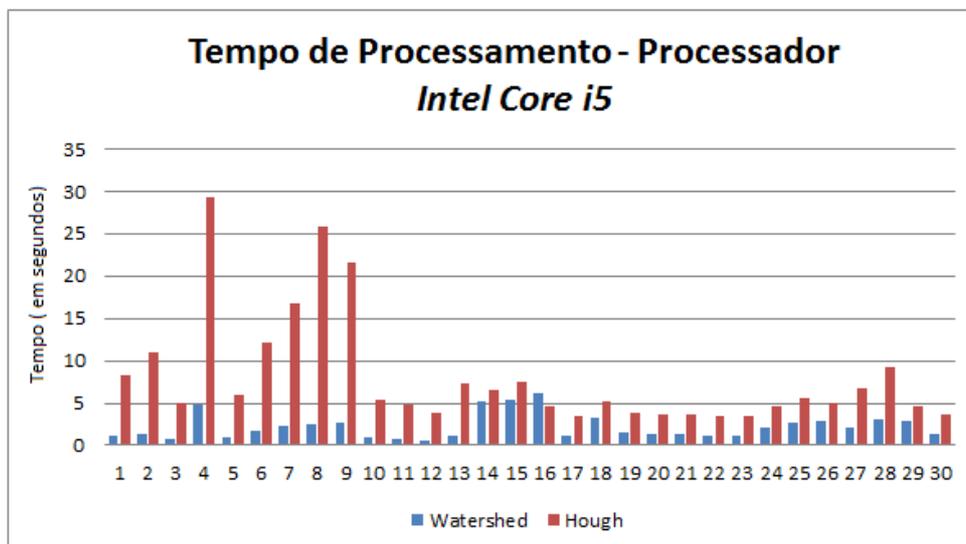


Figura 35-Tempo de Processamento dos algoritmos WT-MO e HT-CD em Processador Intel Core i5

Por meio dos dados apresentados nas Figuras 32,33,34 e 35, pode se notar que o Tempo de Processamento apresentado pelo algoritmo WT-MO foi mais satisfatório que o tempo apresentado pela metodologia HT-CD. A seguir, na Tabela 13, é apresentada a comparação das médias dos valores obtidos, os quais demonstram que a metodologia WT-MO apresenta um menor Tempo de Processamento para cada amostra analisada.

Tabela 10 - Média de Tempo de Processamento dos algoritmos em plataformas de *hardware* distintas

Média do Tempo de Processamento		
Processador	WT - MO	HT - CD
Intel Dual Core - 2GB de memória RAM	2,20''	8,08''
Intel Quad Core - 6GB de memória RAM	2,04''	5,81''
Intel Core i3 - 4GB de memória RAM	2,15''	7,86''
Intel Core i5- 8GB de memória RAM	1,27''	5,32''

Conforme observado na sessão 3, a Transformada *Hough* foi a metodologia mais empregada nos últimos anos para a realização de detecção e contagens de células sanguíneas. Logo podemos considerar essa técnica como um referencial nessa temática. Face aos resultados apresentados na presente sessão é possível notar que o algoritmo WT-MO supera os resultados dos estudos que empregam a Transformada *Hough* para a realização de tais tarefas. Além disso, é possível comparar o tempo de processamento do algoritmo WT - MO com o trabalho de Sahastrabudhe,2016 [95]. Nessa análise o

algoritmo proposto no presente estudo apresenta melhora no consumo de tempo superior a 1000%.

5.1.7 Análise de tempo da primeira simulação do algoritmo WT-MO

Considerando o bom desempenho de tempo de processamento, tempo de execução, acurácia, sensibilidade e especificidade do algoritmo WT-MO para a contagem de células sanguíneas, essa metodologia foi selecionada para a realização de análises a respeito da primeira simulação.

A análise da primeira simulação do algoritmo em cada comando é necessária, pois é no momento da primeira simulação que as variáveis são alocadas e a memória reservada para a execução do algoritmo [101] [102] [103]. Para essa análise foram selecionadas as plataformas de *hardware* Processador *Intel Core i3* e processador *Intel Core i5*, os quais obtiveram melhor desempenho de Tempo de Processamento e Tempo de Execução, conforme apresentado nas sessões 5.1.5 e 5.1.6.

De acordo com estudo de Sobhy, Salem, Dosoki, 2016 [107], foi obtida uma execução de tempo correspondente a 3 segundos por amostra na primeira execução. Simulações do algoritmo WT-MO, em processador *Intel Core i5* apresentaram um melhoramento de 15,3% no tempo da primeira simulação e de 34% de melhora nas simulações seguintes. Esses valores correspondem a média de tempo equivalente a 2,54 segundos e 1,98 segundos, respectivamente. Na Figura 36 são apresentados os resultados (em segundos) referentes as execuções realizadas em uma máquina *Intel Core i5*.

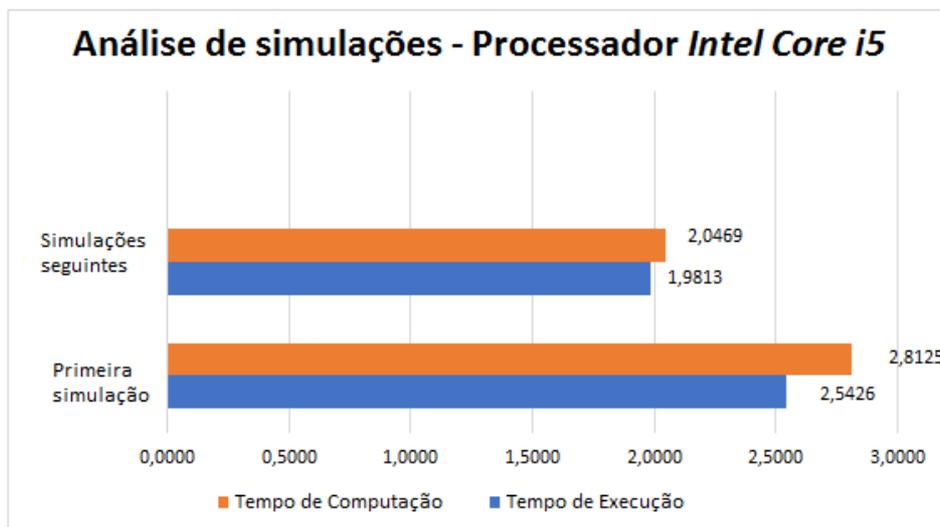


Figura 36 - Análise de simulações da Transformada Watershed em Processador Intel Core i5

As execuções realizadas na plataforma de *hardware Intel Core i3* também demonstraram resultados satisfatórios assim como os obtidos no trabalho de Sobhy, Salem, Dosoki, 2016 [107]. As simulações feitas com o algoritmo WT- MO demonstraram que na primeira execução ocorreu um melhoramento de 34% na performance. Nas demais simulações houve melhora de 42% nas seguintes. Tais valores correspondem a média de tempo de 1,98 segundos e 1,74 segundos, respectivamente. Esses resultados estão apresentados na Figura 37.

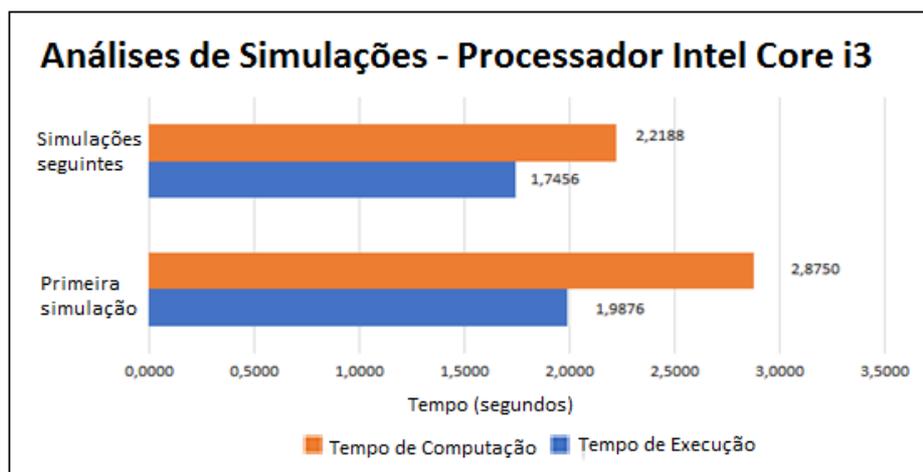


Figura 37- Análise de simulações do algoritmo WT- MO em Processador Intel Core i3

Considerando que os seres humanos são distintos entre si, consequentemente, os resultados de seus exames laboratoriais também são. Essa variação é decorrente do

tipo de patologia do paciente, diferença no tamanho, cor e quantidade das células sanguíneas. Dessa maneira, foram selecionadas 4 imagens do total utilizado nesse trabalho, com o objetivo de analisar a performance do algoritmo WT-MO em amostras com diferentes características, como por exemplo, o tamanho e a quantidade de hemácias e leucócitos. Essas simulações foram realizadas em *hardwares Intel Core i3* e *i5*, entretanto não foram consideradas as análises de primeira execução, sendo apenas investigada a performance do algoritmo em cada uma das amostras. Os resultados sob ótica estão apresentados nas Figuras 38 e 39.

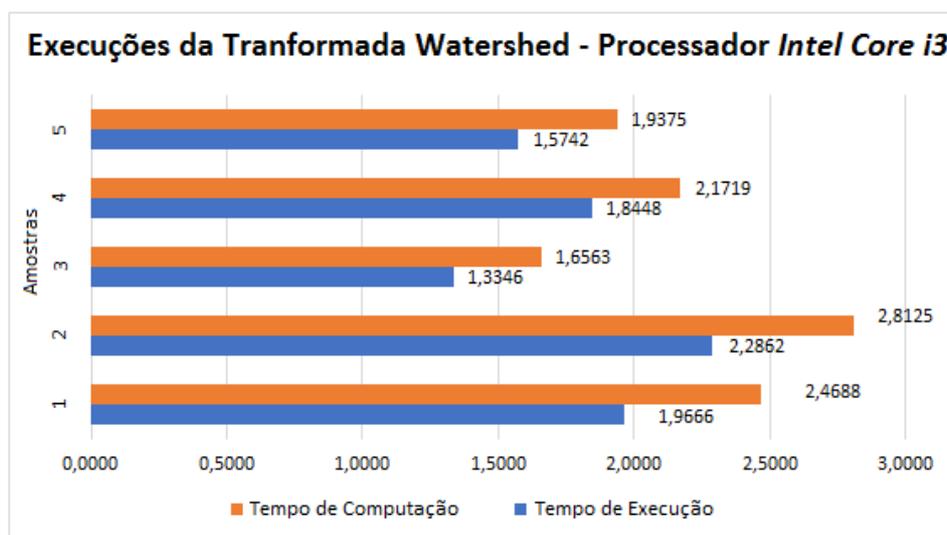


Figura 38 - Execuções de amostras morfologicamente distintas utilizando o algoritmo WT-MO em Processador Intel Core i5.

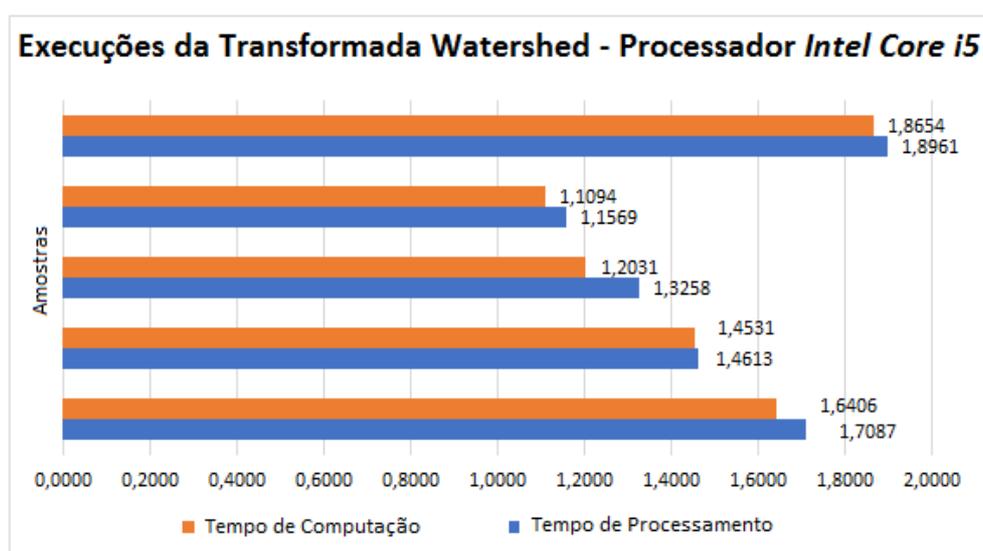


Figura 39 - Execuções de amostras morfologicamente distintas utilizando o algoritmo WT-MO em Processador Intel Core i3

Conforme observado nas Figuras 38 e 39 é possível notar que em processador *Intel Core i3*, o tempo computacional foi elevado. Tal fato é decorrente da ausência de 2 núcleos a menos quando comparado ao processador *Intel Core i5*. Além desse fato, a processador *Intel Core i5* possui o dobro de memória RAM. Entretanto, mesmo com essas diferenças apresentadas, os resultados de tempo do algoritmo WT-MO ainda são satisfatórios a proposta desse trabalho.

As execuções apresentadas nas Figuras 38 e 39 foram comparadas com o estudo de Kaur; Kaur, 2014 [92], onde a Tabela 14 apresenta os resultados sobre a melhor performance obtida:

Tabela 14 - Comparação dos resultados da metodologia WT-MO com trabalho presente na literatura.

<i>Imagens</i>	<i>Trabalho</i>	<i>WT – MO</i>	
	<i>[92]</i>	<i>i3</i>	<i>i5</i>
1	12,72”	84,54%	86,57%
2	2,61”	48,87%	44,01%
3	2,72”	32,18%	51,26%
4	4,76”	66,93%	75,70%

Outra vantagem apresentada pelo uso do algoritmo de segmentação de imagens WT-MO é a possibilidade de criar um banco de imagens de exames de cada paciente, dispensando a necessidade de criar um espaço físico em laboratório para o armazenamento de esfregaços sanguíneos com resultados alterados.

Uma das recomendações médicas mais frequentes é o armazenamento de resultados de teste por longos períodos de tempo. As contagens de células sanguíneas realizadas por meio de imagens podem ajudar o paciente a armazenar seus laudos em formato digital e armazená-los em computadores, telefones celulares, *pen drives* ou até mesmo em nuvem. Desta forma, o risco de deterioração ou perda do laudos é drasticamente reduzido. Outra diferença é a possibilidade de armazenar as imagens das lâminas juntamente com os resultados dos exames de cada paciente, facilitando a análise das células sanguíneas por outros profissionais, sem a necessidade de uma nova coleta de sangue.

Considerando a facilidade de armazenamento e consulta dos relatórios gerados pelo algoritmo WT-MO, os laboratórios, hospitais e clínicas podem armazenar cópias de exames de pacientes. Normalmente, os testes com resultados inalterados são rapidamente descartados pelos laboratórios e muitas vezes não são arquivados pelos médicos. Cópias

de exames de contagem células sanguíneas armazenadas em hospitais e escolas podem servir como ferramentas de estudo e pesquisa para estudantes e profissionais de saúde.

5.1.8 Determinação de Índices Hematimétricos pelo algoritmo WT- MO

Devido aos resultados satisfatórios alcançados pelo algoritmo WT- MO, essa ferramenta foi escolhida para trabalhar em conjunto com funções capazes de determinar os índices hematimétricos (sessão 2.4.3). Para isso foram utilizadas 5 amostras de hemograma, que continham a contagem total de hemácias, hemoglobina, hematócrito, e os valores dos índices hematimétricos VCM, HCM e CHCM. Posteriormente, através da inserção dos valores de hematócrito, a função calculou os valores de VCM, conforme apresentado na Figura 40.

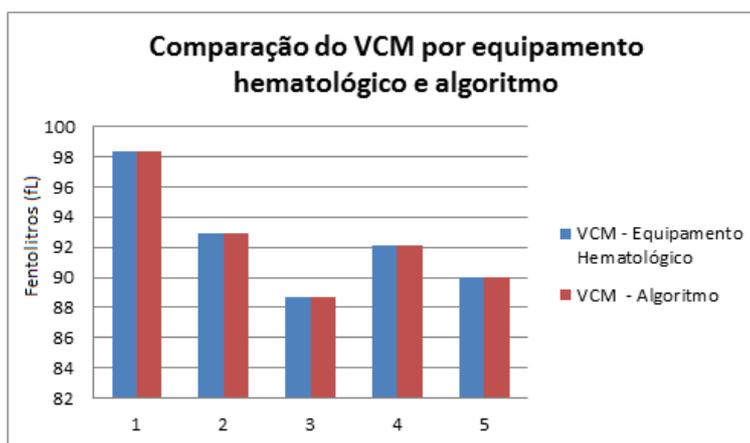


Figura 40 - Comparação do algoritmo de determinação de VCM com equipamento hematológico

Posteriormente, os valores de concentração de hemoglobina e contagem total de hemácias foram inseridas as funções, que foram responsáveis por calcularem os valores de CHM e CHCM presentes nas Figuras 41 e 42.

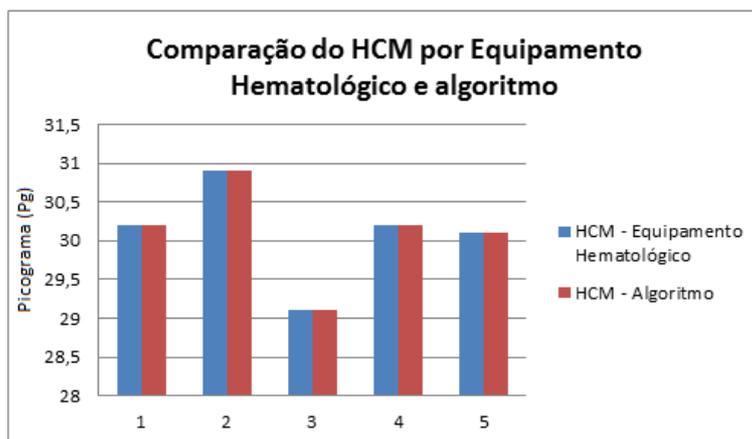


Figura 41- Comparação do algoritmo de determinação de HCM com equipamento hematológico

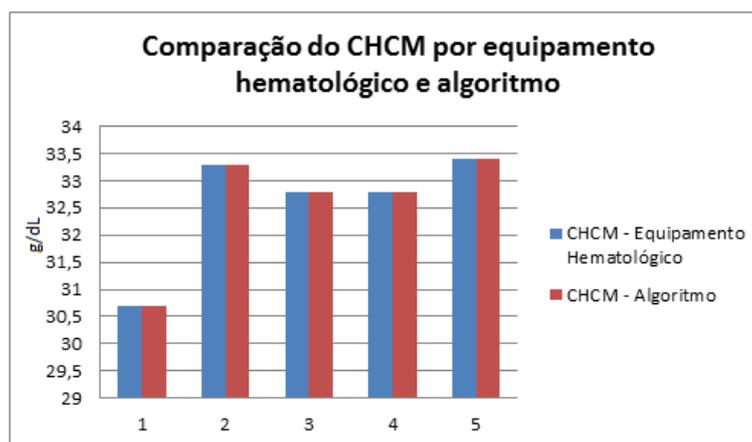


Figura 42 -Comparação do algoritmo de determinação de CHCM com equipamento hematológico

Os valores dos índices hematimétricos VCM, HCM e CHCM obtidos pelo equipamento hematológico, comum em laboratórios de análises clínicas foram utilizados como parâmetros de comparação com os resultados obtidos pelas funções associadas ao algoritmo WT-MO. Assim foi possível verificar que os três algoritmos implementados: VCM, HCM e CHCM apresentaram 100% de acurácia e confiabilidade, os quais são fatores importantes para os diagnósticos médicos. É importante ressaltar que o tempo necessário para a liberação de cada um dos valores de VCM, HCM e CHCM é de 1 segundo, ou seja, são liberados de forma instantânea após a inserção dos dados requeridos.

Considerando a aplicabilidade acadêmica, os algoritmos VCM, HCM e CHCM receberam um comando que auxilia estudantes e profissionais da saúde sobre os índices hematimétricos. O comando “*help*”, é possível visualizar o nome de cada índice hematimétrico bem como sua função no hemograma e seu respectivo valor de referência,

conforme apresentados nas Figuras 43, 44 e 45.

```
>> help vcm
result = Volume Corpuscular médio.
Os índices são referentes ao tamanho a hemácia ( normocitose, macrocitose,
microcitose. VR = 80 a 98 fl
```

Figura 43- Comando "help" para VCM.

```
>> help hcm
result = hcm = Hemoglobina Corpuscular Média. Os
índices são referentes a coloração da hemácia ( normocromico,hipercromica,
e hiperchromica).VR = 27 - 34 pg
```

Figura 44 - Comando "help" para HCM

```
>> help chcm
result = Concentração de Hemoglobina Corpuscular
Média. É um índice associado ao HCM. VR = 32 a 36g/dL
```

Figura 45- Comando "help" para CHCM

5.1.9 Síntese do Capítulo 5

Como pode ser visto através das sessões 5.1.3 a 5.1.8 e da presente sessão, a proposta do algoritmo WT-MO aqui apresentada obteve resultados satisfatórios. Os resultados foram obtidos através de simulações realizadas no *software Matlab*, onde ocorreram as avaliações de Tempo de Execução, Tempo de Processamento, análise da primeira simulação, acurácia e Curva ROC, tanto do algoritmo WT-MO quanto do algoritmo HT-CD.

O Tempo de Processamento e o Tempo de Execução foram obtidos através da execução da proposta em diferentes plataformas de *hardware*, provando sua aplicabilidade no mundo real. Assim, constatou-se que os tempos de processamento, Tempo de Execução e análise da primeira simulação do algoritmo WT-MO apresentaram resultados melhores que trabalhos anteriores, bem como do algoritmo HT-CD, o qual

representa a metodologia mais empregada na literatura como ferramenta de resolução de questões médicas relacionadas a imagens.

A acurácia, sensibilidade e especificidade também são medidas de desempenho e apresentaram resultados expressivos a respeito da proposta deste trabalho. Dessa forma, é constatado tanto a eficiência quanto do algoritmo WT-MO. Esses parâmetros são considerados primordiais para a conclusão de um diagnóstico laboratorial, tornando a metodologia proposta viável.

6 CONCLUSÕES

Em todos os cenários analisados e em todas as amostras, o algoritmo desenvolvido WT-MO obteve melhores resultados de Tempo de Execução e Tempo de Processamento quando comparado a outros trabalhos realizados, resolvendo também os problemas encontrados durante as contagens de hemácias e leucócitos, obtendo um desempenho satisfatório, tanto em acurácia, sensibilidade e especificidade, que são primordiais durante a conclusão de um diagnóstico laboratorial.

A confirmação do diagnóstico ou mesmo a realização de exames laboratoriais por meio de algoritmos, proporciona maior confiabilidade dos resultados tanto aos profissionais de saúde quanto aos pacientes, pois os algoritmos reduzem as chances de falhas humanas. O bom desempenho do algoritmo WT-MO em diferentes plataformas de *hardware* conclui que essa ferramenta é altamente viável para as diferentes realidades dos laboratórios, podendo contribuir diretamente ao acesso a saúde de populações menos favorecidas economicamente.

A área da saúde é um campo amplo diretamente relacionado aos diagnósticos médicos através de imagens. Portanto, o algoritmo WT-MO também prevê que os resultados sugestivos de patologias mais graves possam ser armazenados em arquivos digitais para futuras consultas, dispensando a criação de um espaço físico em hospitais e laboratórios para o armazenamento de dados.

Tanto os algoritmos desenvolvidos nesse estudo (WT-MO e HT – CD) quanto as funções para a determinação dos índices hematimétricos apresentam aplicabilidade acadêmica, pois tem a capacidade de informar os estudantes das áreas médicas dos valores de referência e a aplicabilidade de cada um dos índices.

Desta forma, a completa automação dos exames laboratoriais é uma realidade ainda distante para alguns laboratórios de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. No entanto, a criação de novas metodologias, como a apresentada neste trabalho, utilizando algoritmos de segmentação de imagens, resulta em uma grande redução nos custos com equipamentos sem perda na qualidade e acurácia dos diagnósticos hematológicos.

7 TRABALHOS FUTUROS

Considerando a ampla aplicabilidade e importância da metodologia proposta, aliada a necessidade constante de avanços nas áreas médicas para criações e/ou otimizações de sistemas de detecção e contagem de células visando diagnósticos mais rápidos e precisos, esse trabalho tem sua continuidade relacionada ao desenvolvimento de algoritmos capazes de realizar a contagem de plaquetas em esfregaço sanguíneo. A metodologia apresentada neste trabalho trata apenas da detecção de células em esfregaço sanguíneo, podendo ser ampliada para o desenvolvimento de algoritmos capazes de realizarem contagens de hemácias, leucócitos e plaquetas em câmara de Neubauer, tanto em estado sadio quanto em estado patológico. As detecções de células sanguíneas em estado patológico e as identificações de cada um dos subtipos de leucócitos podem ser realizadas com base em técnicas de *Machine Learning*.

REFERÊNCIAS

- [1] FARAH, Solange Bento. **DNA: Segredos e Mistérios**. In: DNA: segredos e misterios. 2007.
- [2] JUNQUEIRA, Luiz C.; CARNEIRO, Jose. **Biologia Celular e Molecular**. 9ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogam, 2012.
- [3] KOSS, Leopold G.; GOMPEL, Claude. **Introdução à Citopatologia Ginecológica com Correlações Histológicas e Clínicas**. Editora Roca, 2006.
- [4] KARP, Gerald. **Biologia Celular e Molecular: Conceitos e experimentos**. 3ª edição. Barueri, SP, p. 53-54, 2005.
- [5] WEISS, Thomas Fischer. **Cellular Biophysics**. Cambridge, Mass: MIT press, 2017.
- [6] DARWIN, Charles. **A Origem das Espécies**. Martin Claret: Sumaré, 2014
- [7] JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, José. **Histologia Básica**, ; Guarabara Koogan: Rio de Janeiro, Brazil, 2013.
- [8] MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. **Microbiologia médica**. Elsevier Health Sciences, 2017.
- [9] PALLADINO, MICHAEL A. *et al.* **Conceitos de Genética**. Editora Artmed, v. 9, 2010.
- [10] MOLINARO, E.; CAPUTO, L.; AMENDOEIRA, R. **Métodos Para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**. Fio Cruz, Rio de Janeiro, 2009.
- [11] VERRASTRO, T.; LORENZI, T.F.; NETO, S.W. **Hematologia e Hemoterapia: Fundamentos de Morfologia, Patologia e Clínica**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005
- [12] DELVES, Peter J. *et al.* **Essential immunology**. John Wiley & Sons, 2017.
- [13] ABBOT LABORATORIE DE MÉXICO S.A. *Atlas Com Interpretacion Histogramas Y Escatergramas*. Buenos Aires: E.G, 2002
- [14] FISCHBACH, Frances Talaska; DUNNING, Marshall Barnett. **A Manual Of Laboratory And Diagnostic Tests**. Lippincott Williams & Wilkins, 2009.
- [15] ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew HH; PILLAI, Shiv. **Cellular And Molecular Immunology**. Elsevier Health Sciences, 2014.
- [16] SOUZA, Maria Helena L.; RÊGO, Margarethe M. Santiago. **Princípios de Hematologia e Hemoterapia**. Alfa Rio, 2009.
- [17] SILVA, PH da; HASHIMOTO, Yoshio; ALVES, Hemerson Bertassoni. **Hematologia Laboratorial**. Rio de Janeiro: Revinter, 2009.

- [18] SCHMAIER, Alvin H.; PETRUZZELLI, Lilli M. (Ed.). **Hematology for the Medical Student**. Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
- [19] LÖFFLER, Helmut; RASTETTER, Johann. **Atlas of Clinical Hematology**. Springer Science & Business Media, 2012.
- [20] BAIN, Barbara J. **Blood Cells: A Practical Guide**. John Wiley & Sons, 2014.
- [21] HOFFMAN, Ronald *et al.* **Hematology: Basic Principles and Practice**. Elsevier Health Sciences, 2014.
- [22] MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Janeway's Immunobiology**, 8th edn (New York: Garland Science), 2012.
- [23] BERNADETTE, F.; RODAK, George A.; FRISTMA, Katheryn D. **Hematology: Clinical Principles and Applications**. 2015.
- [24] RODAK, Bernadette F.; CARR, Jacqueline H. **Clinical Hematology Atlas**. Elsevier Health Sciences, 2015.
- [25] NEMER, A. S. A.; NEVES, F. J.; FERREIRA, J. E. S. **Manual De Solicitação e Interpretação de Exames Laboratoriais**. Revinter, 2010.
- [26] DA SILVA, Paulo Henrique *et al.* **Hematologia Laboratorial: Teoria e Procedimentos**. Artmed Editora, 2015.
- [27] ERICHSEN, Elza Santiago *et al.* **Medicina Laboratorial Para o Clínico**. Elsevier, 2015.
- [28] STANDRING, Susan (Ed.). **Gray's Anatomia: A Base Anatômica da Prática Clínica**. Elsevier Brasil, 2010.
- [29] FAILACE, Renato. **Hemograma: Manual de Interpretação**. Artmed Editora, 2015.
- [30] DE ROBERTIS, E; HIB, J. **De Robertis Bases da Biologia Celular e Molecular**. 4ª, São Paulo: Guanabara Koogan, 2006.
- [31] DE MELO, Márcio Antonio Wanderley; DA SILVEIRA, Cristina Magalhães. **Laboratório de Hematologia–Teorias, Técnicas e Atlas**. Editora Rubio, 2014.
- [32] KAWTHALKAR, Shirish M. **Essentials of Clinical Pathology**. Jaypee Brothers, Medical Publishers Pvt. Limited, 2018.
- [33] TURGEON, Mary Louise. **Clinical Hematology: Theory and Procedures**. Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
- [34] CIESLA, Betty. **Hematology in Practice**. FA Davis, 2018.
- [35] XAVIER, Ricardo M.; DORA, José Miguel; BARROS, Elvino. **Laboratório na Prática Clínica- Consulta Rápida**. Artmed Editora, 2016.

- [36] [1] ARIVU, S. K.; SATHIYA, M. Analyzing blood cell images to differentiate WBC and counting of linear and non-linear overlapping RBC based on morphological features. **Elixir Comp. Sci. Eng**, v. 48, p. 9410-9413, 2012.
- [37] HANDIN, Robert I.; LUX, Samuel E.; STOSSEL, Thomas P. (Ed.). **Blood: Principles and Practice of Hematology**. Lippincott Williams & Wilkins, 2003.
- [38] MCPHERSON, Richard A.; PINCUS, Matthew R. **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods E-Book**. Elsevier Health Sciences, 2017.
- [39] LABEST. **Hemoglobina**. Minas Gerais: Labtest, 2009
- [40] GONZALEZ, Rafael C.; WOODS, Richards E.; EDDINS, Steven L. **Digital Image Processing Using Matlab**. McGrawHill, 2nd Edition, 2010.
- [41] GONZALEZ, Rafael C.; WOODS, Richard E. **Image Processing. Digital Image Processing**, v. 2, p. 1, 2008.
- [42] CAMPBELL-KELLY, Martin. **Computer, Student Economy Edition: A History of the Information Machine**. Routledge, 2018.
- [43] JONES, Terry; TOWNSEND, David W. History And Future Technical Innovation In Positron Emission Tomography. **Journal of Medical Imaging**, v. 4, n. 1, p. 011013, 2017.
- [44] BHATTACHARYYA, Kalyan B. Godfrey Newbold Hounsfield (1919–2004): The Man Who Revolutionized Neuroimaging. **Annals of Indian Academy of Neurology**, v. 19, n. 4, p. 448, 2016.
- [45] MOULD, Richard F. **Discovery of X-rays: Wilhelm Conrad Röntgen**. In: A Century of X-Rays and Radioactivity in Medicine. Routledge, 2018. p. 17-25.
- [46] MCNEIL, Ian (Ed.). **An Encyclopedia of the History of Technology**. Routledge, 2002.
- [47] EICHHOLZ, Geoffrey G. **Principles of Nuclear Radiation Detection: 0**. CRC Press, 2018.
- [48] HINE, Gerald J. (Ed.). **Instrumentation In Nuclear Medicine**. Academic Press, 2016.
- [49] FANG, P. P. *et al.* **Technical Principles of OCT Angiography**. *Der Ophthalmologe: Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*, v. 113, n. 1, p. 6-13, 2016.
- [50] THE, S. C. O. T. CT Coronary Angiography In Patients With Suspected Angina Due To Coronary Heart Disease (SCOT-HEART): An Open-Label, Parallel-Group, Multicentre Trial. **The Lancet**, v. 385, n. 9985, p. 2383-2391, 2015.

- [51] KWON, Young W.; BANG, Hyochoong. **The Finite Element Method Using MATLAB**. CRC press, 2018.
- [52] REYES-ALDASORO, Constantino Carlos. **Biomedical Image Analysis Recipes In MATLAB: For Life Scientists and Engineers**. John Wiley & Sons, 2015.
- [53] HAHN, B; VALENTINE, D.T. **Essential Matlab for Engineers and Scientists**. Elsevier: Boston, 2007
- [54] TERRAS, Melissa. **Digital Images for the Information Professional**. Routledge, 2016.
- [55] BRONZINO, Joseph D.; PETERSON, Donald R. **The Biomedical Engineering Handbook: Four Volume Set**. CRC Press, 2015.
- [56] MORRIS, Tim. **Image Processing with MATLAB**. Supporting Material for COMP27112, 2016.
- [57] KURUVILLA, Jiss *et al.* **A Review On Image Processing And Image Segmentation**. In: **2016 International Conference On Data Mining And Advanced Computing (SAPIENCE)**. IEEE, 2016. p. 198-203.
- [58] BHAGAVATHI, S. L., & Niba, T. S. (2016). An automatic system for detecting and counting RBC and WBC using fuzzy logic. **J. of Eng. and Appl. Sc.**, 11(11), 2006–2016.
- [59] SOLTANZADE, R. (2010). Classification of Three Types of Red Blood Cells in Peripheral Blood Smear Based on Morphology. **Proceedings of the 2010 ICOSP**. 10.1109/ICOSP.2010.5655754
- [60] NAGESH, A. Sri; VARMA, Dr GPS; GOVARDHAN, Dr A. An Improved Iterative Watershed and Morphological Transformation Techniques for Segmentation of Microarray Images. **IJCA Special Issue on “Computer Aided Soft Computing Techniques for Imaging and Biomedical Applications” CASCT**, v. 2, p. 77-87, 2010.
- [61] [109] VITOR, Giovani Bernardes *et al.* **Analysis of a Step-Based Watershed Algorithm Using CUDA**. In: **Nature-Inspired Computing Design, Development, and Applications**. IGI Global, 2014. p. 321-335.
- [62] [110] MEYER, Fernand. **The Watershed Concept and Its Use In Segmentation: A Brief History**. arXiv preprint arXiv:1202.0216, 2012.
- [63] BAI, Min; URTASUN, Raquel. Deep Watershed Transform For Instance Segmentation. In: **Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition**. 2017. p. 5221-5229.

- [64] WANG, Lei *et al.* **Principles and methods for automatic and semi-automatic tissue segmentation in MRI data. Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine**, v. 29, n. 2, p. 95-110, 2016.
- [65] ANTOLOVIC, Danko. **Review of The Hough Transform Method, with an Implementation of the Fast Hough Variant for Line Detection.** Department Of Computer Science, Indiana University, 2008.
- [66] NAVA, F. Alejandro. The intersective Hough transform for geophysical applications. **Geofísica internacional**, v. 53, n. 3, p. 321-332, 2014.
- [67] YE, Huashan *et al.* A new method based on hough transform for quick line and circle detection. In: 2015 **8th International Conference on Biomedical Engineering and Informatics (BMEI)**. IEEE, 2015. p. 52-56.
- [68] OLSON, Clark F. Constrained Hough Transforms for Curve Detection. **Computer Vision and Image Understanding**, v. 73, n. 3, p. 329-345, 1999.
- [69] SOLTANZADEH, Ramin; RABBANI, Hossein. Classification Of Three Types Of Red Blood Cells In Peripheral Blood Smear Based On Morphology. In: **IEEE 10th International Conference On Signal Processing Proceedings. IEEE**, 2010. p. 707-710.
- [70] ADIGA, PS Umesh; CHAUDHURI, B. B. Region Based Techniques for Segmentation of Volumetric Histo-Pathological Images. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 61, n. 1, p. 23-47, 2000.
- [71] RAFTERY, Adrian E. **Accurate and Efficient Curve Detection in Images: The Importance Sampling Hough Transform.** 2001.
- [72] LI, Qiang; XIE, Yonghong. Randomised Hough Transform with Error Propagation For Line and Circle Detection. **Pattern Analysis & Applications**, v. 6, n. 1, p. 55-64, 2003.
- [73] SONG, Jiqiang; LYU, Michael R. A Hough Transform Based Line Recognition Method Utilizing Both Parameter Space and Image Space. **Pattern recognition**, v. 38, n. 4, p. 539-552, 2004.
- [74] BAGGETT, Daniel *et al.* Whole cell segmentation in solid tissue sections. **Cytometry Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 67, n. 2, p. 137-143, 2005.
- [75] WU, Jianhua *et al.* A Novel Color Image Segmentation Method and Its Application to White Blood Cell Image Analysis. In: 2006 **8th International Conference on Signal Processing. IEEE**, 2006.

- [76] KUMAR, R. Sukesh; VERMA, Abhisek; SINGH, Jasprit. Color Image Segmentation and Multi-Level Thresholding by Maximization of Conditional Entropy. **International Journal of Signal Processing**, v. 3, n. 1, p. 121-125, 2006.
- [77] HOW, Khoo Boon *et al.* Red blood cell segmentation utilizing various image segmentation techniques. In: **Proceeding of International Conference on Man-Machine Systems**. 2006. p. 15-16.
- [78] KHARMA, Nawwaf *et al.* Automatic segmentation of cells from microscopic imagery using ellipse detection. **IET Image Processing**, v. 1, n. 1, p. 39-47, 2007.
- [79] SMEREKA, Marcin; DULEBA, Ignacy. Circular Object Detection Using A Modified Hough Transform. **International Journal of Applied Mathematics and Computer Science**, v. 18, n. 1, p. 85-91, 2008.
- [80] GUO, Siyu *et al.* An Improved Hough Transform Voting Scheme Utilizing Surround Suppression. **Pattern Recognition Letters**, v. 30, n. 13, p. 1241-1252, 2009.
- [81] CAO, Guitao *et al.* Detection Of Red Blood Cell In Urine Micrograph. In: 2009 **3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering**. IEEE, 2009. p. 1-4.
- [82] ROY, A; DIMAYUGA, G. T.; ONG, R. C. S. P.; GEFERSON O; SIY, S. C.; SOHRABI, L.; GUTIERREZ, M.O. Leukemia Detection Using Digital Image Processing in Matlab. **ECE Student Forum, De La Salle University, Manila**. March 26, 2010.
- [83] KAREEM, Saumya; MORLING, Richard CS; KALE, Izzet. A Novel Method to Count the Red Blood Cells in Thin Blood Films. In: 2011 **IEEE International Symposium of Circuits and Systems (ISCAS)**. IEEE, 2011. p. 1021-1024.
- [84] SAVKARE, S. S.; NAROTE, S. P. Automatic Classification of Normal And Infected Blood Cells for Parasitemia Detection. **Int J Comput Sci Net Sec**, v. 11, p. 94-97, 2011.
- [85] BERGE, Heidi *et al.* Improved Red Blood Cell Counting in Thin Blood Smears. In: 2011 **IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro**. IEEE, 2011. p. 204-207.
- [86] MAHMOOD, Nasrul Humaimi; MANSOR, Muhammad Asraf. Red Blood Cells Estimation Using Hough Transform Technique. **Signal & Image Processing**, v. 3, n. 2, p. 53, 2013.
- [88] MOHAMMED, E. A.; *et al.* Chronic Lymphocytic Leukemia Cell Segmentation From Microscopic Blood Images Using Watershed Algorithm And Optimal Thresholding. **26th IEEE Canadian Conference Of Electrical And Computer Engineering (CCECE)**, 2013

- [89] PUTZU, L and DI RUBERTO, C. White Blood Cells Identification and Counting from Microscopic Blood Image. **International Journal of Medical, Health, Pharmaceutical and Biomedical Engineering** Vol:7 No:1,2013.
- [90] VENKATALAKSHMI, B.; THILAGAVATHI, K. Automatic Red Blood Cell Counting Using Hough Transform. In: 2013 **IEEE Conference on Information & Communication Technologies**. IEEE, 2013. p. 267-271.
- [91] MOGRA, Monika; SRIVASTAVA, Vivek. A Comprehensive Review Of Analysis of Counting Blood Cells Using Different Image Processing Algorithms. **Int. J. Eng. Sci. Invention**, v. 3, n. 6, p. 29-31, 2014.
- [92] KAUR, Rajwinder; KAUR, Harpreet. Comparative Analysis of White Blood Cell By Different Segmentation Methods Using Knowledge Based Learning. **Int. J. Adv. Res. Elect. Electr. Instrum. Eng.**(An ISO 3297: 2007 Certified Organization 3, v. 9, p. 29-31, 2014.
- [93] CHOURASIYA, Sumeet; RANI, G. Usha. Automatic Red Blood Cell Counting Using Watershed Segmentation. **Hemoglobin**, v. 14, p. 17, 2014.
- [94] NASREEN, Najiya; KUMAR, C.; NABEEL, A. P. Counting Of RBC Using Circular Hough Transform With Median Filtering. In: **Proceeding of Third National Conference on Emerging Trends in Engineering**. 2015. p. 150-153.
- [95] SAHASTRABUDDHE, Akshaya P.; AJIJ, S. D. Blood Group Detection And RBC, WBC Counting: An Image Processing Approach. **Int. J. Eng. Comput. Sci**, v. 5, p. 18635-18639, 2016.
- [96] BHAGAVATHI, S. L.; NIBA, S. Thomas. An Automatic System For Detecting And Counting RBC And WBC Using Fuzzy Logic. **ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences**, v. 11, n. 11, p. 6891-6894, 2016.
- [97] PAN, Xipeng *et al.* Accurate Segmentation Of Nuclei In Pathological Images Via Sparse Reconstruction and Deep Convolutional Networks. **Neurocomputing**, v. 229, p. 88-99, 2017.
- [98] GHANE, Narjes *et al.* Segmentation of White Blood Cells from Microscopic Images Using a Novel Combination of K-Means Clustering and Modified Watershed Algorithm. **Journal of Medical Signals and Sensors**, v. 7, n. 2, p. 92, 2017.
- [99] SHAHIN, A. I. *et al.* A Novel White Blood Cells Segmentation Algorithm Based on Adaptive Neutrosophic Similarity Score. **Health Information Science and Systems**, v. 6, n. 1, p. 1, 2018.

- [100] BANDYOPADHYAY, Samir K. Method for Blood Cell Segmentation. **Journal of Global Research in Computer Science**, v. 2, n. 4, p. 130-135, 2011.
- [101] DAVIS, Timothy A. **MATLAB Primer**. CRC press, 2010.
- [102] MATHWORKS, INC. **MATLAB: The Language of Technical Computing**. Mathworks, Inc., 2010.
- [103] MATHWORKS. **Image Processing Toolbox: User's Guide**. Mathworks, Inc.2016.
- [104] KAWAMURA, Takao. Interpretação de um Teste sob a Visão Epidemiológica: Eficiência de um Teste. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 79, n. 4, p. 437-441, 2002.
- [105] SABBATINI, Renato ME. Um Programa Para O Cálculo Da Acurácia, Especificidade e Sensibilidade de Testes Médicos. **Revista Informédica**, v. 2, n. 12, p. 19-21, 1995.
- [107] SALEM, Nancy; SOBHY, NOORHAN M.; EL DOSOKY, Mohamed. A Comparative Study of White Blood Cells Segmentation Using Otsu Threshold And Watershed Transformation. **Journal of Biomedical Engineering and Medical Imaging**, v. 3, n. 3, p. 15, 2016.

ANEXOS

LISTA DE PUBLICAÇÕES

ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS E ANAIS DE CONGRESSOS

Padilha, R.; Iano, Y.; Moschim, E.; Loschi, J. H.; **Monteiro, A.C.B.**; “Computational Simulation Performance Based In Hybrid Model For Broadcasting Systems”, in SET International Journal of Broadcast Engineering, SET IJBE, v. 3, 2017 ISSN 2446-9432 / ISSN 2446-9246

Padilha, R.; Iano, Y.; Moschim, E.; **Monteiro, A. C. B.**; Loschi, J. H.; “Computational Simulation Performance based in Hybrid Model for Telecommunication Systems”. BTSym’17, v.3., Campinas, SP – Brasil, December 2017. BTSym 2017 Proceedings. [ISSN 2447-8326](#)

Monteiro, A. C. B.; Iano, Y.; Padilha, R.; “A Methodology for Determining Hematimetric Indices Using High Accuracy Algorithms”. BTSym’17, v.3., Campinas, SP – Brasil, December 2017. [ISSN 2447-8326](#)

Monteiro, A. C. B.; Iano, Y.; Padilha, R.; “An Improved and Fast Methodology for Automatic Detecting and Counting of Red and White Blood Cells Using Watershed Transform”. VIII Simpósio de Instrumentação e Imagens Médicas (SIIM)|VII Simpósio de Processamento de Sinais da UNICAMP (SPS) - SIIMSPS 2017. São Bernardo do Campo, SP – Brasil, 2017. [ISSN 2359-3334](#).

Monteiro, A. C. B.; Iano, Y.; Padilha, R.; “Proposal of a Medical Algorithm Based on the Application of Digital Image Processing and Visual Communication Techniques”, in SET International Journal of Broadcast Engineering, SET IJBE, v. 2018, p. 58-66, 2018 ISSN Print: 2446-9246 ISSN Online: 2446-9432. doi: 10.18580/setijbe.2018.8. Web Link: <http://dx.doi.org/10.18580/setijbe.2018.8>

Padilha, R.; Iano, Y.; **Monteiro, A. C. B.**; Loschi, J. H.; “Improvement of the Content Transmission in Broadcasting Systems: Potential Proposal to Rayleigh and Rician Multichannel MIMO Systems”, in SET International Journal of Broadcast Engineering, SET IJBE, v. 2018, p. 23-33, 2018 ISSN Print: 2446-9246 ISSN Online: 2446-9432. doi: 10.18580/setijbe.2018.3. Web Link: <http://dx.doi.org/10.18580/setijbe.2018.3>

Padilha, R.; Iano, Y.; Moschim, E.; **Monteiro, A. C. B.**; Loschi, J. H.; “Computational Performance of An Hybrid Model for Wireless Telecommunication Systems with Multipath Rayleigh”. Proceedings of the 3rd Brazilian Technology Symposium, chapter 20. 1ed.: Springer, 2018, v. 1, p. 193-203. Springer International Publishing AG, part of Springer Nature 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-319-93112-8_20

Monteiro, A. C. B.; Iano, Y.; Padilha, R.; “Detecting and Counting of Blood Cells Using Watershed Transform: An Improved Methodology”. Proceedings of the 3rd Brazilian Technology Symposium, chapter 31. 1ed.: Springer, 2018, v. 1, p. 301-310.

Springer International Publishing AG, part of Springer Nature 2018.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-93112-8_31

Monteiro, A. C. B.; Iano, Y.; Padilha, R.; “General Aspects of Pathophysiology, Diagnosis and Treatment of Sickle Cell Disease”. Proceedings of the 3rd Brazilian Technology Symposium, chapter 32. 1ed.: Springer, 2018, v. 1, p. 311-318. Springer International Publishing AG, part of Springer Nature 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-319-93112-8_32

Monteiro, A. C. B.; Iano, Y.; Padilha, R.; Razmjoo, N.; “WT-MO Algorithm: Automated Hematological Software Based on the Watershed Transform for Blood Cell Count. Advances in Environmental Engineering and Green Technologies. 1ed.Hershey: IGI Global, 2019, v. 1, p. 39-79.

Monteiro, A. C. B.; Iano, Y.; Padilha, R.; “Fast and Improved Algorithm for Detection and Counting of Red and White Blood Cells Using Watershed Transform with Morphological Operations (WT-MOs)”. 2018. Registro de Software em processo. INOVA- UNICAMP.

Estrela, V. V., **Monteiro, A. C. B.**, R. P. França, Y. Iano, A. Khelassi, and N. Razmjoo. “Health 4.0: Applications, Management, Technologies and Review”. Medical Technologies Journal, Vol. 2, no. 4, Jan. 2019, pp. 262-76, doi:<https://doi.org/10.26415/2572-004X-vol2iss4p262-276>.

Monteiro, A. C. B.; Iano, Yuzo ; Franca, R. P. ; Arthur, R. . “Medical-Laboratory Algorithm WTH-MO For Segmentation of Digital Images of Blood Cells: A New Methodology for Making Hemograms”. International Journal of Simulation Systems, Science & Technology Special Issue: Conference Proceedings UKSim2019, v. 20, p. 19.1-19.5, 2019. ISSN: 1473-804x online, 1473-8031 print. DOI 10.5013/IJSSST.a.20.S1.19

Franca, R. P.; Iano, Yuzo ; **Monteiro, A. C. B.;** Arthur, R. . “A Proposal to Improve Channels with Rician Fading Through the Methodology CBEDE”. International Journal of Simulation Systems, Science & Technology Special Issue: Conference Proceedings UKSim2019, v. 20, p. 20.1-20.5, 2019. ISSN: 1473-804x online, 1473-8031 print. DOI 10.5013/IJSSST.a.20.S1.19

Monteiro, A. C. B.; Y. Iano ; Franca, R. P. ; Arthur, R. ; Estrela, V. V. ; Rodriguez, A. D. ; Assumpcao, S. L. L. . “Development od Digital Image Processing Methodology WT-MO: An Algorithm of High Accuracy in Detection And Counting of Erythrocytes, Leukocytes and Blasts”. In: IV International Symposium on Immunobiologicals and VII Seminário Anual Científico e Tecnológico, 2019, Rio de Janeiro - RJ. Anais do IV International Symposium on Immunobiologicals and VII Seminário Anual Científico e Tecnológico. Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRU: Ministério da Saúde, 2019. v. 7. p. 160-160.

R.P. França ; Iano, Yuzo ; **Monteiro, A. C. B. ;** Arthur, R. ; Estrela, V. V. ; Assumpcao, S. L. L. ; Razmjoo, N. . “Potential Model for improvement og the Datas Transmission in Healthcare Systems”. In: IV International Symposium on Immunobiologicals e VII

Seminário Anual Científico Tecnológico, 2019, Rio de Janeiro - RJ. Anais do IV International Symposium on Immunobiologicals e VII Seminário Anual Científico Tecnológico. Rio de Janeiro - RJ: Ministério da Saúde, 2019. v. 7. p. 161-161.

Monteiro A. C. B.; Y. Iano ; Franca, R. P. . Counting of Erythrocytes and Leucocytes Through the Digital Image Segmentation Algorithm WT-MO: A Quick And Low-cost Methodology. In: Lais Daiene Cosmosk. (Org.). Medicina e Biomedicina. 1ed.Ponta Grossa: Atena, 2019, v. 1, p. 46-56.

Marinho, C.E.V.; Estrela, V.V.; **Monteiro, A. C. B.**; França, R.P.; Loschi, H.J.; Hemanth, J.; Herrmann, A.E.; Razmjoooy, N.; “A Model For Medical Staff Idleness Minimization”. Proceedings of the 4rd Brazilian Technology Symposium Emerging Trends and Challenges in Technology, 2ed.: Springer Nature, 2019.

França, R.P.; **Monteiro, A. C. B.**; Peluso, M.; Iano, Y.; “Development of A Kernel: A Deeper Look At The Architecture of An Operating System”. Proceedings of the 4rd Brazilian Technology Symposium Emerging Trends and Challenges in Technology, 2ed.: Springer Nature, 2019.

França, R.P.; Iano, Y.; **Monteiro, A. C. B.**; Rangel, A.; Estrela, V.V.; “Betterment Proposal to Multipath Fading Channels Potential to MIMO Systems”. Proceedings of the 4rd Brazilian Technology Symposium Emerging Trends and Challenges in Technology, 2ed.: Springer Nature, 2019.

Monteiro, A. C. B.; Iano, Y.; França, R.P.; Rangel, A.; “Methodology of High Accuracy, Sensitivity and Specificity in the Counts of Erythrocytes and Leukocytes in Blood Smear Images”. Proceedings of the 4rd Brazilian Technology Symposium Emerging Trends and Challenges in Technology, 2ed.: Springer Nature, 2019.

Monteiro, A. C. B.; Iano, Y.; França, R.P.; Rangel, A.; Estrela, V.V.; “A comparative study between methodologies based on the Hough Transform and Watershed Transform on the blood cell count”. Proceedings of the 4rd Brazilian Technology Symposium Emerging Trends and Challenges in Technology, 2ed.: Springer Nature, 2019.

Monteiro, A. C. B.; Iano, Y.; França, R.P.; Rangel, A.; Estrela, V.V.; “Toxoplasmosis gondii: From Discovery to Advancement Over Time”. Proceedings of the 4rd Brazilian Technology Symposium Emerging Trends and Challenges in Technology, 2ed.: Springer Nature, 2019.

ARTIGOS E CAPÍTULOS ACEITOS EM PERIÓDICOS E ANAIS DE CONGRESSOS

Monteiro, A. C. B.; Iano, Yuzo; Franca, R. P..“An Improved Methodology for Automatic Detecting and Counting of Red and White Blood Cells Using Watershed Transform”. IEEE 2017 (2nd) International Conference on Automation, Cognitive Science, Optics, Micro Electro-Mechanical System, and Information Technology (ICACOMIT 2017). Jakarta, Indonesia. 23-24 October 2017.

Monteiro, A. C. B.; Iano, Yuzo ; Franca, R. P..“Automatic Detecting and Counting of Blood Cells Using Watershed Transform: An Improved Methodology”. IEEE 2017 Third International Conference on Electrical, Electronics and System Engineering (ICEESE2017). Kanazawa, Japan. 9-10 November 2017.

Monteiro, A. C. B.; Iano, Yuzo ; Franca, R. P..“Detecting and Counting of Red and White Blood Cells Using Watershed Transform: An Improved Methodology”. IEEE International Conference on Electrical Engineering and Informatics (ICELTICs 2017). Banda Aceh, Indonesia. 18-20 Oct. 2017.

Monteiro, A. C. B.; Iano, Yuzo ; Franca, R. P..“Automatic Detecting and Counting of Red and White Blood Cells Using Watershed Transform: An Improved and Fast Methodology”. IEEE 2017 International Conference on Smart Cities, Automation & Intelligent Computing Systems (ICON-SONICS 2017). Yogyakarta, Indonesia. 08-10 November 2017.

Monteiro, A. C. B.; Iano, Yuzo ; Franca, R. P..“Detecting and Counting of Blood Cells Using Watershed Transform: An Improved Methodology”. 8th International Conference on Information and Communication Technology Convergence (ICTC 2017). Jeju Island, Korea. October 18-20, 2017.

Monteiro, A. C. B.; Iano, Yuzo ; Franca, R. P..“ An Improved Methodology for Automatic Detecting and Counting of RBC and WBC Using Watershed Transform”. IEEE European Modelling Symposium on Mathematical Modelling and Computer Simulation (EMS 2017) UKSim-AMSS 11th. Manchester, Reino Unido - UK. 20-22 November 2017.

Monteiro, A. C. B.; Iano, Yuzo ; Franca, R. P..“A Methodology With High Precision Algorithms for Determination of Hematimetric Indices”. 2018 International Conference on Computer and Applications (ICCA-18). Beirut, Lebanon. July 25-26, 2018.

Padilha, R.; Iano, Y.; **Monteiro, A. C. B.;** Arthur, R.; "Improvement for Channels with Multipath Fading (MF) Through the Methodology CBEDE". Fundamental and Supportive Technologies for 5G Mobile Networks. IGI Global, 2019

Padilha, R.; Iano, Y.; **Monteiro, A. C. B.;** Arthur, R.; "A Proposal of Improvement for Transmission Channels in Cloud Environments Using the CBEDE Methodology". Modern Principles, Practices, and Algorithms for Cloud Security. IGI Global, 2019

Padilha, R.; Iano, Y.; **Monteiro, A. C. B.;** Arthur, R.; "Improvement of the

Transmission of Information for ICT Techniques Through CBEDE Methodology". Utilizing Educational Data Mining Techniques for Improved Learning. IGI Global, 2019

Padilha, R.; Iano, Y.; **Monteiro, A. C. B.**; Arthur, R.; "A Proposal of Improvement for Transmission of Data in Intrusion Detection Environments Using the CBEDE Methodology". Handbook of Research on Intrusion Detection Systems. IGI Global, 2019

Padilha, R.; Iano, Y.; **Monteiro, A. C. B.**; Arthur, R.; "Potential to Improvement of the Data Transmission in Healthcare Systems by Methodology CBEDE". Deep Learning for biomedical and health informatics. Springer, 2019

Monteiro, A. C. B.; Iano, Y.; Padilha, R.; Arthur, R.; "Development of Laboratory Medical Algorithm for Simultaneous Detection and Counting of Erythrocytes and Leukocytes in Digital Images of Blood Smear". Deep Learning for biomedical and health informatics. Springer, 2019

Padilha, R.; Iano, Y.; **Monteiro, A. C. B.**; Arthur, R.; "Better Transmission of Information Focused on Green Computing Through Data Transmission Channels in Cloud Environments with Rayleigh Fading". Green Computing in Smart Cities. Springer, 2019

Padilha, R.; Iano, Y.; **Monteiro, A. C. B.**; Arthur, R.; "Coding of Bits for Entities by means of Discrete Events (CBEDE): A Method of Compression and Transmission of Data". Principles of Data Science. Springer, 2019

Padilha, R.; Iano, Y.; Monteiro, A. C. B.; Arthur, R.; "Better Efficiency in Data Transmission and Information in Smart Cloud Environments Using the CBEDE Methodology". Smart Systems Design, Applications and Challenges. IGI Global, 2019

Padilha, R.; Iano, Y.; Monteiro, A. C. B.; Arthur, R.; "CBDE Methodology Applied in Data Transmission in Cyber-Physical Systems Environments". Artificial Intelligence Paradigms for Smart Cyber-Physical Systems. IGI Global, 2019

Padilha, R.; Iano, Y.; Monteiro, A. C. B.; Arthur, R.; "Best Data Transmission in Cloud Environments through CBEDE Methodology". Metaheuristics and Optimization in Computer and Electrical Engineering Series: Advances in Intelligent Systems and Computing. Springer, 2019

Monteiro, A. C. B.; Iano, Y.; Padilha, R.; Arthur, R.; "Proposal of Efficient Algorithm with High Accuracy in Recognition, Detection and Counting of Erythrocytes, Leukocytes and Platelets". Metaheuristics and Optimization in Computer and Electrical Engineering Series: Advances in Intelligent Systems and Computing. Springer, 2019

Padilha, R.; Iano, Y.; Monteiro, A. C. B.; Arthur, R.; "A Methodology for Improving Efficiency in Data Transmission in Healthcare Systems". Energy Efficiency of Medical Devices and Healthcare Applications. Elsevier, 2019

Monteiro, A. C. B.; Iano, Y.; Padilha, R.; Arthur, R.; "Proposal of Algorithm Efficient

with High Accuracy in Detection and Counting of Erythrocytes, Leukocytes, and Blasts". *Energy Efficiency of Medical Devices and Healthcare Applications*. Elsevier, 2019