UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
UFGD

Contagem Automática de Núcleos em Células de Peixes

Autor: Felipe Gomes da Silva
Orientador: Willian Paraguassu Amorim

Dourados
Mato Grosso do Sul
Agosto - 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
UFGD

Contagem Automática de Núcleos em Células de Peixes

Autor: Felipe Gomes da Silva
Orientador: Willian Paraguassu Amorim

Trabalho apresentado para cumprimento de exigência da Disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II.

Dourados
Mato Grosso do Sul
Agosto - 2017

AGRADECIMENTOS

Eu quero agradecer primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo de minha vida, e não somente nestes anos como universitário, mas que em todos os momentos é o maior mestre que alguém pode conhecer.

Agradeço esta universidade, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a janela que hoje vislumbro um horizonte superior, eivado pela acendrada confiança no mérito e ética aqui presentes.

Agradeço o Prof. Dr. Willian Paraguassu Amorim pela oportunidade e apoio na elaboração deste trabalho.

Agradeço a todos os professores por me proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional, por tanto que se dedicaram a mim, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender.

Agradeço a minha mãe Alessandra e minha vó Iracema, heroínas que me deu apoio, incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço.

Agradesso a Géssica, grande mulher, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Ao meu avô Paulo Rocha Pedro que apesar de todas as dificuldades me fortaleceu e que para mm foi muito importante.

Agradeço aos amigos que me apoiaram, que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida com certeza.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

RESUMO

O crescimento das áreas urbanas e da população favoreceu para o aumento de poluição e de contaminação das águas dos rios. Esse indício, tem despertado interesse em vários aspectos, sobretudo relacionado ao destino e os possíveis efeitos que esses contaminantes podem causar a saúde humana. A análise de núcleo em células de peixes é um eficiente mecanismo para identificar a presença de contaminantes emergentes. Este artigo apresenta o estudo e a comparação das técnicas *Template Matching* e *SEG-IHC* como técnicas para realizar a contagem automática de núcleo, apresentando a avaliação de desempenho em diferentes aspectos na imagem.

Palavras-chave: Contegem automática, células de peixes, núcleo de células, Template Matching, Segmentação de núcleos de células Imuno-histoquímica, TM, SEG-IHC.

ABSTRACT

The growth of urban areas and the population has favored increased pollution and contamination of river waters. This clue has aroused interest in several aspects, mainly related to the fate and possible effects that these contaminants can cause to human health. Nuclear analysis in fish cells is an efficient mechanism to identify the presence of emerging contaminants. This article presents the study and comparison of the techniques Template Matching and SEG-IHC as techniques to perform automatic core counting, presenting performance evaluation in different aspects of the image.

Key words: Automatic counting, fish cells, cell nucleus, Template Matching, Cell nucleus segmentation Immunohistochemistry, TM, SEG-IHC.

Lista de Figuras

1 Laboratório de análise para quantificar núcleos em células de peixe. 1
2 Célula nucleada de peixe. 2
3 Resultado da técnica Template Matching. As regiões marcadas são núcleos detectados pela técnica. 2
4 Resultado da técnica SEG-IHC. As regiões marcadas são resultado dos núcleos detectados pela técnica. 3
5 Imagens das Categorias. 3
6 Resultados do processo de aplicação da técnica TM. 4
7 Processo de aplicação da técnica TM. 4
8 Resultado da aplicação da técnica SEG-IHC 5
9 Processo de aplicação da técnica SEG-IHC. 5
10 Análise de resultados entre as técnicas TM e SEG-IHC. 6
11 Resultado da técnica SEG-IHC em uma imagem na qual algumas aglomerações interferiram nos resultados. . . . 6

Lista de Tabelas

I Resultados da análise sobre a técnica Template Matching. 5
II Resultados da análise sobre a técnica SEG-IHC. 5

CONTEÚDO

I Introdução 1

II Template Matching 2

III Segmentação de núcleos de células Imuno-histoquímica (SEG-IHC) 2

IV Experimentos e Resultados 3

IV-A Experimentos com Template Matching 4

IV-B Experimentos com SEG-IHC 4

V Análises 4

VI Conclusão 5

Referências 5

Contagem Automática de Núcleos em Células de Peixes

Felipe Gomes da Silva
Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológica
Universidade Federal da Grande Dourados
Dourados-MS
E-mail: felipe.gomess.1993@gmail.com

Willian Paraguassu Amorim
Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológica
Universidade Federal da Grande Dourados
Dourados-MS
E-mail: willianamorim@ufgd.edu.br

***Resumo*—O crescimento das áreas urbanas e da população favoreceu para o aumento de poluição e de contaminação das águas dos rios. Esse indício, tem despertado interesse em vários aspectos, sobretudo relacionado ao destino e os possíveis efeitos que esses contaminantes podem causar a saúde humana. A análise de núcleo em células de peixes é um eficiente mecanismo para identificar a presença de contaminantes emergentes. Este artigo apresenta o estudo e a comparação das técnicas *Template Matching* e *SEG-IHC* como técnicas para realizar a contagem automática de núcleo, apresentando a avaliação de desempenho em diferentes aspectos na imagem.**

I. Introdução

A presença de metais potencialmente tóxicos em ecossistemas aquáticos urbanos tem despertado interesse em vários aspectos, sobretudo relacionado ao destino e os possíveis efeitos que esses contaminantes podem causar a saúde humana. Os altos índices de toxicidade de alguns metais, mesmo em baixas concentrações, associados à sua relativa facilidade de entrar e permanecer nas cadeias tróficas por longos períodos reforça a importância de estudos que determinem suas concentrações em ambientes aquáticos [7].

Considerando que as metodologias tradicionais de classificação de águas, baseadas apenas em características físicas, químicas e bacteriológicas, muitas vezes, não são suficientes para identificar a contaminação ambiental por substâncias químicas na água [8], o conhecimento da toxicidade de agentes químicos em diferentes organismos aquáticos possibilita a observação direta da saúde dos mesmos e a detecção de efeitos nocivos sobre o ambiente aquático [9]. Ou seja, alterações nos perfis de transcrição gênica fornecem informações sobre a interação dos estressores ambientais ao genoma, e pode servir como uma eficiente ferramenta para diagnosticar a existência de uma alteração ambiental e analisar as respostas biológicas que este vem provocando a uma determinada população [11] [10].

Portanto, a aplicação de metodologias ou ferramentas que possam avaliar propriedades gênicas, genotóxicas de corpos d'água causadas por contaminantes ambientais são prioritárias para gerar informações para planos de controle da qualidade de água. Com a utilização de bioindicadores de poluição ambiental é possível avaliar os efeitos causados por essas substâncias [12], pois estes são sensíveis à agentes poluidores e capazes de detectar misturas de contaminantes presentes no ambiente. Trabalhos recentes, mostram que análise de núcleo em testes utilizando peixes, espécie no qual seus eritrócitos são nucleados [2], são eficientes por responderem aos tóxicos de modo similar ao dos grandes vertebrados, além desta espécie serem encontradas abundantemente nos ecossistemas, possibilitando a identificação de contaminantes emergentes [13].

Em alguns laboratórios de análises a tarefa de quantificar núcleo, é realizada manualmente, à exemplo do Laboratório de Análises Clínicas da UFGD - Universidade Federal da Grande Dourados. A Figura 1, apresenta o ambiente de avaliação e contagem de núcleo.

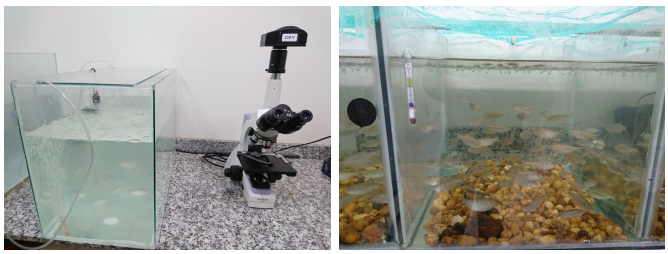


Figura 1. Laboratório de análise para quantificar núcleos em células de peixe.

A contagem manual de núcleos acarreta algumas desvantagens como:

- A fadiga do especialista que está realizando a contagem, pois exige concentração e atenção;
- A troca de especialista pode dar diferença nos resultados;
- É necessária a contagem mais de uma vez para validar o resultado;
- Limitação das análises laboratoriais devido às dificuldades de contagem que podem atrasar o término do processo e a liberação dos resultados.

Para solucionar estes problemas, foi proposto neste trabalho a utilização de duas técnicas de processamento de imagens conhecidas como *TM (Template Matching)* [5] e *SEG-IHC (Segmentação de núcleos de células Imuno-histoquímica)* [4], na qual vai ser apresentada a avaliação do processo de contagem de núcleos comparando com especialistas na área. A Figura 2, ilustra uma imagem das células nucleadas do peixe.

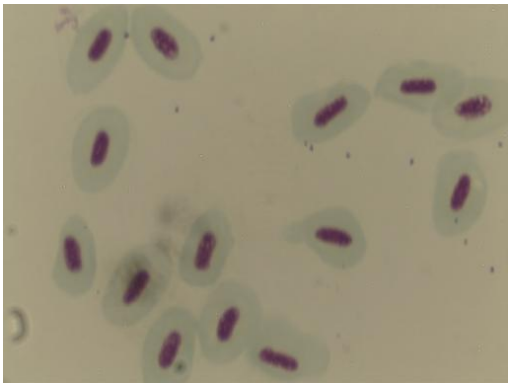


Figura 2. Célula nucleada de peixe.

O trabalho está organizado da seguinte forma. As seções II e III apresentam o funcionamento das técnicas *Template Matching* e *SEG-IHC*. A seção IV, apresenta os experimentos realizados e os resultados obtidos. A seção V apresenta a análise dos resultados, e por fim a seção VI, apresenta as conclusões obtidas a partir das implementações e experimentos realizados.

II. Template Matching

O algoritmo *Template Matching* baseado em Correlação Cruzada Normalizada é um algoritmo de reconhecimento de padrões que realiza a detecção de objetos similares em uma imagem. Ele tem como entrada uma imagem e o objeto a ser detectado e como saída uma imagem denominada imagem de correlação, em que os pontos mais claros indicam os pontos detectados. Para tal detecção, o algoritmo utiliza como medida de similaridade o coeficiente de Correlação Cruzada Normalizada conforme a Equação 1. Esse coeficiente indica o grau de similaridade entre o *template* (objeto a ser detectado) e a imagem de pesquisa. Ele varia de *-1* até *1*. O valor *1* indica total correspondência entre o *template* e a imagem de pesquisa, *0* indica que não houve correspondência e *-1* indica que houve correlação inversa, ou seja, total correspondência entre o *template* e a imagem de pesquisa [14].

$$r = \frac{\sum(x_i - \bar{x})\sum(y_i - \bar{y})}{\sqrt{(\sum(x_i - \bar{x})^2)(\sum(y_i - \bar{y})^2)}} \quad (1)$$

O *Template Matching* baseia-se na correspondência entre um modelo T e uma imagem I na qual este modelo possa ser detectado [16]. Seja I a imagem de pesquisa de dimensão m x n e a imagem T o *template* de dimensão p x q tal que $p < m$ e $q < n$, então é realizado o cálculo do coeficiente de Correlação Cruzada Normalizada entre cada pixel da imagem I e os pixels da imagem T. A cada variação de pixel na imagem I, o valor do coeficiente é calculado e armazenado em uma imagem denominada imagem de Correlação, na qual os valores próximos a *1* indicam a correspondência entre o *template* e a imagem de pesquisa. Por outro lado, os valores próximos a *-1* indicam a divergência entre o Template e a imagem de pesquisa. Na imagem de correlação os pontos mais claros indicam o ponto em que houve a detecção do *template*. Os pixels da borda da imagem I são desconsiderados, pois a imagem T tem sua posição inicial definida no centro da imagem, enquanto a imagem I possui a sua posição inicial definida no canto superior esquerdo. Desta forma, ao posicionar o centro da imagem T na posição inicial da imagem I tem-se uma perda de informação [15]. A Figura 3, ilustra o resultado da aplicação da técnica *Template Matching* sobre uma imagem nucleada do peixe.

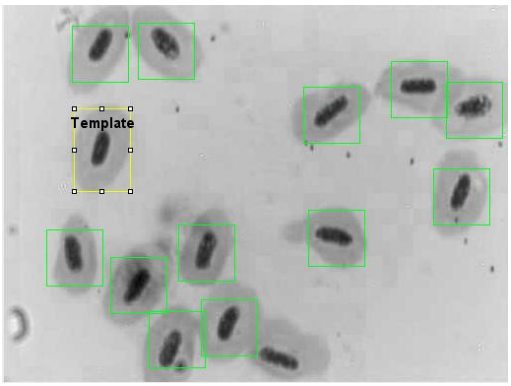


Figura 3. Resultado da técnica Template Matching. As regiões marcadas são núcleos detectados pela técnica.

III. Segmentação de núcleos de células Imuno-histoquímica (SEG-IHC)

A ferramenta de segmentação de núcleos de células que usamos neste trabalho (*SEG-IHC*) foi desenvolvida para detectar de maneira semiautomática diferentes tipos de imagens *imuno-histoquímica (IHC)* [4]. A *imuno-histoquímica* é um método de análise dos tecidos via microscópio muito importante para determinação de fatores preditivos e prognósticos no câncer, buscando identificar características moleculares das doenças, com aplicações como: diagnóstico de doenças inflamatórias, infecciosas e neoplasias. Com esse método, é possível a segmentação automática de núcleos severamente agrupados coradas por DAB (diaminobenzidina[1]) . O DAB é comumente utilizado em *imuno-histoquímica* na identificação de tecidos marcados pelo método da imunoperoxidase. O DAB atua como cromógeno, que na presença da enzima peroxidase produz um precipitado de cor marrom, revelando desta forma os tecidos imunomarcadores. Essa coloração de ponto de interesse, se aproxima da metodologia adotada em nossos experimentos.

A técnica de maneira geral segue 3 passos para segmentação dos núcleos:

(I) as regiões de primeiro plano que podem conter os núcleos são extraídas;

(II) em seguida aplicado a técnica de *watershed* [17] e por fim;

(III) os pixels redundantes são eliminados e uma elipse é adequada a cada núcleo segmentado.

[1]A diaminobenzidina é oxidada por peróxido de hidrogênio na presença de hemoglobina para dar uma cor marrom escuro.

Em geral, a intensidade do primeiro plano, ou seja, pixels pertencentes aos núcleos, podem ser facilmente distinguida do fundo (segundo plano) pelo método de *Threshold* usando limiar adaptativo [18]. Mas embora o limiar adaptativo possa detectar claramente o limite dos núcleos agrupados, os pixels ruidosos podem levar a uma segmentação excessiva, ou em outros momentos levar a uma segmentação abaixo do esperado. Assim, a aplicação da técnica *watershed* baseada em sementes [19], pode produzir eventuais correções na segmentação dos núcleos agrupados e finalmente, uma elipse é adaptada aos núcleos dos pixels. A Figura 4, ilustra o resultado da aplicação da técnica *SEG-IHC* sobre uma imagem nucleada do peixe.

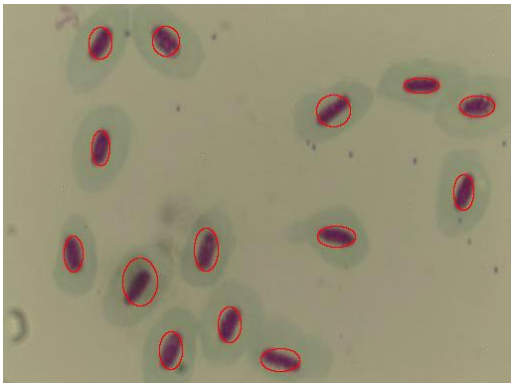


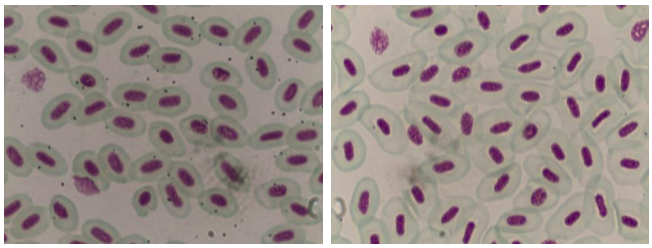
Figura 4. Resultado da técnica SEG-IHC. As regiões marcadas são resultado dos núcleos detectados pela técnica.

IV. Experimentos e Resultados

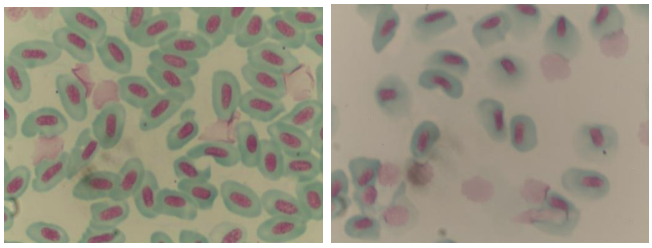
Para a realização dos testes de avaliação das técnicas *Template Matching* e *SEG-IHC*, foi criado um banco de imagens onde foram selecionadas 326 imagens de 4 peixes. Para se fazer a coleta das imagens realizamos uma visita ao Laboratório de Análises da UFGD juntamente com os especialistas na área. Os especialistas utilizaram um corante reativo de *schiff* [6] no processo de aquisição de imagens. Esse reagente é mais específico para material genético evitando a emissão de laudos falso-positivos o que torna as análises mais confiáveis. Foi utilizada uma Câmera do Microscópio que fornece imagens com uma dimensão 2048 x 1536 pixels no formato JPEG. As imagens foram redimensionadas para um tamanho 512 x 384 pixels no qual não interferisse na qualidade da imagem.

As imagens foram coletadas e organizadas em 4 categorias sendo: 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas. Essa separação foi feita justamente para tentarmos avaliar se o tempo no qual a célula nucleada permanece com o corante pode interferir na contagem dos núcleos e alterar os resultados. A Figura 5 mostra as imagens de cada categoria.

Para todas as técnicas, utilizamos uma ferramenta de processamento de imagem conhecida como *ImageJ*[2], baseado em *Java*, de uso livre e que permite a criação de *plugins* e a expansão de suas funcionalidades. Inicialmente realizamos um



(a) Imagem da categoria 24 horas; (b) Imagem da categoria 48 horas;



(c) Imagem da categoria 72 horas; (d) Imagem da categoria 96 horas.

Figura 5. Imagens das Categorias.

processo de contagem manual, considerada em nossos experimentos como contagem do especialista para que pudéssemos comparar com os resultados das técnicas *Template Matching* e *SEG-IHC*. Nesta contagem manual foi utilizado um *plugin* do *ImageJ*, o *Cell Counter*[3], que permite fazer marcações na imagem e contabilizar os núcleos. Após todo esse processo obtivemos nosso banco de dados organizado e com a contagem manual (especialista).

Com isso, para podermos comparar as técnicas *Template Matching* e *SEG-IHC* utilizamos 4 métricas:

• *Erro Médico (ER)*: Consiste na média da diferença entre a quantidade de núcleos contadas pelo especialista (*ec*) e a quantidade de núcleos contadas pela técnica (*hc*) de todas as imagens de cada categoria, métrica ilustrada na Equação 2.

$$ER = \frac{\sum_{i=img1}^{n} |ec_i - hc_i|}{n} \tag{2}$$

• *Recall*: Consiste na divisão entre a quantidade de núcleos contados corretamente pela técnica (*hr*) e a quantidade de núcleos contados pelo especialista (*ec*). Avaliado em uma escala de 0 a 1, quanto mais próximo do valor 1, indica que a técnica está detectando corretamente o maior número de núcleos existentes, métrica ilustrada na Equação 3.

$$Recall = \frac{hr}{ec} \tag{3}$$

• *Precision*: Consiste na divisão entre a quantidade de núcleos contadas corretamente pela técnica (*hr*) e a quantidade de núcleos contados pela técnica (*hc*). Avaliado em uma escala de 0 a 1, quanto mais próximo do valor 1, a técnica é mais precisa na realização da contagem, métrica ilustrada na Equação 4.

[2]https://imagej.nih.gov/ij/

[3]https://imagej.nih.gov/ij/plugins/cell-counter.html

$$Precision = \frac{hr}{hc} \tag{4}$$

• *F-Score (F)*: Uma equação que balanceia os valores de *Precision* e *Recall*, obtendo um valor mais significativo para a análise. Um valor de *Recall* alto não significa que a técnica seja eficiente, pois a técnica pode detectar todos os núcleos, mas detectando vários pontos que não correspondem a um núcleo, o que ocasionará em uma *Precision* baixa. Portanto, equilibrar estes valores é importante para a análise, métrica ilustrada na Equação 5.

$$F = 2 * \frac{Precision * Recall}{Precision + Recall} \tag{5}$$

A. Experimentos com Template Matching

Para a aplicação da técnica *Template Matching* na contagem dos núcleos foi utilizado um plugin em *Java* do *ImageJ*, *Create Template*[4]. O *plugin* converte uma imagem de pesquisa do tipo RGB para escala de cinza e aplica *Template Matching*. Para cada imagem foi escolhido o melhor *Threshold* para ser aplicado, onde o limiar inferior varia de 0.1 a 0.7 e se manteve o limiar superior igual a 1. O *template* foi recortado de cada imagem para tentar obter uma correlação mais próxima da própria imagem. Em seguida, é aplicado o método *Analyse* da classe *Java ParticlesAnalyse*[5] que identifica os pontos que estão entre o limiar inferior e superior. Para ilustrar os processos da técnica *Template Matching*, podemos visualizar a Figura 6 e 7.

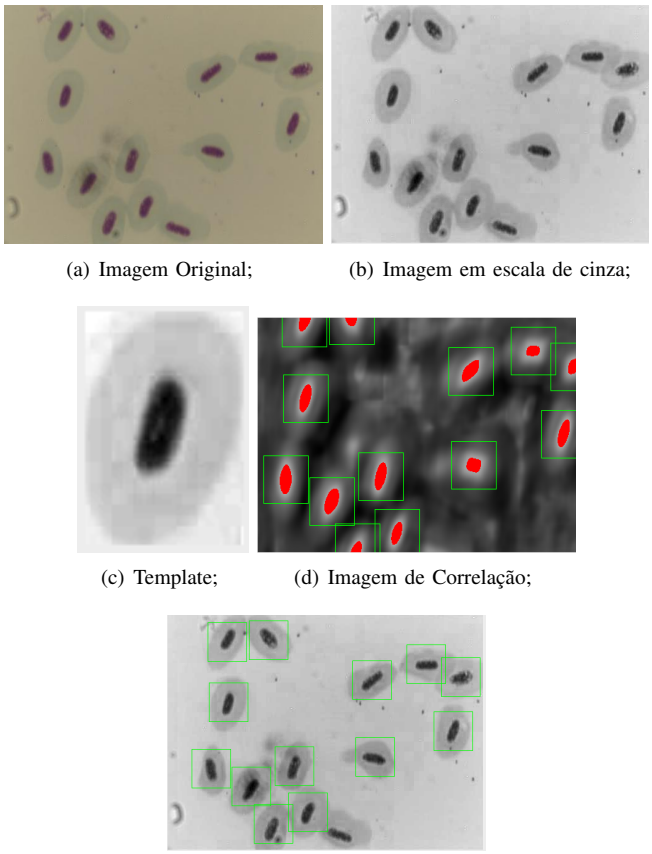
B. Experimentos com SEG-IHC

Para aplicação do SEG-IHC foi utilizado o plugin *Immunohistochemistry(IHC) Image Analysis Toolbox*[6], que basicamente recebe uma imagem colorida em RGB, e em seguida aplica-se a função de segmentação automática de núcleos (*Nuclei*). A função depende da escolha de um modelo de detecção de cores no qual foi utilizado o *H-DAB* (que usa como estimativa para a detecção dos pontos de interesses as cores do DAB). Os parâmetros para função de segmentação automática de núcleos *window size*, *seed size*, *final size* foram utilizados os valores padrões da ferramenta. A opção de tipo de marcação foi utilizada quantificação, que consiste em contar os núcleos positivos e a segmentação dos núcleos. A Figura 8 ilustra um resultado e a Figura 9 o processos desta técnica.

V. Análises

As Tabelas 1 e 2 ilustram os resultados do *Template Matching* e *SEG-IHC* respectivamente, os resultados são apresentados já separados por categorias e os valores de *Erro Médio*, *Precision*, *Recall* e *F-Score* são apresentados no seguinte formato $x \pm y$ onde x é o valor da métrica e y o valor de seu desvio padrão. Podemos observar que a técnica com os melhores resultados foi o *SEG-IHC*. Os valores de maior destaque para *Erro Médio* foi da categoria de 48 horas, para *Recall* categoria 72 horas e para *Precision* e *F-Score* foram os

[4]https://imagej.nih.gov/ij/plugins/template-matching.html
[5]https://imagej.nih.gov/ij/developer/api/ij/plugin/filter/ParticleAnalyzer.html
[6]https://imagej.nih.gov/ij/plugins/ihc-toolbox/index.html



(a) Imagem Original; (b) Imagem em escala de cinza;

(c) Template; (d) Imagem de Correlação;

(e) Resultado do Template Matching.

Figura 6. Resultados do processo de aplicação da técnica TM.

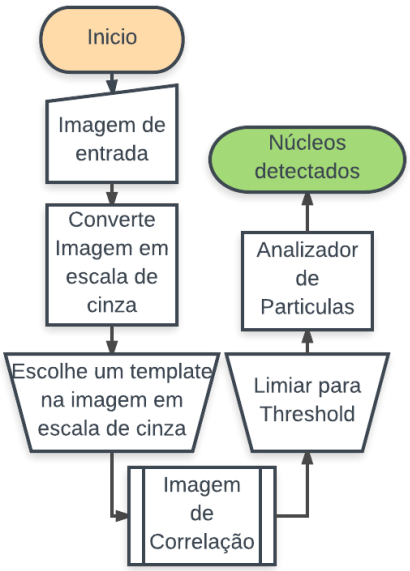
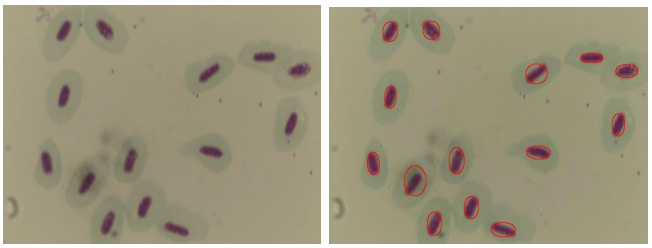


Figura 7. Processo de aplicação da técnica TM.



(a) Imagem Original; (b) Resultado da técnica.

Figura 8. Resultado da aplicação da técnica SEG-IHC

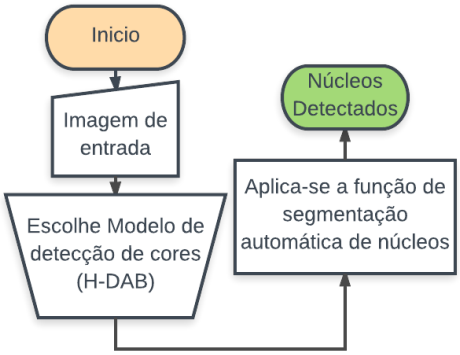


Figura 9. Processo de aplicação da técnica SEG-IHC.

resultados da categoria 24 horas como ilustra a Tabela 2. Para o *Template Matching* a melhor categoria de classificação em relação ao *Erro Médio* foi 96 horas, para *Precision* categoria 72 horas e para *Recall* e *F-Score* a categoria de 24 horas como ilustrado na Tabela 1.

Tabela I
RESULTADOS DA ANÁLISE SOBRE A TÉCNICA TEMPLATE MATCHING.

Categoria	Erro Médio	Precision	Recall	F-Score
24hrs	6,000±4,633	0,844±0,078	**0,833±0,065**	**0,839±0,071**
48hrs	4,000±4,148	0,804±0,114	0,833±0,115	0,818±0,115
72hrs	5,000±4,367	**0,847±0,116**	0,810±0,099	0,828±0,106
96hrs	**4,000±3,254**	0,840±0,095	0,833±0,095	0,837±0,095

Tabela II
RESULTADOS DA ANÁLISE SOBRE A TÉCNICA SEG-IHC.

Categoria	Erro Médio	Precision	Recall	F-Score
24hrs	5,000±8,036	**0,882±0,140**	0,985±0,103	**0,931±0,119**
48hrs	**3,000±4,329**	0,863±0,142	0,975±0,054	0,916±0,078
72hrs	4,500±5,121	0,859±0,139	**1,000±0,029**	0,924±0,048
96hrs	7,000±6,014	0,808±0,112	1,000±0,041	0,894±0,060

Em alguns casos, como exemplo a categoria 96 horas, a *Média de Erro* do *Template Matching* foi menor que a do *SEG-IHC*. Este fenômeno ocorre porque *SEG-IHC* melhor se aproxima da quantidade contada pelo especialista e o *Template Matching* deixa de contar alguns núcleos fazendo parecer que seu erro médio é menor. A Figura 10 ilustra este cenário. A contagem do especialista quantificou 59 núcleos, o *Template Matching* 50 e o *SEG-IHC* 64. Observamos que a técnica *SEG-IHC* está contando mais do que o especialista, mas não deixando de contar o que de fato é núcleo. *Template Matching* está retornando uma quantidade menor de núcleos pois está deixando de contar regiões que o especialista identifica como núcleo. Com isso, em ambiente prático acaba gerando um agravante maior. O resultado de *Erro Médio* do *Template Matching* deve ser destacado porque não representa na prática um valor esperado pelo especialista.

O *SEG-IHC* apresentou alguns problemas que na prática podem ser consideradas graves pelos especialistas. A Figura 11 ilustra este cenário. O *SEG-IHC* em algumas situações encontra uma quantidade em excesso de núcleos. Isso pode ser justificado pela quantidade de ruídos que são apresentados na imagem, problema que pode ser solucionado com aplicação de alguns filtros ou mais técnicas de segmentação.

VI. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi apresentado o estudo das técnicas *Template Matching* e *SEG-IHC*, como técnicas para contagem automática de núcleos em células de peixes e análise de seus desempenhos em várias situações. Através da análise dos resultados dos experimentos e das imagens resultantes após o processamento das técnicas, verificou-se que *SEG-IHC* foi eficiente na categoria de 24 horas por ter um melhor *Precision* e *F-Score* comparado a *Template Matching*. Verificamos também que *Erro Médio* de *SEG-IHC* é alto pelo fato da técnica considerar (identificar) ruídos da imagem como núcleo, mas podendo alcançar melhores resultados com a utilização de filtros e outras técnicas de segmentação de imagens. O *Template Matching* obteve resultados satisfatórios na categoria de 24 horas. Verificamos na técnica *Template Matching* um *Erro Médio* abaixo do esperado, pelo fato da técnica deixar de contar núcleos, o que em um ambiente prático poderá ser um agravante. Com base nas análises a técnica mais indicada para este problema de contagem é o *SEG-IHC* na categoria 48 horas, por ter o menor *Erro Médio* que todas as outras categoria em ambas as técnicas e seu *Precision*, *Recall* e *F-Score* estarem mais próximo dos melhores resultados. Trabalhos futuros visam o estudo de técnicas que resolvam os problemas de aglomeração de núcleos e ruídos nas imagens.

REFERÊNCIAS

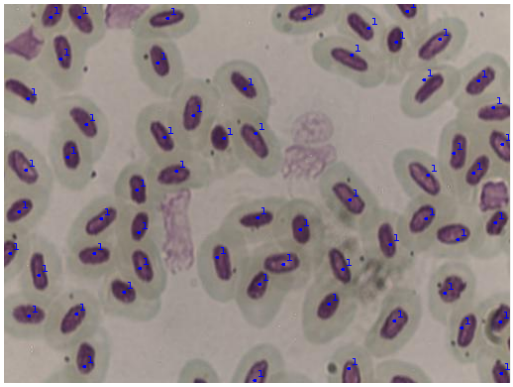
[1] D. C. Silva *Efeitos Tóxicos E Genéticos Ocasionados Por Agrotóxicos* Criciúma, Brasil: UNESC Curso De Pós-Graduação Especialização Em Gestão De Recursos Naturais, 2005.

[2] P. L. R. Dourado *Biomonitoramento Da Qualidade De Água Superficial Em Áreas Agroindustriais No Mato Grosso Do Sul* Dourados/MS, Brasil: UFGD Faculdade De Ciências Exatas E Tecnologias, 2014.

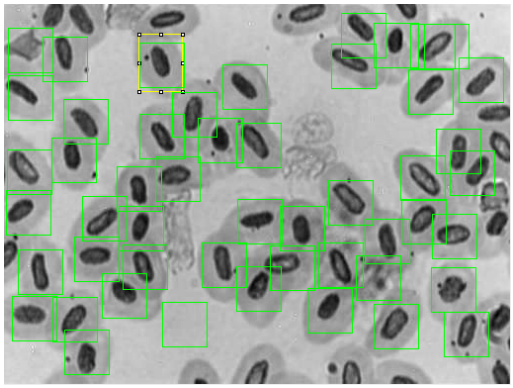
[3] F. Peres et al. *Comunicação relacionada ao uso de agrotóxicos em região agrícola do Estado do Rio de Janeiro.* Rev. Saúde Pública, v.35, n.6, p.564-570, dez. 2001.

[4] J. Shu and H. Fu and G. Qiu and P. Kaye and M. Ilyas *2013 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC) Segmenting overlapping cell nuclei in digital histopathology images.* Jul. 2013.

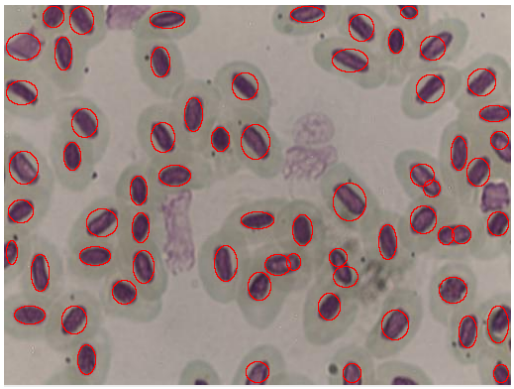
[5] P. R. Wankhede and K. B. Khanchandani *2016 International Conference on Global Trends in Signal Processing, Information Computing and Communication (ICGTSPICC) Optic disc detection using template matching based on color plane histograms.* DEZ. 2016.



(a) Imagem Original. Apresenta 59 núcleos marcados pelo especialista;



(b) Resultado Template Matching. Apresenta 50 marcações, onde 46 estão corretas e 4 erradas de acordo com a Figura 7a;



(c) Resultado SEG-IHC. Apresenta 64 marcações, onde 59 estão corretas e 5 erradas de acordo com a Figura 10a.

Figura 10. Análise de resultados entre as técnicas TM e SEG-IHC.

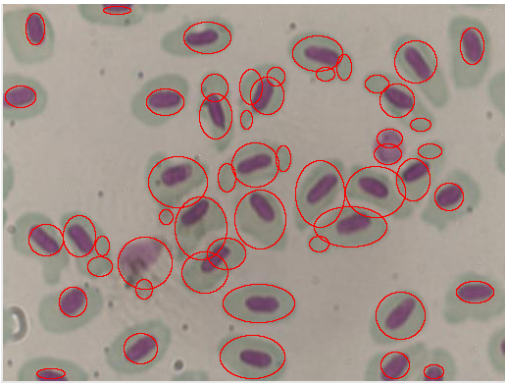


Figura 11. Resultado da técnica SEG-IHC em uma imagem na qual algumas aglomerações interferiram nos resultados.

[6] Qin, Wenling and Long, Sha and Panunzio, Mauro and Biondi, Stefano *Schiff Bases: A Short Survey on an Evergreen Chemistry Tool.* Molecules, 2013.

[7] BARROS, F., RODRIGUES, V.T. & BATISTA, J.A.N. 2009. Orchidaceae. In: J.R. Stehmann, R.C. Forzza, A. Salino, M. Sobral, D.P. Costa & L.H.Y. Kamino (eds.). *Plantas da Floresta Atlântica.* Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

[8] KNIE, J.L.W. e LOPES, E. W. B *Testes Ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações.* Florianópolis: FATMA / GTZ, 2004.

[9] SÄMY, C. H., TORRENS, B.M.O. & MEDEIROS, S. H.W., *Estudo do impacto ambiental na bacia do Rio do Braço através de análises ecotoxicológicas.* Revista de Ciências Ambientais, 2010.

[10] KOSKINEN, S.O.A.; HEINEMEIR, K.M.; OLESEN, J.L; LANGBERG, H.; KJAER, M. *Physical exercise can influence local levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tendon-related connective tissue.* J. Appl. Phys, 2004.

[11] BRULLE, F., et al. *Identification and expression profile of gene transcripts differentially expressed during metallic exposure in Eisenia fetida coelomocytes.* Developmental and Comparative Immunology, 2008.

[12] Pedro J *Detecção da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, do inseticida fipronil no organismo teste Allium cepa.* Dissertação, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2008.

[13] Ramsdorf WA, Ferraro MVM, Oliveira-Ribeiro CA, Cestari MM *Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in Hoplias malabaricus.* Environ Monit Assess, 2009.

[14] H. A. Al-Mamun, N. Jahangir, M. S. Islam, and A. M. Islam *Eye detection in facial image by genetic algorithm driven de formable template matching.* International Journal of Computer Science and Network Security, 9(8), Agosto 2009.

[15] G. M. Alves *Método fundamentado em processamento digital de imagens para contagem automática de unidades formadoras de colônias* Master's thesis, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2006.

[16] J. C. M. Bateira *Caracterização e visualização de movimento para aplicações em biomecânica.* Universidade do Porto, Porto, Portugal, 2004.

[17] Roerdink, Jos B.T.M. and Meijster, Arnold *The Watershed Transform: Definitions, Algorithms and Parallelization Strategies.* Fundam. Inf., IOS Press,Amsterdam, The Netherlands, The Netherlands, 2004.

[18] R. Demirci *2010 IEEE 18th Signal Processing and Communications Applications Conference. Adaptive threshold selection for edge detection in colour images* 2010.

[19] Pinidiyaarachchi, Amalka and Wählby, Carolina *Seeded watersheds for combined segmentation and tracking of cells.* Image Analysis and Processing—ICIAP, 2005.