

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
BACHARELADO EM SISTEMAS DE INFORMAÇÃO

Contagem automática de micronúcleos em células de peixes

Autor: Flávio Nogueira Lima
Orientador: Profa. Dra. Valguima Victoria Viana Aguiar Odakura

Dourados-MS
29 de Abril de 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
BACHARELADO EM SISTEMAS DE INFORMAÇÃO

Contagem automática de micronúcleos em células de peixes

Autor: Flávio Nogueira Lima
Orientador: Profa. Dra. Valguima Victoria Viana Aguiar Odakura

Trabalho de conclusão de Curso de Graduação apresentado à Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Sistemas de Informação.

Dourados-MS
29 de Abril de 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
SISTEMAS DE INFORMAÇÃO

Contagem automática de micronúcleos em células de peixes

Trabalho de conclusão de Curso de Graduação apresentado à Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Sistemas de Informação.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Valguima Victoria Viana Aguiar Odakura

Prof. Me. Anderson Bessa da Costa

Prof. Me. Everton Castelão Tetila

Sumário

1	Introdução	1
2	Objetivos	2
2.1	Objetivos específicos	3
3	Fundamentação Teórica	3
4	Experimentos	4
4.1	Primeiro experimento: Detecção por varredura em quadrante	6
4.1.1	Pré-processamento e Segmentação	7
4.1.2	Detecção, contagem e desenho	7
4.2	Segundo experimento: Detecção com remoção de ruído	8
4.2.1	Pré-processamento e Segmentação	8
4.2.2	Detecção, contagem e desenho	10
5	Resultados & Discussão	11
6	Considerações Finais	12

Contagem automática de micronúcleos em células de peixes

Flávio Nogueira Lima¹, Anderson da Costa Bessa¹, Valguima Victoria Viana Aguiar Odakura¹

¹Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)
Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia (FACET)

{flavionogueiralima, anderson.bessa, valguima.odakura}@gmail.com

Abstract. *The growth of urban areas and the population favored for increased pollution and contamination of river water. To be good indicators of pollution, the fish are widely used to assess water quality. Through the analysis of extracted animal blood cells, it is possible to identify pollutants and contaminants in rivers, through the micronucleus test. The micronucleus is a small body that arises during the process of cell division, and its presence is a strong indication of water contamination. The micronucleus count is a tedious and repetitive work susceptible to error. This paper presents a solution for automatic counting of micronuclei using the particle analyzer technique. In it are discussed two experiments, both using the software ImageJ library for the implementation of the solution. In the results obtained, the first experiment recognized the cells with micronuclei in 81.3% of cases, while the second recognized it in 88.3% of cases.*

Keywords: *Micronucleus, Image processing, ImageJ and Particle analyzer*

Resumo. *O crescimento das áreas urbanas e da população favoreceu para o aumento de poluição e de contaminação das águas dos rios. Por serem bons indicadores de poluição, os peixes são bastante utilizados para avaliação da qualidade da água. Por meio da análise das células extraídas do sangue do animal, é possível identificar agentes poluidores e contaminadores nos rios, através do teste de micronúcleo. O micronúcleo é um pequeno corpo que se origina durante o processo de divisão celular, e sua presença é um forte indício de contaminação da água. A contagem de micronúcleo é um trabalho tedioso e repetitivo susceptível a erro. O presente trabalho apresenta uma solução para contagem automática de micronúcleos utilizando a técnica de analisador de partículas. Nele são discutidos dois experimentos, ambos utilizando a biblioteca do software ImageJ para a implementação da solução. Nos resultados obtidos, o primeiro experimento reconheceu as células com micronúcleos em 81,3% dos casos, já o segundo em 88,3%.*

Palavras-chave: *Micronúcleo, Processamento de Imagens, ImageJ e Analisador de partículas.*

1. Introdução

Com o crescimento desenfreado da população e dos grandes centros urbanos, houve um notável aumento na presença de produtos químicos no meio ambiente. Dentre os principais problemas, está o da contaminação da água dos rios. Os rios são utilizados tanto para

a captação da água, como também para o despejo de agentes poluidores, provenientes de esgotos residenciais e industriais (Silva; Nepomuceno, 2010).

Os peixes vem sendo amplamente utilizados como indicadores para avaliação da qualidade das águas dos rios, devido a sua sensibilidade às adversidades ambientais e seu fácil manuseio em laboratórios. Um tipo de análise bastante conhecida é o teste do micronúcleo. O teste do micronúcleo tem sido bastante utilizado para verificar o índice de contaminação e os efeitos genotóxicos de agentes poluentes nos ecossistemas aquáticos (Silva; Nepomuceno, 2010).

O micronúcleo é um pequeno corpo formado por fragmentos ou partes inteiras de cromossomos que se originam durante o processo de divisão celular (Agostini, 1993). Geralmente sua cor e morfologia são semelhantes ao núcleo principal (Dittmar et al., 2010), como pode ser visto na Figura 1, sendo sua presença na célula um indicativo de possíveis alterações cromossômicas (Agostini, 1993).

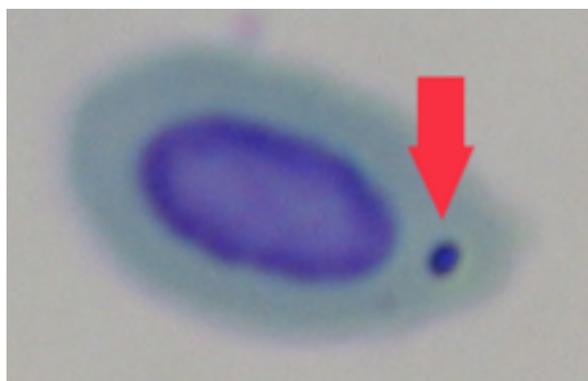


Figura 1. Uma célula com micronúcleo.

Entretanto, a identificação e contagem de micronúcleos normalmente é realizada de forma manual, com o uso de microscópios, a qual pode ser um processo bastante dispendioso e cansativo. Para minimizar essas dificuldades e agilizar o trabalho de quem trabalha nos laboratórios, esse trabalho foi criado com o propósito de desenvolver um sistema de computador para a contagem automática de células e de micronúcleos.

Na Seção 2 são descritos os objetivos do presente trabalho. Na Seção 3 são demonstrados alguns trabalhos relacionados com a contagem automática de células. Na Seção 4 são abordados os experimentos empregados para desenvolver o sistema. Na Seção 5 são apresentados os resultados obtidos durante a fase de experimento. Por fim, na Seção 6 são discutidas as conclusões e perspectivas para trabalhos futuros.

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho consiste em desenvolver um software para a detecção e contagem de micronúcleos em imagens de células de peixes. As imagens fotografadas em um microscópio devem ser lidas pelo software para a detecção. Na Figura 2 é apresentado um exemplo de imagem com células extraídas do peixe. Como saída o software deve produzir uma nova imagem contendo a quantidade de células e de micronúcleos reconhecidos, e também é necessário marcar cada um desses elementos encontrados na própria imagem, facilitando qualquer usuário a interpretar as informações.

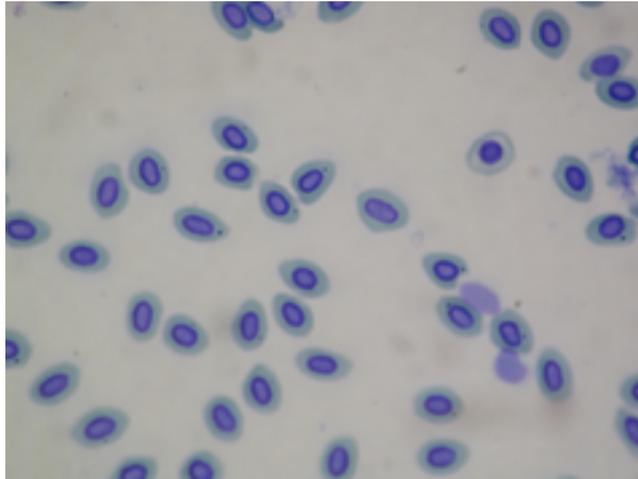


Figura 2. Imagem com células de peixe.

2.1. Objetivos específicos

O sistema proposto deve cumprir as seguintes exigências:

- Fazer a contagem das células
- Fazer a contagem dos micronúcleos
- Marcar na imagem as células e os micronúcleos reconhecidos

3. Fundamentação Teórica

O problema de reconhecimento de células é bastante estudado na literatura. Existem diversos trabalhos que abordam o reconhecimento automatizado de inúmeros tipos de células.

Guo e Yu (2013) discutem como realizaram a contagem automática de células em imagens de microscópios. Eles explicam que através de informações de histograma da imagem, é possível definir automaticamente um valor para limiarização¹. A partir disso, é possível separar as células do fundo da imagem utilizando a técnica de *flood fill* (Guo; Yu, 2013) que preenche as células com uma cor e as isola do fundo. A detecção das células é feita a partir da análise conhecida como *BLOB* (*Binary Large Object*), que extrai informações de qualquer tipo de região contida na imagem. Em seguida, a imagem é segmentada pela técnica de *K-means* que calcula o número de células, contidas em cada região (*blob*) e então obtém o número total de células em toda a imagem. O erro médio dessa abordagem segundo Guo e Yu (2013) é de 0,46%. A vantagem desse método é ele que pode ser adaptado para reconhecer qualquer tipo de célula.

Outro trabalho semelhante é o de Venkatalaksmi e Thilagavathi (2013), que descreveram como fazer a contagem dos glóbulos vermelhos do sangue utilizando a transformada de Hough². O método descrito por eles consiste de cinco etapas: aquisição, pré-processamento, segmentação, extração de características e contagem. Na etapa de pré-processamento a imagem é convertida para o padrão *HSV*³. Na primeira etapa da

¹Conversão de imagem em escala de cinzara para preto e branco (binária).

²Técnica para a detecção de regiões circulares em uma imagem.

³Sistema de cores formadas pelas componentes matiz (Hue), saturação (Saturation) e brilho (Value).

segmentação, são extraídos da imagem os valores mínimos e máximos de limiarização, através de informações do histograma da imagem. A imagem é então dividida em duas imagens limiarizadas. Nas áreas morfológicamente mais próximas são utilizados o valor mínimo de limiarização e nas áreas morfológicamente mais distantes, é usado o valor máximo de limiarização. Logo em seguida é feita uma operação *XOR* entre as duas imagens e então a transformada de Hough é aplicada para fazer a contagem. Apesar do trabalho deles reconhecer células de sangue, o problema é bastante similar ao problema proposto nesse artigo.

Uma outra abordagem que pode ser adaptada para reconhecer qualquer tipo de célula é a de Labno (2016). Ela demonstra como realizar genericamente a contagem automática de células usando o software *ImageJ* e seu analisador de partículas. Nas etapas iniciais a imagem tem seu fundo atenuado por meio de uma ferramenta de subtração de fundo. Logo em seguida ela é limiarizada para separar as células do resto da imagem. Um técnica conhecida como watershed é aplicada para separar as células que estiverem encostadas entre si. A contagem das células é feito pelo analisador de partículas que é aplicado sobre a imagem resultante.

No entanto, para iniciar o desenvolvimento deste trabalho, foi necessário fazer um levantamento a cerca das ferramentas e bibliotecas disponíveis na literatura para auxiliar na solução do problema proposto. Das ferramentas encontradas para atender as necessidades do projeto, foi escolhido o software *ImageJ*.

O *ImageJ*⁴ é um software *open source* de processamento de imagem, desenvolvido na linguagem Java pelo pesquisador americano Wayne Rasband, do *National Institute of Mental Health*. O software contém inúmeras ferramentas para manipulação e segmentação de imagem, como limiarização, ajuste de brilho e contraste, extratores de características, analisador de partículas entre muitas outras. Outra característica importante dele é a sua capacidade de suportar macros e plugins que permite estender suas funcionalidades a problemas específicos dos usuários (Bailer, 2006).

4. Experimentos

A principal dificuldade no desenvolvimento de um sistema de visão computacional é a escolha de técnicas de processamento para a extração das características desejadas (Gonzalez; Woods, 2010). Entretanto, várias técnicas foram testadas e avaliadas, como limiarização e subtração de fundo, a fim de alcançar um fluxograma de processamento que realizasse a contagem de micronúcleos. Dois experimentos foram realizados no transcorrer deste trabalho. O fluxograma contendo as etapas do processamento do primeiro experimento é apresentado na Figura 3, e o do segundo experimento na Figura 4.

A aquisição das imagens de células de peixes foi realizada por meio de uma câmera digital acoplada a um microscópio óptico convencional. Para os experimentos foram usadas somente as imagens que se mostraram de boa qualidade e sem a presença significativa de ruído. Do total foram selecionadas 5 imagens, todas com resolução de 2592x1944 pixels, contendo 160 células e 43 micronúcleos. Para o microscópio foi utilizada uma ocular de 10x em conjunto com uma objetiva de 100x, proporcionando no total uma ampliação de 1000x.

⁴<https://imagej.nih.gov/ij/>

Os experimentos realizados para esse trabalho foram feitos através de um programa escrito na linguagem *Java* utilizando as bibliotecas de processamento de imagem do *ImageJ*. As etapas desses dois experimentos serão explicadas de forma mais detalhada nas seções a seguir.

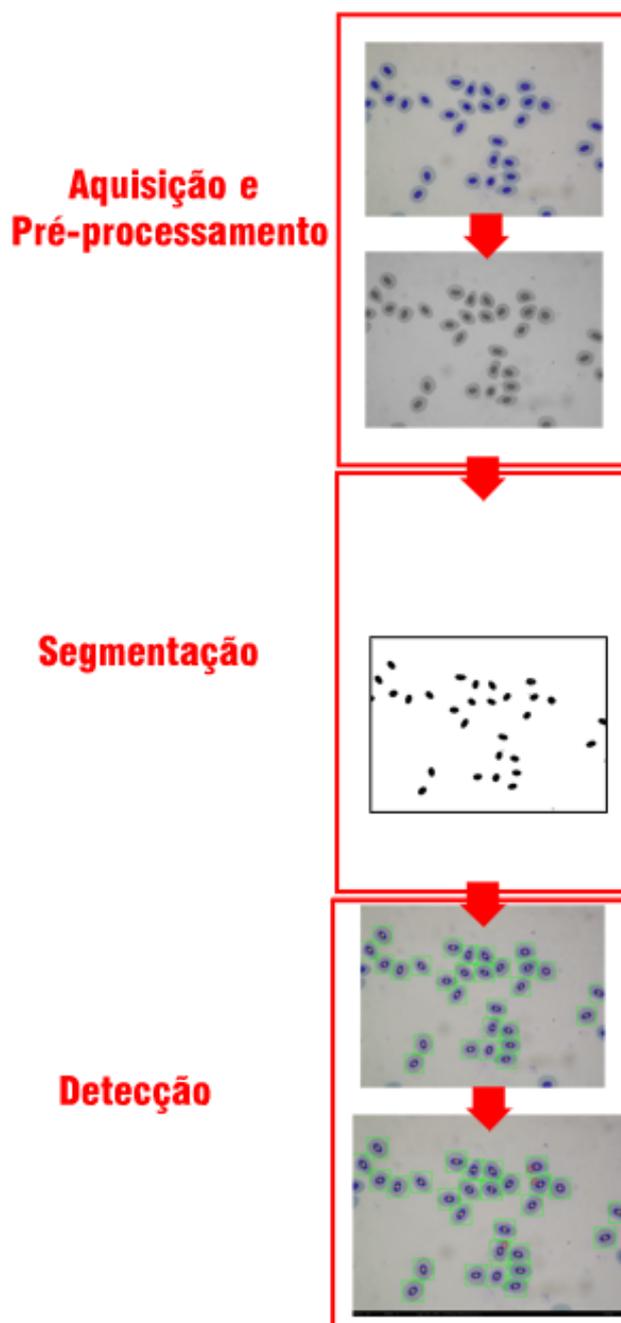


Figura 3. Fluxograma do primeiro experimento: Detecção por varredura em quadrante.

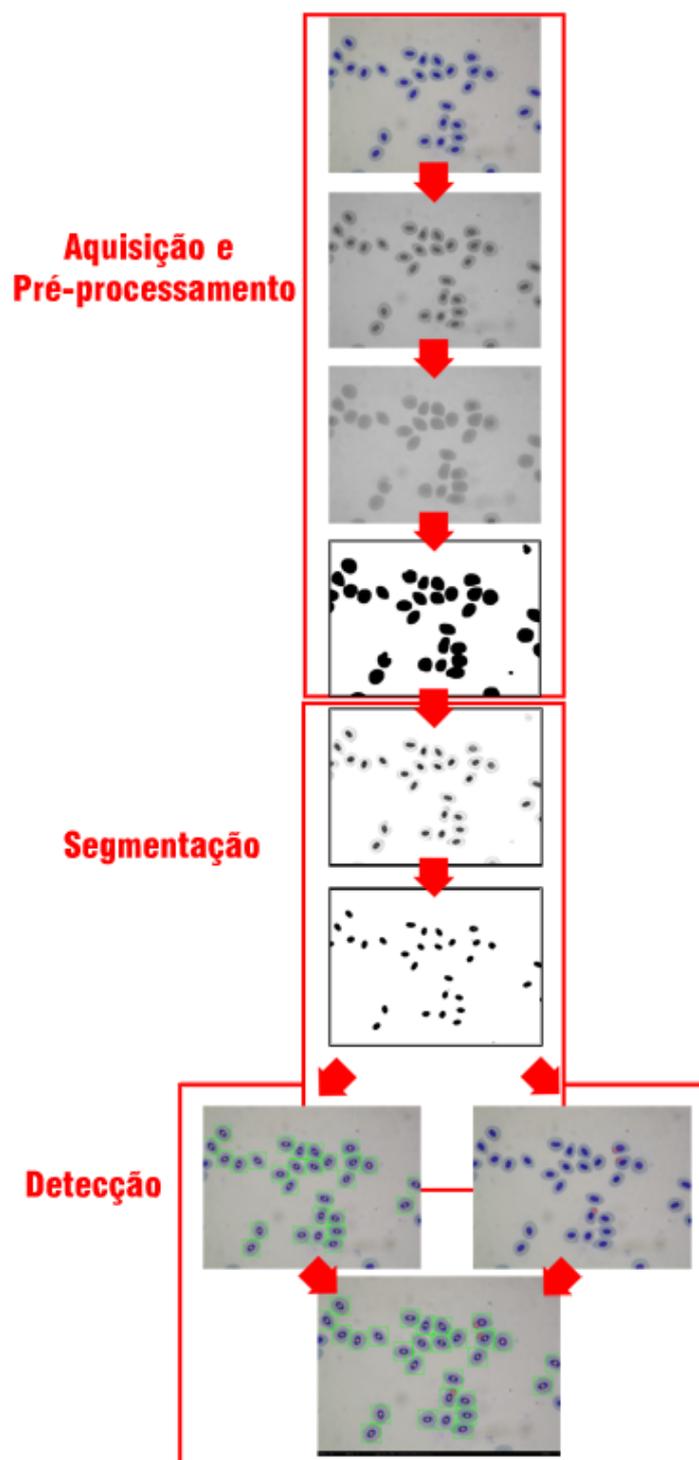


Figura 4. Fluxograma do segundo experimento: Detecção com remoção de ruído.

4.1. Primeiro experimento: Detecção por varredura em quadrante

Na etapa de aquisição e pré-processamento do primeiro experimento, a imagem colorida é convertida para escala de cinza. Posteriormente aplica-se a técnica de subtração de fundo

para atenuar a imagem e então, na etapa de segmentação ela é limiarizada para destacar as regiões de interesse.

A detecção das células é feita com o analisador de partículas do *ImageJ*, que as detecta e faz a contagem. Para cada célula encontrada, é delimitado um quadrante de 250x250 pixels em volta da mesma. Logo então o micronúcleo é procurado pelo analisador dentro desse quadrante.

4.1.1. Pré-processamento e Segmentação

A imagem de entrada é convertida para escala de cinza. No passo seguinte, toda a imagem é atenuada com a função *Subtract Background* na qual permite realçar as regiões de interesses, com base nos seguintes parâmetros:

- *Rolling balls radius* de 50 pixels.
- Opção *Light Background* ativada.

Para segmentar, faz-se o uso da função *Auto-Threshold* que limiariza a imagem. Esse procedimento faz a separação das regiões de interesses do fundo. Os núcleos e micronúcleos são preenchidos com a cor preta e o fundo com branco, como demonstrado na Figura 5.

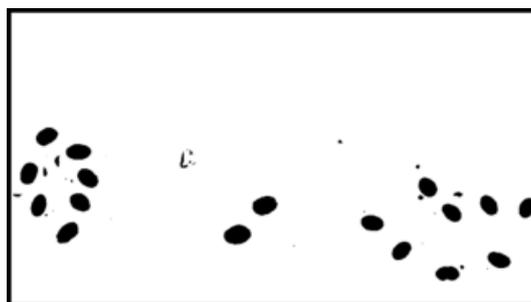


Figura 5. Imagem limiarizada.

4.1.2. Detecção, contagem e desenho

A detecção é executada na imagem adquirida da etapa de segmentação, por meio do analisador de partículas do *ImageJ*. São obtidas do analisador informações como a quantidade de células e micronúcleos encontrados, como também suas localizações cartesianas na imagem.

Antes de mais nada, é preciso deixar claro que a principal característica que irá diferenciar um núcleo de um micronúcleo são os seus tamanhos. Nas amostras de células usadas nos experimentos, os micronúcleos geralmente são 40x menores que os núcleos. A seguir serão demonstrados os parâmetros do analisador para detectar cada um deles.

- Núcleo: Tamanho⁵ entre 3000 pixels e infinito. Circularidade⁶ entre 0.1 e 1.0

⁵O tamanho é a quantidade de pixels de uma determinada região expressa em pixels elevado ao quadrado.

⁶A circularidade é quão circular é essa área de pixel.

- Micronúcleo: Tamanho entre 40 e 500 pixels. Circularidade entre 0.5 e 1.0

Primeiramente o analisador varre em busca de núcleos de células por toda a imagem. Ao término dessa varredura, o próximo passo é encontrar os micronúcleos. No entanto, a varredura por micronúcleos não é feita em toda a imagem, e sim em cada quadrante de célula encontrada.

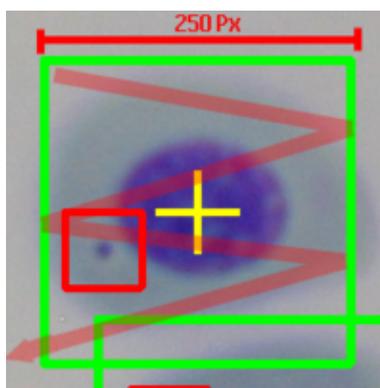


Figura 6. A varredura só é feita dentro do quadrante verde.

Para cada célula encontrada é delimitada uma área de 250x250 pixels em torno do núcleo, conforme a Figura 6. Logo em seguida, essa área é submetida ao analisador de partículas que finalmente irá detectar e fazer a contagem de micronúcleos.

Finalizando todo esses procedimentos são realizados os desenhos dos quadrantes das células e dos micronúcleos, bem como informações sobre a quantidade dos mesmos.

4.2. Segundo experimento: Detecção com remoção de ruído

Das etapas iniciais de aquisição e pré-processamento do segundo experimento, a imagem colorida é convertida para escala de cinza. De maneira análoga ao primeiro experimento, é necessário remover o fundo para isolar as células. Para isso, através de uma etapa de segmentação, é feita uma combinação de técnicas de subtração de fundo, limiarização e mascaramento. Nessa fase quaisquer tipos de ruídos que estejam fora das membranas das células são eliminados. Em seguida uma nova limiarização é aplicada sobre a imagem resultante, permitindo que somente fiquem presentes os núcleos e os micronúcleos das células.

Como saída da etapa de segmentação é obtida uma imagem limiarizada (binária), em que os núcleos e os micronúcleos das células estão separados do fundo. Nesse momento, o fluxograma é dividido em duas partes: uma para detectar os núcleos e fazer sua contagem, outra para detectar os micronúcleos e também fazer sua contagem. Nessa etapa, a detecção é realizada pelo analisador de partículas do *ImageJ*.

4.2.1. Pré-processamento e Segmentação

A imagem de entrada é convertida para escala de cinza. Em seguida, é feita uma cópia dessa imagem que será usada para criar uma máscara de células. Essa máscara é uma

imagem que irá sobrepor a imagem de entrada para proteger as células de serem apagadas durante a etapa de eliminação de ruídos.

Para criar uma máscara de células a imagem deve ser atenuada e então limiarizada, conforme a demonstração a seguir:

- A atenuação é feita com a função *Subtract Background* com *Rolling balls radius* de 50 pixels e as opções *Light Background* e *Create Background* ativadas.
- Aplica-se então a limiarização com a função *Auto-Threshold*.

A etapa de criação dessa máscara pode ser visualizada na Figura 7.

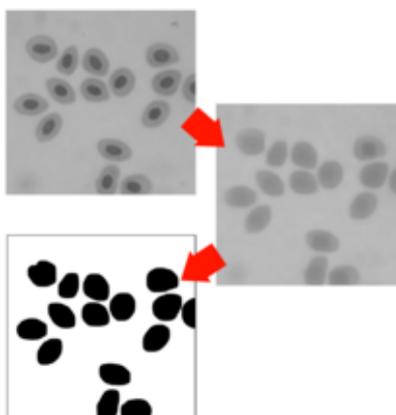


Figura 7. Processo de criação de máscara de células.

O próximo passo é remover os ruídos do fundo. Nessa etapa a remoção é realizada por meio da técnica de mascaramento, mostrada na Figura 8.

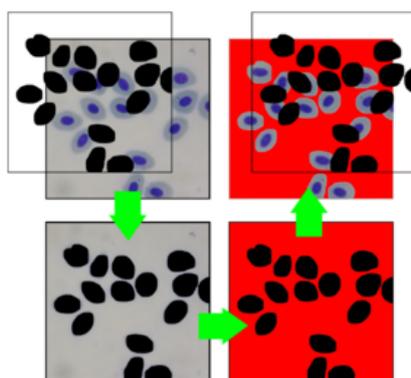


Figura 8. Aplicando a máscara e removendo o fundo.

A máscara de células criada na etapa anterior é posta sobre a imagem de entrada. Em seguida um processo de pintura (ou remoção) é aplicado pixel a pixel sobre a imagem de entrada. Os pixels onde estão localizadas as máscaras das células não são afetados. O resultado é uma imagem com seu fundo totalmente eliminado, como visto na Figura 9.

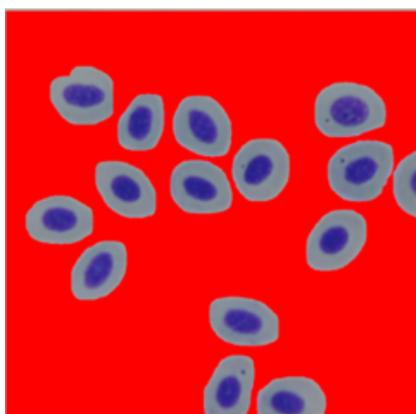


Figura 9. Imagem com fundo removido e células isoladas.

Com a nova imagem obtida, agora com o fundo eliminado, a próxima etapa é realçar as regiões de interesse, que são os núcleos e os micronúcleos. E logo depois, aplica-se a limiarização. Esse processo é descrito abaixo:

- Realça as regiões de interesses com a função *Subtract Background* com *Rolling balls radius* de 50 pixels e a opção *Light Background* ativada.
- Aplica-se então a limiarização com a função *Auto-Threshold*.

O resultado é a imagem que pode ser vista na Figura 10.

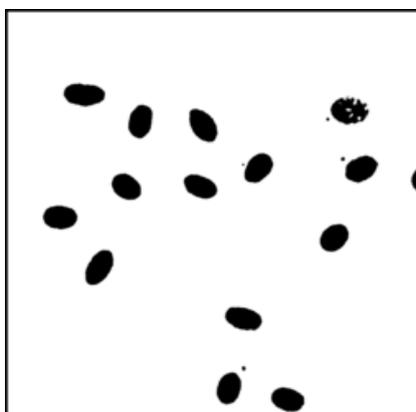


Figura 10. Imagem limiarizada.

4.2.2. Detecção, contagem e desenho

A imagem obtida na etapa anterior é submetida ao analisador de partículas do *ImageJ*, para então obter o número de núcleos, o número de micronúcleos, e suas localizações na imagem. Primeiramente esse processo é feito para os núcleos, depois se repete para os micronúcleos.

Como descrito no experimento anterior, o que irá diferenciar um núcleo de um micronúcleo para o analisador de partículas, são principalmente seus tamanhos. Segue abaixo os parâmetros utilizados no analisador para reconhecer os núcleos e o micronúcleos:

- Núcleo: Tamanho entre 3000 pixels e infinito. Circularidade entre 0.1 e 1.0
- Micronúcleo: Tamanho entre 40 e 500 pixels. Circularidade entre 0.5 e 1.0

Para finalizar, é desenhado na imagem de entrada, quadrantes que determinam as células e micronúcleos reconhecidos, bem como informações sobre a quantidade dos mesmos. Todo o processo dessa etapa é demonstrado na Figura 11.

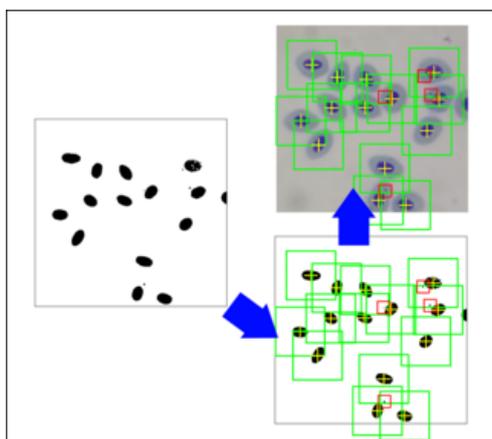


Figura 11. Detecção e desenho

5. Resultados & Discussão

Para validar os experimentos, foram realizados vários testes com as imagens coletadas de 5 lâminas contendo células de peixes. As amostras foram avaliadas tanto manualmente quanto pelo sistema desenvolvido, para identificar quantas células possuem micronúcleos e quantas não.

Os resultados foram submetidos à uma matriz de confusão e avaliados com as medidas de precisão, sensibilidade, acurácia e especificidade, como representado na Tabela 1 para o primeiro experimento, e na Tabela 2 para o segundo experimento.

Para a matriz de confusão, há quatro diferentes resultados: Verdadeiro-Positivo (VP), Falso-Positivo (FP), Verdadeiro-Negativo (VN) e Falso-Negativo (FN). Para a avaliação do sistema desenvolvido foram usadas as seguintes classificações:

- VP: Células com micronúcleo; O sistema reconhece micronúcleo.
- FP: Células sem micronúcleo; O sistema reconhece micronúcleo.
- VN: Células sem micronúcleo; O sistema não reconhece micronúcleo.
- FN: Células com micronúcleo; O sistema não reconhece micronúcleo.

Para analisar os dados da matriz de confusão foram utilizadas quatro medidas:

- Acurácia: $\frac{(VP+VN)}{(VP+VN+FP+FN)}$

É o nível de confiabilidade do sistema. O quão ele está correto (Souza; Santos, 2011).

- Sensibilidade: $\frac{VP}{(VP+FN)}$

É a porcentagem de Verdadeiro-Positivo detectado pelo sistema (Souza; Santos, 2011).

- Precisão: $\frac{VP}{(VP+FP)}$
É o nível de acurácia de uma determinada classe. Nesse caso, Verdadeiro-Positivo (Souza; Santos, 2011).
- Especificidade: $\frac{VN}{(VN+FP)}$
É a porcentagem de vezes que o sistema reporta corretamente Verdadeiro-Negativo (Souza; Santos, 2011).

Experimento 1	P	N	Precisão	Sensibilidade	Acurácia	Especificidade
V	35	107	77,7%	81,3%	88,7%	91,4%
F	10	8	-	-	-	-

Tabela 1. Primeiro experimento: Detecção por varredura em quadrante

Experimento 2	P	N	Precisão	Sensibilidade	Acurácia	Especificidade
V	38	116	97,4%	88,3%	96,2%	99,1%
F	1	5	-	-	-	-

Tabela 2. Primeiro experimento: Detecção com remoção de ruído

Analisando os resultados, é possível observar que no primeiro experimento o sistema reconheceu corretamente as células em 81,3% dos casos. E de todas as células que julgou como verdadeiro-positivo, apenas 22,3% não continham quaisquer micronúcleos.

Já no segundo experimento houve uma taxa de acertos ligeiramente maior. O sistema reconheceu as células com micronúcleos em 88,3% dos casos. E das ocasiões que o mesmo classificava como verdadeiro-positivo, somente 2,6% não possuíam micronúcleos.

Para os casos em que o sistema reportava as células como verdadeiro-negativo, ou seja as células que não continham micronúcleos, as taxas de erros encontradas nos primeiro e segundo experimentos foram respectivamente de 8,6% e 0,9%.

De modo geral, avaliando do ponto de vista da acurácia, é notável a diferença de confiabilidade entre os dois experimentos. A etapa de eliminação de ruídos implementada no segundo experimento possibilitou que o sistema adquirisse uma confiabilidade de 7,5% maior que a alcançada no experimento anterior.

6. Considerações Finais

Apesar dos resultados bastante promissores, é necessário ainda muito trabalho a ser realizado afim de reduzir as porcentagens de erros do sistema. Deve ser levado em consideração a eliminação de ruídos como ponto fundamental para obtenção de melhores resultados. Fase essa, que se deve ter um cuidado especial desde a etapa de preparo das lâminas para análise.

No decorrer deste trabalho, a quantidade de imagens de boa qualidade adquiridas por meio do microscópio foram poucas comparadas ao restante das imagens. Simplesmente pelo fato da maior parte delas possuírem muito ruídos, difícil até para distinguir manualmente um micronúcleo. A respeito disso, é fundamental um aperfeiçoamento na etapa de aquisição das imagens. A qualidade das imagens depende exclusivamente do

modo como foi preparada a lâmina, o corante utilizado, e da extração do sangue para a análise.

Analisando os resultados alcançados com os dois experimentos realizados, é possível concluir que o segundo experimento foi muito mais eficiente em relação ao primeiro. Em outras palavras, a etapa de eliminação de ruídos incluída no segundo experimento foi a responsável por tal precisão em relação ao outro experimento. Delimitar a varredura em um quadrante não foi suficiente para se livrar dos ruídos, já que o sistema poderia confundir qualquer partícula fora da membrana da célula como um micronúcleo, por mais que esteja dentro do quadrante.

Um outro ponto que também deve ser levado em conta, é a resolução da imagem. Todos os parâmetros usados nos experimentos foram alcançados baseando-se na resolução de 2592x1944 pixels, na qual estavam todas as imagens utilizadas. Ter como entrada uma imagem com resolução diferente dessa faixa, possivelmente acarretaria falha no sistema em muitos aspectos. Outro fator relevante, é a ampliação utilizada no microscópio para capturar as amostras. Nesse trabalho, todas as imagens foram capturadas no microscópio com ampliação de 1000x. Trabalhar com outros valores possivelmente comprometeria a taxa de acertos do algoritmo. Por fim, ambos esses assuntos podem ser discutidos em trabalhos futuros, na elaboração de um software dinâmico, que cruza os valores de resolução e de ampliação para dinamicamente ajustar os parâmetros adequados para a classificação.

Referências

- Agostini, J. M. S. "O teste do micronúcleo: seu uso no Homem.", *Revista Biotemas*, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1993.
- Bailer, W. "Writing ImageJ Plugins—A Tutorial", *Upper Austria University of Applied Sciences*, Hagenberg, Austria, Jul. de 2006.
- Dittmar É. et al. "Associação entre o desenvolvimento gonadal e a frequência de micronúcleos em eritrócitos de pacus (*Piaractus mesopotamicus*)", *Revista Agrarian*, 2010.
- Gonzalez, C.; Woods, E. "Processamento Digital de Imagens", *Pearson*, 2010.
- Guo, X.; Yu, F. "A Method of Automatic Cell Counting Based on Microscopic Image", *Optical Engineering Department*, Zhejiang University, Hangzhou, 2013.
- Labno, C. "Two Ways to Count Cells with ImageJ", disponível em <<https://www.unige.ch/medecine/bioimaging/files/3714/1208/5964/CellCounting.pdf>>, acesso em: 11 abr. de 2016.
- Silva, A.da C.; Nepomuceno, J. C. "Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) do rio Paranaíba", *Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão do UNIPAM*, Ago. de 2010.
- Souza, C. R. C; Santos, P. E. "Probabilistic Logic Reasoning About Traffic", *Annual Conference on Towards autonomous robotic systems*, Berlin, 2011.
- Venkatalaksmi, B.; Thilagavathi, K., "Automatic Red Blood Cell Counting Using Hough Transform", *IEEE Conference on Information and Communication Technology*, 2013.