

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

ANDRÉ MARCOS PEREZ

Automação da contagem de placas de Zika vírus do
experimento *plaque assay* utilizando visão computacional

São Carlos, Brasil
2017

ANDRÉ MARCOS PEREZ

Automação da contagem de placas de Zika vírus do experimento *plaque assay* utilizando visão computacional

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Elétrica com ênfase em Eletrônica, da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Engenheiro Eletricista.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Andrade da Costa Vieira.

São Carlos, Brasil
2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Perez, Andre Marcos

P438a Automação da contagem de placas de Zika vírus do experimento *plaque assay* utilizando visão computacional / Andre Marcos Perez; orientador Marcelo Andrade da Costa Vieira. São Carlos, 2017.

Monografia (Graduação em Engenharia Elétrica com ênfase em Eletrônica) -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2017.

1. Visão Computacional. 2. Processamento de Imagem.
3. Inteligência Artificial. 4. *Plaque Assay*. 5. Zika vírus. I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: André Marcos Perez

Titulo: "Automação da contagem de placas de Zika vírus do experimento plaque assay utilizando visão computacional"

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado
em 16/11/2017,

com NOTA 8,0 (oito, zero), pela Comissão Julgadora:

*Prof. Dr. Marcelo Andrade da Costa Vieira - Orientador -
SEL/EESC/USP*

Prof. Associado Otavio Henrique Thiemann - FCI/IFSC/USP

Prof. Associado Evandro Luis Linhari Rodrigues - SEL/EESC/USP

Coordenador da CoC-Engenharia Elétrica - EESC/USP:
Prof. Associado Rogério Andrade Flauzino

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Marcos e Shirlei, por me ensinarem
a voar.*

A GRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer meu orientador Dr. Marcelo Andrade da Costa Vieira pela oportunidade de desenvolver este trabalho sobre sua supervisão. Agradeço aos professores Otavio Henrique Thiemann e Evandro Luiz Linhari Rodrigues por aceitarem o convite para participar da banca avaliadora deste trabalho e pelas sugestões de como o mesmo pôde ser aperfeiçoados.

Gostaria também de agradecer a Luíza Zuvanov, aluna de graduação em ciências biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, não só por sua ampla colaboração no projeto no que tange conhecimentos específicos em biologia molecular, mas também por providenciar diferentes pontos de vista durante o desenvolvimento deste que, de forma direta ou indireta, enriqueceram-no.

Por último, mas certamente não menos importante, gostaria de agradecer a minha família e a todos os meus amigos pelo suporte providenciado ao longo de toda a minha vida universitária.

“Aquilo que escuto eu esqueço. Aquilo que vejo eu lembro. Aquilo que faço eu aprendo.”

Confúcio

RESUMO

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de um sistema de automação da contagem de placas de Zika vírus do experimento *plaque assay* utilizando técnicas de visão computacional. Atualmente, o Zika vírus é um problema de saúde pública de impacto global, causando doenças como a microcefalia. Para combatê-las, pesquisadores ao redor do mundo pesquisam e desenvolvem tratamentos e medicamentos. Uma etapa comum nas pesquisas desta área é a titulação viral, onde o *plaque assay* é uma das técnicas mais utilizadas. Contudo, erros cometidos pelos pesquisadores na coleta dos resultados devido tanto à má realização do experimento quanto a fatores aleatórios podem comprometer a eficiência da técnica. Sendo assim esforços para aumentar a precisão da coleta dos resultados são de grande interesse. Nesse contexto, o presente trabalho propõe um sistema de automação da contagem das placas de Zika vírus resultantes do experimento *plaque assay*, visando o aumento da eficiência da titulação viral. O sistema é composto por três etapas: processamento de imagens; representação e descrição; reconhecimento e interpretação. Na primeira etapa, as imagens dos poços são escolhidas, segmentadas e filtradas. As imagens das placas individuais são isoladas e eventuais placas sobrepostas são separadas. Já na segunda etapa, as características geométricas das placas são extraídas. Na última etapa, cada placa é classificada como placa viral ou ruído por um classificador binário, cujos parâmetros foram obtidos por meio de uma técnica de treino supervisionado. Por fim, a contagem é obtida pela soma das placas classificadas como placas virais. Para que fosse possível avaliar a eficácia do sistema, quatro pesquisadores da universidade de Brasília, com experiência no uso do *plaque assay*, forneceram a contagem e a classificação de placas de três de poços distintos. Na etapa de processamento de imagens, observou-se que foi isolado um número maior de placas do que o número médio fornecido pelos pesquisadores, gerando um erro médio relativo de 67,23% na contagem. Já na etapa de reconhecimento e interpretação, o classificador binário apresentou um erro médio relativo de apenas 5,22%, melhorando a contagem anterior em 92,23%. Concluiu-se que o sistema proposto contou automaticamente as placas de Zika vírus das amostras do experimento *plaque assay* com qualidade semelhante àquelas feitas por pesquisadores experientes.

Palavras-chave: Visão computacional, processamento de imagens, inteligência artificial, *plaque assay*, Zika vírus.

ABSTRACT

The aim of this work is to development of an automatic Zika virus plaque counter system using computer vision techniques. Nowadays, the Zika virus is a public health problem with global impacts, causing diseases such as microcephaly. To combat them, researchers around the world research and develop treatments and medicaments. A common step on researches in this area is the viral titer and the plaque assay is one of the most used techniques. However, mistakes made by the researchers in the collection of results due both to bad performed experiments and random factors may compromise the efficiency of the technique. Therefore, efforts to increase the accuracy of the collection of results are of great interest. In this context, the present work proposes an automation system for counting Zika virus plaques from plaque assay experiments, aiming to increase the efficiency of viral titer. The system consists of three steps: image processing; representation and description; recognition and interpretation. In the first step, the well images are chosen, segmented and filtered. The images of individual plaques are isolated and any eventual overlapping plaque are separated. In the second stage, the geometric characteristics of the plaques are extracted. In the last step, each plaque is classified as viral plaque or noise by a binary classifier, whose parameters were obtained through a supervised training technique. Finally, the count is obtained by summing the plaques classified as viral plaques. In order to evaluate the efficacy of the system, four researchers from the University of Brasília with experience in the plaque assay experiment helped by providing the counting and the classification of plaques from three different wells. In the image processing step, it was observed that a larger number of plaques were isolated than the average number provided by the researchers, generating a mean relative error of 67.23% in the count. In the recognition and interpretation step, the binary classifier presented a mean relative error of only 5.22%, improving the previous count by 92.23%. It was concluded that the proposed system automatically counted the Zika virus plaques from samples from the plaque assay experiment with similar quality to those made by experienced researchers.

Key-words: Computer vision, image processing, artificial intelligence, *plaque assay*, Zika virus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Modelo de cor RGB com sistema de coordenadas cartesianas e subespaço no formato de um cubo unitário.....	27
Figura 2 - Modelo de cor HSV de sistema de coordenadas cilíndricas e subespaço no formato de pirâmide de base quadrada de lado unitário e de cone.com raio de base unitário.....	27
Figura 3 – Aplicação de um filtro morfológico para a remoção de ruídos internos e externos de uma imagem.....	29
Figura 4 - Exemplos de elemento estruturantes no formato de cruz, quadrado, linha e disco, respectivamente da esquerda para a direita.....	29
Figura 5 - Exemplo do algoritmo seguidor de fronteira.	30
Figura 6 – Arquitetura proposta do sistema para a automação da contagem de placas de Zika vírus do experimento plaque assay. Blocos azuis e verdes representam etapas de processamento de imagem enquanto os blocos vermelhos de inteligência artificial.....	33
Figura 7 – Exemplo do resultado do experimento plaque assay realizado em células A549/BVDV-Npro 5 dias após a infecção. Em cada poço, 2.5×10^5 células foram infectadas com a cepa Zika vírus PE243, em diluições seriadas de 10^{-7} , 10^{-6} e 10^{-5} , da esquerda para a direita. Poços organizados na mesma coluna representam a mesma diluição de vírus.....	34
Figura 8 –Três amostras do experimento plaque assay realizado em células A549/BVDV-Npro 5 dias após a infecção. Em cada poço, 2.5×10^5 células foram infectadas com a cepa Zika vírus PE243, em diluições de 10^{-6} , 10^{-6} e 10^{-7} , da esquerda para a direita. Os poços foram utilizados para o desenvolvimento do sistema.	35
Figura 9 - Assinatura (curva azul) de um círculo.	37
Figura 10 - Assinatura (curva azul) de dois círculos sobrepostos com centros distantes.	38
Figura 11 - Assinatura (curva azul) de dois círculos sobrepostos com centros próximos.	38
Figura 12 - Assinatura (curva azul) de dois círculos sobrepostos de tamanhos diferentes....	38
Figura 13 - Assinatura (curva azul) de três círculos sobrepostos de maneira total.....	39
Figura 14 - Assinatura (curva azul) de três círculos sobrepostos de maneira parcial.	39
Figura 15 - Pontos de mínimo (pontos vermelhos) da assinatura (curva azul) de três círculos sobrepostos de maneira completa. A curva e o ponto verde representam a derivada da média móvel da assinatura (curva azul) e o centro de massa da imagem, respectivamente.	40

Figura 16 - Estágio de interpretação e descrição. A classificação das placas por pesquisadores e as amostras 1 e 2 serão utilizadas para obter os parâmetros do classificador binário. Este, por sua vez contará o número de placas em cada amostra.....	42
Figura 17 – Amostra 1: histogramas no sistema de cor RGB e HSV.	43
Figura 18 – Amostra 2: histogramas no sistema de cor RGB e HSV.	43
Figura 19 – Amostra 1. Da esquerda para a direita temos $i(x,y)$, $i_{GRAY}(x,y)$, $i_{BINARY}(x,y)$ antes e depois do filtragem morfológica.	44
Figura 20 - Amostra 2. Da esquerda para a direita temos $i(x,y)$, $i_{GRAY}(x,y)$, $i_{BINARY}(x,y)$ antes e depois do filtragem morfológica.	44
Figura 21 – Amostra 1: placas simples, duplas e triplas. A curva azul representa a assinatura da placa, a curva verde sua derivada, o ponto verde seu centro de massa e os pontos vermelhos seus mínimos locais.....	45
Figura 22 – Amostra 2: placas simples, duplas e triplas. A curva azul representa a assinatura da placa, a curva verde sua derivada, o ponto verde seu centro de massa e os pontos vermelhos seus mínimos locais.....	46
Figura 23 – Amostra 1 e 2: separação parcial de placas sobrepostas.....	47
Figura 24 - Área e excentricidade das placas das amostras 1 e 2 classificadas como placas virais (pontos verdes) ou ruído (pontos azuis) de acordo com pesquisadores com experiência no experimento plaque assay.....	49
Figura 25 – Fronteira de decisão obtida por meio do método do gradiente. Placas com um conjunto de características geométricas acima da fronteira serão classificadas como placas virais. Taxa de acerto de 82,12%.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparaçao entre técnicas de titulação viral em relação a reprodutibilidade, tempo de execução, quantidade de trabalho e custos envolvidos (VIROCYT, 2013).	25
Tabela 2 - Contagem final de placas na etapa de processamento de imagens.	47
Tabela 3 - Contagem das placas de Zika vírus das três amostras por pesquisadores com experiência no experimento plaque assay.....	48
Tabela 4 - Comparaçao entre a contagem do estágio de processamento de imagens e da contagem realizadas por pesquisadores com experiência no experimento plaque assay.....	48
Tabela 5 - Comparaçao entre a contagem do estágio de reconhecimento e interpretação e da contagem realizadas por pesquisadores com experiência no experimento plaque assay.....	50
Tabela 6 - Comparaçao entre o erro médio da contagem do estágio de processamento de imagens e do erro médio da contagem do estágio de reconhecimento e interpretação.	50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	Contextualização	23
1.2	Justificativas	24
1.3	Objetivo	24
2	EMBASAMENTO TEÓRICO	25
2.1	<i>Plaque Assay</i>	25
2.2	Processamento de Imagens	26
2.2.1	Sistema de cores RGB e HSV	26
2.2.2	Limiarização global ótima	28
2.2.3	Filtros morfológicos.....	28
2.2.4	Algoritmo seguidor de fronteira	29
2.3	Inteligência artificial	30
2.3.1	Função sigmoide	30
2.3.2	Método do gradiente	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1	Arquitetura do sistema	32
3.2	Processamento de imagens	33
3.2.1	Aquisição das imagens dos poços	33
3.2.2	Segmentação	35
3.2.3	Filtragem	35
3.2.4	Aquisição das imagens das placas.....	36
3.2.5	Separação de placas sobrepostas	37
3.3	Representação e descrição	41
3.4	Reconhecimento e interpretação	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1	Processamento de imagens	43
4.2	Representação e descrição	47
4.3	Reconhecimento e interpretação	47
5	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS.....	53
	APÊNDICE A – CÓDIGO FONTE E IMAGENS.....	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 Contextualização

Desde 430 A.C., há relatos de doenças virais importantes que afetaram grande parcela da população (RETIEF e CILLIERS, 1998). Entre as várias doenças virais conhecidas, pode-se citar as seguintes: HIV/AIDS, hepatites virais, ebola, raiva, sarampo, herpes, doenças causadas pelo vírus Influenza e doenças causadas pela família de Flavivirus como dengue, febre amarela e Zika.

No Brasil, recentemente, houveram relatos de epidemia causada pelo agente viral Zika vírus. Este vírus foi primeiramente descrito em 1947 durante uma vigilância de rotina contra febre amarela em Uganda (DICK et al., 1952). Por muito tempo, pensou-se que o Zika vírus fosse majoritariamente um vírus de primatas não humanos. Entretanto, a zoonose passou a afetar a população humana, onde seu primeiro relato é datado de 1952 (SMITHBURN, 1952). Contudo, apenas em 1964 o vírus foi confirmado como causador de doença humana (SIMPSON, 1964).

O primeiro grande surto detectado por Zika vírus ocorreu na Ilha de Yap em 2007, infectando 73% da população. Esta foi a primeira vez que a doença Zika estava restrita a transmissão humano-mosquito, já que não foram encontrados macacos próximos a região (DUFYY et al., 2009). O segundo surto por Zika vírus foi registrado na Polinésia Francesa em 2013, onde foi relatada uma possível associação do Zika vírus com complicações autoimunes, malformações congênitas e desordens neurológicas, como a síndrome de Guillain-Barré (OEHLER et al, 2014).

A entrada do Zika vírus em território brasileiro pode ter se dado segundo duas hipóteses: introdução durante a copa do mundo *FIFA* de 2014 ou pelo campeonato de canoagem *Va'a World Sprint*, sendo a última a mais provável (WHO, 2016). Em apenas três meses, de fevereiro de 2015 ao final de abril do mesmo ano, foram reportados aproximadamente 7000 casos de pacientes contendo sintomas semelhantes àqueles causados pelo Zika vírus. Entretanto, foi apenas em maio de 2015 que houve confirmação da circulação do Zika vírus no país (WHO, 2016). Em outubro de 2015, foi notado um elevado aumento nos casos de microcefalia de recém-nascidos no Brasil, cerca de 3000 casos estavam sendo analisados (SCHULER-FACCINI, 2016). A doença Zika se espalhou pelo globo, atingindo 84 países (WHO, 2017), onde, além de transmissão por vetor, houveram relatos de transmissão de pessoa a pessoa, como por exemplo de forma sexual (WHO, 2016).

Dos casos de pacientes contendo Zika vírus que desenvolveram sintomas, os mais comuns são febre, erupções cutâneas, dor nas juntas e conjuntivite (CDC, 2017). Em casos mais extremos, observa-se o aparecimento da síndrome de Guillain-Barré. Já mulheres grávidas que tenham contraído o Zika vírus, podem apresentar bebês com

malformações como microcefalia, problemas na audição, visão e crescimento (WHO, 2017). Atualmente, a abordagem médica consiste no tratamento dos sintomas da doença ao invés do combate direto ao vírus. Mesmo com todos os esforços por parte dos laboratórios de pesquisa, ainda não são encontrados remédios ou vacinas específicas para o Zika vírus (WHO, 2017).

1.2 Justificativas

Para a combater doença causada pelo Zika vírus, pesquisadores ao redor do mundo investigam a sua biologia e buscam o desenvolvimento de testes de diagnóstico, vacinas e tratamentos. Para que as pesquisas possam ser realizadas, as amostras virais a serem utilizadas devem ser quantificadas previamente (VIROCYT, 2013). Para tanto, os pesquisadores utilizam métodos de titulação viral como o ensaio em placa, conhecido como *plaque assay*. Este passo é essencial nos estudos que envolvem também outros agentes virais, como HIV e ebola.

A determinação do título viral pelo *plaque assay* pode ser exaustiva e ambígua (VIROCYT, 2013). A quantificação viral pode ser estimada por meio da contagem do número de zonas circulares, conhecidas como placas, presentes nos poços ao término do experimento. Dois fatores podem dificultar a correta contagem: a sobreposição aleatória de duas ou mais placas e o ruído causado pelo desprendimento das células do fundo dos poços. Como as placas são contadas pelo pesquisador por inspeção visual, o resultado final é dependente da interpretação humana, a qual pode ser considerada subjetiva e, consequentemente, passível de erros, apresentando divergências que podem variar entre 5% e 44% na titulação viral de um mesmo experimento por diferentes pesquisadores (BAE et al, 2003).

Portanto, o impacto do Zika vírus na saúde pública global justifica a busca por ferramentas que auxiliem a elevar a eficiência das técnicas de titulação viral, como o *plaque assay*, para auxiliar pesquisadores na busca da solução de um problema real e relevante para a sociedade.

1.3 Objetivo

O presente trabalho tem como objetivo propor um sistema de contagem automática de placas de Zika vírus, provenientes do experimento *plaque assay*, que utiliza técnicas de processamento de imagens e inteligência artificial para diminuir erros na coleta dos resultados devido a sobreposição aleatória das placas e ruídos causados por células que se desprenderam do fundo dos poços, aumentando assim a eficiência da titulação viral.

2 EMBASAMENTO TEÓRICO

2.1 *Plaque Assay*

A quantificação de amostras virais pode ser considerada como um passo primordial aos estudos em virologia. A confecção de proteínas recombinantes, vacinas, drogas e métodos para o combate e entendimento de doenças virais, por exemplo, tornam-se dependentes de titulação viral prévia aos experimentos. As técnicas de titulação viral podem ser agrupadas em duas categorias: tradicionais ou modernas. No primeiro grupo, abrange-se técnicas como *plaque assay* e *fluorescente focus assay* (FFA). Já na categoria de técnicas modernas, pode-se citar às técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (VIROCYT, 2013). A tabela 1 apresenta a comparação entre as técnicas acima mencionadas em relação as suas respectivas reprodutibilidades, tempo de realização, quantidade de trabalho para suas execuções e os custos envolvidos.

Tabela 1 – Comparação entre técnicas de titulação viral em relação a reprodutibilidade, tempo de execução, quantidade de trabalho e custos envolvidos (VIROCYT, 2013).

Técnica	Reprodutibilidade	Tempo	Trabalho	Custo
<i>Plaque assay</i>	Pobre	Dias	Elevado	Baixo
FFA	Pobre	Dias	Elevado	Alto
PCR	Excelente	Horas	Elevado	Alto
ELISA	Boa	Horas	Moderado	Alto

Devido ao seu baixo custo, um dos métodos amplamente utilizados de titulação viral para análises da eficácia de moléculas no combate de doenças virais, por exemplo, é o *plaque assay*. Originalmente criada para quantificar bacteriófagos (vírus de bactérias), a técnica de *plaque assay* foi aprimorada em 1952 para contagem de vírus que infectam animais pelo médico patologista Renato Dulbecco (DULBECCO; VOGT, 1953), agraciado com o Nobel de Fisiologia e Medicina no ano de 1975 por estudos com tumores virais (NOBEL PRIZE, 2017). Hoje, o *plaque assay* pode ser utilizada para diferentes vírus e continua sendo considerada referência mesmo com advento de novas técnicas de titulação (BAER; KEHN-HALL, 2014).

A técnica de *plaque assay* consiste de infecção de monocamada de células cultivadas em placas de cultivo por diluições seriadas da amostra viral. Após infecção, adiciona-se a cada poço da placa um meio imobilizante para que a infecção se espalhe apenas para as células vizinhas. Dependendo da linhagem celular e da cepa viral utilizada

no experimento, a placa deve ser incubada em condições ótimas de cultivo por um período que pode variar de poucos dias a duas semanas. Em seguida, as células são fixadas à placa por método químico e posteriormente coradas. Devido a utilização de meio imobilizante e tempo de espera suficiente, formam-se zonas circulares macroscópicas provenientes de lise celular que podem ser vistas a olho nu e que são chamadas de placas. Por fim, as placas são contadas e a titulação viral pode ser calculada em termos de unidades formadoras de placa por ml (PFU/ml) de acordo com a equação 2.1 (BAER; KEHN-HALL, 2014):

$$\frac{PFU}{ml} = \frac{\text{Número total de placas no poço}}{\text{Diluição} \times \text{Volume de vírus adicionado ao poço}} \quad (2.1)$$

Para minimizar erros na contagem de placas formadas, escolhe-se o poço em que são encontradas de 10 a 100 placas. Sabe-se que, a cada 100 placas contadas, o título amostrado pode variar 10% para mais ou para menos (BAER; KEHN-HALL, 2014). Entretanto, mesmo com as devidas precauções tomadas, a contagem das placas virais varia de pesquisador para pesquisadores já que estas podem apresentar diferentes morfologias dependendo da linhagem celular e vírus utilizados. Desse modo, considerando as fontes de imprecisão desde a confecção do experimento até a contagem final das placas, a titulação de um mesmo vírus por diferentes pesquisadores pode variar entre 5% e 44% (BAE et al, 2003).

2.2 Processamento de Imagens

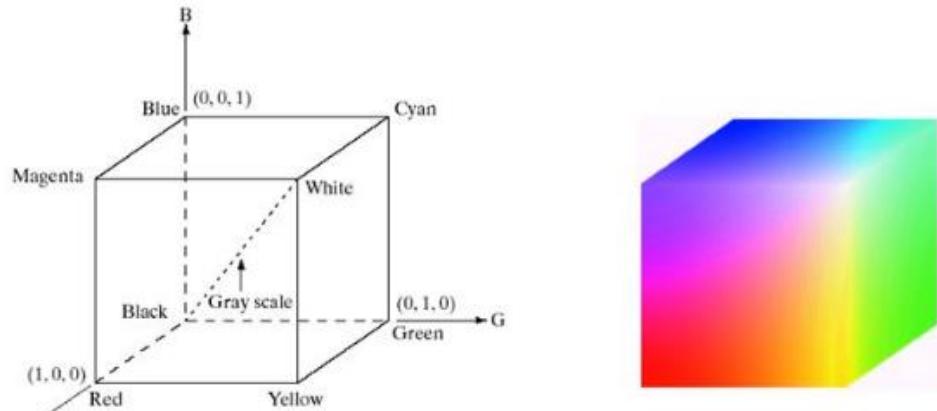
2.2.1 Sistema de cores RGB e HSV

Segundo Gonzalez e Woods (2010, pg.264), o objetivo de um modelo de cores é facilitar a especificação das cores em alguma forma padronizada e amplamente aceita. Em geral, os modelos de cores definem um sistema de coordenadas e um subespaço dentro deste, onde uma cor específica é determinada única e exclusivamente por um ponto pertencente a este subespaço.

De acordo com a definição apresentada, o modelo RGB (*red*, *green* e *blue*) utiliza coordenadas cartesianas (*x,y,z*) e tem como subespaço um cubo unitário, conforme figura 1, onde cada coordenada é associada a uma única cor primária: vermelho, verde ou azul. Portanto, qualquer cor dentro deste modelo pode ser expressa como um ponto com três coordenadas. Por exemplo, os pontos com coordenadas (1,0,0), (0,1,0) e (0,0,1) representam respectivamente as cores primárias vermelha, verde e azul. Dessa maneira, o ponto de coordenada (1,1,0) representa a cor amarela enquanto o ponto (1,1,1) representa a cor branca.

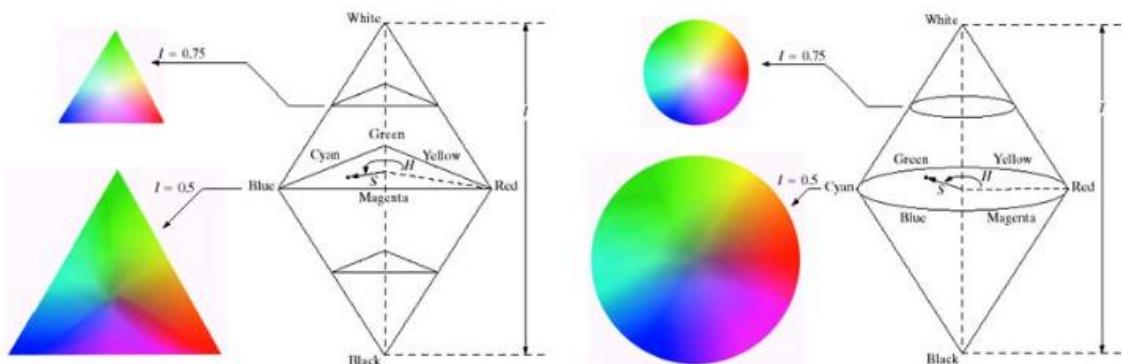
O modelo de cores HSV (*hue*, *saturation* e *valume*) é uma alternativa ao modelo de cores RGB. Amplamente utilizado, o modelo é mais intuitivo para a visão humana (CHENG ET AL., 2001). O modelo utiliza coordenadas cilíndricas (ϱ, φ, z) e pode apresentar diferentes subespaços. A figura 2 apresenta dois exemplos, um em formato de pirâmide de base quadrada com lado unitário e outro em formato de cone com raio da base também unitário. O primeiro componente do modelo é o matiz (*hue*), seu valor varia de forma angular e expressa uma única cor. Assim, as cores puras do sistema RGB são separadas por ângulos de 120° . O segundo componente é a saturação (*saturation*) e equivale ao componente radial do sistema de coordenadas cilíndricas. Variando de 0 a 1, este define o quão próximo do nível de cinza estará a cor definida pelo matiz. Por fim, o terceiro é o brilho (*value*). O componente está localizado na mesma dimensão da altura do sistema, também varia de 0 a 1, e define a intensidade do tom de cinza a ser adicionado na cor pura, definida pelo matiz, conforme sua proximidade do centro do sistema, definida pela saturação. Por exemplo, os pontos de coordenadas $(0,0,1)$ e $(0,0,0)$ apresentam as cores branca e preta, respectivamente, enquanto os pontos $(0^\circ, 1, 0)$, $(120^\circ, 1, 0)$ e $(240^\circ, 1, 0)$ representam as cores vermelha, verde e azul.

Figura 1 - Modelo de cor RGB com sistema de coordenadas cartesiana e subespaço no formato de um cubo unitário.



Fonte: GONZALEZ e WOODS, 2002.

Figura 2 - Modelo de cor HSV de sistema de coordenadas cilíndricas e subespaço no formato de pirâmide de base quadrada de lado unitário e de cone.com raio de base unitário.



Fonte: GONZALEZ e WOODS, 2002.

2.2.2 Limiarização global ótima

Segmentação por similaridade é o processo que subdivide uma imagem em regiões menores que satisfaçam um critério pré-determinado. De acordo com Sankur e Mehmet, (2004), o método mais utilizado é o método estatístico de limiarização global ótima conhecida como método de Otsu. Publicado em 1979 em um artigo intitulado ‘*A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms*’ (OTSU, 1979), o autor propõe um algoritmo que procura encontrar um limiar global ótimo que melhor separe um histograma em dois utilizando o conceito de máxima variância. O algoritmo 1 apresenta, em linhas gerais, o funcionamento do método.

Algoritmo 1: Método de Otsu

1. `hist[] <- histograma de uma imagem com L níveis de intensidade`
 2. `Para todo T variando de 1 até L-2`
 3. `C1 <- hist[0,T]`
 4. `C2 <- hist[T+1,L-1]`
 5. `var(i) <- variância entre C1 e C2`
 6. `Fim`
 7. `TOTIMO <- índice do valor máximo de var`
 8. `Fim`
-

Se aplicado a uma imagem em escala de cinzas, o algoritmo permite que a mesma seja eficientemente segmentada, ou seja, transformada da escala de cores original para uma imagem em preto e branco. Neste caso, após o algoritmo encontrar o valor de *TOTIMO*, todos os *pixels* da imagem à esquerda do limiar assumem o valor de 0 (preto) enquanto os *pixels* a sua direita assumem o valor de 1 (branco).

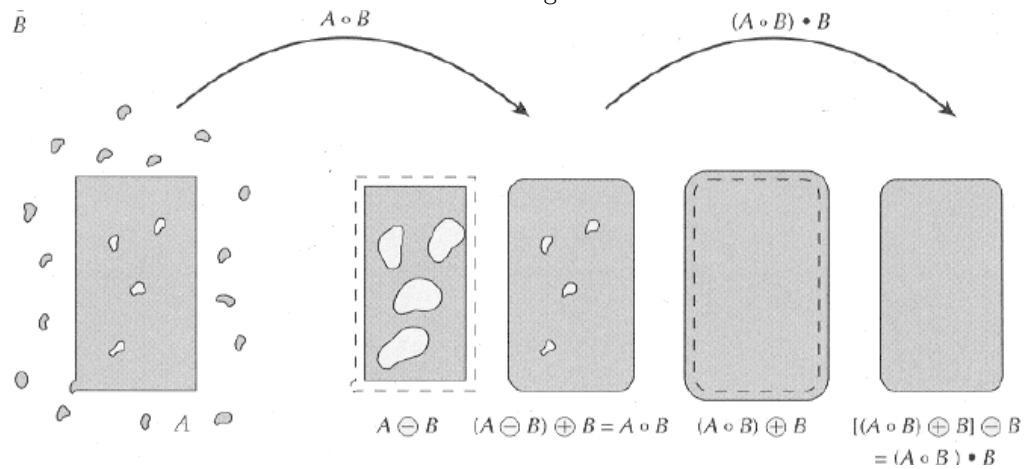
2.2.3 Filtros morfológicos

Filtros morfológicos são filtros não lineares baseados na forma dos elementos de interesse nas imagens e consistem em uma aplicação ordenada dos processos de abertura, erosão seguida de dilatação, e de fechamento, dilatação seguida de erosão. Uma abertura seguida de um fechamento constitui em um filtro morfológico, o qual é utilizado tanto suavização de imagens como para remoção de ruído. A etapa de abertura suprime detalhes menores que o elemento estruturante fora das bordas de um objeto presente em uma imagem, corroendo levemente suas bordas, enquanto a etapa de fechamento suprime os detalhes menores que o elemento estruturante dentro das bordas, recuperando os detalhes das bordas corroídas na etapa anterior (GONZALEZ e WOODS, 2010, pg.443). Uma ilustração do funcionamento de um filtro morfológico, está presente na figura 3.

Nas duas primeiras imagens, ocorre o processo de abertura. A etapa de erosão remove os ruídos externos e diminui o tamanho da imagem enquanto aumenta os ruídos

internos. Já a etapa de dilatação restaura o seu tamanho e diminui ruídos internos ressaltados anteriormente. O resultado do processo de abertura, presente na terceira imagem, apresenta uma imagem com bordas suavizadas e limpa de ruídos externos. Nas duas últimas imagens, ocorre o processo de fechadura. A dilatação elimina os ruídos internos da imagem e expande suas bordas enquanto a erosão recupera o seu tamanho original. O resultado do processo de fechamento e do filtro morfológico, presente na última imagem, é o de uma imagem ainda com bordas suavizadas, mas livre de ruídos.

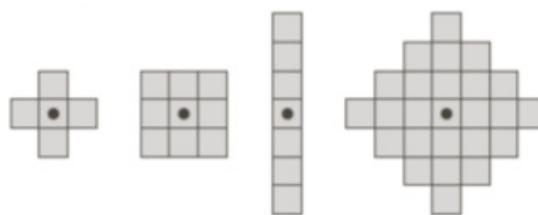
Figura 3 – Aplicação de um filtro morfológico para a remoção de ruídos internos e externos de uma imagem.



Fonte: GONZALEZ e WOODS, 2010.

Se um objeto apresentar um formato majoritariamente circular, por exemplo, deve-se utilizar um elemento estruturante no formato de disco a fim de minimizar a deformação do mesmo durante o processo de filtragem. Exemplos de elementos estruturantes podem ser encontrados na figura 4.

Figura 4 - Exemplos de elemento estruturantes no formato de cruz, quadrado, linha e disco, respectivamente da esquerda para a direita.



Fonte: GONZALEZ e WOODS, 2010.

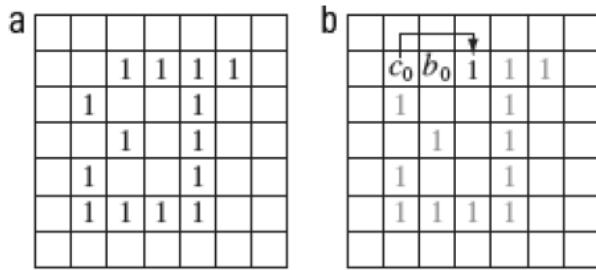
2.2.4 Algoritmo seguidor de fronteira

Algoritmos descritores de fronteiras focam nas características externas dos objetos, como seu formato geométrico, orientação, tamanho, etc. De fato, Suzuki e Abe

(1985) definem um algoritmo seguidor de fronteiras como uma função que deriva uma sequência coordenada de pontos da fronteira de um objeto conectado. Em outras palavras, o algoritmo busca descrever o formato bidimensional de uma imagem em um vetor unidimensional (GONZALEZ e WOODS, 2010, pg.524). Para explicar seu funcionamento, considere a figura 3

Escolhendo um ponto de referência b_0 qualquer da fronteira do objeto, o algoritmo varre, no sentido horário, sua região 8-conectada partir do ponto c_0 . Ao encontrar um ponto com o valor de 1, o algoritmo descola o ponto de referência de b_0 para este novo ponto. Este então passa a ser denominado como b_1 . O algoritmo repete o processo até que a coordenada do ponto b_N seja igual a coordenada do ponto b_0 , realizando assim uma volta completa na fronteira do objeto. Se a coordenada do ponto de referência for armazenada em um vetor a cada troca, obtém-se uma representação unidimensional do objeto pelas coordenadas de sua fronteira.

Figura 5 - Exemplo do algoritmo seguidor de fronteira.



Fonte: GONZALEZ e WOODS, 2010.

2.3 Inteligência artificial

2.3.1 Função sigmoide

A função sigmoide, também conhecida função logística, é definida conforme a equação 2.2. É uma função $f: \mathbb{R} \rightarrow \mathbb{R}$ com domínio $\{x \in \mathbb{R} \mid -\infty \leq x \leq \infty\}$ e contradomínio $\{f(x) \in \mathbb{R} \mid 0 \leq x \leq 1\}$. O nome sigmoide deriva do formato em “s” do seu gráfico em torno do intervalo $I = \{x \in \mathbb{R} \mid -5 \leq x \leq 5\}$ e apresenta aplicações em diversas áreas do conhecimento, como biologia, psicologia e economia (VON SEGGERN, 2007, p.148).

$$f(x) = \frac{1}{1 + e^{-kx}} \quad (2.2)$$

Nota-se que seu contradomínio é limitado ao intervalo $I = \{f(x) \in \mathbb{R} \mid 0 \leq f(x) \leq 1\}$ para qualquer valor de x . Nota-se também que $f(0) = 0.5$. Essas duas propriedades

fazem com que a função seja amplamente utilizada como um classificador binário dentro da área de inteligência artificial (VON SEGGERN, 2007, p.148).

2.3.2 Método do gradiente

O método do gradiente, também conhecido como método do máximo declive, é um algoritmo iterativo de otimização de primeira ordem utilizado para encontrar mínimos locais de uma função (ARFKEN e WEBER, 2011). Dado uma função multivariada $f(x)$ definida e diferenciável em torno de uma vizinhança ϑ , ela decrescerá mais rapidamente caso x varie de ϑ_i para ϑ_{i+1} na direção de $-\nabla f(\vartheta_i)$, ou seja, na direção do negativo do gradiente de f calculado ϑ_i . A equação iterativa que rege o comportamento do algoritmo está presente na equação 2.3.

$$\vartheta_{i+1} = \vartheta_i - k \nabla f(\vartheta_i) = \vartheta_i - k \frac{\partial f(\vartheta_i)}{\partial \vartheta_i} \quad (2.3)$$

A constante k é conhecida como o taxa de aprendizado e se for pequena o suficiente $f(\vartheta_{i+1})$ será menor que $f(\vartheta_i)$. Caso essa condição seja falsa, o algoritmo finaliza as iterações, convergindo para o mínimo local ϑ_{i+1} . O algoritmo 2 resume de forma sucinta o funcionamento do algoritmo.

Algoritmo 2: Método do gradiente

1. $\theta \leftarrow$ ponto inicial
 2. $k \leftarrow$ taxa de aprendizado
 3. Faça:
 4. $\theta_1 \leftarrow \theta$
 5. $\theta_2 \leftarrow \theta_1 - k \nabla f(\theta_1)$
 6. $\theta \leftarrow \theta_2$
 7. Enquanto $\theta_2 \leq \theta_1$
 8. Fim
-

É importante ressaltar que, se o valor de k for muito grande, o algoritmo pode divergir e se for muito pequeno, a convergência pode ser lenta. A definição de pequeno e grande varia de aplicação para aplicação, contudo, uma boa prática para ajustar seu valor é calcular o número de iterações realizadas até a convergência do algoritmo para diferentes valores de k . Por fim, o algoritmo busca convergir para mínimos locais, portanto a escolha aleatória do ponto inicial não garante sua convergência para um ponto de mínimo global.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho é proposto um sistema de contagem automática de placas de Zika vírus obtidas em titulações virais por meio do experimento *plaque assay* utilizando um conjunto de técnicas de processamento de imagens e inteligência artificial. Em linhas gerais a arquitetura e o design do sistema são uma adaptação do *framework* proposto por Gonzalez e Woods (2010, p.16). Os autores dividem as técnicas em dois grandes grupos, aquelas que apresentam em sua entrada e saída imagens e aquelas em que a entrada pode ou não ser uma imagem, mas a saída é necessariamente um conjunto de dados, como as características extraídas das imagens de entrada, por exemplo. Neste trabalho, estes grupos foram nomeados de processamento de imagens e representação, sendo descritos em detalhes nas seções 3.2 e 3.3 respectivamente. Já na seção 3.4, um terceiro grupo denominado reconhecimento e representação foi adicionado a composição original do sistema. Este, por sua vez é responsável pelo tratamento dos dados extraídos na seção 3.3, portanto suas entradas e saídas são exclusivamente um conjunto de dados. A descrição detalhada de cada etapa, presente em suas respectivas seções, é precedida pela seção 3.1, na qual é apresentada uma visão geral da arquitetura do sistema. Todo o sistema foi desenvolvido na linguagem de programação utilizada pelo software MatLab® da empresa MathWorks em sua versão R2017a. Este foi escolhido devido a sua extensa e otimizada biblioteca de processamento de imagens. Os códigos fonte utilizados no desenvolvimento de todo o trabalho estão disponíveis em um repositório público cujo endereço eletrônico está presente no apêndice A.

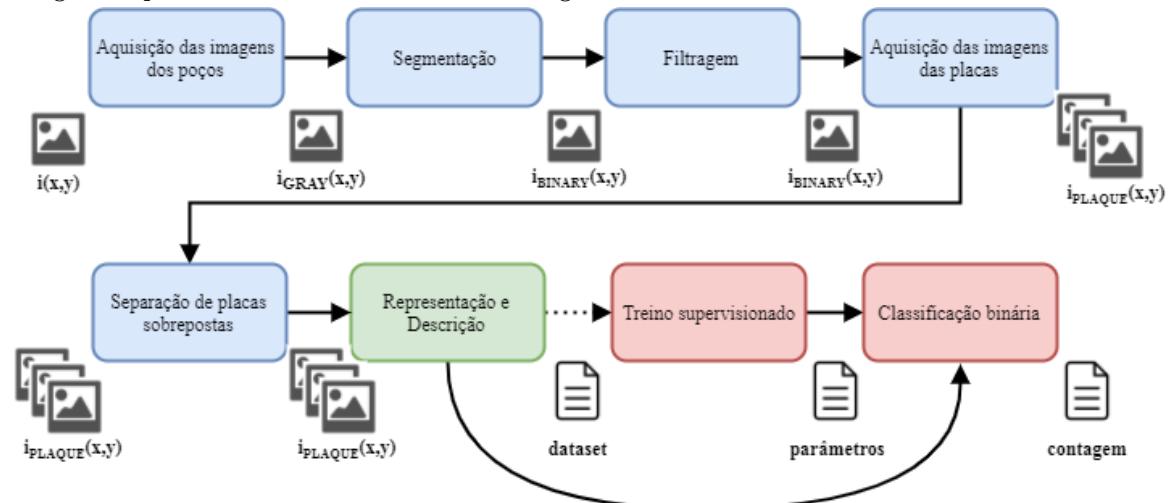
3.1 Arquitetura do sistema.

Para alcançar a automação proposta, a arquitetura do sistema, presente na figura 6, foi dividida em três estágios: processamento de imagens (blocos azuis), representação e descrição (bloco verde) e reconhecimento e interpretação (blocos vermelhos). A figura 6 apresenta também o nome e o tipo da informação de entrada e saída de cada um dos blocos, sendo estas imagens ou dados, para facilitar o acompanhamento da descrição detalhada de cada uma das etapas.

Nos blocos azuis do estágio de processamento de imagem, a melhor imagem em escala de cinza $i_{GRAY}(x,y)$ da imagem colorida $i(x,y)$ de um poço é escolhida, segmentada e filtrada, obtendo-se a imagem em preto e branco $i_{BINARY}(x,y)$ do poço. As imagens $i_{PLAQUE}(x,y)$ das placas individuais são isoladas da imagem $i_{BINARY}(x,y)$ e, caso apresentem algum tipo de sobreposição, são devidamente processadas e separadas. Já na etapa de representação e descrição, o bloco verde recebe como entrada as imagens das placas isoladas no último bloco do estágio de processamento de imagens. Neste estágio, as características geométricas das placas são extraídas e organizadas em uma matriz que,

por sua vez, é salva em um arquivo no formato *CSV (comma-separated values)* intitulado banco de dados. Por fim, o arquivo é utilizado na entrada do estágio de reconhecimento e interpretação. No bloco de treino supervisionado, os parâmetros de um classificador binário são obtidos por meio de uma técnica de aprendizagem supervisionada utilizando tanto o banco de dados quanto conhecimentos providenciados por pesquisadores com experiência no experimento *plaque assay*. Já o bloco de classificação binária recebe tanto os parâmetros treinados quanto o banco de dados. Este utiliza um classificador binário para decidir se uma placa é uma placa viral ou um ruído, permitindo a contagem final das placas.

Figura 6 – Arquitetura proposta do sistema para a automação da contagem de placas de Zika vírus do experimento *plaque assay*. Blocos azuis e verdes representam etapas de processamento de imagem enquanto os blocos vermelhos de inteligência artificial.



Fonte: Autoria própria.

3.2 Processamento de imagens

3.2.1 Aquisição das imagens dos poços.

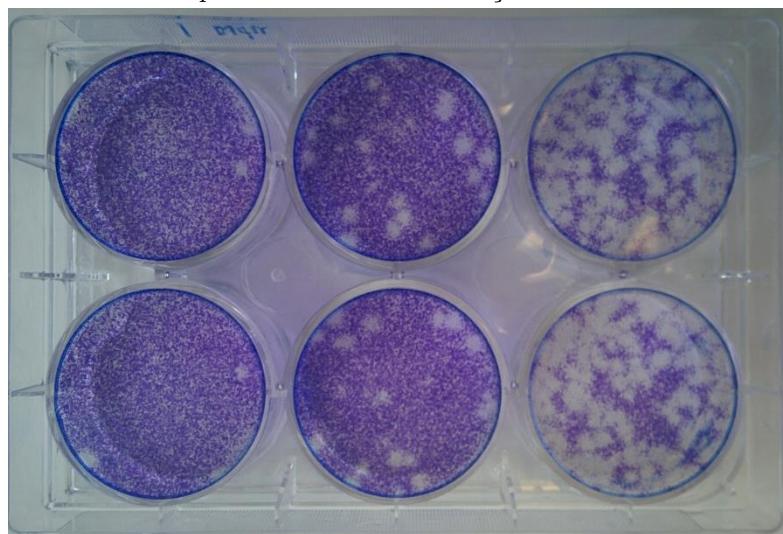
As imagens das amostras utilizadas neste trabalho foram obtidas de um experimento de *plaque assay* presente no relatório da aluna Luiza Zuvanov (ZUVANOV, 2016). Este, por sua vez, foi escrito durante sua participação na realização do projeto intitulado *Zika Virus and Cells Interactions*, realizado pelo grupo do Dr. Alain Kohl no *Centre for Virus Research*, vinculado a Universidade de Glasgow.

Para a obtenção das amostras de placas virais em monocamada celular, foram utilizadas células *A549/BVDV-Npro* (DONALD et al, 2016) previamente crescidas em meio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) acrescido com 10% de soro fetal bovino (FCS). A cepa viral brasileira Zika vírus PE243 (DONALD et al, 2016) foi utilizada para realização do ensaio em placa. O experimento foi conduzido em placa para

cultivo celular contendo 6 poços. Monocamadas de células *A549/BVDV-Npro*, com 2.5×10^5 células por poço, foram infectadas com diluições seriadas da cepa Zika vírus PE243. As células foram incubadas a 37°C contendo DMEM suplementado com 4% FCS e 1.2% *Avicel* a proporção 1:1 por um período de 5 dias após infecção. Seguidamente, as células foram fixadas com adição de 10% de formaldeído e, a posteriori, coradas com 0.1% de azul de toluidina (ZUVANOV, 2016).

A imagem de uma das placas de cultivo celular resultantes pode ser vista na figura 7. Da esquerda para a direita, a quantidade de vírus aplicado nos poços vai aumentando com um fato de 10, ou seja, a placa mais a direita tem 10 vezes mais vírus que a placa imediatamente a sua esquerda. É possível notar então que existe uma relação direta entre a quantida de placas presentes na poço e quantidade de virus aplicada.

Figura 7 – Exemplo do resultado do experimento *plaque assay* realizado em células *A549/BVDV-Npro* 5 dias após a infecção. Em cada poço, 2.5×10^5 células foram infectadas com a cepa Zika vírus PE243, em diluições seriadas de 10^{-7} , 10^{-6} e 10^{-5} , da esquerda para a direita. Poços organizados na mesma coluna representam a mesma diluição de vírus.



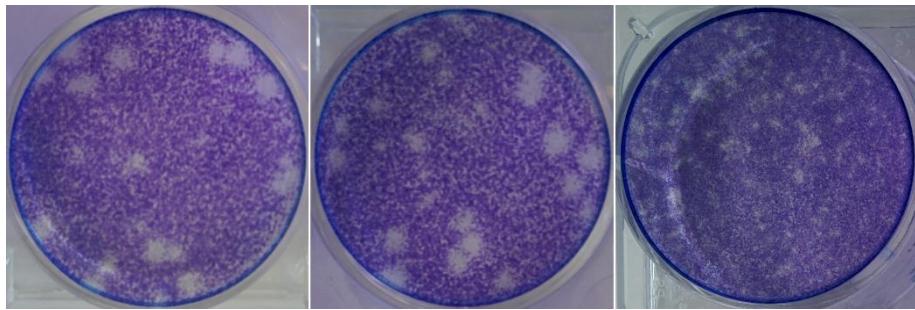
Fonte: ZUVANOV, 2016.

Levando em consideração o fato de que o PFU é normalizado pela quantidade de virus aplicada no poço em que as placas foram contadas, conforme exposto na equação 2.1, é possível afirmar que não há diferença teórica entre estimar seu valor contando as placas presentes em poços com mais ou menos vírus. Portanto, para reduzir erros e aumentar a precisão da estimativa do PFU é recomendado que se escolha os poços em que seja mais fácil a contagem das placas formadas (BAER; KEHN-HALL, 2014). Nesse sentido, três amostras de poços foram isoladas para serem utilizadas neste trabalho e estão presentes na figura 8.

As imagens das amostras foram capturadas com a câmera de 8 megapixels de um celular *Nexus 5* e foram recortadas e salvas no formato padrão *JPG* (*Joint Photographic*

Group) com o tamanho de 850 x 850 pixels, resolução de 72 dpi (dots per inch) e uma profundidade de cor (bit depth) de 24 bits, sendo 8 para cada canal RGB. As imagens estão disponíveis no endereço eletrônico presente no apêndice A.

Figura 8 –Três amostras do experimento *plaque assay* realizado em células *A549/BVDV-Npro* 5 dias após a infecção. Em cada poço, 2.5×10^5 células foram infectadas com a cepa Zika vírus PE243, em diluições de 10^{-6} , 10^{-6} e 10^{-7} , da esquerda para a direita. Os poços foram utilizados para o desenvolvimento do sistema.



Fonte: ZUVANOV, 2016.

3.2.2 Segmentação

Devido a utilização de métodos derivativos de primeira e segunda ordem, os métodos de segmentação por descontinuidade são muito sensíveis a ruído. Como os poços apresentam regiões em que as células se desprenderam do seu fundo, as suas imagens apresentam regiões ruidosas por toda a sua extensão, tornando assim inviável a utilização deste tipo de segmentação. Portanto, métodos de segmentação por similaridade podem ser mais adequados para este tipo de imagem.

O método de segmentação por similaridade escolhido foi o método estatístico de limiarização global ótima (método de Otsu) devido a sua simplicidade e elevada eficiência. Para que o método possa encontrar o valor limiar ótimo, a imagem deve apresentar um histograma idealmente bimodal. Neste sentido, o fato das imagens dos poços serem coloridas torna-se uma vantagem pois pode-se obter diversas imagens em escala de cinza utilizando diferentes sistemas de cor, bastando escolher aquele que apresentar o histograma bimodal melhor definido. Neste trabalho, foram explorados seis níveis de cinza de cada imagem, três provenientes do sistema de cor RGB e três do sistema HSV. A imagem em escala de cinza escolhida e a imagem binária em preto e branco resultante do processo de segmentação foram denominadas como $i_{GRAY}(x,y)$ e $i_{BINARY}(x,y)$ respectivamente.

3.2.3 Filtragem

Buscando mitigar o problema dos ruídos isolados inerentes do experimento *plaque assay* e prováveis imperfeições geradas durante o processo de segmentação, uma filtragem

não linear com um filtro morfológico foi aplicado a imagens dos poços segmentada $i_{BINARY}(x,y)$. Esta etapa foi realizada para que o processo de abertura elimine os ruídos isolados enquanto o processo de fechamento ajude a corrigir as imperfeições presentes nas bordas das placas. Como estas possuem idealmente um formato circular, um elemento estruturante morfológico no formato de disco se torna a melhor opção para esta aplicação. De forma empírica, seu raio foi definido em seis *pixels*.

3.2.4 Aquisição das imagens das placas.

A penúltima etapa do processamento de imagens consiste no isolamento individual da imagem de cada placa do seu respectivo poço, formando assim as imagens $i_{PLAQUE}(x,y)$. Devidamente segmentada e filtrada, a imagem de um poço $i_{BINARY}(x,y)$ apresenta placas com bordas contínuas e bem definidas, num formato idealmente circular e na cor preta, contrastando, assim, com a camada de células do poço na cor branca. Para a identificação das placas, a imagem $i_{BINARY}(x,y)$ foi varrida de ponta a ponta e, sempre que um pixel preto fosse atingido, um algoritmo seguidor de fronteira foi aplicado. Desse modo, captaram-se os *pixels* ou as coordenadas da fronteira de cada placa dentro em uma matriz M_{mx2} de m linhas por duas colunas, uma para o seu *pixel* no eixo das abscissas e outro no eixo das ordenadas, respectivamente. É importante salientar que o número de linhas m não é único e depende diretamente do tamanho da placa. Em seguida, as matrizes contendo as coordenadas das fronteiras foram deslocados para a origem por meio da subtração do valor mínimo de cada coluna em suas respectivas linhas, conforme algoritmo 3.

Algoritmo 3: Normalização do código de fronteira

1. $xMin \leftarrow$ mínimo das abscissas de M_{mx2}
 2. $yMin \leftarrow$ mínimo das ordenadas de M_{mx2}
 3. Para todo i variando de 1 até 2
 4. Para todo j variando de 1 até m
 5. Se $i = 1$ então $M(j,i) \leftarrow M(j,i) - xMin$
 6. Se $i = 2$ então $M(j,i) \leftarrow M(j,i) - yMin$
 7. Fim
 8. Fim
-

Por fim, a imagem de cada placa foi reconstruída de acordo com a lógica presente no algoritmo 4. Se o pixel estiver dentro ou na borda do polígono formado pelo código de fronteira presente na matriz M_{mx2} , ele recebe o valor de zero, representando a cor preta. Caso contrário, recebe o valor de um, formando-se, por fim, a imagem de cada placa

Algoritmo 4: Construção da imagem de uma placa

1. Para todo i variando de 1 até m
 2. Para todo j variando de 1 até m
 3. Se o ponto (i,j) estiver dentro ou na borda do polígono em M_{mx2}
-

```

4.      I_PLAQUE(i,j) <- 0
5.      Senão
6.          I_PLAQUE(i,j) <- 1
7.      Fim
8.  Fim

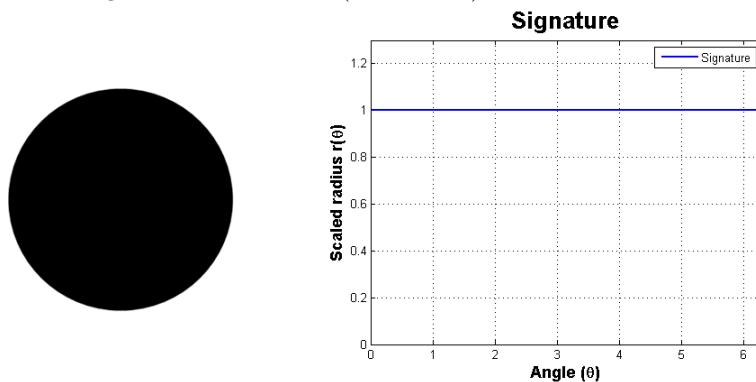
```

3.2.5 Separação de placas sobrepostas

Como observado posteriormente na seção 3.2.1, os vírus tendem a se espalhar pelas células presentes nos poços segundo um padrão predominantemente circular. Caso o centro de formação de uma placa seja próximo de outro, pode acontecer a sobreposição de duas ou mais placas. Esse tipo de situação pode comprometer a contagem, pois placas sobrepostas podem ser interpretadas como uma única. Isso ocorre porque o algoritmo seguidor de fronteira irá incluir as fronteiras de todas as placas sobrepostas em uma única matriz M_{mx2} .

A assinatura de um objeto de interesse presente em uma imagem é um vetor contendo a distância euclidiana entre cada um dos pontos da fronteira deste objeto com o seu centro de massa. Se um objeto apresentar um formato geométrico perfeitamente circular, sua assinatura será constante, pois a distância entre qualquer ponto da fronteira e o seu centro de massa será igual ao seu raio. A figura 10 ilustra esta situação.

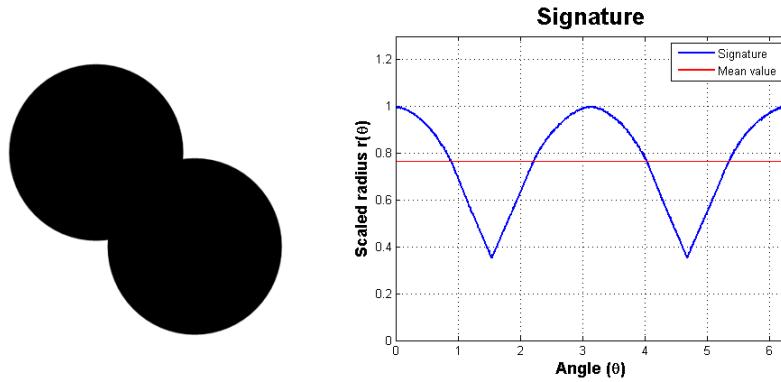
Figura 9 - Assinatura (curva azul) de um círculo.



Fonte: Autoria própria.

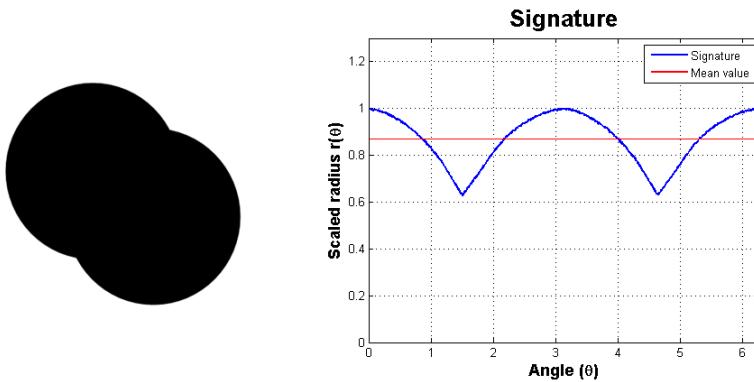
Caso um objeto seja composto pela superposição de dois círculos, nota-se a formação de dois vales em sua assinatura. Além disso, quanto mais distantes forem os seus centros, mais acentuados serão estes vales. Ambas as situações estão ilustradas nas figuras 11 e 12. Observa-se este fato mesmo em situações em que os círculos sobrepostos apresentam raios de diferentes tamanhos, como ilustrado na figura 13.

Figura 10 - Assinatura (curva azul) de dois círculos sobrepostos com centros distantes.



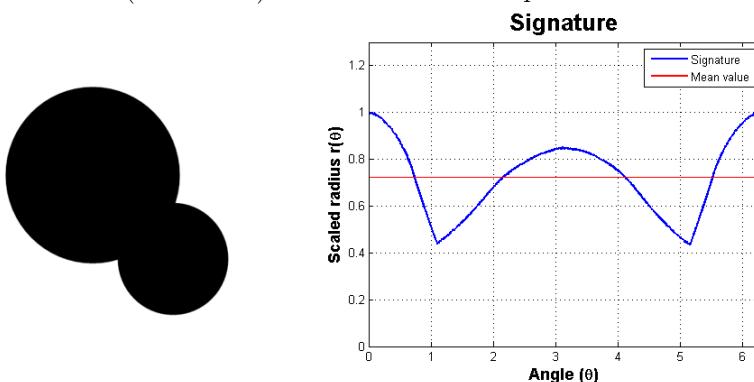
Fonte: Autoria própria.

Figura 11 - Assinatura (curva azul) de dois círculos sobrepostos com centros próximos.



Fonte: Autoria própria.

Figura 12 - Assinatura (curva azul) de dois círculos sobrepostos de tamanhos diferentes.

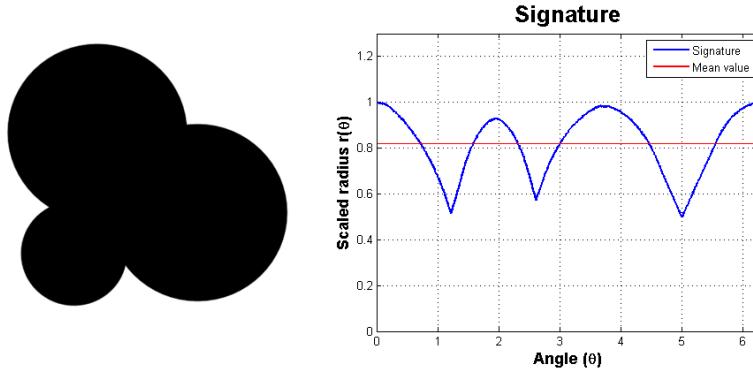


Fonte: Autoria própria.

Este comportamento se propaga para situações em que há a superposição de três ou mais círculos, desde que cada um se sobreponha a todos os outros. Para exemplificar esta situação, considere o exemplo da sobreposição de três círculos. No caso em que os três se sobrepõem como na figura 14, observamos a presença de três vales em sua assinatura, chama-se esse caso de sobreposição total. Já no caso em que um dos dois círculos sobrepõem apenas um, como o exemplo presente na figura 15, ainda observamos

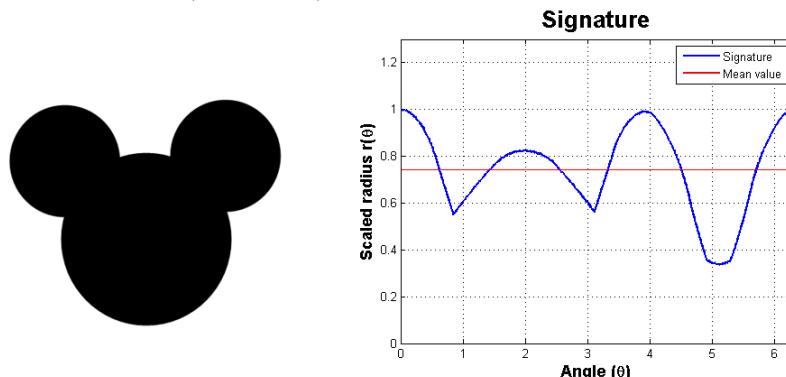
a presença de três vales. Contudo, um deles não representa um ponto de cruzamento de fronteiras de placas, invalidando assim a generalização proposta. Chama-se esse último tipo de sobreposição parcial.

Figura 13 - Assinatura (curva azul) de três círculos sobrepostos de maneira total.



Fonte: Autoria própria.

Figura 14 - Assinatura (curva azul) de três círculos sobrepostos de maneira parcial.



Fonte: Autoria própria.

Portanto, este trabalho propõe um método para a separação de um número qualquer de placas sobrepostas para o caso em que há a sobreposição total, presente no algoritmo 5. De maneira recursiva, o algoritmo desenha uma linha branca entre os dois *pixels* mais próximos do centro de massa do objeto.

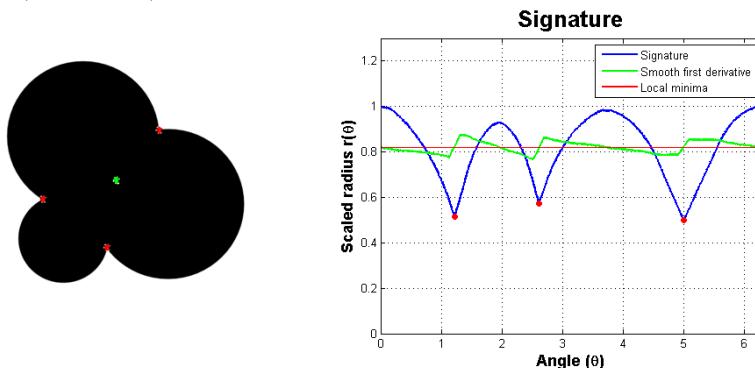
Algoritmo 5: Separação de placas sobrepostas com sobreposição total

1. $s[] \leftarrow$ assinatura de $i_{PLAQUE}(x, y)$
 2. $\partial s'[] \leftarrow$ derivada da média móvel de $s[]$
 3. $\min[] \leftarrow$ cruzamento por zero de $\partial s'$ de 'baixo para cima'
 4. Se o tamanho de $\min[] \geq 2$
 5. $\minA \leftarrow$ mínimo valor de $\min[]$
 6. $\minB \leftarrow$ mínimo valor de $\min[]$ diferente de \minA
 7. Desenhar linha branca em $i_{PLAQUE}(x, y)$ entre os pontos \minA e \minB
 8. $i_{PLAQUE}(x, y) \leftarrow$ parte separada de $i_{PLAQUE}(x, y)$ de maior área
 9. Pule para o passo 1
 4. Senão
 10. Fim
-

Em suma, o algoritmo calcula e insere a assinatura do objeto no vetor s . Calculase então a sua assinatura suavizada s' por meio de uma média móvel, suavizando os ruídos presentes na fronteira das placas reais. Em seguida, toma a primeira derivada de s' para encontrar os pontos de máximo e mínimo locais da sua assinatura, estes representam os *pixels* mais distantes e mais próximos do centro de massa do objeto. Para diferenciar os pontos de mínimo dos de máximo, o algoritmo avalia se o cruzamento por zero de $\partial s'$ ocorre ‘de baixo para cima’ ou ‘de cima para baixo’. Caso existam pelo menos dois pontos de mínimo, o algoritmo toma os índices dos dois pontos de menor valor dentre o conjunto de pontos de mínimo elegíveis e desenha uma linha branca entre eles, separando as placas. Por fim, repete-se o algoritmo utilizando o pedaço da placa cortada com a área de maior valor. O algoritmo para quando houver menos que dois pontos de mínimo.

Para ilustrar o seu funcionamento, aplicou-se a imagem da figura 14, a parte do algoritmo proposto que identifica os pontos de mínimo locais do objeto. O resultado pode ser visto na figura 16. No gráfico da assinatura representado pela curva azul, foi adicionado a curva verde que é a sua derivada da média móvel, a qual foi ampliada e deslocada em torno da média da assinatura (curva vermelha) para facilitar sua visualização. Nota-se que, toda vez que a curva verde cruza a curva vermelha de ‘baixo para cima’, um ponto vermelho foi marcado na curva azul. Estes pontos são os pontos de mínimo da curva da assinatura. Nota-se também que o número de pontos de mínimos é o mesmo número de placas sobrepostas. Para facilitar a interpretação do gráfico, os pontos foram marcados na própria figura das placas sobrepostas. Observa-se que eles estão exatamente nos pontos de intersecção das fronteiras dos círculos sobrepostos, exatamente nos pontos aonde a linha branca deve ser desenhada.

Figura 15 - Pontos de mínimo (pontos vermelhos) da assinatura (curva azul) de três círculos sobrepostos de maneira completa. A curva e o ponto verde representam a derivada da média móvel da assinatura (curva azul) e o centro de massa da imagem, respectivamente.



Fonte: Autoria própria.

3.3 Representação e descrição

O estágio de processamento de imagens selecionou e filtrou as imagens dos poços, permitindo assim que as imagens individuais das placas pudessem ser isoladas. Contudo, existe a possibilidade de a área da região formada pelo desprendimento das células do fundo dos poços ser maior que a área do elemento estruturante utilizada pelo filtro morfológico no processo de filtragem. Neste caso, a imagem individual deste ruído será isolada como se fosse uma placa viral legítima e, consequentemente, a contagem poderá ser prejudicada. Para mitigar este problema, o sistema proposto refinará a contagem das placas resultante exclusivamente do estágio de processamento de imagens por meio de técnicas de inteligência artificial baseadas no formato geométrico das placas no estágio de reconhecimento e interpretação.

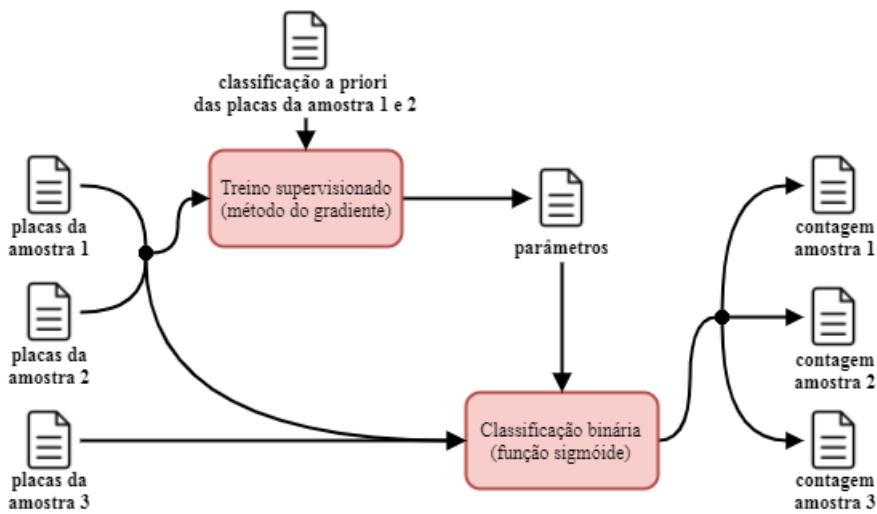
Para tanto, o estágio de representação e descrição é a etapa responsável por extrair as características geométricas de cada $iPLAQUE(x,y)$, sendo ela uma placa viral ou não. Utilizando funções das bibliotecas de processamento de imagens do software utilizado no desenvolvimento do projeto, foram extraídas três características geométricas das imagens individuais das placas: área, excentricidade e presença ou não do centro de massa dentro das bordas da figura. Estes três parâmetros foram escolhidos pelas seguintes razões: como as placas tendem a apresentar um formato geométrico de padrão circular, espera-se que elas apresentem seus respectivos centros de massa dentro dos limites das suas fronteiras e que apresentem uma excentricidade próxima de um. Além disso, espera-se também que uma placa viral possua um valor de área maior que o valor de um ruído. Por fim, os três parâmetros foram organizados em um vetor x , de três dimensões, e estes em uma matriz de características $X_{m \times 3}$, com m linhas (número total de placas isoladas) e 3 colunas, uma para cada característica extraída, conforme equação 3.1.

$$\mathbf{X} = \begin{bmatrix} x_1 \\ \vdots \\ x_m \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} x_1^1 & \cdots & x_1^3 \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ x_m^1 & \cdots & x_m^3 \end{bmatrix} \quad (3.1)$$

3.4 Reconhecimento e interpretação

O último estágio da arquitetura consiste no refinamento da contagem realizada pelo estágio de processamento de imagens por meio de técnicas de inteligência artificial. A ideia geral desta etapa é utilizar um classificador binário que receba como entrada os dados geométricos de uma placa e retorne em sua saída a sua classificação como placa viral ou ruído. Para que o classificador seja capaz de realizar tal classificação, o mesmo deve ter seus parâmetros ajustados através de uma técnica de treino supervisionado. A figura 16 apresentam as etapas realizadas neste processo.

Figura 16 - Estágio de interpretação e descrição. A classificação das placas por pesquisadores e as amostras 1 e 2 serão utilizadas para obter os parâmetros do classificador binário. Este, por sua vez contará o número de placas em cada amostra.



Fonte: Autoria própria.

Em suma, as amostras 1 e 2, em conjunto com o conhecimento a priori sobre a classificação de suas placas em placa viral ou ruído, são utilizadas no treino supervisionado para treinar os parâmetros do classificador binário por meio de um algoritmo de otimização chamado método de gradiente. Um vez treinado, o classificador binário, que utiliza uma função sigmoide, recebe os dados geométricas de cada uma das placas de cada amostra e as classifica como placa viral ou ruído, permitindo assim gerar de maneira automática a contagem final das placas virais do experimento *plaque assay*. É importante ressaltar que a amostra 3 foi propositalmente excluída do treino supervisionado justamente para que a qualidade da classificação possa ser avaliada.

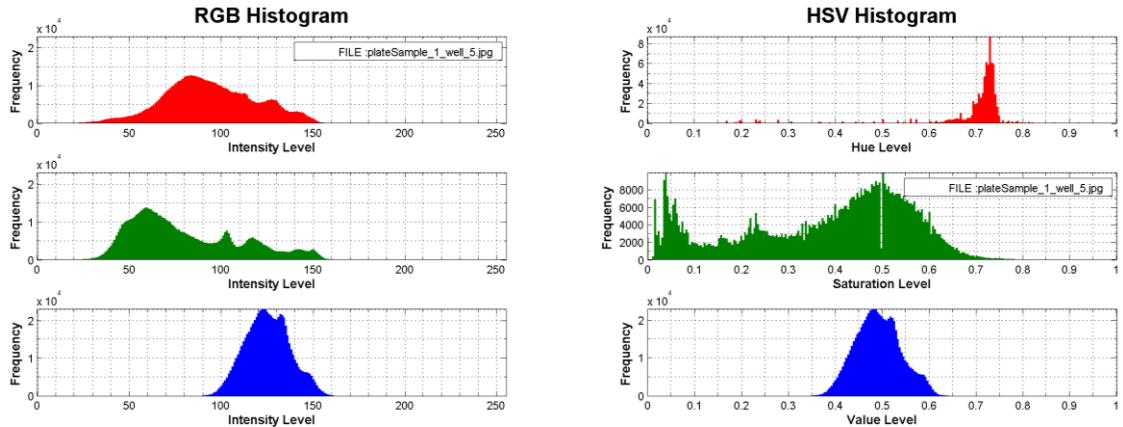
O conhecimento a priori sobre a classificação das placas foi obtido por meio do auxílio de quatro pesquisadores do instituto de biologia da universidade de Brasília. Com experiência na realização do experimento *plaque assay*, cada pesquisador forneceu não só, a classificação de cada placa da amostra 1 e 2, mas também o número de placas virais presentes em cada uma das três amostras. Por fim, a contagem final do sistema automático foi comparada com a contagem do estágio de processamento de imagens e com o valor médio da contagem fornecida pelos pesquisadores.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Processamento de imagens

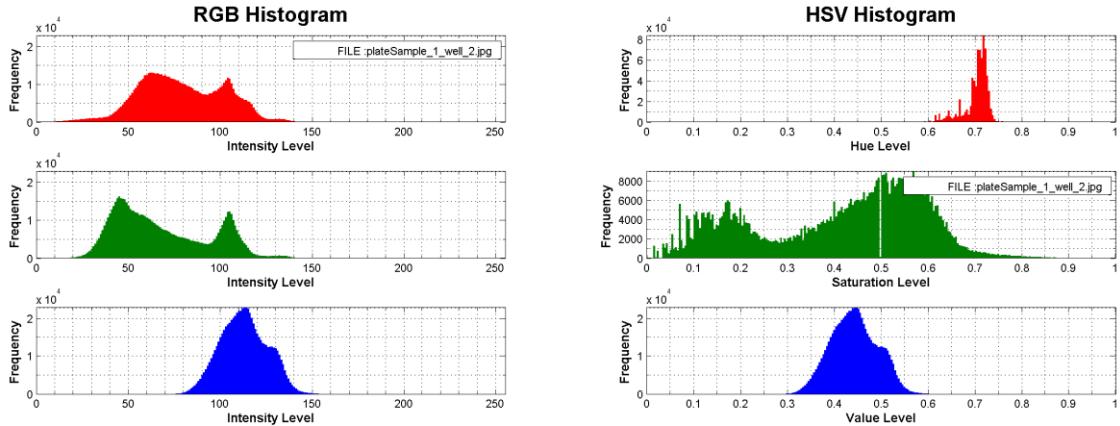
A primeira etapa do processamento de imagens é o bloco de aquisição de imagens dos poços. Para que a melhor imagem em escala de cinza fosse escolhida, os histogramas do sistema de cor RGB e HSV de todas as amostras foram obtidos. As figuras 17 e 18 apresentam os histogramas mencionados para as amostras 1 e 2.

Figura 17 – Amostra 1: histogramas no sistema de cor RGB e HSV.



Fonte: Autoria própria.

Figura 18 – Amostra 2: histogramas no sistema de cor RGB e HSV.



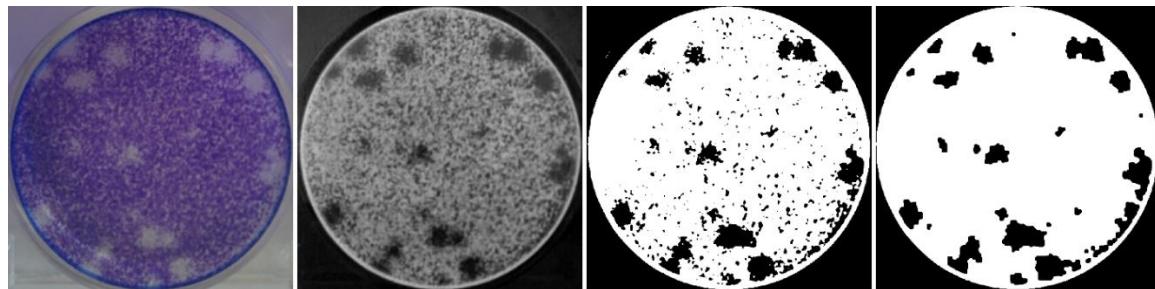
Fonte: Autoria própria.

Uma possível explicação para o pico presente no canal azul do histograma RGB é devido ao fato de que o corante utilizado no experimento ser o azul de toluidina. Este fato é evidenciado pela concentração em torno do valor de 0.7 do matiz do histograma HSV. Observa-se que o valor do brilho no histograma HSV apresenta um comportamento

semelhante e esperado pois as placas não apresentam variações relevantes em seus respectivos brilhos. Observa-se também, que os histogramas do canal vermelho e verde apresentam comportamento semelhantes, ambos colaboram com a formação da cor roxa, com picos em torno de 50, e com a cor cinza do fundo, com picos em torno de 100. Por fim, observa-se claramente que os histogramas do canal verde do RGB e de saturação do HSV apresentam os histogramas mais próximos de histogramas bimodais, tornando-os as melhores opções para escolha da imagem em escala de cinza. Por uma questão de performance, foi escolhido a imagem em escala de cinza do histograma da saturação do HSV para ser utilizada como $iGRAY(x,y)$.

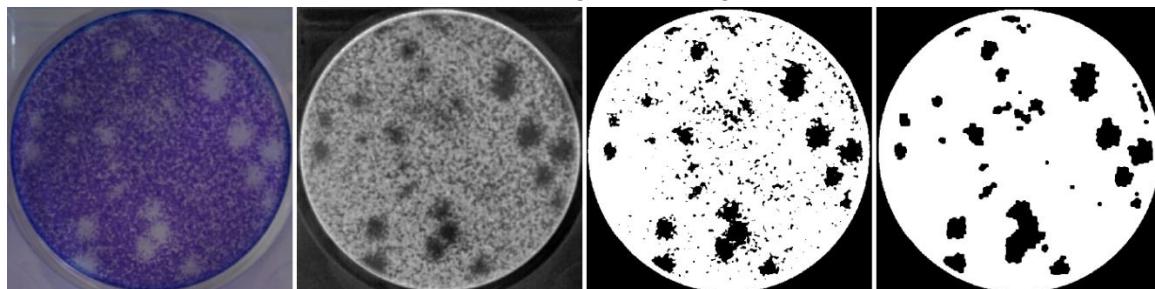
As figuras 19 e 20 apresentam os resultados dos blocos de aquisição da imagem do poço, segmentação e filtragem, nas quais foram obtidas as imagens $i(x,y)$, $iGRAY(x,y)$ e $iBINARY(x,y)$ antes e depois da filtragem para cada um dos poços.

Figura 19 – Amostra 1. Da esquerda para a direita temos $i(x,y)$, $iGRAY(x,y)$, $iBINARY(x,y)$ antes e depois do filtragem morfológica.



Fonte: Autoria própria.

Figura 20 - Amostra 2. Da esquerda para a direita temos $i(x,y)$, $iGRAY(x,y)$, $iBINARY(x,y)$ antes e depois do filtragem morfológica.



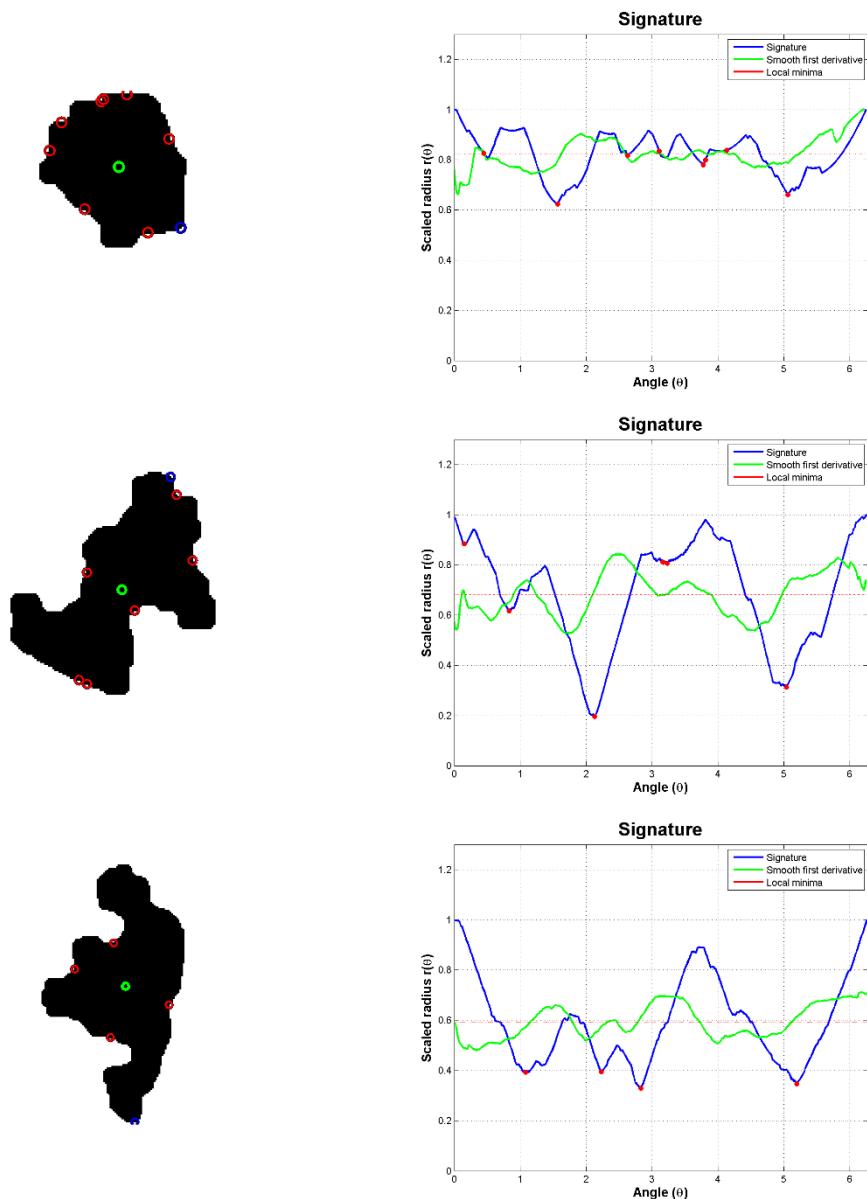
Fonte: Autoria própria.

Observa-se que filtro morfológico foi capaz de filtrar grande parte do ruído causado pelo desprendimento das células do fundo dos poços. Contudo, nota-se também a formação de placas de ruídos devido a área de determinados aglomerados de células desprendidas serem maiores que a área do elemento estruturante utilizado pelo filtro. Por fim, nota-se também sobreposição de placas duplas e triplas de maneira parcial.

No bloco de aquisição da imagem das placas, as imagens individuais das placas $iPLAQUE(x,y)$ foram isoladas das imagens dos seus respectivos poços. Estas foram então

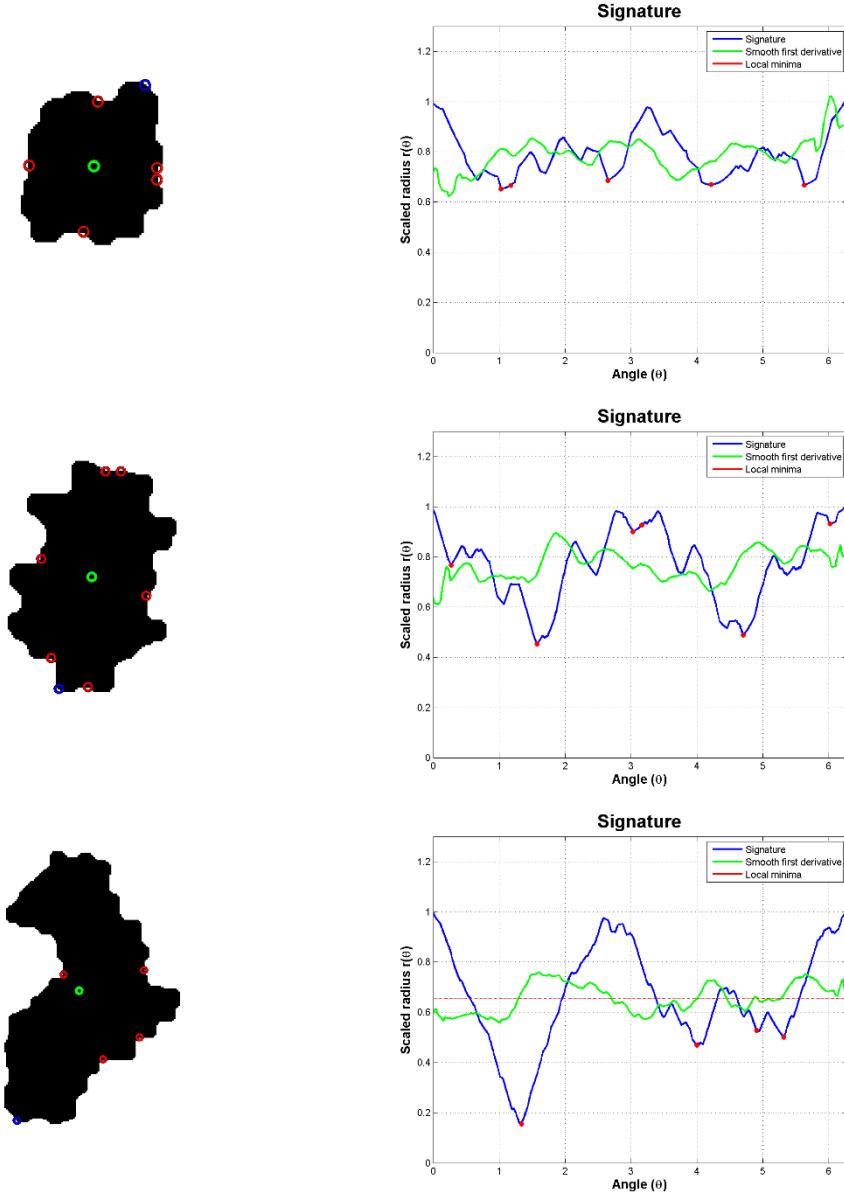
submetidas ao algoritmo separador de placas sobrepostas proposto no algoritmo 5. As figuras 22 e 23 apresentam exemplos de placas simples, dupla e triplas para a amostra 1 e 2, independe destas serem placas virais ou ruídos. É possível observar que o comportamento da assinatura para um caso real varia muito mais do que as assinaturas apresentadas no capítulo anterior. Este fato justifica a utilização da média móvel para suavização da mesma, pois se não fosse utilizada, a curva da derivada poderia oscilar a tal ponto que os pontos de mínimo seriam erroneamente obtidos.

Figura 21 – Amostra 1: placas simples, duplas e triplas. A curva azul representa a assinatura da placa, a curva verde sua derivada, o ponto verde seu centro de massa e os pontos vermelhos seus mínimos locais



Fonte: Autoria própria.

Figura 22 – Amostra 2: placas simples, duplas e triplas. A curva azul representa a assinatura da placa, a curva verde sua derivada, o ponto verde seu centro de massa e os pontos vermelhos seus mínimos locais

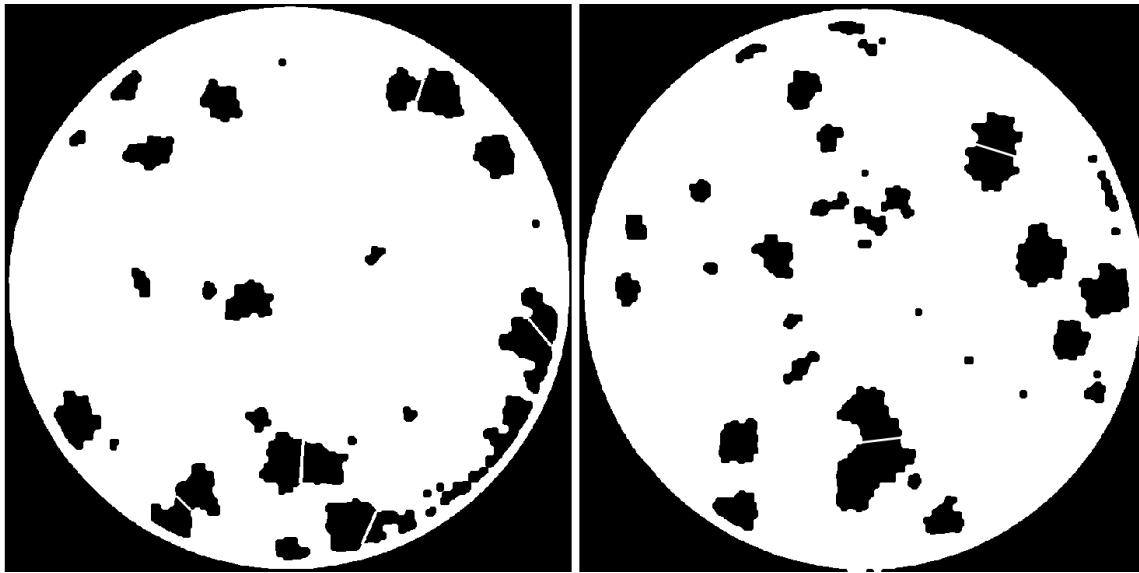


Fonte: Autoria própria.

Como esperado, as placas simples apresentam um comportamento mais uniforme enquanto as placas duplas apresentam dois vales bem definidos. Além disso, todas as placas triplas apresentaram sobreposição parcial, portanto um dos pontos de mínimo identificados não será um ponto de interseção de fronteiras e, consequentemente, o algoritmo de separação não conseguirá separar estas placas em outras três placas distintas. Para ilustrar o resultado final desta etapa, o algoritmo de separação foi aplicado também nas imagens binárias dos poços `iBINARY(x,y)` da amostra 1 e da amostra 2, enfatizando assim a sua boa performance na separação das placas duplas e a falha

parcial na separação das placas triplas com sobreposição parcial, conforme figura 24. A tabela 2 apresenta a contagem final das placas resultante desta etapa.

Figura 23 – Amostra 1 e 2: separação parcial de placas sobrepostas.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 2 - Contagem final de placas na etapa de processamento de imagens.

Amostra	Total de placas
1	31
2	37
3	59

4.2 Representação e descrição

Nesta etapa, foram extraídas as seguintes características geométricas de cada uma das $iPLAQUE(x,y)$: área, excentricidade e presença ou não do centro de massa dentro da placa, formando assim os vetores de características x de cada placa. Os resultados foram compilados e armazenados em duas matrizes de características, uma contendo os vetores de características da amostra 3 e a outra não. Essa segunda foi utilizada no bloco de treinamento supervisionado, enquanto a primeira foi aplicada no classificado binário.

4.3 Reconhecimento e interpretação

A tabela 3 apresenta a contagem das placas de cada amostra realizada pelos pesquisadores colaboradores. Nota-se que há um desvio padrão médio de aproximadamente 3 placas.

Tabela 3 - Contagem das placas de Zika vírus das três amostras por pesquisadores com experiência no experimento *plaque assay*.

Amostra	1	2	3	4	Média	Desvio Padrão
1	16	19	19	22	19	2.5
2	26	22	26	23	24	2.1
3	36	30	28	33	32	3.5

Já a tabela 4 apresenta uma comparação entre o valor médio da contagem feira pelos pesquisadores e a contagem realizada exclusivamente pelo estágio de processamento de imagens. Com um erro médio relativo de 67,23%, é evidente afirmar que só a etapa de processamento de imagens não é o suficiente, portanto, sua contagem deve ser refinada.

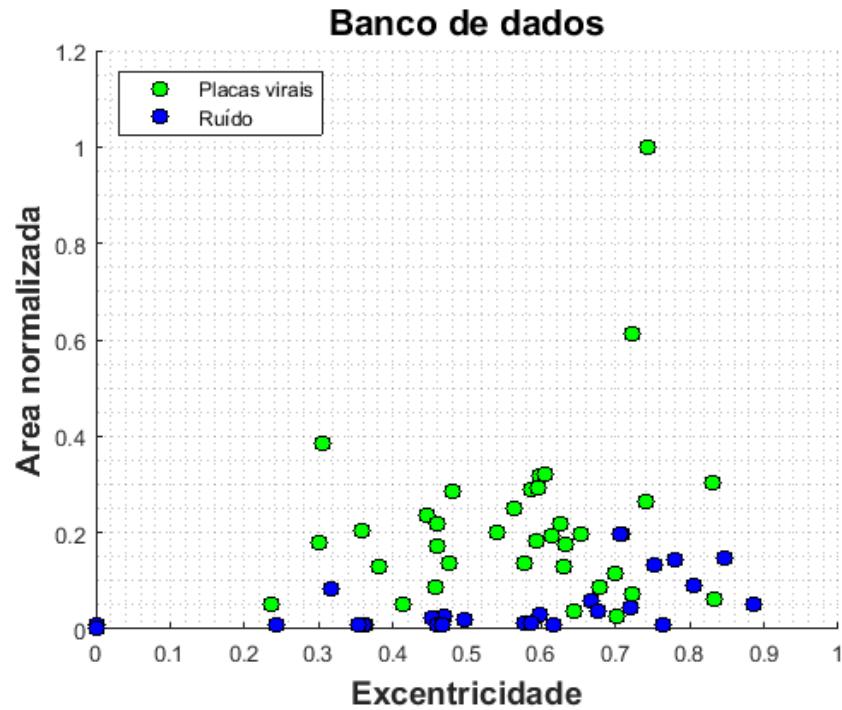
Tabela 4 - Comparação entre a contagem do estágio de processamento de imagens e da contagem realizadas por pesquisadores com experiência no experimento *plaque assay*.

Amostra	Contagem por pesquisadores	Contagem por processamento de imagem	Error Relativo
1	19	31	63,15%
2	24	37	54,16%
3	32	59	84,38%

Para realizar tal refinamento, aplicou-se o último estágio do sistema proposto, o de reconhecimento e interpretação. A figura 25 apresenta os dados geométricos das placas das amostras 1 e 2 separados em dois grupos pelos pesquisadores: o grupo de placas virais (pontos verdes) e o grupo de ruídos (pontos azuis). Nota-se que as placas classificadas como ruído apresentam, em geral, um menor valor de área que as placas classificadas como placas virais. A figura 27 apresenta a fronteira de decisão obtida através do método do gradiente. Todas as placas abaixo da linha pontilhada foram classificadas como ruídos e todas acima, como placas virais. O treino atingiu uma taxa de acerto de aproximadamente 82,13%.

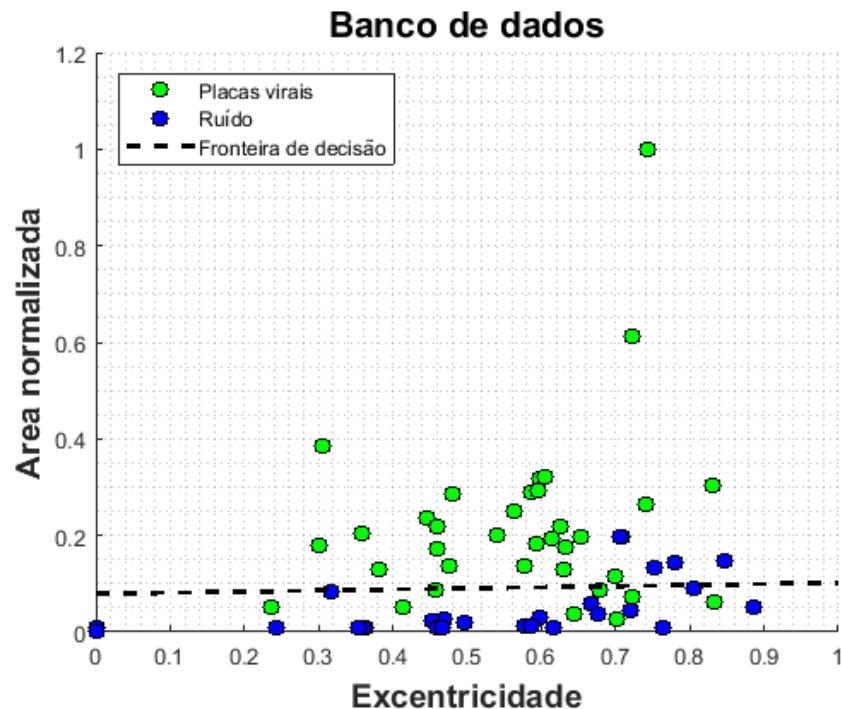
Por fim, os parâmetros refinados foram inseridos no classificador binário e este gerou a contagem presente na tabela 5. A contagem apresentou um erro médio de apenas 5,22% em relação a contagem realizada pelos pesquisadores, melhorando em 92,23% a contagem realizada pela etapa do processamento de imagens, conforme tabela 6.

Figura 24 - Área e excentricidade das placas das amostras 1 e 2 classificadas como placas virais (pontos verdes) ou ruído (pontos azuis) de acordo com pesquisadores com experiência no experimento *plaque assay*.



Fonte: Autoria própria.

Figura 25 – Fronteira de decisão obtida por meio do método do gradiente. Placas com um conjunto de características geométricas acima da fronteira serão classificadas como placas virais. Taxa de acerto de 82,12%.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 5 - Comparação entre a contagem do estágio de reconhecimento e interpretação e da contagem realizadas por pesquisadores com experiência no experimento *plaque assay*.

Amostra	Contagem por pesquisadores	Contagem por inteligência artificial	Error Relativo
1	19	18	5,26%
2	24	23	4,17%
3	32	34	6,25%

Tabela 6 - Comparação entre o erro médio da contagem do estágio de processamento de imagens e do erro médio da contagem do estágio de reconhecimento e interpretação.

Erro médio da contagem por processamento de imagem	Erro médio da contagem por inteligência artificial	Diferença entre os erros médios
67,23	5,22	92,23%

5 CONCLUSÃO

O objetivo do trabalho foi o desenvolvimento de um sistema de contagem automática de placas de Zika vírus, provenientes do experimento *plaque assay*, que utiliza técnicas de processamento de imagens e inteligência artificial para diminuir erros na coleta dos resultados, aumentando assim a eficiência da titulação viral. O problema se resumiu na dificuldade da contagem final das placas pelo olho humano devido a sobreposição aleatória das placas e o ruído causado pelo desprendimento das células do fundo da placa, podendo apresentar diferenças de até 44% na contagem de um mesmo experimento por diferentes pesquisadores. Buscando mitigar os erros na contagem e aumentar a eficiência da titulação viral, foi proposto um sistema para a automação da contagem das placas de Zika vírus resultantes do experimento *plaque assay* utilizando visão computacional.

A arquitetura do sistema foi composta por três estágios distintos: processamento de imagens; representação e descrição; reconhecimento e interpretação. Na primeira etapa, as imagens de 3 poços foram selecionadas, segmentadas e filtradas. Posteriormente a imagem individual de cada placa foi isolada da imagem dos seus respectivos poços e eventualmente separadas no caso de sobreposição de placas. O algoritmo de separação de placas conseguiu separar todas as placas duplas mas falhou parcialmente na separação das placas tripas pois estas apresentaram sobreposição parcial de placas. O filtro morfológico utilizado na etapa de filtragem conseguiu remover uma grande quantidade de ruído das placas, contudo o número de placas contadas apresentou um erro médio relativo de 67,23% em relação a contagem realizada por quatro especialistas na área, ou seja, o número total de placas isoladas foi composto tanto por placas virais quanto por ruídos. No segundo estágio, as seguintes características geométricas das placas foram coletadas: área, excentricidade e presença ou não do centro de massa dentro da fronteira da placa. Por fim, o último estágio utilizou técnicas de treino supervisionado para treinar os parâmetros de um classificador binário de placas. Este classificador apresentou uma contagem de placas com um erro médio relativo de apenas 5,22%, apresentando uma melhora de 92,23% em relação a contagem anterior.

Concluiu-se que o sistema proposto contou automaticamente as placas de Zika vírus das 3 amostras do experimento *plaque assay* com qualidade semelhante àquelas feitas por pesquisadores experientes, apresentando um erro de aproximadamente 5%.

O sistema apresentado neste trabalho extrapolou as fronteiras do ambiente acadêmico. Desenvolvida em conjunto com Luíza Zuvanov, colaboradora deste projeto, a ideia foi aprovada em um programa de empreendedorismo e pré-aceleração de startups chamado *Academic Working Capital* (AWC, 2017). O programa, fruto da parceria do instituto de inovação da TIM e do Núcleo de Empreendedorismo da USP de São Paulo, busca transformar os trabalhos de conclusão de curso em produtos prontos para serem

lançados no mercado. Neste sentido, o autor deste trabalho, em parceria com sua colaboradora, vem trabalhando desde abril de 2017 para alcançar o objetivo proposto pelo programa. Em agosto do mesmo ano, a equipe foi contatada por uma empresa de *venture capital* para apresentar o projeto. Em setembro de 2017 a ideia foi vencedora de um *hackathon* promovido pelo IME-USP com o seguinte tema: utilizando a tecnologia para melhorar a produção científica (EESC, 2017). Já em dezembro de 2017 o projeto, sob o nome de *beThink*, será apresentado em uma feira de investimentos para potenciais investidores (AWC, 2017).

REFERÊNCIAS

- ARFKEN, G. AND WEBER, H. (2011). *Mathematical methods for physicists*. Amsterdam. Elsevier Acad. Press.
- AWC. (2017) - *CONFIRA OS PROJETOS SELECIONADOS PARA AWC 2017*. Disponível em: <<https://awc.institutotim.org.br/selecionados-2017/>>. Acesso em: 01 nov. 2017.
- AWC. (2017) – *FEIRA DE INVESTIMENTOS 2017*. Disponível em: <<https://awc.institutotim.org.br/feira-de-investimentos/>>. Acesso em: 19 nov. 2017.
- BAER, A.; KEHN-HALL, K. (2014). Viral Concentration Determination Through Plaque Assays: Using Traditional and Novel Overlay Systems. *Journal of Visualized Experiments*, (93).
- BAE, H. et al. (2003). Detection of yellow fever virus: a comparison of quantitative real-time PCR and plaque assay. *Journal of Virological Methods*, 110(2), pp.185-191.
- CDC. (2017). *Zika Symptoms*. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/zika/symptoms/symptoms.html>>. Acesso em: 1 nov. 2017.
- CHENG, H.; JIANG, X., SUN, Y.; WANG, J. (2001). Color image segmentation: advances and prospects. *Pattern Recognition*, 34(12), pp.2259-2281.
- Congresso Brasileiro de Virologia. (2017). *Resumos*. Disponível em: <http://consulteventos.com.br/virologia/?page_id=11704>. Acesso em: 1 nov. 2017.
- DICK, G.; KITCHEN, S.; HADDOW, A. (1952). Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 46(5), pp.509-520.
- DONALD, C. et al. (2017). Full Genome Sequence and sfRNA Interferon Antagonist Activity of Zika Virus from Recife, Brazil. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005048#references>>. Acesso em: 1 nov. 2017.
- DUFFY, M. et al. (2009). Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *New England Journal of Medicine*, 360(24), pp.2536-2543.
- DULBECCO, R.; VOGT, M. (1953). Some Problems of Animal Virology As Studied By the Plaque Technique. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 18(0), pp.273-279.
- EESC. (2017) - *PROJETO DE ALUNO DA EESC CONQUISTA O PRIMEIRO LUGAR NO "HACKATHONUSP 2017"*. Disponível em: <http://www.eesc.usp.br/portaleesc/index.php?option=com_content&view=article&id=3972&catid=2&Itemid=164>. Acesso em: 19 nov. 2017.
- GONZALEZ, R.; WOODS, R. (2010). *Processamento Digital de Imagens*. 3 ed. São Paulo: Pearson.

- GONZALEZ, R.; WOODS, R. (2002). *Processamento Digital de Imagens*. 2 ed. São Paulo: Pearson.
- NOBELPRIZE.ORG. (2017). *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1975*. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1975/>. Acesso em: 1 nov. 2017.
- OEHLER, E. et al. (2014). Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report, French Polynesia, December 2013. *Eurosurveillance*, 19(9).
- OTSU, N. (1979). A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, 9(1), pp.62-66.
- RETIEF, F.; CILLIERS, L. (1998). The epidemic of Athens, 430 - 426 BC. *South African Medical Journal*, 88(1).
- SANKUR, B.; MEHMET, S. (2004). Survey over image thresholding techniques and quantitative performance evaluation. *Journal of Electronic Imaging*, 13(1), p.146.
- SCHULER-FACCINI, L. et al. (2016). Possible Association between Zika Virus Infection and Microcephaly — Brazil, 2015. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 65(3), pp.1-4.
- SIMPSON, D. (1964). Zika virus infection in man. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 58(4), pp.339-348.
- SMITHBURN, K. (1952). Neutralizing Antibodies against Certain Recently Isolated Viruses in the Sera of Human Beings Residing in East Africa. *The journal of immunology*, 69(2).
- SUZUKI, S.; ABE, K. (1985). Topological structural analysis of digitized binary images by border following. *Computer Vision, Graphics, and Image Processing*, 29(3), p.396.
- VON SEGGERN, D. (2007). *CRC standard curves and surfaces with Mathematica*. Boca Raton (Florida): Chapman & Hall.
- WHO (2016). *Situation Report Zika Virus Microcephaly Guillain-Barré Syndrome*. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250049/1/zikasitrep8Sep16-eng.pdf?ua=1>>. Acesso em: 1 nov. 2017.
- WHO (2017). *One year into the Zika outbreak: how an obscure disease became a global health emergency*. Disponível em: <<http://www.who.int/emergencies/zika-virus/articles/one-year-outbreak/en/index2.html>>. Acesso em: 1 nov. 2017.
- WHO (2017). *The History of Zika*. Disponível em: <<http://www.who.int/emergencies/zika-virus/history/en/>>. Acesso em: 1 nov. 2017.
- WHO (2017). *Zika virus and potential complications*. Disponível em <<http://www.who.int/features/qa/zika/en/>>. Acesso em: 1 nov. 2017.
- WHO (2017). *Zika virus disease*. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/disease/zika/en/>>. Acesso em: 1 nov. 2017.

- WHO (2017). *Situation Report Zika Virus Microcephaly Guillain-Barré Syndrome*. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254714/1/zikasitrep10Mar17-eng.pdf?ua=1>>. Acesso em: 1 nov. 2017.
- ZUVANOV, L. (2016). *Zika Virus and Cell Interactions*. Glasgow: University of Glasgow, p.5.

APÊNDICE A – CÓDIGO FONTE E IMAGENS

Os códigos fonte dos algoritmos desenvolvidos neste trabalho estão presente em um repositório público para livre acesso no seguinte endereço eletrônico: https://github.com/andreMarcosPerez/SEL0444_finalYearProject.

