



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL**  
**IC – INSTITUTO DE COMPUTAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MODELAGEM COMPUTACIONAL DO**  
**CONHECIMENTO**

**Thiana Tenório Marinho**

**Aspectos Clínicos Laboratoriais e o uso da Modelagem Computacional no**  
**diagnóstico da Leishmaniose Visceral**

**Maceió**  
**2020**

**Thiana Tenório Marinho**

**Aspectos Clínicos Laboratoriais e o uso da Modelagem Computacional no diagnóstico da Leishmaniose Visceral**

Defesa de dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Modelagem Computacional do Conhecimento, PPGMCC, da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Modelagem Computacional do Conhecimento.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Michelle Jacintha Cavalcante Oliveira.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Fabiane da Silva Queiroz.

**Maceió**

**2020**

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

- M338a      Marinho, Thiana Tenório.  
Aspectos clínicos laborais e o uso da modelagem computacional no diagnóstico da leishmaniose visceral / Thiana Tenório Marinho. – 2020.  
49 f. il. : figs. ; tabs. Color
- Orientadora: Michelle Jacintha Cavalcante Oliveira  
Coorientadora: Fabiane da Silva Queiroz.  
Dissertação (Mestrado em Modelagem Computacional do Conhecimento) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Computação. Maceió, 2020.
- Bibliografia: f. 36-43.  
Apêndices: f. 44-48.  
Anexo: f. 49.
1. Leishmaniose visceral. 2. Leishmania. 3. Diagnóstico. 4. Rede neural convolucional. I. Título.
- CDU: 616.993.161: 004.8

**Thiana Tenório Marinho**

**Aspectos Clínicos Laboratoriais e o uso da Modelagem Computacional no diagnóstico da Leishmaniose Visceral**

Defesa de dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Modelagem Computacional do Conhecimento, PPGMCC, da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Modelagem Computacional do Conhecimento.

---

**Professora Dra. Michelle Jacintha Cavalcante Oliveira**

Faculdade de Medicina - UFAL

Orientadora

---

**Professora Dra. Fabiane da Silva Queiroz**

Centro de Ciências Agrárias - UFAL

Coorientadora

---

**Professora Dra. Rosana Quintela Brandão Vilela**

Faculdade de Medicina - UFAL

Examinadora externa

---

**Professora Dra. Cinthya Pereira Leite Costa de Araújo**

Centro Universitário Tiradentes – UNIT-AL

Examinadora externa

## RESUMO

A leishmaniose é causada por parasitas do gênero *Leishmania*. Existem três formas principais de leishmaniose: visceral, também conhecida como Calazar, que é a forma mais grave da doença, cutânea, a mais comum, e mucocutânea. Segundo dados da organização mundial de saúde, estima-se que 700.000 a 1 milhão de novos casos e cerca de 26.000 a 65.000 mortes ocorram anualmente.

Diferentes metodologias podem ser utilizadas para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral (LV). Atualmente, há uma variedade de técnicas, mas nenhuma apresenta 100% de sensibilidade e especificidade. O requisito básico, seguro e determinante (padrão-ouro) no diagnóstico laboratorial da LV é a documentação de formas amastigotas em material obtido da punção de medula óssea. No entanto, os processos de identificação manual são trabalhosos, demorados e propensos a erros humanos. Detecção de *Leishmania* automaticamente é uma tarefa computacional desafiadora. O cenário atual carece de ferramentas de análise de imagens eficientes que auxiliem nessa detecção. Uma nova maneira potencial de contornar a técnica manual é a técnica de aprendizado de máquina da qual destaca-se a rede neural convolucional.

Trata-se de um estudo retrospectivo e observacional realizado com os dados clínicos e laboratoriais de vinte pacientes com diagnóstico de Leishmaniose Visceral (LV) no período de Janeiro de 2018 a Maio de 2019 e tem como objetivo desenvolver recursos para auxílio diagnóstico de LV.

Neste trabalho apresentamos a construção de uma rede neural convolucional profunda para automatizar o processo de detecção de *Leishmania* com uma acurácia de 83% e ainda descrevemos características do exame parasitológico e dados clínicos dos pacientes que também podem corroborar com o diagnóstico aumentando a sensibilidade do método.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral. *Leishmania*. Diagnóstico. Mielograma. Rede Neural

## ABSTRACT

Leishmaniasis is caused by parasites of the genus *Leishmania*. There are three main forms of leishmaniasis: visceral, also known as Calazar, which is a more serious form of the disease, cutaneous, a more common and mucocutaneous. According to data from the world health organization, it is estimated that 700,000 to 1 million new cases and about 26,000 to 65,000 deaths occur.

Different methods can be used for the diagnosis of Visceral Leishmaniasis (VL). Currently, there are a variety of techniques, but none have 100% sensitivity and specificity. The basic, safe and determining requirement (gold standard) in the laboratory diagnosis of VL is the application of amastigote forms in the material applied by bone marrow puncture. However, manual identification processes are work, demonstrated and prone to human errors. Detecting *Leishmania* automatically is a challenging computational task. The current scenario of efficient image analysis tools that assist in this detection. A potential new way to get around a technical manual is a machine learning technique from which to save a neural convolutional.

This is a retrospective and observational study conducted with the clinical and laboratory data of twenty patients diagnosed with Visceral Leishmaniasis (VL) from January 2018 to May 2019 and aims to develop resources to aid in the diagnosis of VL.

In this work, we present a construction of a deep convolutional neural network to automate the detection process of *Leishmania* with an accuracy of 83% and also describe characteristics of the parasitological examination and clinical data of patients that can also corroborate which diagnosis increasing the sensivity of the method.

Keywords: Visceral Leishmaniasis. *Leishmania*. Diagnosis. Myelogram. Neural Network.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Imagem 1 – Representação esquemática das principais organelas intracelulares da forma amastigota da Leishmania .....	23
Imagem 2 – Representação do processo de rotulação das imagens .....	32
Imagem 3 – Representação gráfica da construção do problema.....	33
Imagem 4 – Representação gráfica da arquitetura proposta.....	34
Figura 1 – Evolução da taxa de aprendizagem com o tempo .....	39

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características laboratoriais e clínicas dos pacientes da pesquisa.....	37
Tabela 2 – Comparação dos métodos .....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Acurácia
AM	Aprendizado de Máquina
CNN	<i>Convolutional Neural Network</i>
DCNN	<i>Deep Convolutional Neural Network</i>
DeepSCNN	<i>DeepSiameseConvolutional Neural Networks</i>
ELISA	Ensaio Imuno Enzimático
HDT	Hospital de Doenças Tropicais
Hemoal	Hemocentro do Estado de Alagoas
IA	Inteligência Artificial
KNN	<i>K-Nearest Neighbor</i>
LV	Leishmaniose Visceral
MO	Medula Óssea
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
RIPE	Reação de Imunofluorescência Indireta
SVM	<i>Support Vector Machines</i>
TRL	Teste Rápido Anticorpo rK39
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
VGG	<i>Visual Geometry Group Network</i>

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	13
1.1 Fundamentação teórica e trabalhos relacionados .....	21
1.1.1 Quadro clínico e laboratorial.....	21
1.1.2 Diagnóstico.....	22
1.2 Avaliação computacional de imagens em microscopia .....	24
1.2.1 Aplicação de técnicas de aprendizado de máquina.....	25
1.2.2 Redes neurais convolucionais, <i>Siamese Network</i> e <i>Data Augmentation</i> .....	26
2 OBJETIVOS .....	22
2.1 Objetivo primário .....	22
2.2 Objetivos secundários .....	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 Definição do problema.....	242
3.2 Proposta da pesquisa.....	25
3.2.1. Arquitetura.....	25
3.2.2 Inicialização dos pesos.....	264
3.2.3 Treinamento .....	275
3.2.4 <i>Learning schedule</i> .....	275
3.2.5 Procedimento Ético.....	35
4 RESULTADOS .....	37
4.1 Resultados dos dados clínicos e laboratoriais.....	38
4.2 Resultados da rede neural .....	38
5 DISCUSSÃO .....	41
6 CONCLUSÕES .....	45

7 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS .....	45
REFERÊNCIAS .....	47
APÊNDICE A – DISPENSA DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	55
APÊNDICE B – DECLARAÇÃO DE CUMPRIMENTO DAS NORMAS DA RESOLUÇÃO 466/12, PUBLICIZAÇÃO DOS RESULTADOS E SOBRE O USO DE DESTINAÇÃO DO MATERIAL / DADOS COLETADOS .....	57
APÊNDICE C – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS FORMULÁRIO DE SOLICITAÇÃO DE MIELOGRAMA .....	59
ANEXO A – FORMULÁRIO DE SOLICITAÇÃO DE MIELOGRAMA .....	61



## 1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença causada por parasitas do gênero *Leishmania* que são transmitidos pela picada de flebotomíneos infectados. Existem três formas principais de leishmaniose: visceral, também conhecida como Calazar, que é a forma mais grave da doença, cutânea, a mais comum, e mucocutânea. Estima-se 700.000 a 1 milhão de novos casos e cerca de 26.000 a 65.000 mortes ocorram anualmente. Apenas uma pequena fração dos infectados por parasitas de *Leishmania* desenvolverão a doença. A Leishmaniose Visceral (LV) afeta algumas das pessoas mais pobres do planeta e está associada à desnutrição, deslocamento populacional, moradia precária, imunossupressão e falta de recursos financeiros. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

É a segunda doença parasitária que mais mata, perdendo apenas para Malária (MARKLE; MAKHOUL, 2004; TALARI; SADR, 2005). Atualmente, está entre as seis doenças endêmicas priorizadas no mundo. (ALTMAN et al, 1990)

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença de grande expansão geográfica, endêmica em cinco continentes, com casos relatados em cerca de 54 países localizados em regiões tropicais e subtropicais. Mais de 90% dos casos ocorrem em Bangladesh, Índia, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil. Infelizmente, esses dados são subestimados, uma vez que essa doença não é de notificação compulsória em todos os países em que ocorre, e muitos países não realizam vigilância ou outras investigações e não possuem um sistema de armazenamento de dados. (MORENO; ALVAR, 2002; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). Além disso, o número de seres humanos assintomáticos ou expostos à LV é muitas vezes superior ao número de casos detectados. (MORENO; ALVAR, 2002).

No Brasil, a LV é uma doença de notificação compulsória no Território Nacional conforme Lei nº 6.259, de 30 de outubro de 1975 e Portaria 1100/96, regulamentada pelo Ministério da Saúde do Brasil.

O relato inicial da doença foi feito na Grécia em 1835 e apenas em 1869, na Índia, recebeu a denominação de "kala-jwar", que quer dizer febre negra, ou "kala-azar", que significa pele negra em virtude do discreto aumento da pigmentação da pele ocorrido durante a doença. No Brasil, a doença teve seu primeiro caso em 1913. (ALENCAR, 1977).

A Leishmaniose Visceral (LV) é um importante problema de saúde pública internacional, é uma doença sistêmica grave que se não diagnosticada e tratada pode

ser fatal. Nas Américas, a LV é endêmica em 12 países e no período de 2001-2017 foram registrados 59.769 casos novos, resultando em uma média de 3.516 casos por ano. Cerca de 96% (57.582) dos casos foram reportados pelo Brasil, entretanto, países Sul Americanos como Argentina, Colômbia, Paraguai e Venezuela estão entre aqueles com maiores registros de casos. Por outro lado, alguns países da América Central, como Honduras e Guatemala que apresentavam anteriormente casos esporádicos de LV, reportaram nos últimos anos um aumento ou registro anual constante de casos, respectivamente. (ORGANIZAÇÃO PAN – AMERICANA DA SAÚDE, 2019).

Na Região das Américas, casos de leishmaniose foram notificados desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção das ilhas do Caribe, Chile e Uruguai. No mundo, a coinfeção da Leishmania e do HIV aumentou a carga da doença devido à maior dificuldade do diagnóstico e do tratamento clínico. (ORGANIZAÇÃO PAN – AMERICANA DA SAÚDE, 2019).

Nos primeiros seis meses de 2018, Alagoas registrou 63 casos de leishmaniose, um número 30% maior do que o registrado durante todo o ano de 2017. Em 2018, até 08 de outubro, foram notificados no SINAN 108 casos em residentes de 31 municípios, dos quais, 71 foram confirmados, 23 casos foram descartados e 14 encontram-se ainda sob investigação. Foram 16 o número de óbitos no período avaliado (ALAGOAS, 2018). A doença predomina nas áreas rurais, afetando principalmente as crianças que vivem nessas áreas. Dos 102 municípios do Estado, a LV foi relatada em 89% deles. Nos últimos cinco anos os municípios que mais reportaram casos foram Arapiraca, Palmeira dos Índios, Traipú, Cacimbinhas, Igaci, Santana do Ipanema e São José da Tapera. (SILVEIRA et al, 2015).

Existem 30–100 infecções subclínicas para cada caso evidente de leishmaniose visceral. (HO et al, 1982). Os fatores de risco para o desenvolvimento de doenças clínicas incluem desnutrição, drogas imunossupressoras e, especialmente, a coinfeção por HIV. (ALVAR et al, 1997; BERMAN, 1997; CERF et al, 1987). O número de coinfeções continuará a aumentar, notadamente na Índia e Brasil, onde a epidemia urbana de HIV e a epidemia de leishmaniose visceral rural estão cada vez mais em contato. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998). Pacientes coinfectados podem ser difíceis de diagnosticar, respondem mal ao tratamento e recidivam repetidamente (PINTADO; LÓPEZ – VÉLEZ, 2001). A LV afeta adversamente a produtividade e o bem-estar.

Diante da relevância da doença no mundo e da demasiada complexidade e necessidade de recursos humanos especializados para o diagnóstico de LV, este estudo se propôs a responder aos seguintes questionamentos: Quais as características do mielograma na amostra de indivíduos com diagnóstico de LV? Quais os principais achados clínicos e laboratoriais na amostra de pacientes com LV? Até que ponto o desenvolvimento de uma rede neural convolucional pode identificar a presença de *Leishmania* no mielograma?

### **1.1 Fundamentação teórica e trabalhos relacionados**

Nesta seção foi realizada uma revisão de conceitos e publicações associados ao quadro clínico-laboratorial dos pacientes com Leishmaniose Visceral, demonstrado um panorama histórico da evolução diagnóstica e apresentadas as limitações de cada método. Por fim, foi descrita a evolução das técnicas de Processamento de Imagens Digitais e/ou Visão Computacional aplicada em microscopia.

#### *1.1.1 Quadro clínico e laboratorial*

O quadro clínico da LV consiste em febre, perda de peso e fadiga. Os pacientes podem apresentar linfonodos aumentados, hepatomegalia e esplenomegalia.

Os achados laboratoriais da LV incluem anemia, leucopenia, trombocitopenia e hipergamaglobulinemia. A anemia está quase sempre presente e pode ser grave, geralmente é normocítica e normocrômica. Uma combinação de fatores são responsáveis pela anemia, incluindo hemólise, substituição de medula por macrófagos infectados por *Leishmania*, hemorragia, seqüestro esplênico de eritrócitos, hemodiluição e efeitos supressores da medula como citocinas. A leucopenia também é proeminente, com contagens de leucócitos ocasionalmente tão baixas quanto 1000 / mm<sup>3</sup>. Não se sabe se a neutropenia observada se deve ao aumento da marginalização dos neutrófilos, ao sequestro esplênico, a um processo auto-imune ou ainda a uma combinação desses fatores. A eosinopenia, ou ausência de eosinófilos, é frequentemente observada. É digno de nota que anemia e neutropenia não tenham sido proeminentes em pacientes com LV que realizaram esplenectomia. (KARIMI; ALBORZI; AMANATI, 2015).

Como a LV é uma condição fatal quando não tratada e os tratamentos têm alta toxicidade, é necessário um teste de diagnóstico altamente sensível e específico para

limitar o progresso da doença, aliviar os sinais e sintomas e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. (DE RUITER *et al*, 2014).

### 1.1.2 Diagnóstico

Diferentes metodologias podem ser utilizadas para o diagnóstico de LV humana. Atualmente, há uma variedade de técnicas, mas nenhuma apresenta 100% de sensibilidade e especificidade. (GONTIJO; MELO, 2004). O requisito básico, seguro e determinante (padrão-ouro ou *gold standard*) no diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral é a documentação de formas amastigotas em material obtido da punção de medula óssea ou baço. A especificidade desses métodos é de 100%, mas a sensibilidade é muito variável, em torno de 60% a 85%, em punção de medula óssea (PMO), e 95% em punção esplênica. (SUNDAR *et al*, 2003; ZIJLSTRA *et al*, 2001).

Os aspirados esplênicos podem estar associados à hemorragia e o processo deve ser realizado apenas com acesso a instalações cirúrgicas não sendo realizado na prática clínica. Por esta razão, aspirados de medula óssea são comumente tomados para o diagnóstico parasitológico. (DE RUITER *et al*, 2014).

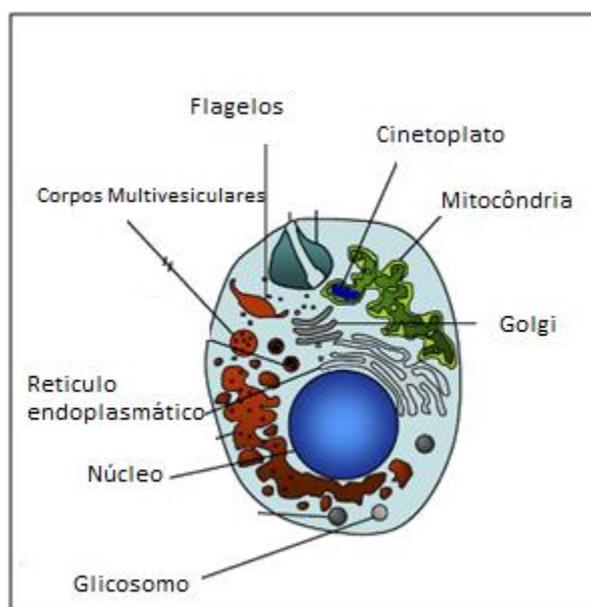
As sensibilidades das técnicas parasitológicas podem variar muito de laboratório para laboratório. A análise do esfregaço depende da qualidade da confecção das lâminas, expertise do microscopista e do tempo de análise das lâminas. (SILVA; STEWART; COSTA, 2015). A importância da capacidade técnica em ler os mielogramas é fundamental para o diagnóstico de LV (DE RUITER *et al*, 2014).

O encontro da *Leishmania* no esfregaço de medula óssea é proporcional ao tempo de exame ao microscópio. Para se alcançar uma sensibilidade de 90%, são necessários que 1.200 campos sejam examinados, o que significa aproximadamente 20 minutos de observação. Recomenda-se que mais tempo seja dedicado ao exame das lâminas dos pacientes com alta probabilidade pré-teste de LV, se a pesquisa de *Leishmania* foi negativa nesta fase inicial (SILVA; STEWART; COSTA, 2015).

Podem ser necessárias longas buscas para demonstrar o parasita. A cultura do parasita pode melhorar a sensibilidade de detecção do parasita, mas raramente é necessária na prática clínica. Além disso, cultivar parasitas é caro e consome tempo e requer perícia e equipamento de alto custo, restringindo severamente seu uso na rotina (SUNDAR; RAI, 2002)

A forma amastigota possui formato esférico a ovóide e o tamanho varia de acordo com a espécie, ficando entre 1,5 – 3,0 por 3,0 - 5,5 micrômetros. Possui um núcleo esférico localizado em um dos lados, um cinetoplasto em forma de bastão, geralmente próximo ao núcleo, e um flagelo interno rudimentar. (LEMOS *et al*, 2003; NEVES, 2001). (Imagem 1).

Imagem 1 – Representação esquemática das principais organelas intracelulares da forma amastigota da Leishmania.



Fonte: Adaptado de BESTEIRO *et al*, 2007.

Muito esforço tem sido feito no sentido de desenvolver testes menos invasivos para o diagnóstico da LV (BADARÓ *et al*, 1996; PIARROUX *et al*, 1994; SCOTT *et al*, 1991; ZIJLSTRA *et al*, 1998). O teste de fixação de complemento, o teste de imunofluorescência indireta, o ensaio imunoadsorvente ligado a enzima (ELISA) e os testes baseados em PCR para amplificação de DNA de leishmania são alguns dos exemplos destes esforços. Infelizmente, todos estes testes apresentam alguns inconvenientes: significativa reatividade cruzada com outras doenças, como tripanossomíase, hanseníase, malária, esquistossomose, tuberculose e outras leishmanioses, permanência de anticorpos após o tratamento (cicatriz sorológica), não permitindo avaliação de resposta terapêutica e a dificuldade para ser realizado em laboratório com poucos recursos. (CARVALHO *et al*, 2003; SUNDAR, 2003; SUNDAR *et al*, 2002).

A sorologia pode ser positiva em indivíduos de áreas endêmicas devido à exposição anterior e pode não ser indicativo de doença ativa atual. Enquanto pacientes imunocompetentes com LV geralmente tem alto título de anticorpos, pacientes imunocomprometidos muitas vezes não têm anticorpos específicos para parasitas detectáveis; assim, a sorologia pode não ser um teste sensível nesses hospedeiros. Testes Sorológico utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA), teste de fixação do complemento, imunofluorescência indireta (IFA) e testes de aglutinação direta (DAT) estão disponíveis. (KARIMI; ALBORZI; AMANATI, 2015).

Uma das principais desvantagens dos testes sorológicos é o fato de que eles não podem ser usados para detectar casos de recaída porque os anticorpos permanecem presentes por muito tempo após a cura clínica e muitas pessoas de áreas endêmicas também têm títulos de anticorpos devido à alta exposição ou infecção assintomática. (DE ALMEIDA *et al*, 2006; DE RUITER *et al*, 2014; HAILU, 1990).

Uma grande descoberta diagnóstica tem sido a identificação do antígeno K39 de leishmania. A detecção de anticorpos IgG anti-K39 tem se mostrado bastante sensível e específica para LV. A sensibilidade do teste com o rK39 variou entre 67% a 100%. A mais alta sensibilidade (100%) ocorreu em pacientes da Índia e Nepal. (BERN *et al*, 2000; SUNDAR *et al*, 2002; SUNDAR *et al*, 1998). Pacientes da Venezuela tiveram menor porcentagem de resultados verdadeiramente positivos (88%), e o teste com o rk39 foi menos sensível em pacientes do Sudão e outras áreas. (DELGADO *et al*, 2001; JELINEK; EICHENLAUB; LÖSCHER, 1999; ZIJLSTRA *et al*, 2001). Um dado importante na utilização desses testes com o rK39 é que após o tratamento um número significativo permanece positivo. (LE MOS *et al*, 2003; ZIJLSTRA *et al*, 1998).

## **1.2 Avaliação computacional de imagens em microscopia**

É um equívoco comum considerar que a patologia digital é uma técnica nova, visto que pesquisas sobre o uso de computadores e “softwares” para analisar e medir células ou tecidos em patologia datam de 1960 e 70. Estes sistemas iniciais são de capacidade limitada em comparação com a atualidade, mas foram os primeiros a demonstrar o valor que dados de imagens baseadas em computador para medição e a quantificação celular poderiam desempenhar no diagnóstico e descoberta patológica. (HAMILTON *et al*, 2014).

Durante a última década, aumentos dramáticos no poder computacional e melhoria nos algoritmos de análise de imagem permitiram o desenvolvimento de poderosas abordagens analíticas assistidas por computador. Com o recente advento dos scanners digitais de lâminas inteiras, as lâminas de histopatologia dos tecidos podem agora ser digitalizadas e armazenadas em formato de imagem digital. (GURCAN *et al*, 2009). Conseqüentemente, a histopatologia tecidual digitalizada tornou-se agora passível de aplicação de análise computadorizada de imagens e técnicas de aprendizado de máquina.

Analogamente ao papel dos algoritmos de diagnóstico assistido por computador em imagens médicas para complementar a opinião de um radiologista, esses algoritmos começaram a ser desenvolvidos para a detecção de doenças, diagnóstico e prognóstico para complementar a opinião do patologista. (GURCAN *et al*, 2009).

Por se tratar de uma atividade manual, a tarefa de contagem e identificação de células detém o profissional durante longo período. Diversos fatores como o cansaço, o “stress”, a diminuição de atenção e experiência do profissional podem influenciar na identificação de estruturas. A patologia digital está transformando a prática da patologia e cada vez mais se encontra integrada aos procedimentos de ensino/educação/treinamento, diagnóstico e garantia de qualidade na utilização de biomarcadores. A análise quantitativa e qualitativa de imagens pode detectar e trazer informações que não são facilmente visualizadas pelo observador humano. A contagem e detecção de objetos celulares em imagens digitais é muito menos trabalhosa e de maior rendimento. (GURCAN *et al*, 2009).

### *1.2.1 Aplicação de técnicas de aprendizado de máquina*

Após a década de 90, houve um enorme investimento em pesquisas de triagem de citologia automatizada com base em Inteligência Artificial (IA) com a promessa de que isso poderia ser usado para reduzir a carga de trabalho e melhorar o desempenho de diagnósticos em laboratórios. Infelizmente, isso ainda não aconteceu na escala prevista e até mesmo os sistemas mais avançados da IA não conseguiram mudar significativamente a prática em patologia. Assim, o entusiasmo inicial por esta tecnologia restringiu-se posteriormente ao foco na patologia molecular e na promessa de classificação diagnóstica de amostras de tecido sem a necessidade de avaliação morfológica. (HAMILTON *et al*, 2014).

O Aprendizado de Máquina (AM) é uma área de pesquisa em Ciência da Computação que evoluiu do estudo de reconhecimento de padrões e da teoria do aprendizado computacional em IA.

Os últimos anos testemunharam alguns avanços importantes de novas técnicas de AM. Uma importante técnica inovadora é conhecida como “aprendizado profundo”. O aprendizado profundo é constituído pelo uso de redes neurais profundas que imitam o cérebro humano que é organizado em uma arquitetura profunda e processa informações através de múltiplos estágios de transformação e representação de dados. (SUN *et al*, 2017).

Técnicas de AM exploram o estudo e construção de algoritmos que podem, de maneira indutiva, aprender com seus próprios erros e fazer previsões sobre dados, como também permitem que pesquisadores possam “produzir decisões e resultados confiáveis e repetíveis” e descobrir os “insights escondidos” através do aprendizado das relações e tendências históricas nos dados. Para se obter sucesso no uso de métodos de AM, geralmente começa com a extração de características da imagem importantes para fazer a predição ou o diagnóstico de interesse. Dessa forma, os algoritmos de AM operam sobre estas características extraídas (dados amostrais), construindo um modelo a fim de realizar previsões ou decisões guiadas pelos dados.

O uso de técnicas de AM aplicadas à análise automática de imagens médicas tem crescido consideravelmente nos últimos anos. (DE BRUIJNE, 2016). Mais recentemente, técnicas de Aprendizado Profundo de Máquina (*Deep Learning*) começaram a ser usadas com sucesso. Tais técnicas têm o benefício de que não requerem a identificação e extração de características de imagem como na técnica de AM supracitada. Ao invés disso, as características são identificadas como parte do processo de aprendizagem. (LITJENSE *et al*, 2017).

### 1.2.2 Redes neurais convolucionais e a Siamese Network e Data Augmentation

Recentemente, a Rede Neural Convolucional Profunda/ Deep Convolutional Neuro Network (DCNN) ganhou atenção no campo da biologia celular computacional e tem mostrado notável sucesso em complexas tarefas de classificação de imagens (CHEN; CHEFD'HOTEL, 2014; CIRESAN *et al*, 2013; DONG *et al*, 2015; GAO *et al*, 2017; SIRINUKUNWATTANA *et al*, 2016; XUE; RAY, 2017).

No contexto de Aprendizado de Máquina profundo, uma Rede Neural Convolutiva (CNN, do inglês *Convolutional Neural Network*) é uma variedade de Rede Neural Artificial, que vem sendo amplamente utilizada com sucesso em áreas como processamento e análise de imagens digitais. (GOODFELLOW; BENGIO; COURVILLE, 2016). Muitas CNNs tem sido desenvolvidas nos últimos anos com o objetivo de realizar reconhecimento de objetos em imagens (AlexNet, GoogleNet, VGG, etc); detecção de objetos em imagens (R-CNN, SPP-Net, etc); segmentação de objetos em imagens (U-Net, Teraus-Net, Seg-Net, etc.) e detecção de objetos com segmentação (Mask R-CNN).

Redes Neurais Convolucionais Siamesas Profundas (Deep Siamese Convolutional Neural Networks- Deep SCNN) são duas redes neurais convolucionais profundas cujo treinamento é realizado de maneira síncrona, ou seja, os pesos ajustados ao processo de treinamento são compartilhados por ambas as redes. Dessa forma, uma vez que estas redes recebam entradas pertencentes a classes diferentes ou iguais, elas irão computar a similaridade entre tais classes. Uma vez que a rede é treinada para computar a similaridade entre dois objetos de entradas, e considerando que num processo de aprendizado supervisionado, tem-se objetos rotulados, que podem ser utilizados como referência, o modelo treinado pode ser posteriormente utilizado para computar as diferenças entre um objeto de entrada não rotulado e o objeto de referência.(BROMLEY *et al*, 1994; CHOPRA; HADSELL; LECUN, 2005; TAIGMAN *et al*, 2014).

Data Augmentation (Aumento de Dados) é uma técnica utilizada em problemas de classificação quando não se dispõe de uma quantidade suficiente de dados para realizar treinamento e teste de classificadores (HALEVY; NORVIG; PEREIRA, 2009). Esta técnica é comumente utilizada com imagens médicas, em situações em que não seja possível capturar um banco de imagens suficientemente grande.

## **2 OBJETIVOS**

### ***2.1 Objetivo primário***

Desenvolver de recursos para auxílio ao diagnóstico de Leishmaniose Visceral (LV).

### ***2.2 Objetivos secundários***

Avaliar as características do mielograma na amostra de indivíduos com diagnóstico de LV.

Identificar os principais achados clínicos na amostra de pacientes com LV.

Demonstrar e classificar os achados laboratoriais.

Construir rede neural convolucional visando a automatização do processo de detecção de Leishmania no mielograma.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo retrospectivo e observacional realizado com os dados clínicos de prontuários de vinte pacientes com diagnóstico de Leishmaniose Visceral (LV) confirmado através do encontro de formas amastigotas de parasito em mielogramas colhidos no Hemocentro do Estado de Alagoas (Hemoal) no período de Janeiro de 2018 a Maio de 2019 independente do sexo, idade, e patologias associadas.

As leituras das lâminas coradas foram realizadas em microscopia de luz com objetiva de imersão em óleo em aumento de 100x sendo realizada por microscopista único. Cada esfregaço foi cuidadosamente examinado por pelo menos uma hora. Todos os casos confirmados com a presença de *Leishmania* foram selecionados para a pesquisa e várias fotos foram tiradas com a câmera do celular modelo I Phone 8 plus da marca Apple, acoplada manualmente no microscópio Nikon Eclipse E 200, sendo criado um banco de imagens além da coleta de dados clínicos e laboratoriais encontrados na solicitação médica (Anexo A)

Foram reunidas 76 imagens de mielogramas de pacientes com LV e foi construído um banco de dados com imagens de 3024 x 4032 pixels, posteriormente foram segmentadas em imagens de 200 x 200 pixels. Após esse processo foram identificadas 4710 imagens sem *Leishmania* e 553 imagens contendo *leishmania*. As imagens foram tratadas, foi utilizado *Hough Circle transformation* na detecção da borda circular do microscópio para corte da região de interesse além de aplicação de um filtro de borramento gaussiano para redução de ruído na imagem.

Usamos para o aumento de dados: escalonamento aleatório, rotação em 3 direções (90°, 180° e 270°) e flip aleatório (horizontal e vertical) gerando assim 1000 novas imagens sintéticas (500 para cada classe). Para validação da proposta da pesquisa, selecionamos 600 amostras para cada classe com o objetivo de manter a igualdade entre as mesmas. O conjunto de dados no final desse processo possui 1200 imagens, onde utilizou-se uma abordagem estratificada para seleção de 960 imagens para treinamento (80%) e 240 para teste (20%). Logo, podemos realizar a contagens dos pares utilizando a fórmula de combinação:  $N_{pairs} = \frac{(2I)!}{2!(2I-2)!} = 2I(2I - 1)$ , onde  $I$  é o número de elemento de cada classe (considerando que ambas as classes possuem a mesma quantidade). Logo, foi possível que  $N_{pairs}^{treinamento} = 960(960 - 1) =$

920640 e  $N_{\text{pairs}}^{\text{teste}} = 240 * 960 = 230400$  pares para treinamento e teste respectivamente. Devido ao grande número de imagens geradas o que impossibilitaria o treinamento da proposta em tempo, foi utilizado 200 mil pares para treinamento e 30 mil pares para teste.

O banco de imagens microscópicas com presença Leishmania foi criado e através do programa GIMP foi realizada a rotulação das imagens que é a identificação e marcação do parasita em cada imagem fotográfica. (Imagem 2).

Imagem 2 –Representação do processo de rotulação das imagens.



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: 1- Imagem original, 2- Identificação e marcação das Leishmanias; 3- Aproximação da imagem de Leishmania marcada.

### 3.1 Definição do problema da pesquisa

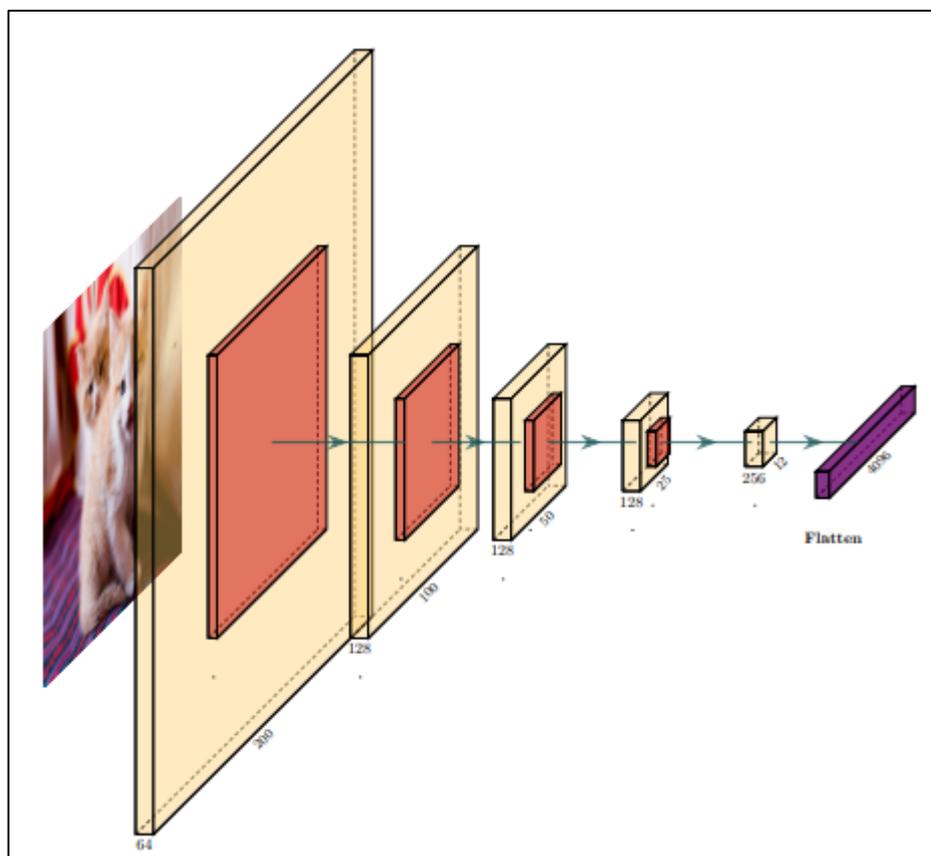
Seja o conjunto de dados  $X = \{x_1, x_2, \dots, x_n\}$ , onde cada elemento  $x_i$  possui um rótulo/classe denominado por  $y_i$  em um conjunto  $y$ , de modo que  $y_i \in y$ . Temos que para o conjunto  $y = \{y_1, y_2, \dots, y_n\}$  existe uma função  $\phi : x \rightarrow y$  que mapeia o conjunto de dados em seus respectivos rótulos/classes.

Com isso definimos a função  $d : x \times x \rightarrow \mathbf{R}^+$  descrita como  $d(x_i, x_j) = 1 - d'(\theta, \phi(x_i, x_j)) = d'(\theta, y_i, y_j)$ , onde  $d'$  é uma função de distância entre os rótulos, ou seja,  $d' : y \times y \rightarrow \mathbf{R}^+$  de modo que  $d'(\theta, y_i, y_j) \approx 0$  se  $y_i = y_j$  e  $\theta$  representa os parâmetros para o mapeamento  $d'$ .

Para construção da função  $d$  podemos definir o problema como um problema de otimização, como podemos ver em CHOPRA; HADSELL; LECUN, 2015. Definimos a função de loss como sendo  $J = \sum_{i,j} l_{ij} d(x_i, x_j)^2 + (1 - l_{ij}) h(\alpha - d(x_i, x_j))^2$ , onde  $l_{ij} \in \{0, 1\}$  representa uma função de marcação de modo que  $l_{ij} = 0$  se  $y_i \neq$

$y_j$  e  $l_{ij} = \mathbf{1}_{ij} = 1$  se  $y_i = y_j$  e  $h(x) = \max(0, x)$  is the hinge loss function. Desse modo, podemos estimar o parâmetro  $\theta^*$  como sendo  $\theta^* = \mathbf{arg\,min}_0 J(\theta, \{x\})$ .

Imagem3 – Representação gráfica da construção do problema.



Fonte: elaborada pela autora.

## 3.2 Proposta da pesquisa

### 3.2.1. Arquitetura

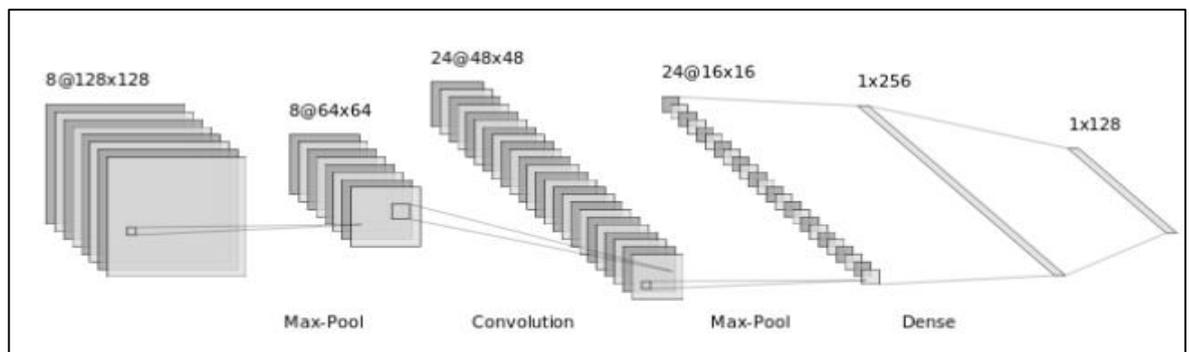
*Siamese neural networks* (SNN) proposto por BROMLEY *et al.* 1994 foram desenvolvidas para encontrar similaridade de forma não-linear entre dois objetos comparáveis. Como as redes convolucionais possuem a mesma arquitetura e compartilham os mesmos pesos, as SNN descrevem uma métrica de similaridade não-linear. Portanto, dado  $p(x_1 \text{ o } x_2)$  como sendo a probabilidade de uma imagem  $x_1$  pertencer a mesma classe que uma imagem  $x_2$ , temos  $p(x_1 \text{ o } x_2) = p(x_2 \text{ o } x_1)$ .

A proposta desse trabalho, inspiradas nas SNN, consiste em duas sub-redes idênticas, cada uma possuindo 5 camadas convolutivas com kernels de tamanhos 10, 7, 4, 4 e 5 além de camadas de *pooling* entre cada uma delas. Depois do processamento das camadas convolucionais, a rede constrói 2 descritores de 1-

dimensão com 3072 *features* representando cada imagem de entrada. Foi calculada a norma L1 (distância absoluta) entre os dois vetores de *features* ponto a ponto. A escolha da norma adotada se deve ao fato de que ser menos sensível que a norma L2, ou seja, se duas imagens semelhantes tivessem alguns pixels modificados, a distância tem seu valor modificado de forma menos impactada que a norma L2, além disso, a norma L2 sofre bastante com dados de alta dimensão (maldição de dimensionalidade), como é o caso do nosso problema.

Como resultado da norma L1, temos um vetor unidimensional de 3072 elementos, que representa a diferença entre os descritores de cada imagem. Nesse passo, foi aplicado um PCA (Análise de componente principal), realizando assim, uma redução de dimensionalidade para um vetor de dois elementos. Por fim, adotamos uma estratégia não paramétrica bayesiana e modelamos diretamente a função subjacente desconhecida para realizar a regressão do novo vetor de dois elementos, onde como saída do nosso modelo, temos 1 para elementos de mesma classe e 0 para elementos de classes distintas. Para isso, empregamos o modelo de processo gaussiano com o kernel RBF, como visto em RASMUSSEN, 2004.

Imagem 4 – Representação gráfica da arquitetura proposta.



Fonte: elaborada pela autora.

### 3.2.2 Inicialização dos pesos

Todos os pesos das camadas convolucionais foram inicializados a partir de uma distribuição normal com média ( $\mu$ ) = 0 e desvio padrão ( $\sigma$ ) = 0.01. Os "biases" também foram inicializados de uma distribuição normal, porém foi utilizado média ( $\mu$ ) = 0.5 e desvio padrão ( $\sigma$ ) = 0.01, onde esses valores podem ser encontrados em KOCH; ZEMEL; SALAKHUTDINOV, 2015.

### .2.3 Treinamento

Para treinamento da rede, utilizamos a função Loss como sendo:  $L(x_1, x_2, t) = t \cdot \log(p(x_1 | x_2)) + (1 - t) \cdot \log(1 - p(x_1 | x_2)) + \lambda \cdot \|\omega\|_2$ , onde temos que  $t$  é um elemento de marcação, ou seja,  $t = 1$  quando as imagens forem de classes semelhantes e  $t = 0$  quando as imagens forem de classes distintas. Foi utilizado um termo de regularização L2 para evitar *overfitting*.

### 3.2.4 Learning schedule

Foi utilizado uma taxa de aprendizagem diferente para cada rodada de treinamento da proposta, onde a taxa decai de forma sistemática em específicos períodos de tempo durante o treinamento. Este método foi implementado para que a taxa de aprendizagem decaia em 70% para um número fixo de rodadas de treinamento. Logo, definimos a taxa de aprendizagem  $l_t$  em uma dada rodada de treinamento  $t$  como sendo  $l_t = l_0 * r^{\lfloor t/d \rfloor}$ , onde  $l_0$  corresponde a taxa de aprendizagem inicial,  $r$  é o fator de decaimento e  $d$  a quantidade de rodadas que a taxa de aprendizagem permanece constante. Para este trabalho utilizamos  $l_0 = 0.1$ ,  $r = 0.7$  e  $d = 10$ , onde foi realizado o treinamento do modelo para 300 *epoch*.

### 3.2.5 Procedimento Ético:

O trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas. CAAE 17438019800005013.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Resultados dos dados clínicos e laboratoriais

As lâminas de vinte pacientes foram selecionados para pesquisa, sendo 13 do sexo feminino e 07 do sexo masculino. A idade variou entre 1 a 55 anos, média de idade 18,2 anos. Quanto a qualidade do aspirado, 75% celular, inversão da relação G : E ( Granulócitos: Eritrócitos) estava presente em 55% dos pacientes e em 50% deles foram encontrados aumento significativo de plasmócitos na medula. A quantidade de Leishmania foi dividida em 3 categorias: 1-5 parasita por campo presente em 12 pacientes, 5-10 parasitas por campo em 4 pacientes e acima de 10 parasitas por campo em 4 pacientes. Presença de hemofagocitose estava presente em 6 pacientes e diseritropoese em 8 pacientes.

Quanto às características laboratoriais, classificadas segundo os critérios de terminologia comum para eventos adversos versão 4.0, 100% dos pacientes tinham anemia (Grau1: 0, Grau 2: 5, Grau 3:7, Grau 4: 8), 95% dos pacientes tinham plaquetopenia (Grau1: 7, Grau 2: 4, Grau 3:4, Grau 4: 4), 80% dos pacientes Leucopenia, Neutropenia em 90% dos pacientes (Grau1: 2, Grau 2: 2, Grau 3:3, Grau 4: 11), 80% dos pacientes tinham Linfopenia (Grau1: 5, Grau 2: 6, Grau 3:4, Grau 4: 1).

No tocante às características clínicas, 17 pacientes tinham febre e esplenomegalia (85% dos pacientes), 9 pacientes tinham hepatomegalia (45% dos pacientes) e em nenhum paciente foi relatado linfonomegalia palpável. (Tabela1).

Tabela 1 – Características laboratoriais e clínicas dos pacientes da pesquisa.

		(Continua)
<b>Parâmetros</b>		<b>N (%)</b>
<b>Celularidade</b>	Aumentada	07 (35%)
	Normal	11 (55%)
	Diminuída	02 (10%)
<b>Relação G:E</b>	Normal	09 (45%)
	Invertida	09 (45%)
	Não Avaliável	02 (10%)
<b>Plasmócitos</b>	>5%	10 (50%)
	<5%	08 (40%)
	Não Avaliável	02 (10%)
<b>Parasitemia</b>	1-5 /100x	12 (60%)
	5-10/100x	04 (20%)
	>10/100x	04 (20%)
<b>LD Intra-histiocitário</b>		13 (65%)
<b>LD Extra-histiocitário</b>		18 (90%)
<b>Intra e Extra-hisocitário</b>		11 (55%)

<b>Eosinofilia</b>	Presente	03 (15%)
	Ausente	15 (75%)
	Não avaliável	02 (10%)

Tabela 1 – Características laboratoriais e clínicas dos pacientes da pesquisa.

		(Conclusão)
<b>Parâmetros</b>		<b>N (%)</b>
<b>Diseritropoese</b>	Presente	08 (40%)
	Ausente	12(60%)
<b>Anemia</b>	Presente	20 (100%)
	Ausente	0
<b>Grau 1</b>	<LIN- 10g/dL	0
<b>Grau 2</b>	<10g/dl – 8g/dL	5 (25%)
<b>Grau 3</b>	<8,0g/dl-6,5g/dL	7 (35%)
<b>Grau 4</b>	<6,5g/dl	8 (40%)
<b>Plaquetopenia</b>	Presente	19 (95%)
	Ausente	01(01%)
<b>Grau 1</b>	<LIN – 75.000/mm <sup>3</sup>	07 (35%)
<b>Grau 2</b>	<75.000-50.000/mm <sup>3</sup>	04 (20%)
<b>Grau 3</b>	<50.000-25.000/mm <sup>3</sup>	03 (15%)
<b>Grau 4</b>	<25.000/mm <sup>3</sup>	04 (20%)
<b>Leucopenia</b>	Presente	16 (70%)
	Ausente	06 (30%)
<b>Neutropenia</b>	Presente	18 (90%)
	Ausente	02 (10%)
<b>Grau 1</b>	<LIN-1500/mm <sup>3</sup>	02 (10%)
<b>Grau 2</b>	<1500-1000/mm <sup>3</sup>	02 (10%)
<b>Grau 3</b>	<1000-500/mm <sup>3</sup>	03 (15%)
<b>Grau 4</b>	<500/mm <sup>3</sup>	11 (55%)
<b>Linfopenia</b>	Presente	16 (80%)
	Ausente	04 (20%)
<b>Grau 1</b>	<LIN-1500/mm <sup>3</sup>	05 (25%)
<b>Grau 2</b>	<1500-1000/mm <sup>3</sup>	06 (30%)
<b>Grau 3</b>	<1000-500/mm <sup>3</sup>	04 (20%)
<b>Grau 4</b>	<500/mm <sup>3</sup>	01(05%)
<b>Pancitopenia</b>	Presente	16 (80%)
	Ausente	04(20%)
<b>Febre</b>	Presente	17 (85%)
	Ausente	03 (15%)
<b>Esplenomegalia</b>	Presente	17 (85%)
	Ausente	03 (15%)
<b>Hepatomegalia</b>	Presente	09 (45%)
	Ausente	11 (55%)

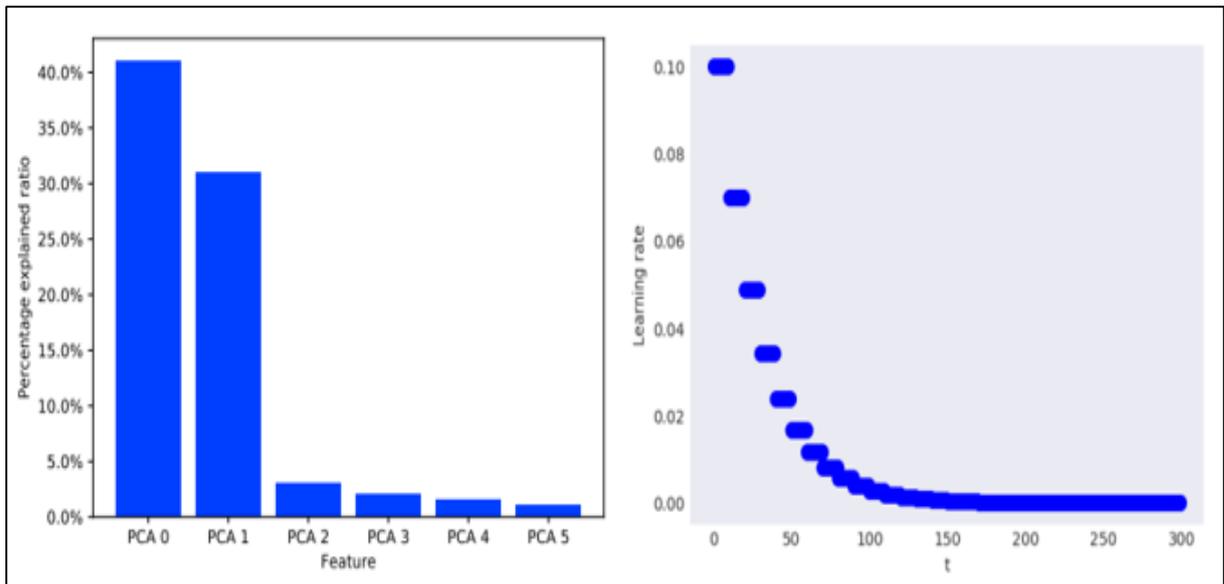
Fonte: Elaborado pela autora.

#### **4.2 Resultados da rede neural**

Como a proposta deste trabalho é a redução para duas dimensões cada imagem do conjunto de dados, observou-se que essas duas dimensões conseguem representar a variância de 72.85% dos dados, mostrando-se assim um bom descritor de características dos mesmos. Percebemos ainda, que se tivéssemos adicionado mais característica, não teríamos um aumento considerável na variância dos dados.

Para isso, inicialmente, foi investigada como se comporta a *Percentage Explained Ratio* de uma *feature* depois da transformação do PCA. Com isso, foram selecionadas as 6 características mais relevantes como podemos ver na figura 1.

Figura 1 – Evolução da taxa de aprendizagem com o tempo.



Fonte: elaborada pela autora.

Os resultados da avaliação são mostrados na tabela 2 onde o melhor resultado é mostrado em negrito. Percebemos que técnica desenvolvida nesse trabalho consegue ser melhor que técnicas padrões na literatura para classificação como redes neurais convolucionais (CNN) e Support Vector Machines (SVM). Além das comparações acima, nossa proposta foi avaliada com técnicas de *one-short learning*, onde conseguiu resultados mais promissores. Provavelmente isso se deve ao fato de que quando adicionada a informação de outra imagens, como é o caso da *Siameses neural networks*, estamos dando a possibilidade de comparar dois vetores de *features*, ou seja, se pelo menos uma *features* for diferente, devido à norma L1, conseguimos capturar melhor esse comportamento e assim realizar a classificação de forma mais efetiva. Em comparação com a nossa abordagem, como os vetores de *features* possuem muitas dimensões, acreditamos que a “maldição ao da dimensionalidade” estava afetando o resultado da *siamese network*. Com isso, a motivação de se utilizar um PCA para reduzir a dimensão, além de excluir as informações inúteis, ou seja, que as classes tinham comum.

Tabela 2 – Comparação dos métodos

<b>Método</b>	<b>Acc</b>
KNN (K = 1) (baseline)	0.308
VGG16	0.732
SVM	0.513
<b>Nossa proposta</b>	<b>0.830</b>

Fonte: elaborada pela autora.

## 5 DISCUSSÃO

De acordo com a revisão da literatura, a hiperplasia eritroide tem sido relatada quase que universalmente nos esfregaços de aspirado de medula óssea. (AL – JURAYYAN *et al*, 1995; KUMAR *et al*, 2007; ROCHA FILHO *et al*, 2000). O mecanismo sugerido postula que a infecção por *Leishmania* nos macrófagos estromais da medula aumenta seletivamente a mielopoese pela superprodução de GM-CSF e TNF-alfa. (COTTERELL; ENGWERDA; KAYE, 2000). Dados de celularidade são importantes para avaliar o prognóstico dos pacientes. Pacientes com medula óssea hiperplásica respondem melhor ao tratamento. (KUMAR *et al*, 2007).

A hiperplasia eritroide com inversão da relação G:E, encontrada neste trabalho em quase metade dos pacientes, é descrita na literatura com frequência bastante diversa, variando entre 22 e 81.4%. (BHATIA *et al*, 2011; CHANDRA; CHANDRA; KAUSHIK, 2013; DANESHBOD; DEGHANI; DANESHBOD, 2010; DHINGRA *et al*, 2010).

Um dado relevante nesse trabalho foi a presença de diseritropoese em 8 pacientes. Relatos de casos de LV simulando mielodisplasia foram descritos na literatura. (KOPTERIDES; HALIKIAS; TSAVARIS, 2003; SIPAHI; TAVIL; OKSAL, 2015; YARALI *et al*, 2002). Diseritropoese isolada foi relatada por autores juntamente com características megaloblásticas (SHAHRIAR *et al*, 1999; KOÇAK *et al*, 2004), no entanto, a prevalência foi menor de achados mielodisplásicos quando comparados ao presente estudo (DHINGRA *et al*, 2010), provavelmente pela presença de doença avançada tão presente nos pacientes desse trabalho. Níveis elevados de fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) podem causar mielodisplasia de trilinear não-clonal em pacientes com LV. (YARALI *et al*, 2002). A mielodisplasia é um dos fatores responsáveis pela pancitopenia sendo um achado encontrado nas apresentações mais graves. Esta é uma causa de erro de diagnóstico se *Leishmania* não forem rastreadas. Além disso, é uma causa potencialmente reversível de mielodisplasia.

O aumento de plasmócito na medula está descrito em alguns trabalhos. (BHATIA *et al*, 2011; DHINGRA *et al*, 2010). A presença de plasmocitose em indivíduos com quadro de hepatoesplenomegalia febril deve ter LV como uma grande hipótese diagnóstica e a procura de *Leishmania* deve ser intensificada. Se as *Leishmanias* não são vistas, pode-se facilmente confundir Calazar com tuberculose, brucelose, infecções virais ou fúngicas. (KUMAR *et al*, 2007).

Alterações hematológicas estão presentes em praticamente todos os indivíduos com LV. A quantificação dessas alterações não está bem relatada na literatura. A maioria dos trabalhos informa apenas a presença ou ausência de citopenias. O grau de anemia, leucopenia e plaquetopenia chamou atenção nessa pesquisa (Tabela 1), mostrando a gravidade desta patologia e o provável retardo no diagnóstico. Pesquisa anterior demonstrou que a anemia estava presente em 94% casos com uma concentração média de hemoglobina de 7,5 g/dl. Da mesma forma, trombocitopenia estava presente em 61% casos com uma contagem média de 84,000 mm<sup>3</sup>. (DHINGRA *et al*, 2010). Em outro trabalho a presença de anemia foi de 70% e de plaquetopenia foi de apenas 30%. (DANESHBOD; DEGHANI; DANESHBOD, 2010). Comparando com os dados coletados para essa pesquisa, a prevalência tanto de anemia quanto de plaquetopenia foram maiores, todos os pacientes tinham anemia, e a grande maioria plaquetopenia (DANESHBOD; DEGHANI; DANESHBOD, 2010; DHINGRA *et al*, 2010) e a gravidade das citopenias quando comparada foi maior. (DANESHBOD; DEGHANI; DANESHBOD, 2010).

Hemofagocitose, presente em 6 pacientes, está descrita em diferentes prevalências na literatura. (BHATIA *et al*, 2011; DANESHBOD; DEGHANI; DANESHBOD, 2010; DHINGRA *et al*, 2010). A diferenciação entre a síndrome hemofagocítica primária e secundária é muito importante porque a hemofagocitose associada a doenças infecciosas como a LV resolve com o tratamento da infecção subjacente, enquanto o tratamento de casos primários drogas imunossupressoras são usadas. (AGARWAL *et al*, 2006). Hemofagocitose foi descrito com complicação da LV em vários outros estudos, especialmente como uma complicação com risco de vida em crianças (AGARWAL *et al*, 2006; GAGNAIRE; GALAMBRUN; STÉPHAN, 2000; OZYÜREK *et al*, 2005). Inclusive foi relatado como causa de retardo no diagnóstico ao desviar o patologista do diagnóstico primário. (DHINGRA *et al*, 2010).

Uma análise adequada do mielograma, desde a avaliação pré-analítica dos sinais e sintomas até a observação cuidadosa das pistas diagnósticas acima discutidas, é de suma importância para o diagnóstico de Leishmaniose.

A baixa parasitemia encontrada nas lâminas de mielograma, 1-5 parasita por campo, em mais da metade dos pacientes, evidência a dificuldade de encontrar o parasita e a necessidade de criar métodos que auxiliem esse diagnóstico.

Tradicionalmente, técnicas manuais têm sido usadas para identificação de Leishmania no mielograma. No entanto, os processos de identificação manual são

trabalhosos, demorados e propensos a erros humanos. Detecção de *Leishmania* automaticamente é uma tarefa computacional desafiadora, para a qual nos falta atualmente ferramentas de análise de imagem eficientes.

Embora a análise automática de células sanguíneas e outras imagens médicas tenham sido estudadas nos últimos 50 anos, apenas na última década existiu um crescente interesse no processamento de imagens de protozoários parasitas intracelulares, incluindo o processamento de imagens adquiridas a partir de amostras de doenças negligenciadas como Malária, Chagas e Leishmaniose. (GÓRRIZ *et al*, 2018). Em particular, a detecção automática de leishmania através de técnicas de processamento de imagens foi abordada por alguns autores. Considerando a coloração padrão e a visão morfológica e computacional, métodos para segmentar parasitas foram utilizados por FAHARI *et al*, (2015). Outra abordagem considerando uma técnica de segmentação baseada em “watershed” é apresentada em VAZQUEZ NOGUERA *et al*, (2013), que descreve uma abordagem para a contagem automática de parasitas intracelulares na doença de Chagas com marcadores internos e externos com técnica de segmentação e rotulagem de componentes conectados para posterior contagem de célula.

Nos últimos anos, técnicas de aprendizado profundo mostraram um desempenho crescente em diferentes aplicações de processamento de imagens e visão computacional. Desde trabalho iniciais de KRIZHEVSKY; SUTSKEVER; HINTON, 2012 para classificação de imagens, muitas novas arquiteturas e aplicações foram abordadas. Em particular, redes neurais convolucionais (CNN) tornaram-se rapidamente uma metodologia de escolha para a análise de imagens biomédicas. Recentemente, alguns sistemas baseados em CNNs foram propostos para diagnóstico em ambientes com recursos limitados, usando fotografias de amostras vistas do microscópio. Por exemplo, QUINN *et al*, 2016 avalia o desempenho de redes neurais convolucionais profundas em três diferentes tarefas de microscopia: diagnóstico de malária em amostras de sangue espesso, tuberculose em amostras de escarro e de ovos de parasitas em amostras de fezes. Em todos os casos, a precisão é alta e substancialmente melhor do que abordagens alternativas baseadas em técnicas tradicionais de estudo de imagem médica. Mehanian *et al*, (2017) propõem um sistema de visão computacional que aproveita a aprendizagem profunda para identificar parasitas da malária em micrografias de sangue espesso. Eles treinam uma CNN baseada em uma arquitetura VGG para extração de recursos e usam regressão

logística para classificação. DELAS PEÑAS; RIVERA; NAVAL, (2017) também usam uma CNN para detectar e identificar algumas espécies de parasitas da malária através de imagens de sangue fino esfregaço. O trabalho de GÓRRIZ *et al*, (2018) utiliza o aprendizado profundo para segmentação e classificação de parasitas de leishmania em imagens microscópicas desenvolvendo um sistema automatizado baseado em uma abordagem totalmente convolucional, utiliza rede neural para segmentar leishmania com imagens extraídas de culturas e classifica em promastigotas, amastigotas e parasitas aderidos.

Uma nova maneira potencial de contornar técnicas manuais é usar rede neural profunda. Redes neurais profundas têm sido investigadas na aprendizagem de representações latentes de imagens médicas, mas a maioria dos estudos limita sua abordagem em uma única rede neural convolucional supervisionada (CNN), que geralmente depende muito de um conjunto de dados anotados em grande escala para treinamento (SUN *et al*, 2017). Para aprender representações de imagens sobre uma base de imagens desbalanceada, ou seja, uma base onde o número de imagens contendo leishmania é significativamente menor que as imagens que não contem a leishmania, foi desenvolvida uma arquitetura de CNN siamês profunda (SCNN) que pode ser treinada apenas com informações binárias de pares de imagens.

O resultado de detecção de Leishmania com acurácia de 83%, desenvolvida neste trabalho impressiona. Esse método supera os métodos avançados de análise de imagem e aprendizado de máquina e fornece precisão superior aos dos peritos humanos. Além disso, o tempo de execução da detecção de células é rápido e com baixo custo.

## 6 CONCLUSÕES

Foi criado um banco de dados de imagens de mielogramas de pacientes com Leishmaniose Visceral que auxiliou o desenvolvimento de técnicas computacionais para automação.

Com relação aos achados de mielograma observou-se que a inversão relação G:E (Granulocítica: Eritrocítica) assim como aumento de plasmócitos estão presentes em aproximadamente metade dos casos. O encontro de displasias em série eritroide em mais de um terço dos casos também foi relatado no presente estudo.

Características clínicas também foram analisadas nesse trabalho e o achado de esplenomegalia e febre associado à citopenia de diversos graus foi encontrado na maioria dos pacientes enquanto menos da metade apresentaram hepatomegalia e nenhum caso de linfonomegalia foi descrito.

Foi desenvolvida uma rede neural convolucional com o objetivo de automatizar a localização da Leishmania com uma acurácia elevada, superior a 80%, pouco dispendiosa e acessível, sendo esse resultado superior ao descrito pelo método diagnóstico padrão ouro da literatura.

A grande utilidade prática atribuída a esta automatização é a capacidade da rede neural identificar a Leishmania com uma sensibilidade alta diferenciando a sua estrutura de outras estruturas encontradas no mielograma, contribuindo para realização de diagnóstico principalmente onde existem dúvidas na identificação do parasita, sendo também de suma importância esse auxílio em regiões onde a doença é rara ou até mesmo em regiões endêmicas, contribuindo de forma social impactante no diagnóstico de uma doença ainda considerada negligenciada.

## 7 LIMITAÇÕES, PERSPECTIVAS FUTURAS

O diagnóstico da leishmaniose Visceral permanece um desafio, mesmo com o grande desenvolvimento da biotecnologia. Nem mesmo a técnica de biologia molecular tem conseguido alcançar 100% de sensibilidade e especificidade. Em relação à alta frequência dessa doença e à nocividade do atraso no diagnóstico, é necessário aumentar a sensibilidade e a especificidade dos critérios diagnósticos para reduzir a morbimortalidade

Algumas limitações do processo foram identificadas nesse trabalho, como a avaliação manual por apenas um profissional, o número limitado de casos analisados principalmente para avaliação de dados clínicos mesmo por que o banco de imagens nem foi utilizado em sua totalidade devido a sua grandiosidade. Dificuldade pessoal em entender e acompanhar o desenvolvimento da área computacional por praticamente viver anteriormente apenas na área médica.

Otimizar o tempo utilizado na identificação do parasita e até mesmo o simples encontro do mesmo o que leva em alguns casos mais de uma hora será provavelmente a grande sugestão dos próximos trabalhos através da digitalização das lâminas e encontro automático dos parasitas através da rede Neural eliminado o viés da capacidade técnica do responsável pela leitura do mielograma. Com isso uma importante barreira técnica será superada. A construção de aplicativo para reconhecimento de Leishmania com acesso universal e gratuito já está sendo desenvolvido pelo grupo de informática da universidade a partir desse trabalho.

Além disso, a técnica desenvolvida nesta pesquisa pode ser generalizada para outros tipos de células ampliando o seu uso para inúmeras áreas médicas em que a quantificação de célula e a identificação de estruturas são importantes.

Existe um compromisso social nesse trabalho por discutir uma doença negligenciada, fatal quando não diagnosticada e tratada e praticamente restrita a países pobres. Todo avanço em termos de diagnóstico principalmente de baixo custo são estratégias controladoras da doença e serão sempre bem-vindas.

A interação da área médica e computacional foi o grande mérito da pesquisa e a forma de mestrado multidisciplinar proporcionou uma troca de experiência grandiosa.

## REFERÊNCIAS

AGARWAL, S. *et al.* Hemophagocytic syndrome associated with visceral leishmaniasis. **Indian Journal of Pediatrics**, Nova Deli, v. 73, n. 5, p. 445 – 446, 2006.

ALAGOAS. Secretaria da Saúde. Gerência de Vigilância e Controle de Doenças Transmissíveis. **Nota Informativa SUVISA nº 51/2018 – Leishmaniose Visceral em Alagoas**. Alagoas: Secretaria da Saúde, 18 out. 2018. Disponível em: <http://www.saude.al.gov.br/wp-content/uploads/2018/11/Nota-Informativa-n%C2%BA-51-GEDT-Leishmaniose-Visceral-em-Alagoas.pdf>. Acesso em: 16 jul. 2019.

ALENCAR, J. E. Leishmaniose Visceral no Brasil. **Revista de Medicina da Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, v. 17, p. 129 - 148, 1977.

ALTMAN, Douglas G. **Practical Statistics for Medical Research**. Londres: Chapman and Hall, 1990. 624 p.

ALVAR, J. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 10, n. 2, p. 298 – 319, 1997.

AL – JURAYYAN, N. A. *et al.* The haematological manifestations of visceral leishmaniasis in infancy and childhood. **Journal of tropical pediatrics**, Londres, v. 41, n. 3, p. 143 – 148, 1995.

ANAVI, Yaron *et al.* Visualizing and enhancing a deep learning framework using patients age and gender for chest x – ray image retrieval. *In*: SPIE Medical Imaging, 2016, San Diego. **Anais, volume 9785, Medical Imaging 2016: Computer – Aided Diagnosis**. Orlando: SPIE, 2016. Disponível em: <https://www.spiedigitallibrary.org/conference-proceedings-of-spie/9785/978510/Visualizing-and-enhancing-a-deep-learning-framework-using-patients-age/10.1117/12.2217587.short?SSO=1>. Acesso em 01 jul. 2019.

ARONSON, Naomi *et al.* Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). **Clinical Infectious Diseases**, Arlington, v. 63, n. 12, p. e202 – e264, 2016.

BADARÓ, R. *et al.* rK39: a cloned of Leishmania chagasi that predicts active visceral leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, Oxford, v. 173, n. 3, p. 758 – 761, 1996.

BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: Clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical Infectious Diseases**, Arlington, v. 24, n. 4, p. 684 – 703, 1997.

BERN, C. *et al.* Use of the recombinant K39 dipstick test and the direct agglutination test in a setting endemic for visceral leishmaniasis in Nepal. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Arlington, v. 63, n. 3 – 4, p. 153 – 157, 2000.

BESTEIRO, Sébastien *et al.* Protein turnover and differentiation in Leishmania. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 37, n. 10, p. 1063 – 1075, 2007.

BHATIA, Prateek *et al.* A Case Series Highlighting the Relative Frequencies of the Common, Uncommon and Atypical / Unusual Hematological Findings on Bone Marrow Examination in Cases of Visceral Leishmaniasis. **Mediterranean journal of hematology and infectious diseases**, Roma, v. 3, n. 1, e. 2011035, 2011.

BROMLEY, Jane *et al.* Signature Verification using a “Siamese” Time Delay Neural Network. **International Journal of Pattern Recognition and Artificial Intelligence**, Área Central de Singapura, v. 7, n. 4, p. 25, 1993.

BROMLEY, Jane *et al.* Signature Verification using a “Siamese” Time Delay Neural Network. *In: 7<sup>th</sup> Annual Neural Information Processing Systems Conference*, 1993, Denver. **Anais**. Burlington: Morgan Kaufmann Publishers, 1994. Disponível em: <http://books.nips.cc/papers/files/nips06/0737.pdf>. Acesso em: 16 jul. 2019.

CARVALHO, S. F. *et al.* Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Arlington, v. 68, n. 3, p. 321 – 324, 2003.

CERF, B. *et al.* Malnutrition as a Risk Factor for Severe Visceral Leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, Arlington, v. 156, n. 6, p. 1030 – 1033, 1987.

CHANDRA, Harish; CHANDRA, Smita; KAUSHIK, Rajeev Mohan. Visceral Leishmaniasis with Associated Common, Uncommon, and Atypical Morphological Features on Bone Marrow Aspirate Cytology in Nonendemic Region. **Journal of Tropical Medicine**, Cairo, v. 2013, e. 861032, 2013.

CHEN, Ting; CHEFD’HOTEL, Christophe. Deep Learning Based Automatic Immune Cell Detection for Immunohistochemistry Images. *In: WU, G.; ZHANG, D.; ZHOU, L. (ed.). Machine Learning in Medical Imaging*. Nova Iorque: Springer, 2014. Disponível em: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-10581-9\\_3](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-10581-9_3). Acesso em: 01 jul. 2019.

CHOPRA, Sumit; HADSELL, Raia; LECUN, Yann. Learning a similarity metric discriminatively, with application to face verification. *In: Computer Vision and Pattern Recognition*, 2005, San Diego. **Anais**. Nova Iorque: IEEE, 2005. Disponível em: <http://yann.lecun.com/exdb/publis/pdf/chopra-05.pdf>. Acesso em: 01 jul. 2019.

CIRESAN, D. C. *et al.* Mitosis detection in breast cancer histology images with deep neural networks. **Medical image computing and computer – assisted intervention: MICCAI...**, Berlim, v. 16, p. 411 – 418, 2013.

COTTERELL, S. E.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Leishmania donovani infection of bone marrow stromal macrophages selectively enhances myelopoiesis, by a mechanism involving GM – CSF and TNF – alpha. **Blood**, Nova Iorque, v. 95, n. 5, p. 1642 – 1651, 2000.

DANESHBOD, Y.; DEHGHANI, S. J.; DANESHBOD, K. Bone marrow aspiration findings in kala – azar. **Acta cytologica**, Chicago, v. 54, n. 1, p. 12 – 24, 2010.

DE ALMEIDA, L. S. *et al.* Immunologic tests in patients after clinical cure of visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Arlington, v. 75, n. 4, p. 739 – 743, 2006.

DE BRUIJNE, M. Machine learning approaches in medical image analysis: From detection to diagnosis. **Medical image analysis**, Londres, v. 33, p. 94 – 97, 2016.

DE RUITER, C. M. *et al.* Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 52, n. 9, p. 3147 – 3155, 2014.

DELAS PEÑAS, Kristofer E.; RIVERA, Pilarita T.; NAVAL, Prospero C. Malaria Parasite Detection and Species Identification on Thin Blood Smears Using a Convolutional Neural Network. *In*: 2017 IEEE / ACM International Conference on Connected Health: Applications, Systems and Engineering Technologies (CHASE), Filadélfia, 2017. **Anais**. São Francisco: IEEE, 2017. Disponível em: <https://ieeexplore.ieee.org/document/8010566>. Acesso em 16 jul. 2019.

DELGADO, O. *et al.* Value of a dipstick based on recombinant RK39 antigen for differential diagnosis of American visceral leishmaniasis from other sympatric endemic diseases in Venezuela. **Parasite: Journal de la Société Française de Parasitologie**, Paris, v. 8, n. 4, p. 355 – 357, 2001.

DHINGRA, K. K. *et al.* Morphological findings in bone marrow biopsy and aspirate smears of visceral Kala Azar: a review. **Indian journal of pathology & microbiology, Chandigarh**, v. 53, n. 1, p. 96 – 100, 2010.

DONG, Bo. *et al.* Deep learning for automatic cell detection in wide – field microscopy zebrafish images. *In*: 2015 IEEE 12<sup>th</sup> International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI), 2015, Nova Iorque. **Anais**. Nova Iorque: IEEE, 2015. Disponível em: <https://ieeexplore.ieee.org/document/7163986>. Acesso em: 01 jul. 2019.

FAHARI, Maria *et al.* Automatic segmentation of Leishmania parasite in microscopic images using a modified CV level set method. *In*: 7<sup>th</sup> International Conference on Graphic and Image Processing (ICGIP), 2015, Singapura. **Anais**. Orlando: SPIE, 2015. Disponível em: <https://www.spiedigitallibrary.org/conference-proceedings-of-spie/9817/98170K/Automatic-segmentation-of-Leishmania-parasite-in-microscopic-images-using-a/10.1117/12.2228580.short?SSO=1>. Acesso em: 16 jul. 2019.

GAGNAIRE, M. H.; GALAMBRUN, C.; STÉPHAN, J. L. Hemophagocytic syndrome: A misleading complication of visceral leishmaniasis in children – a series of 12 cases. **Pediatrics**, Springfield, v. 106, n. 4, e.58, 2000.

GAO, Zhimin *et al.* HEp-2 Cell Image Classification with Deep Convolutional Neural Networks. **IEEE Journal of Biomedical and Health Informatics**, Piscataway, v. 21, n. 2, p. 416 – 428, 2017.

GOODFELLOW, Ian; BENGIO, Yoshua; COURVILLE, Aaron. **Deep Learning**. Cambridge: MIT Press, 2016. E-book. Disponível em: <https://www.deeplearningbook.org/>. Acesso em: 01 jul. 2019.

GONTIJO, Célia Maria Ferreira; MELO, Maria Norma. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 338 – 349, 2004.

GÓRRIZ, M *et al.* Leishmaniasis Parasite Segmentation and Classification Using Deep Learning. *In*: PERALES, F.; KITTLER, J. (ed.). **Articulated Motion and Deformable Objects**. Berlim: Springer, 2018. Disponível em: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-94544-6\\_6](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-94544-6_6). Acesso em: 16 jul. 2019.

GUERIN, Philippe J. *et al.* Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **The Lancet: Infectious Diseases**, Londres, v. 2, n. 8, p. 494 – 501, 2002.

GURCAN, Metin N. *et al.* Histopathological Image Analysis: A Review. **IEEE reviews in biomedical engineering**, Piscataway, v. 2, p. 147 – 171, 2009.

HAILU, A. Pre – and post – treatment antibody levels in visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 84, n. 5, p. 673 – 675, 1990.

HALEVY, Alon; NORVIG, Peter; PEREIRA, Fernando. The Unreasonable Effectiveness of Data. **IEEE Intelligent Systems**, Washington, v. 24, n. 2, p. 8 – 12, 2009.

HAMILTON, Peter W. *et al.* Digital pathology and image analysis in tissue biomarker research. **Methods**, San Diego, v. 70, n. 1, p. 59 – 73, 2014.

HAVAEI, Mohammad *et al.* Brain tumor segmentation with Deep Neural Networks. **Medical image analysis**, Amsterdã, v. 35, p. 18 – 31, 2017.

HO, M. *et al.* Prevalence and disease spectrum in a new focus of visceral leishmaniasis in Kenya. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 76, n. 6, p. 741 – 746, 1982.

JELINEK, T.; EICHENLAUB, S.; LÖSCHER, T. Sensitivity and specificity of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of visceral leishmaniasis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**, Berlim, v. 18, n. 9, p. 669 – 670, 1999.

KARIMI, Abdollah; ALBORZI, Abdolvahab; AMANATI, Ali. Visceral Leishmaniasis: An Update and Literature Review. **Archives of Pediatric Infectious Diseases**, Teerã, v. 4, n. 3, p. e31612, 2016.

KRIZHEVSKY, Alex; SUTSKEVER, Ilya; HINTON, Geoffrey E. ImageNet Classification with Deep Convolutional Neural Networks. **Advances in neural information processing systems**, Nova Iorque, v. 25, n. 2, p. 1097 – 1105, 2012.

KOCH, G.; ZEMEL, R.; SALAKHUTDINOV, R. Siamese neural networks for one – shot image recognition. In: 32<sup>th</sup> International Conference on Machine – Learning Deep Learning Workshop, 2015, Lille. **Anais**. Disponível em: <https://www.cs.cmu.edu/~rsalakhu/papers/oneshot1.pdf>. Acesso em: 16 jul. 2019.

KOÇAK, N. *et al.* Hemophagocytic syndrome associated with visceral leishmaniasis. **Indian pediatrics**, Nova Deli, v.41, n. 6, p. 605 – 607, 2004.

KOPTERIDES, P.; HALIKIAS, S.; TSAVARIS, N. Visceral leishmaniasis masquerading as myelodysplasia. **American journal of hematology**, Nova Iorque, v. 74, n. 3, p. 198 -199, 2003.

KUMAR, P. V. *et al.* Visceral leishmaniasis: bone marrow biopsy findings. **Journal of pediatric hematology / oncology**, Nova Iorque, v. 29, n. 2, p. 77 – 80, 2007.

LEMOS, Elenice Moreira *et al.* Avaliação do teste rápido utilizando o antígeno recombinante K39 no diagnóstico da leishmaniose visceral o Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 36, supl. 2, p. 36 – 38, 2003.

MARKLE, William H.; MAKHOUL, Khaldoun. Cutaneous Leishmaniasis: Recognition and Treatment. **American Family Physician**, Kansas City, v. 69, n. 6, p. 1455 – 1460, 2004.

MEHANIAN, Couroshe *et al.* Computer – Automated Malaria Diagnosis and Quantitation Using Convolutional Neural Networks. In: 2017 IEEE International Conference on Computer Vision Workshops (ICCVW), Veneza, 2017. **Anais**. São Francisco: IEEE, 2017. Disponível em: <https://ieeexplore.ieee.org/document/8265232>. Acesso em: 16 jul. 2019.

MORENO, Javier; ALVAR, Jorge. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in parasitology**, Cambridge, v. 18, n. 9, p. 399 – 405, 2002.

NEVES, David Pereira. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

ORGANIZAÇÃO PAN – AMERICANA DA SAÚDE. **Informe Epidemiológico das Américas**. Washington: OPAS, 2019. 8 p. Disponível em: <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/50505/2019-cde-leish-informe-epi-das-americas.pdf?sequence=2&isAllowed=y>. Acesso em 20 jun. 2019.

OZYÜREK, E. *et al.* Hemophagocytic lymphohistiocytosis associated with visceral leishmaniasis: a case report. **Pediatric hematology and oncology**, Washington, v. 22, n. 5, p. 409 – 414, 2005.

PIARROUX, R. *et al.* Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral Leishmaniasis in immunocompromised patients. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 32, n. 3, p. 746 – 749, 1994.

PINTADO, V.; LÓPEZ – VÉLEZ, P. HIV – associated visceral leishmaniasis. **Clinical Microbiology and Infection**, Basileia, v. 7, n. 6, p. 291 – 300, 2001.

QUINN, John A. *et al.* Deep Convolutional Neural Networks for Microscopy – Based Point of Care Diagnostics. *In: 1<sup>st</sup> Machine Learning for Healthcare Conference*, Los Angeles, 2016. **Anais**. [s. l.]: [s. n.], 2016. Disponível em: <http://proceedings.mlr.press/v56/Quinn16.html>. Acesso em: 16 jul. 2019.

RASMUSSEN, C. E. Gaussian Processes in Machine Learning. *In: BOUSQUET, O.; von LUXBURG, U.; RÄTSCH, G. (ed.). Advanced Lectures on Machine Learning*. Berlim: Springer, 2004. Disponível em: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-28650-9\\_4](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-28650-9_4). Acesso em: 16 jul. 2019.

ROCHA FILHO, Francisco Dário *et al.* Bone marrow fibrosis (pseudo – myelofibrosis) in human kala-azar. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 33, n. 4, p. 363 – 366, 2000.

SCOTT, Jeannine M. *et al.* A Rapid and Simple Diagnostic Test for Active Visceral Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Arlington, v. 44, n. 3, p. 272 – 277, 1991.

SHAH, Amit *et al.* Deeply learnt hashing forests for content based image retrieval in prostate MR images. *In: SPIE Medical Imaging*, 2016, San Diego. **Anais, volume 9784, Medical Imaging 2016: Image Processing**. Orlando: SPIE, 2016. Disponível em: <https://www.spiedigitallibrary.org/conference-proceedings-of-spie/9784/978414/Deeply-learnt-hashing-forests-for-content-based-image-retrieval-in/10.1117/12.2217162.short>. Acesso em 01 jul. 2019.

SHAHRIAR, D. *et al.* Cytological clues of bone marrow findings in Kala-Azar. **Diagnostic cytopathology**, Nova Iorque, v. 20, n. 4, p. 208 – 211, 1999.

SILVA, Mauro Roberto B.; STEWART, Jay M.; COSTA, Carlos Henrique N. Sensitivity of Bone Marrow Aspirates in the Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Arlington, v. 72, n. 6, p. 811 – 814, 2005.

SILVEIRA, Lindon JohnsonDiniz *et al.* Historical series of patients with visceral leishmaniasis treated with meglutime antimoniate in a hospital for tropical diseases, Maceió – AL, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 57, n. 1, p. 33 – 38, 2015.

SIPAHI, T.; TAVIL, B.; OKSAL, A. Visceral leishmaniasis and pseudomonas septicemia associated with hemophagocytic syndrome and myelodysplasia in a Turkish child. **The Turkish journal of pediatrics**, Ancara, v. 47, n. 2, p. 191 – 194, 2005.

SIRINUKUNWATTANA, K. *et al.* Locality Sensitive Deep Learning for Detection and Classification of Nuclei in Routine Colon Cancer Histology Images. **IEEE transactions on medical imaging**, Nova lorque, v. 35, n. 5, p. 1196 – 1206, 2016.

SUN, Q. *et al.* Using deep learning for content – based medical image retrieval. *In: SPIE Medical Imaging, 2017, Orlando. Anais, volume 10138, Medical Imaging 2017: Imaging Informatics for Healthcare, Research, and Applications.* Orlando: SPIE, 2017. Disponível em: <https://www.spiedigitallibrary.org/conference-proceedings-of-spie/10138/1013812/Using-deep-learning-for-content-based-medical-image-retrieval/10.1117/12.2251115.short?SSO=1>. Acesso em 01 jul. 2019.

SUNDAR, S. Diagnosis of Kala-azar – an important stride. **The Journal of the Association of Physicians of India**, Bombaim, v. 51, p. 753 – 755, 2003.

SUNDAR, S. *et al.* Evaluation of a new rapid immunochromatographic diagnostic test (Diamed – it Leish) for Indian visceral leishmaniasis and PKLD. *In: ASTMH 52<sup>nd</sup> Annual Meeting, 2003, Philadelphia. Anais.* Belo Horizonte: DiaMed, 2003. Disponível em: <http://www.diamed.com.br/cmi/Pagina.aspx?387>. Acesso em 20 jun. 2019.

SUNDAR, S. *et al.* Immunochromatographic strip-test detection of anti – K39 antibody in Indian visceral leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Abingdon, v. 96, n. 1, p. 19 – 23, 2002.

SUNDAR, S. *et al.* Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. **The Lancet**, Londres, v. 351, n. 9102, p. 563 – 565, 1998.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 9, n. 5, p. 951 – 958, 2002.

TAIGMAN, Yaniv *et al.* DeepFace: Closing the Gap to Human – Level Performance in Face Verification. *In: 2014 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition, 2014, Columbus. Anais.* Nova lorque: IEEE, 2014. Disponível em: <https://ieeexplore.ieee.org/document/6909616>. Acesso em: 01 jul. 2019

TALARI, Safar Ali; SADR, Fakhroddin. Treatment of Cutaneous Leishmaniasis: Effectiveness, and Adverse Effects of the Drugs. **Journal of Kashan University of Medical Sciences**, Caxã, v. 9, n. 1, p. 85 – 94, 2005.

VAZQUEZ NOGUERA, José Luis *et al.* Mathematical morphology for counting Trypanosoma cruzi amastigotes. *In: 2013 XXXIX Latin American Computing Conference (CLEI), 2013, Naiguata. Anais.* Nova lorque: IEEE, 2013. Disponível em: <https://ieeexplore.ieee.org/document/6670646>. Acesso em: 16 jul. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmania and HIV in gridlock**. Genebra: WHO, 1998. Disponível em: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/64104/WHO\\_CTD\\_LEISH\\_98.9\\_ADD.1.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/64104/WHO_CTD_LEISH_98.9_ADD.1.pdf?sequence=1&isAllowed=y). Acesso em 20 jun. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Genebra, 16 jun. 2019. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em 20 jun. 2019.

XUE, Yao; RAY, Nilanjan. Cell Detection with Deep Convolutional Neural Network and Compressed Sensing. **ArXiv**, Nova Iorque, 2017. Disponível em: <https://arxiv.org/abs/1708.03307>. Acesso em: 01 jul. 2019.

YARALI, N. *et al.* Myelodysplastic features in visceral leishmaniasis. **American journal of hematology**, Nova Iorque, v. 71, n. 3, p. 191 -195, 2002.

ZIJLSTRA, E. *et al.* Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan. **Tropical medicine & international health: TM & IM**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 108 – 113, 2001.

ZIJLSTRA, E. *et al.* rK39 Enzyme – Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of *Leishmania donovani* Infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 5, n. 5, p. 717 – 720, 1998.

## APÊNDICE A – DISPENSA DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisador Responsável: Thiana Tenório Marinho

Endereço: R Sta Fernanda, 460, Edf. Vogue, Apt. 902.

CEP: 57035 – 670 – Maceió, Alagoas

Fone: (82) 999721610

E-mail: marinhotiana@hotmail.com

Solicito a dispensa da aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do projeto de pesquisa intitulado “Correlação entre Aspectos Clínicos Laboratoriais e o Diagnóstico da Leishmaniose Visceral através da Modelagem Computacional” com a seguinte justificativa: Ex.: Trata-se de pesquisa retrospectiva com uso de prontuários e laudos de exames.

Declaro:

- a) Que o acesso aos dados registrados em prontuários de pacientes em bases de dados para fins da pesquisa científica será feito somente após aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética;
- b) O acesso aos dados será supervisionado por uma pessoa que esteja plenamente informada sobre as exigências de confiabilidade;
- c) Assegurar o compromisso com a privacidade e a confidencialidade dos dados utilizados preservando integralmente o anonimato e a imagem do sujeito bem como a sua não estigmatização;

- d) Assegurar a não utilização as informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades, inclusive em termos de autoestima, de prestígio e/ou econômico-financeiro;
- e) O pesquisador responsável estabeleceu salvaguardas seguras para confidencialidades dos dados de pesquisa;
- f) Os dados obtidos na pesquisa serão usados exclusivamente para finalidade prevista no protocolo;
- g) Os dados obtidos na pesquisa somente serão utilizados para o projeto vinculado.

Devido à impossibilidade de obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de todos os sujeitos, assino este termo para salvaguardar seus direitos.

---

Thiana Tenório Marinho  
Pesquisador responsável

Maceió, 08 de abril de 2019.

**APÊNDICE B – DECLARAÇÃO DE CUMPRIMENTO DAS NORMAS DA  
RESOLUÇÃO 466/12, PUBLICIZAÇÃO DOS RESULTADOS E SOBRE O USO DE  
DESTINAÇÃO DO MATERIAL / DADOS COLETADOS**

Thiana Tenório Marinho, pesquisadora responsável, e Michelle Jacintha Cavalcante Oliveira, orientadora, pesquisadores do projeto intitulado “Correlação entre Aspectos Clínicos Laboratoriais e o Diagnóstico da Leishmaniose Visceral através da Modelagem Computacional”, ao tempo em que nos comprometemos em seguir fielmente os dispositivos da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/MS, asseguramos que os resultados da presente pesquisa serão tornados públicos sejam eles favoráveis ou não, bem como declaramos que os dados coletados para o desenvolvimento do projeto, imagens das lâminas de mielograma, dados clínicos e laboratoriais serão utilizados para criar instrumentos para diagnóstico laboratorial de leishmaniose visceral através de técnicas de modelagem computacionais a partir das imagens fotografadas das lâminas dos pacientes e após o desenvolvimento dessa técnica para identificação do parasita correlacionaremos com outros achados laboratoriais e clínicos dos pacientes e, após a conclusão da pesquisa, serão armazenados em banco de imagem e ficarão na posse do pesquisador por um período de 5 anos. As lâminas utilizadas na pesquisa são de guarda permanente do Hemoal, sem prazo para descarte.

Maceió, 05 de janeiro de 2019.

---

Thiana Tenório Marinho  
Pesquisador responsável

---

Michelle Jacintha Cavalcante Oliveira  
Orientadora

**APÊNDICE C – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS****Dados do Mielograma:**

Caso Clínico Nº: \_\_\_\_\_

1. Paciente:
2. Sexo:
3. Idade:
4. Qualidade do aspirado: ( ) Celular ( ) Diluído ( ) Seco
5. Celularidade: ( ) Normal ( ) Aumentada ( ) Diminuída
6. Relação G:E:
7. Eritropoese:
8. Mielopoese:
9. Megacariocitos:
10. Linfocitos:
11. Plasmocitos:
12. Macrófagos:
13. Parasita índice: ( ) 1 – 5 / 100x ( ) 5 – 10 / 100x ( ) > 10 / 100x
14. Intrahistiocytic LD Bodies: ( ) Present ( ) Absent
15. Extra e Intrahistiocytic LD Bodies: ( ) Present ( ) Absent
16. Haemophagocytosis: ( ) Present ( ) Absent
17. Eosinofilia: ( ) Present ( ) Absent
18. LD Bodies: ( ) Present ( ) Absent
19. Diseritropoese: ( ) Present ( ) Absent
20. Blastos:
21. Reedsteinbery like cells: ( ) Present ( ) Absent
22. Observações:
23. Fotos:

**Dados Clínicos e Laboratoriais:**

Caso Clínico Nº: \_\_\_\_\_

1. Febre: ( ) Presente ( ) Ausente
2. Esplenomegalia: ( ) Presente ( ) Ausente
3. Hepatomegalia: ( ) Presente ( ) Ausente
4. Sangramento: ( ) Presente ( ) Ausente
5. Anemia: ( ) Presente ( ) Ausente
6. Grau de Anemia:
7. Leucopenia: ( ) Presente ( ) Ausente
8. Neutropenia: ( ) Presente ( ) Ausente
9. Grau de Neutropenia:
10. Linfopenia: ( ) Presente ( ) Ausente
11. Grau de Linfopenia:
12. Plaquetopenia: ( ) Presente ( ) Ausente
13. Grau de Plaquetopenia:

## ANEXO A – FORMULÁRIO DE SOLICITAÇÃO DE MIELOGRAMA

 <b>HEMOAL</b> ESTADO DE ALAGOAS SECRETARIA DE SAÚDE GERENTE DA HEMORREDE	<b>FORMULÁRIO DE SOLICITAÇÃO DE MIELOGRAMA</b>	<b>Código: FSM289</b>
		<b>Página 1 de 1</b>

### DADOS DO PACIENTE:

Nome: \_\_\_\_\_ Reg.: \_\_\_\_\_

Data de Nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Data Coleta: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Indicação Clínica: \_\_\_\_\_

Diagnóstico ( ) Controle ( )

### DADOS CLÍNICOS:

Febre ( ) Sangramento ( ) Dores Ósseas ( ) Esplenomegalia ( )

Adenomegalias( ) Hepatomegalia ( ) Outros: \_\_\_\_\_

### DADOS LABORATORIAIS:

- Eritrograma: Hb = \_\_\_\_\_ g/dl HT = \_\_\_\_\_ %
- Leucócitos: \_\_\_\_\_/mm<sup>3</sup> PM \_\_\_\_\_ % Mielo \_\_\_\_\_ % Meta \_\_\_\_\_ % Bast \_\_\_\_\_ %  
 Seg \_\_\_\_\_ % Linf \_\_\_\_\_ % LinfAtip \_\_\_\_\_ % Monoc. \_\_\_\_\_ % Eos \_\_\_\_\_ % Baso \_\_\_\_\_ %
- Bastos: Não ( ) Sim ( )
- Plaquetas: \_\_\_\_\_/mm<sup>3</sup>
- Outros: \_\_\_\_\_

### DADOS DA COLETA:

Local da Punção: Esterno ( ) Cipd ( ) Cipe ( ) Outro: \_\_\_\_\_

Resistência Óssea: Normal ( ) Diminuída ( ) Aumentada ( )

**MÉDICO(A) SOLICITANTE:** \_\_\_\_\_