

CLASSIFICAÇÃO DE COLORAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA COMBINANDO COR E TEXTURA COMO DESCRITOR

Marcelo Dornbusch Lopes^{1,2}, Aldo von Wangenheim^{1,2}, Leonardo Andrade Ribeiro³,
Antonio Carlos Sobieranski^{1,2} e Eros Comunello⁴

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência da Computação (PPGCC),
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brasil

²Instituto Nacional para Convergência Nacional (INCoD),
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brasil

³Instituto de Informática, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Brasil

⁴Mestrado em Computação Aplicada (MCA),
Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), Itajaí, Brasil

Resumo: O presente trabalho teve por objetivo demonstrar a melhora no desempenho da classificação de coloração imuno-histoquímica em imagens microscópicas, utilizando a abordagem de aprendizado supervisionada que emprega a projeção polinomial da distância de Mahalanobis. Foi definido um descritor de características híbrido, combinando cor e textura baseada no método Local Binary Pattern, proporcionando inicialmente um descritor 23-dimensional para cada píxel. Uma análise de componentes principais foi realizada e um segundo descritor 12-dimensional foi empregado na avaliação. Os testes foram realizados em imagens e metadados obtidos no The Human Protein Atlas, avaliando uma série de medidas de acerto e erro. Com os resultados encontrados percebeu-se que a utilização do descritor híbrido tornou o processo de classificação mais específico e restritivo nas predições positivas.

Palavras-chave: Processamento de Imagem Assistida por Computador, Reconhecimento Automatizado de Padrão, Imuno-Histoquímica

Abstract: This study aimed to demonstrate the improvement in performance of immunohistochemical staining classification in microscopic images using a supervised learning approach that employs the polynomial projection of the Mahalanobis distance. A hybrid feature descriptor was defined by combining color and texture based on Local Binary Pattern method, initially provided a 23-dimensional descriptor, for each pixel. A principal component analysis was performed and a second 12-dimensional descriptor was used in the assay. The tests were performed on images and metadata, obtained on The Human Protein Atlas. With the results it can be seen that the use of hybrid descriptor has made the classification process more specific and restrictive on the positive predictions.

Keywords: Computer-Assisted Image Processing, Automated Pattern Recognition, Immunohistochemistry

Introdução

Na área médica, tipicamente o diagnóstico de câncer é feito pelo patologista através de uma inspeção visual da morfologia e cromaticidade de amostras de tecidos. Uma atividade laboriosa e sujeita a erro, onde a efetividade do método depende diretamente da atenção e conhecimento do patologista. O desenvolvimento contínuo em tecnologias relacionadas à bioimagem, especialmente na microscopia, vem estabelecendo técnicas guiadas por computador para avaliação de imagens biológicas como uma forma efetiva para extração de informações clínicas e funcionais a partir de amostras de tecido^{1,2}.

O desenvolvimento de tecnologias voltadas a sistemas para diagnóstico médico guiado por computador tornou-se um dos principais temas de pesquisa em imagens médicas e radiodiagnóstico, uma vez que cresce o consenso entre especialistas da área de análise de imagens e patologia sobre a importância da análise quantitativa de imagens patológicas. Essas análises envolvem tanto o ponto de vista do diagnóstico clínico, quanto à área de pesquisa, proporcionando o entendimento dos mecanismos biológicos das doenças³.

A Imuno-histoquímica (IHQ) é uma tecnologia aplicada no diagnóstico patológico desde a década de setenta, amplamente utilizada como uma ferramenta para a detecção de proteínas em amostras de tecido. A IHC Permite o monitoramento e a quantificação da expressão de proteínas com fins de diagnóstico e prognóstico. Os anticorpos são marcados com uma coloração específica, e a intensidade da referida expressão está relacionada com a intensidade da coloração alcançada no processo^{4, 5, 6}.

No trabalho proposto por Sobieranski⁷ é apresentada uma abordagem para identificação de coloração imuno-histoquímica em imagens microscópicas de amostra de pele. Baseado em um processo de aprendizado definido como Distância Polinomial de Mahalanobis (DPM), que emprega a projeção polinomial da Distância de Mahalanobis (DM) para a construção de uma função de similaridade.

O método DPM permite a classificação de padrões não lineares de IHQ em imagens microscópicas de histopatologia. A abordagem referida emprega atributos de cor no modelo cromático Vermelho, Verde e Azul (red, green e blue – RGB), como Descritores de Características (DC) para o treinamento da métrica de discriminação.

Desta forma o problema de pesquisa abordado neste trabalho está relacionado a classificação e mensuração automatizada da expressão biomarcadores em imagens microscópicas de imuno-histoquímica. Um biomarcador consiste em qualquer entidade, passível de ser mensurado e indica uma condição normal ou patológica, permitindo diagnóstico, prognóstico, planejamento no tratamento e pesquisa de doenças.

A solução desenvolvida neste trabalho, restringiu o escopo no reconhecimento de coloração de IHC, e teve por objetivo demonstrar a melhora no desempenho de classificação do método DPM (considerando taxas de acerto e erro), apresentado em Sobieranski⁷. O referido aprimoramento foi alcançado definindo um DC híbrido, combinando cor e textura.

Métodos

Trabalhos Relacionados – Uma revisão da literatura foi elaborada a partir de um protocolo de busca, onde 62 trabalhos entre 3 bases (ACM Digital Library, IEEEExplore e Science Direct) foram selecionados para análise preliminar. Destes 62, 20 foram selecionados para análise completa. O critério utilizado para inclusão dos trabalhos na análise completa foi: títulos e resumos deveriam conter informações sobre métodos e técnicas computacionais, empregados na quantificação de coloração imuno-histoquímica em imagens microscópicas.

Os critérios adotados para exclusão dos trabalhos, na fase de análise completa foram: trabalhos onde títulos e resumos eram conflitantes, ou seja, o título remetia a um assunto enquanto o resumo remetia a outro. Trabalhos que não tinham o foco voltado à segmentação e quantificação imuno-histoquímica, e ainda trabalhos especificamente voltados à área médica.

Dentre estes 20 trabalhos, foram selecionados 7 trabalhos relacionados, seguindo os critérios: (i) combinar informações de cor e textura como DC; e (ii) utilizar um método de classificação supervisionada. Dos 20 trabalhos avaliados 11 empregaram um método de classificação supervisionado (que depende de uma etapa de treinamento para construção do classificador)^{1, 5, 8}, baseados em redes neurais. Bem como baseados em SVM^{9, 10}.

Dos 20 trabalhos avaliados nove não usaram um método de classificação supervisionado, apresentando abordagens baseadas principalmente em três técnicas: (i) limiarização, com o método Otsu

como apresentado em¹¹; (ii) crescimento de regiões, principalmente baseado no algoritmo Watershed como apresentado em^{12, 13}; (iii) ou ainda uma combinação das técnicas (i) e (ii), como apresentado em¹⁴.

Dos 20 trabalhos avaliados 13 utilizam algum espaço de cor específico durante o processo de segmentação/classificação e seis empregam alguma métrica de textura no processo de segmentação/classificação, como apresentados em^{8, 10, 12, 15, 16, 17}. A maioria dos trabalhos avaliados empregam métodos que foram utilizados na proposta (segmentação/classificação supervisionada e descritores de características formados por atributos de cor e textura).

A Tabela 1 apresenta uma comparação entre os 7 trabalhos relacionados e a presente proposta (última linha), a coluna T indica o trabalho, a coluna Descritor indica o método empregado para descrição de características, a coluna Método indica quais abordagens de segmentação/classificação, e a coluna Avaliação indica as métricas de avaliação empregadas nos trabalhos.

Tabela 1: Comparação entre os trabalhos relacionados e a proposta.

T	Descritor	Método	Avaliação
RI ¹⁸	Cor YCbCr	Modelo estatístico de deconvolução, supervisionado.	Área sob a curva ROC.
RII ¹⁵	Textura de Laws, medidas estatísticas e Cor RGB	K-NN com votos ponderados, supervisionado.	Erro médio, Acurácia.
RIII ¹⁶	Cor RGB, Textura 2D-Gaussiana	BVS, k-Means clusterização, supervisionado	Erro Absoluto, Acurácia e Entropia
RIV ¹²	Cor HSV, Textura Matriz de Coocorrência, medidas estatísticas	K-Means, Watershed, não supervisionado.	Escore de similaridade.
RV ¹⁴	Cor RGB, Tons de cinza	Limiarização, Watershed supervisionado.	Média de distância absoluta, acurácia, super e sub segmentação
RVI ⁵	Cor RGB	MLP, supervisionado	Diferença em área de segmentação.
RVII ⁷	Cor RGB	DPM, supervisionado.	SEM, ESP e FIT.
P	Cor RGB, Textura LBP, medidas estatísticas	DPM, supervisionado.	SEM, ESP, PRE, ACC, TFP, TFD e TFN.

Os trabalhos RII, RIII ajudam a comprovar a viabilidade da proposta, uma vez que tem a mesma abordagem, empregando cor e textura com um método de classificação supervisionada. O trabalho RIV tem um princípio ligeiramente diferente por empregar um método não supervisionado de classificação. A diferença entre estes trabalhos e a presente proposta está no método de textura empregado e na composição do DC, bem como a utilização específica do algoritmo de classificação DPM.

Descritor de Características – Vetores de características são representados por letras maiúsculas como x , onde cada componente x_i , representa a i -ésima medida que compõem o descritor. Normalmente os vetores são expressos na forma de matrizes $n \times l$, a natureza de cada medida que compõem um vetor de características x depende da metodologia empregada para descrever o padrão físico propriamente dito¹⁹.

Um método popular na descrição de texturas encontrado na literatura é denominado Padrão Binário Local (Local Binary Pattern - LBP), onde um descritor invariante, baseado em níveis de cinza é composto através da comparação de um píxel central com seus píxeis vizinhos. O método LBP demonstra ser um descritor de baixa complexidade computacional e menos sensível a variações de luminosidade do que muitos descritores, sendo utilizado em muitas tarefas de classificação com resultados promissores^{20,21}.

As medidas estatísticas escolhidas para compor o DC foram baseadas nas mesmas utilizadas no trabalho relacionado RII¹⁵, média, desvio padrão, assimetria, curtose e energia. Tais medidas foram computadas em cinco vizinhanças distintas, a fim de descrever um único píxel. Desta forma o DC foi formado por três componentes de cor e vinte componentes de textura. A Figura 1 mostra uma visão geral da formação do DC.

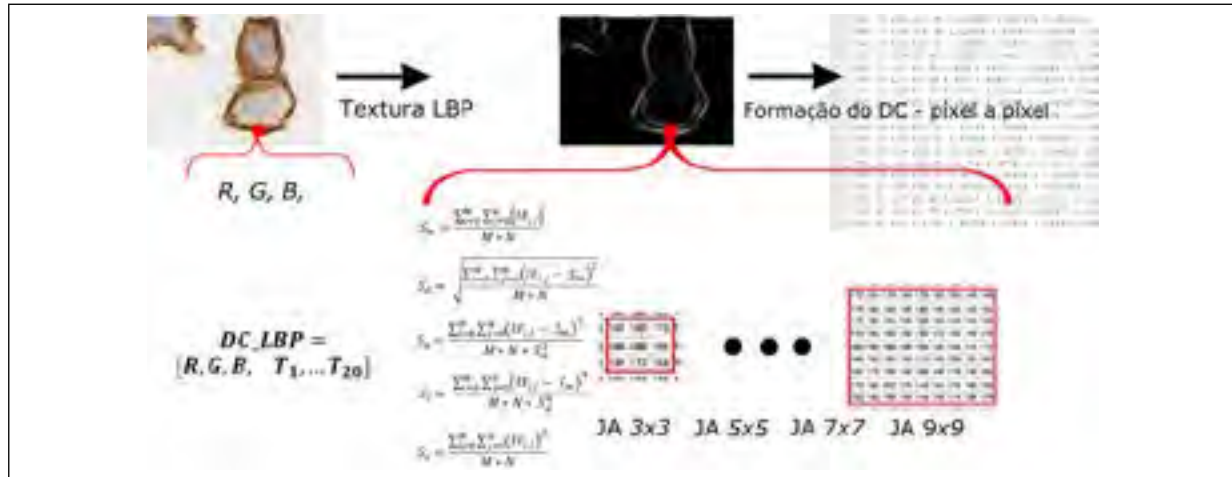


Figura 1: Visão geral da formação do DC

Classificador –O algoritmo para computar a DPM²² com a finalidade de calcular similaridade empregando polinomiais de grande ordem, considera um grupo de N descritores de características (x_1, x_2, \dots, x_N) e um x_0 usado para cálculos de covariância, a DPM entre dois descritores x_i e x_j é expressa por:

$$DPM(x_i, x_j) = DM_{\sigma^2}(x_i, x_j) + \sum_{l=1}^L DM_{\sigma^2}(g_l^i, g_l^j) \quad (1)$$

onde DM_{σ^2} , representa a distância de Mahalanobis computada com um pequeno escalar positivo σ^2 usado para anular limitações de inversão de matrizes se algum valor for zero, $L > 0$ é o número máximo de projeções de q -ordem ($q = 2L$), e os argumentos g_l^i e g_l^j são as projeções dos descritores de características x_i e x_j em seus termos polinomiais.

O processo de reconhecimento empregado ocorre em duas etapas: (i) Treinamento e (ii) Classificação, seguindo a mesma abordagem do trabalho relacionado RVII⁷, diferindo no descritor de característica utilizado. A etapa (i) é subdividida em duas fases: (i-a) geração dos descritores e (i-b) calibração do modelo. A Figura 2 mostra uma visão geral do processo de classificação.

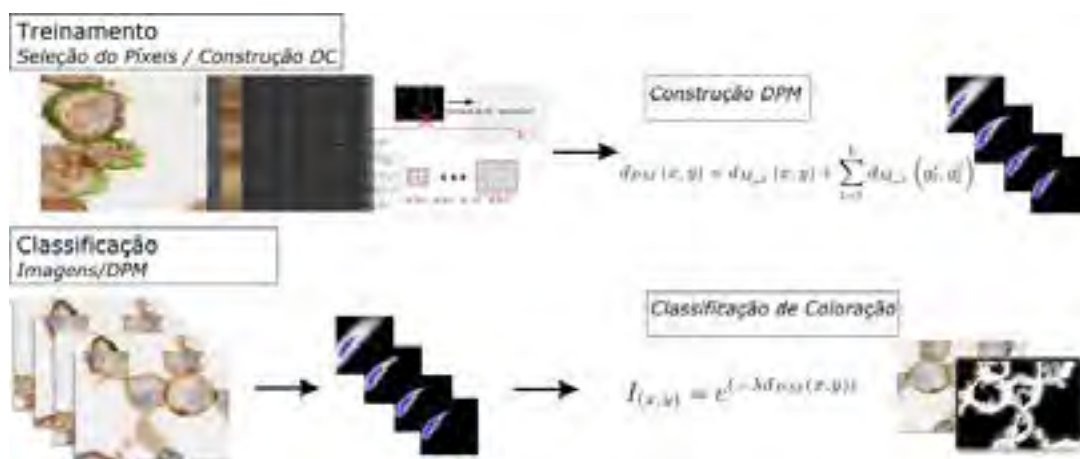


Figura 2: Visão geral da formação do DC

Na fase (i-a) são gerados os DC para formar o conjunto de treinamento, estes dados serão usados como entrada no processo de aprendizagem da métrica de distância. A Figura 2 ilustra uma imagem original, a seleção de pontos para treinamento (marcados em verde). Todos os píxeis selecionados no espaço de cor RGB e combinados com as medidas estatísticas relacionadas a textura LBP.

Na fase (i-b) da etapa de treinamento ocorre a calibração do modelo onde a métrica de distância é estabelecida. A Figura 2 ilustra a construção dos mapas polinomiais para cada ordem, onde os pontos em azul correspondem a distribuição do padrão alvo, os pontos dentro da área branca são considerados pertencentes ao padrão alvo, as áreas em preto são consideradas não pertencentes (as quatro imagens a direita, com ordens polinomiais distintas).

Na etapa (ii) classificação, ocorre a computação do cálculo de similaridade, para cada DC que representa um píxel, em um mapa polinomial de ordem q específico. Desta forma, para cada imagem processada é criada uma imagem de similaridade que define as áreas segmentadas de acordo com o padrão de coloração alvo aprendido.

Altas ordens polinomiais proporcionam diferenças significativas entre vetores de cor não similares, esta diferença aumenta de acordo com a ordem polinomial (q) escolhida. Portanto uma normalização é efetuada conforme:

$$I_{(xy)} = e^{(-\lambda d_{PM}(xy))} \quad (2)$$

onde a d_{PM} representa a DPM, $\lambda > 0$ representa um parâmetro de contraste para refinar o mapa polinomial. Esta normalização resulta em um valor variando entre 0 e 1 (para cada píxel (x,y)), vetores de cor similares são próximo de 1 e não similares próximo de 0.

Experimentos – Todo o Conjunto de Dados (CD) selecionado para avaliação neste trabalho foi extraído do Human Protein Atlas (HPA)²³. As imagens utilizadas são relativas ao gene CD44, a proteína codificada por este gene é classificada como um biomarcador para candidato a câncer. Estas imagens proveem de 56 linhas de células distintas, de origens variadas (p. ex. cérebro, fígado, mama, pele), e são relacionadas ao anticorpo CAB000316.

Foram utilizadas imagens da categoria linha de célula do HPA, onde são fornecidas imagens de sobreposição (metadados), com anotação píxel a píxel. O conjunto de imagens empregados nos experimentos foi composto por 24 imagens com dimensões de 508x508 píxeis com suas respectivas imagens de anotações, bem como uma imagem distinta para a extração do conjunto de treinamento.

Três grupos de experimentos foram elaborados para avaliar o DC definido: (i) Dimensionalidade, que consistiu em avaliar o grau de importância que cada dimensão do DC tinha em relação a representatividade do padrão de interesse; (ii) Desempenho, que consistiu em executar uma série de testes avaliando o resultado de classificação; e (iii) Variância que consistiu em uma análise de variância entre os testes realizados no segundo experimento.

Dimensionalidade - Em análises estatísticas conjuntos de dados com altos espaços dimensionais podem ser simplificados empregando um método definido como Análise de Componentes Principais (Principal Component Analysis - PCA)²⁴. A ideia principal consiste em prover um subespaço em que a maior parte da informação seja retida, uma vez que as medidas originais sejam projetadas neste subespaço.

O descritor definido inicialmente foi composto por 23 medidas, este experimento consistiu em avaliar a representatividade dos 20 componentes compostos por medidas estatísticas relativas ao filtro de textura, propondo um segundo DC representativo e reduzido.

Desempenho – Usualmente a medida de acurácia é a mais comum para avaliação de classificadores, entretanto ela não é suficiente quando existe um desbalanceamento entre as classes, conforme o corre nas imagens selecionadas para avaliação. Nestes casos medidas mais recomendadas são Precisão e Recall²⁵.

Dois experimentos relacionados ao desempenho de classificação foram executados: (i) Classificação Piloto (C-PI); e (ii) Classificação Principal (C-PR). O experimento C-PI teve a finalidade de definir o tamanho do conjunto de treinamento e a combinação de parâmetros, para a execução do experimento C-PR.

Para a análise do desempenho de classificação foram computadas as medidas de Sensitividade (SEN), Especificidade (ESP), Precisão (PRE), Acurácia (ACC), Taxa de Falso Positivo (TFP), Taxa de Falsa Descoberta (TFD) e Taxa de Falso Negativo (TFN). A Figura 3 mostra uma iteração dos experimentos realizados.

Todo o conjunto de imagens foi classificado pixel a pixel (C-PI e C-PR), gerando uma imagem de predição (Figura 3). Esta imagem foi confrontada com a imagem respectiva anotada (HPA), estabelecendo os valores de Verdadeiro Positivo (VP), Verdadeiro Negativo (VN), Falso Positivo (FP) e Falso Negativo (FN). Estes valores foram utilizados para calcular as medidas utilizadas na análise de desempenho.

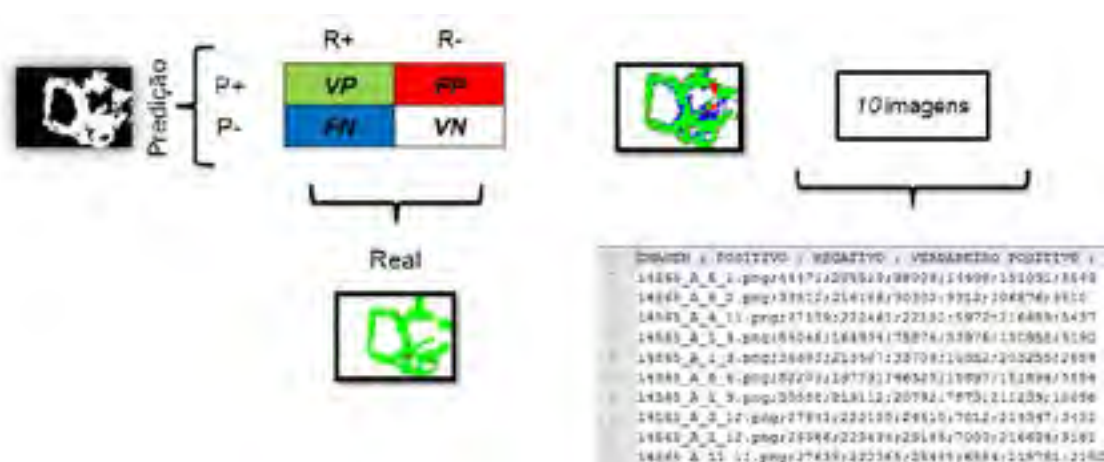


Figura 3: Experimento de Desempenho

No teste piloto de classificação foi utilizado um grupo de 10 imagens, para avaliar o comportamento dos três descritores (RGB, RGB-LBP completo, e o primeiro descritor reduzido), em combinações distintas de parâmetros.

Variância – O teste de hipótese pode assumir dois valores: H_0 , como hipótese nula ou verdadeira; ou H_a , como hipótese alternativa. Para aceitar a hipótese alternativa, o desempenho de classificação do método DPM, combinado com um descritor de características híbrido (cor mais textura), deve ser maior que o desempenho de classificação que considera o descritor simples (utilizando somente cor).

O experimento de Variância avaliou as medidas de Sensitividade, Especificidade, Precisão e Acurácia (medidas de acerto), bem como as medidas de Taxas de Falso Positivo, Falso Negativo e Falsa Descoberta.

O teste escolhido para o experimento de variância foi o Mann-Whitney (MW) ou Wilcoxon-Mann-Whitney, onde a ideia principal foi avaliar a posição central de duas populações, as hipóteses foram colocadas como:

$$H_0 : n_1 = n_2 \quad H_a : n_1 \neq n_2 \quad (3)$$

onde n_1 e n_2 são as medianas das populações 1 e 2 respectivamente, e H_a pode ser avaliada unilateralmente com $n_1 > n_2$ ou $n_1 < n_2$ de acordo com o que se deseja provar.

A hipótese nula neste experimento partiu do princípio que as variâncias entre as populações são iguais, ou seja, o desempenho de classificação dos descritores avaliados é o mesmo. Já a hipótese

alternativa investigada indica que o desempenho de classificação com o descritor baseado no método LBP é melhor do que o desempenho com o descritor que considera somente os valores de RGB, formalmente $n_2 > n_1$. Com estas definições foi possível calcular a estatística U do teste considerando um grau de confiança alfa de 0.05.

Resultados e Discussões

O descritor definido inicialmente foi composto por 23 valores, um dos experimentos planejado consistiu em avaliar a representatividade dos 20 componentes compostos por medidas estatísticas relativas ao filtro de textura. O método utilizado no experimento foi a Análise de Componentes Principais e teve como objetivo investigar a relevância de cada uma destas 20 medidas em relação ao padrão descrito.

No Figura 4 é mostrado o resultado do experimento de PCA, o eixo y relaciona os autovalores para cada componente resultante (eixo x). A linha em vermelho mostra a variabilidade acumulada do padrão descrito, ao longo das 20 componentes.

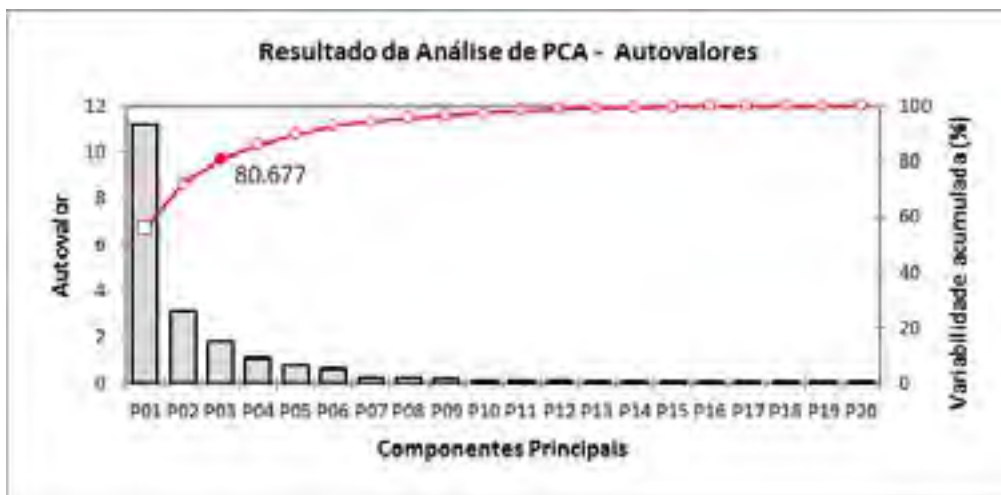


Figura 4: Resultado da análise de componentes principais sobre o DC

Como pode ser observado no gráfico da Figura 4, 80.677% (ponto preenchido com vermelho) da variabilidade (representatividade) do padrão descrito estavam contidas nas três primeiras componentes principais (P01, P02 e P03).

Um segundo descritor híbrido, combinando cor e textura foi definido (reduzido), baseado nas três medidas com maiores valores de contribuição, observadas na avaliação de PCA. Este novo descritor considerou as medidas de média, desvio padrão e energia nas janelas de 5x5 até 9x9. Este segundo descritor foi utilizado no experimento de desempenho principal, e definido por: DESC_MDE.

De acordo com os resultados encontrados durante o experimento piloto foi definido o experimento principal, com um conjunto de 23 imagens distintas das 10 imagens avaliadas preliminarmente. O conjunto de treinamento foi mantido o mesmo, 5100 amostras extraídas de uma imagem não considerada nos testes (preliminar ou principal). A Tabela 2 apresentou **à média, o desvio padrão, e a variância das medidas avaliadas**.

Na Tabela 2 é possível observar uma maior média nas medidas de ESP e PRE quando foi utilizado o descritor baseado no método LBP, nas demais medidas de acerto, a maior média foi encontrada com a utilização do descritor considerando somente os valores de cor RGB. Nas medidas de erro, as menores médias encontradas para T-FP e T-FD foram observadas empregando o descritor baseado no método LBP.

Tabela 2. Resultados do Experimento principal (média para 23 imagens)

	SEN	ESP	PRE	T-PN	T-FP	T-FD	T-FN	ACC	F1	MCC
DESC-MDE										
Média	0.701	0.991	0.866	0.978	0.008	0.134	0.022	0.971	0.767	0.761
Desvio	0.120	0.004	0.0332	0.007	0.004	0.033	0.008	0.007	0.074	0.065
Variância	0.0145	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.005	0.004
DESC-RGB										
Média	0.855	0.983	0.802	0.989	0.017	0.197	0.010	0.974	0.822	0.812
Desvio	0.100	0.007	0.045	0.006	0.007	0.045	0.006	0.007	0.046	0.045
Variância	0.010	0.001	0.002	0.001	0.001	0.002	0.001	0.001	0.002	0.002

O teste de variância foi realizado para as medidas de Precisão, Especificidade, Sensitividade e Acurácia. Com o teste de hipóteses realizado foi possível comprovar aumento no desempenho de classificação segundo a medida de precisão, quando utilizando o DC híbrido. Para as outras medidas assertivas não se observou diferença significativa. Para as medidas de erro, comprovou-se uma melhora de desempenho significativa, considerando as medidas de T-FN e T-FD. Para a medida de T-FP não se observou uma diferença significativa. Todos os testes de hipóteses foram efetuados utilizando o método não paramétrico Mann-Whitney, considerando um nível de significância alfa de 0.05.

Conclusão

Durante a execução do teste piloto, pode-se observar uma melhora no desempenho de classificação utilizando o descritor LBP, entretanto esta melhora não foi incondicional. Foi observada uma melhora nas medidas de Especificidade (Taxa de Verdadeiro Positivo) e Precisão. Já nas medidas de erros, o maior desempenho (menor valor, o que se espera de uma taxa de erro) encontrado utilizando o descritor RGB foi observado apenas na medida Taxa Falso Negativo.

Com o teste de hipóteses realizado foi possível comprovar a melhoria de desempenho de classificação segundo a medida de precisão, quando utilizando o DC híbrido. Para as outras medidas assertivas não se observou diferença significativa.

Para as medidas de erro, comprovou-se uma melhora de desempenho significativa com o DC híbrido, considerando as medidas de T-FN e T-FD. Para a medida de T-FP não se observou uma diferença significativa. Todos os testes de hipóteses foram efetuados utilizando o método não paramétrico Mann-Whitney, considerando um nível de significância alfa de 0.05. A escolha deste método deveu-se a característica de não balanceamento entre as classes.

A presente abordagem foi pensada para ser utilizada em um contexto maior de telemedicina. Como expectativa espera-se integrar o presente descritor de características a uma ferramenta Web para identificação de coloração imuno-histoquímica em imagens de alta resolução (que podem atingir valores entre 40Gb e 100 Gb, com dimensões de até 65000 x 45000 píxeis), projetada para o conceito de telepatologia, que vem sendo desenvolvida e encontra-se em fase de integração com o Sistema de Telemedicina e Telessaúde de Santa Catarina^{26, 27}.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro a este projeto.

Referências

- [1] Mouelhi A, Sayadi M, Mrad K, Romdhame B. K. Automatic image segmentation of nuclear stained breast tissue sections using color active contour model and an improved watershed method. *Biomed Signal Process Control*. 2013; 8(5):421-436.
- [2] Cataldo SD, Ficarra E, Macii E. Computer-aided techniques for chromogenic Immunohistochemistry: Status and Directions. *Comput Biol Med*. 2012; 42(10):1210-1225.
- [3] Gurcan M, Boucheron L, CAN A, Madabhushi A., Rajpoot N, Yener B. Histopathological image analysis: A review. *IEEE Rev Biomed Eng*. 2009; 2:147-171.
- [4] Liu B, Wang W, Fang X. Automatic extraction of positive cells in tumor immunohistochemical pathology image based on ycbcr. *WCICA 2006: Proceedings of the 6th World Congress On Intelligent Control And Automation*; 2006 Jun- 21-23, Dalian, China. IEEE; 2006. p. 9708–9712.
- [5] Wemmert C, Krüger JM, Forestier G, Sternberger L, Feuerhake F, Gançarski P. Stain unmixing in brightfield multiplexed immunohistochemistry. *ICIP 20013: Proceedings of the 20th IEEE International Conference On Image Processing*; 2013 Sep 15-18, Melbourne, Australia. IEEE; 2013. p. 1125 - 1129.
- [6] Ficarra E, Macii E, Computer-aided evaluation of protein expression in pathological tissue images. *CBMS 2006: Proceedings of the 19th International Symposium on Computer-based Medical Systems*; Jun 20-22, Porto, Portugal. IEEE; 2006. p. 413–418.
- [7] Sobieranski A, Neto SLM, Coser L, Comunello E, Wangenheim AV, Ferreira EC, et al. Learning a nonlinear color distance metric for the identification of skin immunohistochemical staining. *CBMS 2009: Proceedings of the Computer-based Medical Systems*; Aug 3-4, Albuquerque, USA. IEEE; 2009. p. 1-7.
- [8] Jitaree, S.; Phinyomark, A.; Thongnoo, K.; Boonyapiphat, P.; Phukpattaranont, P. Classifying breast cancer regions in microscopic image using texture analysis and neural network. *BMEICON 2013: Proceedings of the 6th International Conference on Biomedical Engineering*, 2013. p. 1–4.
- [9] Mete, M.; Topaloglu, U. Statistical comparison of color model-classifier pairs in hematoxylin and eosin stained histological images. *CIBCB 2009: Proceedings of the 9th IEEE Symposium on Computational Intelligence in Bioinformatics and Computational Biology*. Neshville, IEEE Computational Intelligence Society, 2009, p. 284 – 291.
- [10] Hui, W.; Zhiguo, Z.; Longmei, J. Automatic detection of lumina in mouse liver immunohistochemical color image using support vector machine and cellular neural network. *CIS 2011: Proceedings of the International Conference on Computational Intelligence and Security*. 2011, Hainan, China. IEEE; 2013, p. 1086–1090.
- [11] Dong, J.; Li, J.; Fu, A.; Lv, H. Automatic segmentation for ovarian cancer immunohistochemical image based on yuv color space. *ICBECS 2010: Proceedings of the International Conference on Biomedical Engineering And Computer Science*; 2010, Apr 23-25, Wuhan, China. p. 1–4.
- [12] Samsi S, Lozanski G, Shanarah A, Krishanmurthy AK, Gurcan MN. Detection of follicles from IHQ-stained slides of follicular lymphoma using iterative watershed. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2010; 57(10): 2609–2612.

- [13] Zhao, P.; Mao, K.Z.; Koh, T. S.; Tan, P. H. Automatic cell analysis for p53 immunohistochemistry in bladder inverted papilloma. IEEE EMBS 2003: Proceedings of the IEEE Asian-Pacific Conference on Biomedical Engineering. Oct 20-22, IEEE2003, p. 168-169.
- [14] Mao K, Zhao P, Tan PH. Supervised learning-based cell image segmentation for p53 immunohistochemistry. IEEE Trans Biomed Eng. 2006; 53(6):1153–1163.
- [15] Kostopoulos S, Cavouras D, Daskalakis A, Bougioukos P, Georgiadis P, Kagadis GC, et al. Colour-texture based image analysis method for assessing the hormone receptors status in breast tissue sections. EMBS 2007: Proceedings of the 29th Annual International Conference on Engineering In Medicine And Biology Society; 2007 Aug 22-26, Lyon, França. p. 4985–4988.
- [16] Amaral T, Mckenna SJ, Robertson K, Thompson A. Classification and Immunohistochemical scoring of breast tissue microarray spots. IEEE Trans Biomed Eng. 2013; 60(10):2806–2814.
- [17] Signolle, N.; Revenua, M.; Plancoulaine, B.; Herlin, P. Wavelet-based multiscale texture segmentation: Application to stromal compartment characterization on virtual slides. Signal Processing. v.90, i.8, p.2412-2422, 08/2010.
- [18] Shu J, Qiu G, Mohammad I. A Semi-automatic Image Analysis Tool for Biomarker Detection in Immunohistochemistry Analysis. ICGI 2013: Proceedings of the International Conference On Image And Graphics; 2013 Jul 26-28, Shandong, China. Elsevier Science; 2013. p. 937–942.
- [19] Gonzalez RC; Woods RE. Processamento Digital de Imagens. 3. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2010.
- [20] Gu J, Liu C. Feature local binary patterns with application to eye detection. Neurocomputing, 2013; 113:138-152.
- [21] Nanni L. Brahnam S, Lumini A. A simple method for improving local binary patterns by considering non-uniform patterns. Pattern Recognit. 2012; 45:2012.
- [22] Grudic GZ, Mulligan J. Outdoor Path Labeling Using Polynomial Mahalanobis Distance. Robotics: Science and Systems II, pp. 16-19, 2006.
- [23] Pontén F, Jirstrom K, Uhlen M. J Pathol. 2008; 216(4): 387-393.
- [24] Pearson K. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. Philosophical Magazine, 1901; 2(6):559-572.
- [25] Arbel R, Rokach L. Classifier evaluation under limited resources. Pattern Recognit Lett. 2006; 27:1619-1631.
- [26] Maia RS, Wangenheim AV, Nobre LF. A state wide telemedicine network for public health in Brazil. CBMS 2006: Proceedings of the 19th International Symposium on Computer-based Medical Systems; Jun 20-22, Porto, Portugal. IEEE; 2006. p. 495-500.
- [27] Wallauer J, Macedo D, Andrade R, Wangenheim AV. Creating a statewide public health record starting from a telemedicine network. IT Professional. 2008; 10(2):12–17.;

Contato

Marcelo Dornbusch Lopes, Universidade
Federal de Santa Catarina – UFSC, Campus
Universitário Trindade, Departamento de
Informática e Estatística – sala 320, 88040-900
Fone: 55-48-37214715 Florianópolis – SC –
Brazil – marcelo@incod.ufsc.br.