

**UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E CULTURA**  
**PROGRAMA DE MESTRADO ACADÊMICO EM COMPUTAÇÃO APLICADA**

**LEVANTAMENTO DE MÁTODOS COMPUTACIONAIS NA  
ANÁLISE DE IMAGENS DE IMUNO-HISTOQUÍMICA**

**Relatório de Estudo Dirigido**

por

Marcelo Dornbusch Lopes

Eros Comunello, Dr. rer, nat.  
Orientador (a)

Florianópolis (SC), março de 2014

**UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E CULTURA**  
**PROGRAMA DE MESTRADO ACADÊMICO EM COMPUTAÇÃO APLICADA**

**LEVANTAMENTO DE MÁTODOS COMPUTACIONAIS NA  
ANÁLISE DE IMAGENS DE IMUNO-HISTOQUÍMICA**

**Relatório de Estudo Dirigido**

por

Marcelo Dornbusch Lopes

Relatório apresentado como requisito para a  
aprovação na disciplina Estudo Dirigido do  
Curso de Mestrado Acadêmico em Computação  
Aplicada.

Orientador (a): Eros Comunello, Dr. rer. nat.

Florianópolis (SC), março de 2014

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>iii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>iv</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>vi</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>7</b>
<b>2 CONCEITO DE TEXTURA NA ANÁLISE DE IMAGENS.....</b>	<b>9</b>
<b>3 REVISÃO SISTEMÁTICA .....</b>	<b>11</b>
3.1 PROTOCOLO DE BUSCA .....	11
3.2 RESULTADO DE BUSCA .....	14
3.2.1 IEEE .....	14
3.2.2 ScienceDirect .....	30
3.2.3 ACM Digital Library .....	33
3.3 ANÁLISE DE RESULTADOS.....	34
<b>4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>40</b>

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Resultado de pesquisa e selecção de trabalhos para análise.....	14
Tabela 2 Reunião de técnicas e campos de aplicação encontrados na revisão sistemática.....	35

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

UNIVALI	Universidade do Vale do Itajaí
CCD	Charge-coupled Device
HSV	Hue Saturarion Value (espaço de cores)
RGB	Red Green Blue (espaço de cores)
GT	Ground Truth
RSL	Revisão Sistemática da Literatura

## RESUMO

DORNBUSCH L., Marcelo. **Levantamento de Métodos Computacionais na Análise de Imagens de Imuno-histoquímica**. Florianópolis, 20013. 46 f. Relatório de Estudo Dirigido (Mestrado em Computação Aplicada)–Programa de Mestrado Acadêmico em Computação Aplicada, Universidade do Vale do Itajaí, Florianópolis, 2013.

Diversas técnicas de processamento de imagens vêm sendo utilizadas para a análise de imagens médicas de microscopia. Processos laboriosos e subjetivos de diagnósticos podem ser aperfeiçoados, proporcionando a patologistas e biólogos a extração de informação quantitativa a partir deste tipo de imagem. O principal objetivo deste trabalho foi contextualizar o tema a ser proposto na dissertação de mestrado do aluno, na área de análise de imagens microscópicas de imuno-histoquímica. O estudo dirigido foi conduzido em duas etapas, inicialmente foi efetuando um levantamento sobre técnicas de extração de descritores de característica baseadas em textura, cinco métodos foram avaliados totalizando 214 medidas de textura. Na segunda etapa foi efetuada uma revisão sistemática da literatura a fim de contextualizar a proposta de dissertação do aluno no estado da arte, 62 trabalhos foram identificados, dos quais 20 foram analisados. Os resultados obtidos foram à contextualização do trabalho do aluno, bem como a identificação de métodos a serem empregados e comparados na proposta de dissertação.

**Palavras-chave:** Análise de Imagens. Classificação Supervisionada. Imuno-histoquímica.

## ABSTRACT

*Several imaging techniques have been used for microscopy medical image analysis. Laborious and subjective processes can be improved, providing pathologists and biologists to extract quantitative information from this type of image. The main objective of this work was to contextualize the topic being proposed in the dissertation the student, in the area of analysis of microscopic images of immunohistochemistry. Directed study was conducted in two stages, initially carrying out a survey on techniques for extracting feature descriptors based on texture, five methods were evaluated totaling 214 texture measures. In the second step was performed a systematic literature review to contextualize the student's dissertation, 62 studies were identified, of which 20 were analyzed. The results were the contextualization of student work, as well as identifying methods to be employed and compared the dissertation proposal.*

**Keywords:** Image Analysis. Supervised Classification. Immunohistochemistry.

# 1 INTRODUÇÃO

A pesquisa voltada ao desenvolvimento de sistemas para Diagnóstico Médico Guiado por Computador (CAD) tornou-se um dos principais temas de pesquisa em imagens médicas e radiodiagnóstico. Essas análises envolvem tanto o ponto de vista do diagnóstico clínico, quanto na área de pesquisa, propiciando o entendimento dos mecanismos biológicos das doenças (GURCAN et al., 2009).

Diversas técnicas de processamento de imagens vêm sendo utilizadas para a análise de imagens médicas de microscopia. Processos laboriosos e subjetivos de diagnósticos podem ser aperfeiçoados, proporcionando a patologistas e biólogos a extração de informação quantitativa a partir deste tipo de imagem. Tanto no campo da citologia (estudo das células), quanto na histologia (estudo anatômico das estruturas dos tecidos) (LIU et al., 2006).

Um dos processos inerentes à patologia é a imuno-histoquímica que é empregada na avaliação da expressão de antígenos em histopatologia, aliada a metodologias de alta resolução para análise citogenética constituem padrões estabelecidos no diagnóstico e prognóstico de câncer bem como em outras doenças (PHAM et al., 2007).

O procedimento de imuno-histoquímica é utilizado na busca por antígenos em amostras de células ou tecidos, que vão dos aminoácidos e proteínas até agentes infecciosos e populações celulares específicas. O processo é conduzido em dois momentos: a) preparação das lâminas e os estágios da reação (contraste de coloração empregando biomarcador); b) interpretação e quantificação da expressão de coloração obtida. (MATOS et al., 2010).

As abordagens tradicionais para a análise nos padrões de coloração em imagens de histopatologia tais como, a observação direta por um grupo de especialistas ou empregando análise estereológica<sup>1</sup>, constituem processos laboriosos e subjetivos. Por outro lado soluções que empregam uso do computador para a análise de imagens proporcionam uma quantificação eficiente, objetiva e de fácil reprodução. (PRASAD; PRABHU, 2011).

---

<sup>1</sup> Procedimento de sobrepor uma retícula sobre a lâmina a ser avaliada, contando visualmente a ocorrência do padrão alvo em cada intersecção da retícula, usando o microscópio.



Abordagens computacionais especificamente projetadas para mensurar de forma automatizada a extensão e o grau de expressões de imagens de imuno-histoquímica abrangem um pequeno grupo de biomarcadores e tecidos. Métodos genéricos normalmente são baseados em algum procedimento de aprendizagem, no qual características dos biomarcadores são modeladas em um método semi-supervisionado. Segundo Kothari et al. (2011) abordagens supervisionadas têm mostrado melhor desempenho se comparados a métodos não supervisionados.

No campo do processamento de imagens e da visão computacional uma importante área de pesquisa está relacionada à segmentação de imagens. Devido a sua grande disseminação e variada gama de aplicação, a segmentação traz contribuições relevantes em áreas como medicina, sensoriamento remoto e recuperação de imagens por conteúdo. O principal objetivo da segmentação de imagens consiste em dividir a imagem em conjuntos disjuntos, agrupados por alguma característica como cor ou textura. (ZUVA et al., 2011).

O processo de classificação estatística é o cerne do reconhecimento de padrões estatísticos, onde conjuntos de itens são agrupados com base em uma ou mais características inerentes (cor, textura, variáveis...), a partir do treinamento de um grupo de itens previamente anotados. Onde a acurácia dos resultados está diretamente ligada ao tamanho do conjunto de treinamento, bem como da variabilidade requerida para a generalização do padrão alvo. (ZHENG; XUE, 2009)

Desta forma o presente trabalho tem por objetivo integrar parte do trabalho de mestrado do autor, proporcionando uma contextualização adequada, bem como a composição da fundamentação teórica do referido trabalho. Uma vez que o objetivo do mestrado está relacionado à segmentação e mensuração automatizada da expressão de biomarcadores em imagens microscópicas de imuno-histoquímica.

A metodologia empregada para a realização do trabalho foi executar um levantamento bibliográfico relacionado à análise de imagens usando atributos de textura, bem como a execução de uma revisão sistemática da literatura (RSL), relacionada à análise guiada por computador de imagens microscópicas de imuno-histoquímica. Assim o restante do relatório está organizado da seguinte forma, no Capítulo 2 é apresentado um levantamento bibliográfico sobre o conceito de textura na análise de imagens, no Capítulo 3 o resultado da revisão sistemática realizada, e no Capítulo 4 as considerações finais.

## 2 CONCEITO DE TEXTURA NA ANÁLISE DE IMAGENS

Organize o restante do relatório de estudo dirigido em capítulos e cada capítulo em

A textura é um fenômeno comum, fácil de reconhecer, entretanto difícil de definir, causando divergência na sua definição entre os autores, tipicamente para um efeito ser definido como textura, ele depende da escala na qual é observado. As texturas no contexto de imagens digitais geralmente são formadas por um padrão organizado de subelementos bastante regulares (textons). Uma abordagem para representação de texturas consiste em encontrar os *textons* e em seguida descrever a forma em que eles são definidos. (FORSYTH; PONCE, 2002).

Segundo Kaur e Gupta (2012), no campo de análise de imagens abordagens de textura são normalmente classificadas em duas categorias principais:

- **Estatística** – nesta categoria texturas são categorizadas por medidas estatísticas relacionadas aos níveis de cinza dos pontos que compreendem uma superfície, computadas através de técnicas baseadas em histogramas;
- **Estrutural** – nesta categoria texturas são textons determinísticos, que se repetem com alguma regra de localização. Tais regras determinam o relacionamento entre os textons, que podem ser adjacentes, com uma distância aproximada ou periódica;

Além das abordagens estatísticas e estruturais Gonzalez e Woods (2010) apontam uma terceira categoria:

- **Espectral** – nesta categoria texturas são caracterizadas por propriedades do espectro de Fourier, sendo usadas principalmente para identificar a periodicidade global em uma imagem através de picos de alta energia no espectro.

Sharma, Markou e Singh (2001) apresentam uma avaliação de cinco métodos para extração de textura, estes métodos são brevemente descritos a seguir:

- **Autocorrelação**: características de texturas em imagens dependem do tamanho espacial de primitivas destas texturas, grandes primitivas caracterizam texturas grosseiras (como rochas), pequenas primitivas fornecem texturas finas (como seda). O método de autocorrelação fornecem funções que podem mensurar esta grosseria, avaliando o relacionamento linear destas primitivas.

Se as primitivas são grandes a função decai lentamente com o aumento da distância, se as primitivas são pequenas a função decai rapidamente. Entretanto se as primitivas são periódicas, a autocorrelação decai e aumenta periodicamente com a distância.

- **Matriz de coocorrência:** é a ocorrência de probabilidade conjunta de níveis de cinza  $i$  e  $j$  para dois pixels com uma relação espacial em uma imagem. Tais relações são descritas em função de uma distância  $d$  e um ângulo  $q$ . A partir de cada matriz de coocorrência, quatorze medidas estatísticas são propostas por Haralick.
- **Frequência de bordas:** um conjunto de descritores de bordas pode ser usado para construir uma imagem de bordas a partir da imagem original. Pode-se então computar uma função de descrição de textura baseada em bordas, que define a diferença de um pixel referente a uma distância específica. Um total de setenta medidas podem ser calculadas para este método.
- **Comprimento primitivo:** uma primitiva é caracterizada por um conjunto contíguo de constantes de níveis de cinza localizados em uma linha. Tais primitivas podem ser então descritas pelo nível de cinza, comprimento e direção. Computando a probabilidade contínua destas medidas. Um total de cinco medidas é extraído por este método.
- **Texturas de Law's:** neste método 25 máscaras de convolução são aplicadas sobre a região de textura, com a finalidade de acentuar micro estruturas. Fornecendo assim uma imagem onde estas micro estruturas são mensuradas a partir de cinco métricas estatísticas, fornecendo assim um descritor de características com 125 medidas (25 x 5).

### **3 REVISÃO SISTEMÁTICA**

No Capítulo 3 é apresentado o resultado da revisão sistemática realizado, compreendendo a elaboração do protocolo de busca, a condução da revisão, a reunião dos dados e a análise dos artigos selecionados para leitura.

A motivação para a realização da revisão sistemática foi à identificação de trabalhos relacionados, seus métodos e métricas, relativos à quantificação de coloração imuno-histoquímica guiada por computador. Bem como a identificação dos resultados alcançados por estes trabalhos, e ainda possíveis problemas em aberto.

#### **3.1 Protocolo de Busca**

O protocolo de busca elaborado para o presente trabalho definiu os seguintes critérios, pergunta de pesquisa, população, resultados, estratégia para pesquisa, critérios e procedimentos para seleção, lista de verificação e procedimentos para avaliação da qualidade de estudos e reunião dos dados.

1. Pergunta de pesquisa:

- Primária: Quais métodos computacionais são empregados na análise de imagens de imuno-histoquímica, especificamente relacionados à segmentação e quantificação de coloração imuno-histoquímica?

2. População:

- Abordagens computacionais para análise de imagens microscópicas de imuno-histoquímica.

3. Resultados:

- Métodos computacionais para segmentação e quantificação de coloração imuno-histoquímica;
- Resultados alcançados por estes métodos; e

- Problemas em aberto apontados nos trabalhos selecionados.

#### 4. Estratégia utilizada para pesquisa dos estudos primários:

- Palavras chaves: *immunohistochemistry staining, immunohistochemistry quantification, immunohistochemical staining, immunohistochemical quantification, pattern recognition, image analysis, semi-supervised learning, nonlinear color distance metric, texture analysis.*
- *String* de busca: Devido as diferentes sintaxes permitidas, nas três fontes de pesquisas, a string de busca foi adequada de acordo com cada mecanismo de busca empregado na revisão sistemática. No Apêndice A foram apresentadas as *strings* utilizadas em cada fonte de pesquisa, *string* de busca padrão estabelecida foi:

(  
 ("immunohistochemistry staining" OR "immunohistochemistry quantification" OR  
 "immunohistochemical staining" OR "immunohistochemical quantification" )  
 AND  
 ("pattern recognition" OR "image analysis" OR "semi-supervised learning" OR  
 "nonlinear color distance metric" OR "texture analysis")  
 )

- Fontes:

ACM Digital Library	<a href="http://portal.acm.org">http://portal.acm.org</a>
IEEEExplore	<a href="http://ieeexplore.ieee.org">http://ieeexplore.ieee.org</a>
ScienceDirect	<a href="http://www.sciencedirect.com/">http://www.sciencedirect.com/</a>
Springer Link	<a href="http://link.springer.com/">http://link.springer.com/</a>

#### 5. Critérios e procedimentos para seleção de estudos:

- Análise do título do trabalho;

- Análise do resumo do trabalho; e
  - Pela data de publicação do trabalho (entre 2003 e 2014).
  - Critérios para inclusão: Trabalhos cujos títulos e resumos contenham informações sobre métodos e técnicas computacionais, empregados na quantificação de coloração imuno-histoquímica em imagens microscópicas.
  - Critérios para exclusão: Trabalhos cujos 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.
6. Lista de verificação e procedimentos para avaliação da qualidade dos estudos:
- Objetivos: O objetivo dos trabalhos estava focado em métodos computacionais para a quantificação de coloração imuno-histoquímica.
  - Condução: Os trabalhos deveriam estar bem referenciados e possuir, preferencialmente, uma etapa de avaliação experimental com abordagem quantitativa.
7. Reunião de dados:
- Título;
  - Ano de Publicação;
  - Autores
  - Conceito do Periódico/Evento (Qualis CAPS);
  - Principal problema abordado;
  - Solução Proposta;
  - Existência de implementação disponível;
  - Métricas de avaliação;
  - Resultados obtidos;
  - Problemas em aberto; e

- Disponibilidade do conjunto de imagens utilizado.

## 3.2 Resultado de Busca

Na Tabela 1 é apresentado o resultado da pesquisa, seguindo o protocolo de busca apresentado. Somando os resultados das três fontes de pesquisa, totalizaram 62 trabalhos retornados, os quais foram lidos o resumo e o título para avaliação de inclusão. Deste 62 trabalhos 20 foram selecionados para a análise.

Tabela 1. Resultado de pesquisa e seleção de trabalhos para análise

Fonte	Retorno	Excluídos	Selecionados
IEEE	25	10	15
ScienceDirect	18	15	3
ACM Digital Library	19	17	2

No Apêndice A são é apresentado a lista de trabalhos excluídos, título e link, de acordo com os critérios estabelecidos previamente (análise de título, análise de resumo e data de publicação acima de 2003).

### 3.2.1 IEEE

1. **Título:** Classifying breast cancer regions in microscopic image using texture analysis and neural network
  - Autores: Jitaree, S., Phinyomark, A., Thongnoo, K., Boonyapiphat, P., Phukpattaranont, P.;
  - Ano Publicação / Conceito (Qualis): 2013 / não qualificada;
  - Problema Abordado: classificação de estruturas histológicas em imagens microscópicas de câncer de mama, entre normal e cancerígena;
  - Solução Proposta: a solução proposta emprega como descritor de características medidas de textura baseadas em duas abordagens, gray level co-occurrence matrices (GLCM) e fractal dimension (FD). Como classificador a abordagem utiliza uma rede neural com arquitetura multilayer perceptron e o algoritmo de treinamento back propagation;

- Métricas de Avaliação / Resultados: As métricas utilizadas para avaliação da abordagem foram sensibilidade (verdadeiro positivo), especificidade (verdadeiro negativo) e acurácia (relação entre sensibilidade e especificidade). Os resultados demonstrados variaram entre 0 e 100, o melhor resultado apresentado ocorreu com uma combinação de descritores de textura, que apresentou uma taxa de acurácia de 94,23% ;
- Problemas em Aberto: os problemas em aberto apontados relacionaram a futura implementação de um método automatizado para a segmentação, e a avaliação da abordagem com novos descritores de textura e algoritmos de classificação.
- Disponibilidade de implementação: não; e
- Disponibilidade do Conjunto de Imagens: não; e
- Comparação: A metodologia procura identificar estruturas histológicas entre saudáveis e cancerígenas. As imagens avaliadas foram cortadas em tamanhos fixos, de modo que houvesse somente células saudáveis ou somente células cancerígenas.

## 2. **Título:** Automatic cell analysis for P53 immunohistochemistry in bladder inverted papilloma

- Autores: Zhao, P., Mao, K.Z., Koh, T.S., Tan, P.H.;
- Ano Publicação / Conceito (Qualis): 2003 / não qualificado;
- Problema Abordado: Análises automática de imagens microscópicas de imuno-histoquímica, relativas a neoplasia decorrente da proteína citoplasmática P53;
- Solução Proposta: A solução apresentada neste trabalho consiste em quatro passos distintos, inicialmente um espaço de cores híbrido (empregando quatro espaços de cores, RGB, XYZ, HSI e Luv ) é construído a fim de realizar a classificação pixel a pixel de área de núcleo e não núcleo. No segundo passo um algoritmo de crescimento de regiões é executado para dividir a imagem em regiões desconectadas (núcleo/não núcleo). No terceiro passo uma nova segmentação é executada a fim de separar núcleos sobrepostos. Por fim ocorre a avaliação da intensidade de coloração ao redor do núcleo, a fim de executar a avaliação da célula;



- Métricas de Avaliação / Resultados: Não apresentado, no resumo deste trabalho é dito que foram feitos testes com algumas imagens. Entretanto durante o artigo não é apresentado nenhum resultado quantitativo, apenas uma imagem de exemplo;
- Problemas em Aberto: não apontado;
- Disponibilidade de implementação: não apontado;
- Disponibilidade do Conjunto de Imagens: não apontado; e
- Comparação: a abordagem apresenta uma técnica totalmente automatizada, para segmentação de núcleo.

3. **Título:** A Semi-Automatic Image Analysis Tool for Biomarker Detection in Immunoistochemistry Analysis.

- Autores: Jie Shu, Guoping Qiu, Ilyas Mohammad;
- Ano Publicação / Conceito (Qualis): 2013 / B3;
- Problema Abordado: Detecção e segmentação de coloração imuno-histoquímica em imagem de amostras de tecido. Empregando uma abordagem semiautomática. ;
- Solução Proposta: A solução apresentada neste trabalho é constituída de duas etapas distintas, treinamento e reconhecimento. Na etapa de treinamento é construído um modelo estatístico baseado em histogramas, quantificados de acordo com a identificação de pixels representativos do padrão alvo pelo usuário. Após a construção do modelo estatístico, o reconhecimento de coloração pode ser computado automaticamente a partir do cálculo de probabilidade;
- Métricas de Avaliação / Resultados: Foram executados testes com modelos criados por quatro usuários, comparados com dois métodos específicos (color deconvolution e uma abordagem baseada no espaço de cor CMYK). Para a avaliação dos resultados foram calculado, com relação a um padrão ouro estabelecido, taxas de verdadeiro positivo e falso positivo plotadas como curvas ROC. Bem como o cálculo da área abaixo da curva (AUC).

Os resultados demonstrados para as métricas de AUC tiveram média máxima de 98,5% e mínima de 97,6%, onde 100% representaria uma classificação ótima. Mantendo resultados superiores aos métodos com os quais foram comparados;

- Problemas em Aberto: Um problema apontado pelo trabalho diz respeito a acurácia do método, a qual depende diretamente da captação dos pixels de treinamento, o que justifica a diferença encontrada entre modelos construídos por diferentes usuários;
- Disponibilidade de implementação: A abordagem foi desenvolvida em Java e disponibilizada como um plugin do ImageJ<sup>2</sup>;
- Disponibilidade do Conjunto de Imagens: não; e
- Comparação: Abordagem compatível com o trabalho a ser proposto, emprega um método de classificação estatístico. Com uma abordagem supervisionada dividida entre treinamento e segmentação.

#### 4. **Título:** Computer-aided Evaluation of Protein Expression in Pathological Tissue Images

- Autores: Elisa Ficarra, Enrico Macci, Giovanni De Micheli e Luca Benini;
- Ano Publicação / Conceito (Qualis): 2006 / B1;
- Problema Abordado: Análise de imagens de amostra de tecidos identificando de regiões celulares (núcleo, membrana e citoplasma), quantificação de área de atividade de proteínas (resultante da relação antígeno/anticorpo) em relação a área celular, classificação da reação ad proteína de acordo com a localização celular e a quantificação da intensidade da reação da proteína;
- Solução Proposta: A solução apresentada neste trabalho propõe uma abordagem totalmente automatizada, composta por várias etapas. Inicialmente uma sequencia de algoritmos morfológicos padrões (filtros de ruídos, filtros de cor, preenchimento de componentes conectados e detector de bordas), são empregados para a detecção do núcleo das células, etapa finalizada com um algoritmo de contornos ativos.

---

<sup>2</sup> Software open source para processamento e análise de imagens, desenvolvido em Java.  
<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>

Para a detecção de regiões onde ocorre reação positiva (coloração) é aplicado um filtro de cor no espaço HSI (matiz, saturação e intensidade), finalizado com o algoritmo de limiarização de Ridler.

Na etapa seguinte ocorre a detecção da membrana celular através de uma abordagem iterativa de *fitting*. Finalmente são computados os parâmetros clínicos através da quantificação da reação (coloração), em toda a área da membrana;

- Métricas de Avaliação / Resultados: A abordagem foi avaliada com análise de três conjuntos de imagens, diferindo na intensidade da reação positiva. Comparadas com anotações manuais feitas por especialistas médicos.

Foram computados o erro médio e o erro quadrático médio, medidas de correlação e regressão linear. Apresentados resultados de correlação entre 0,96% e 0,98%. Com erro médio entre -0,77% e -0,145%, e erro quadrático médio entre 3,3 e 1,58;

- Problemas em Aberto: não relatado;
- Disponibilidade de implementação: não relatado;
- Disponibilidade do Conjunto de Imagens: não relatado; e
- Comparação: Esta solução difere da solução a ser proposta uma vez que tem uma abordagem totalmente automatizada.

5. **Título:** Colour-Texture based image analysis method for assessing the Hormone Receptors status in Breast tissue sections

- Autores: Kostopoulos, S. Cavouras, D. ; Daskalakis, A. ; Bougioukos, P. ; Georgiadis, P. ; Kagadis, G.C. ; Kalatzis, I. ; Ravazoula, P. ; Nikiforidis, G.;
- Ano Publicação / Conceito (Qualis): 2007 / B1;
- Problema Abordado: Avaliação da condição de receptores (proteínas) estrogênicos no diagnóstico e prognóstico de câncer de mama, empregando análise de imagens.
- Solução Proposta: A solução apresentada neste trabalho empregada um método de análise de imagem baseada em atributos de cor e textura, composta por uma etapa de segmentação de núcleos celulares e uma etapa de classificação;

Inicialmente as imagens são convertidas em tons de cinza e limiarizadas com o algoritmo Otsu's, a fim de segmentar núcleos celulares. Neste ponto é possível aplicar ajustes no parâmetro de limiarização, através da interface gráfica construída em MatLab<sup>3</sup>. Para finalizar a segmentação uma sequência de algoritmos morfológicos é aplicada para correção de ruídos e eliminação de núcleos com menos de 300 pixels, o parâmetro destes algoritmos morfológicos foram mantidos fixos para as imagens analisadas.

Para a extração de características foram empregadas medidas baseadas no método Laws de energia de textura, avaliando os cinco *kernels* L5, E5, S5, W5 e R5. Adicionalmente são incorporadas medidas cor aos descritores de características, ao final cada descritor contém 60 medidas (cor/textura).

A fim de reduzir essa dimensionalidade (60 dimensional) bem como o esforço computacional, os descritores são reduzidos empregando o teste estatístico não paramétrico Wilcoxon, escolhendo-se as 15 medidas mais bem ranqueadas pelo teste.

Finalmente estes descritores de característica 15-dimensional são utilizados no treinamento e classificação dos núcleos celulares, empregando uma variação do algoritmo k-Nearest Neighbours que emprega um sistema de votos.

- Métricas de Avaliação / Resultados: Foram avaliadas 22 imagens, totalizando 921 núcleos (1/3 destes foram usados para treinamento). Foram computadas medidas de acurácia da ferramenta, contra uma avaliação feita manualmente por um especialista médico. Foram ranqueadas corretamente 19/22 casos, 86,8% de acurácia;
- Problemas em Aberto: não apontado;
- Disponibilidade de implementação: não;
- Disponibilidade do Conjunto de Imagens: não; e
- Comparação: Esta abordagem é compatível com a abordagem a ser proposta, uma vez que prevê um método supervisionado (etapa de treinamento), empregando atributos de cor e textura como descritores de características. Entretanto esta abordagem vai além da

---

<sup>3</sup> Linguagem de programação, visualização e computação numérica - <http://www.mathworks.com/products/matlab/>

quantificação de coloração imuno-histoquímica, provendo diagnóstico de câncer de mama através da identificação de reação positiva de receptores estrogênicos.

6. **Título:** Classification and Immunohistochemical Scoring of Breast Tissue Microarray Spots

- Autores: Amaral, T. McKenna, S.J. ; Robertson, K. ; Thompson, A.;
- Ano Publicação / Conceito (Qualis): 2013 / A1;
- Problema Abordado: Classificação e quantificação de câncer de mama em imagens de microarranjos de tecido. A quantificação imuno-histoquímica é realizada através da computação da proporção de epitélio nuclear corado, bem como a intensidade desta coloração;
- Solução Proposta: A solução proposta por esta abordagem emprega o conceito de bag of visual words, para a computação de descritores de características. Estes descritores são compostos de 15 dimensões, as três primeiras representam a cor no espaço RGB, as 12 restantes são compostas por medidas de convolação de um grupo de *kernels* derivativos de primeira e segunda ordem de 2D-Gaussiana, estas medidas foram escolhidas devido sua característica de invariância a rotação e orientação;
- Métricas de Avaliação / Resultados: Para a avaliação da solução proposta foram executados testes com três classificadores distintos, multilayer perceptron, latent topic models e support vector machine, para classificação dos núcleos do microarranjo. Para a quantificação do núcleos foram comparados os métodos de regressão gaussiana e regressão linear.

Foram computadas medidas de acurácia de classificação, entre a abordagem proposta e seus diferentes algoritmos de classificação, contra anotações feitas por um patologista. Os melhores resultados observados foram os computados através do algoritmo de support vector machine;

- Problemas em Aberto;;
- Disponibilidade de implementação: não;
- Disponibilidade do Conjunto de Imagens: não; e

- Comparação: A solução proposta é compatível com a solução a ser proposta, combinado atributos de cor e métricas semelhantes a textura em um único descritor de características (15-dimensional). Entretanto esta abordagem vai além da quantificação de padrões de coloração, proporcionando essa quantificação em localizações celulares específicas.

7. **Título:** Detection of Follicles From IHC-Stained Slides of Follicular Lymphoma Using Iterative Watershed

- Autores: Samsi, S. Lozanski, G. ; Shanarah, A. ; Krishanmurthy, A.K. ; Gurcan, M.N.;
- Ano Publicação / Conceito (Qualis): 2010 / A1;
- Problema Abordado: O problema tratado por este trabalho consiste na detecção de regiões foliculares em imagens de imuno-histoquímica;
- Solução Proposta: A solução proposta por este trabalho é baseada na segmentação de Rough, empregando um descritor de características de três elementos (uma medida de cor e duas de textura).

Para a construção do descritor de características inicialmente ocorre a conversão da imagem para o espaço de cor HSV, a informação do canal *hue* (H) é extraída para compor a primeira parte do descritor. A segunda parte do descritor é composta por uma medida de textura a partir da aplicação de um filtro de *smoothing* seguido de uma equalização, valores decorrentes da equalização do histograma são utilizados como segunda parte do descritor.

A última parte do descritor é computada calculando a matriz de coocorrência em níveis de cinza. Este cálculo prove um método estatístico para a caracterização da dependência espacial de níveis de cinza na imagem.

Com os descritores de características montados a segmentação propriamente dita (regiões de folículo e não folículo) ocorre com o emprego do algoritmo de k-means, um algoritmo não supervisionado para o agrupamento de dados em k classes. Um algoritmo baseado em watershed iterativo é aplicado para executar a separação de folículos sobrepostos. Finalmente uma etapa de suavização, empregando descritores de Fourier, é executada para suavizar as delimitações dos folículos;

- Métricas de Avaliação / Resultados: um conjunto de imagens foi avaliado, comparando a segmentação do método proposto contra a segmentação executada por um patologista. O resultado mostrou uma média de similaridade de 87,11%;
- Problemas em Aberto: não indicado;
- Disponibilidade de implementação: não indicado;
- Disponibilidade do Conjunto de Imagens: não; e
- Comparação: Esta proposta difere da metodologia ser proposta uma vez que se propõe a identificar estruturas histológicas específicas. Entretanto é compatível no quesito descritor de características, empregando atributos de cor e textura.

8. **Título:** Automatic Segmentation for Ovarian Cancer Immunohistochemical Image Based on YUV Color Space

- Autores: Jiwen Dong ; Jing Li ; Aifang Fu ; Huiming Lv;
- Ano Publicação / Conceito (Qualis): 2010;
- Problema Abordado: Segmentação de imagens de imuno-histoquímica, especificamente testadas em câncer de ovário;
- Solução Proposta: Este trabalho apresenta uma abordagem para segmentação automática, de acordo com as características de câncer de ovário, em imagens de imuno-histoquímica. Inicialmente é extraído um diagrama de três componentes, de acordo com o espaço de cor utilizado (YUV), então as células positivas são identificadas em áreas de nível alto de cinza no canal V e baixos níveis de cinza no canal U, enquanto células negativas são identificadas em áreas de nível alto de cinza no canal U e áreas de baixo nível de cinza no canal V.

Então o algoritmo de limiarização OTSU é empregado para extrair células positivas nos componentes Y e V, bem como células negativas nos componentes Y e U;

- Métricas de Avaliação / Resultados: Não foram apresentados resultados quantitativos;
- Problemas em Aberto: não indicado;
- Disponibilidade de implementação: não indicado;

- Disponibilidade do Conjunto de Imagens: não indicado; e
- Comparação: Este trabalho é semelhante ao trabalho a ser proposto uma vez que aborda a segmentação baseada em atributos de cor. Entretanto não faz nenhum tipo de mensuração/quantificação.

9. **Título:** Automatic Segmentation for Ovarian Cancer Immunohistochemical Image Based on Chroma Criterion

- Autores: Jiwen Dong ; Jing Li ; Aifang Fu ; Huiming Lv;
- Ano Publicação / Conceito (Qualis): 2010;
- Problema Abordado: Segmentação de imagens de imuno-histoquímica, especificamente testadas em câncer de ovário;
- Solução Proposta: A solução proposta neste trabalho inicialmente estabelece um critério de cromaticidade no espaço de cor RGB, este critério divide a imagem em duas. Em seguida as células positivas são extraídas na imagem A (canal R), e as células negativas são extraídas na imagem B (canal B) empregando o algoritmo de clusterização ISODATA;
- Métricas de Avaliação / Resultados: Apenas uma imagem foi mostrada como exemplo, sem avaliação quantitativa;
- Problemas em Aberto: Não apontado;
- Disponibilidade de implementação: Não apontado;
- Disponibilidade do Conjunto de Imagens: Não apontado; e
- Comparação: Este trabalho é semelhante ao trabalho a ser proposto uma vez que aborda a segmentação baseada em atributos de cor. Entretanto não faz nenhum tipo de mensuração/quantificação.

10. **Título:** Scoring Histological Sections Through Immunohistochemistry

- Autores: Hang Chang; DeFilippis, R.A. ; Tlsty, T.D. ; Parvin, B.;
- Ano Publicação / Conceito (Qualis): 2008 / B1;



- Problema Abordado: Quantificação de coloração imuno-histoquímica, baseada em uma abordagem célula por célula;
- Solução Proposta: Inicialmente as regiões nucleares são extraídas através da detecção de características elípticas (com a convolução de uma máscara sobre a imagem). Entretanto esta convolução está sujeita a interferência, devido a ruídos na imagem, incorporação de objetos estranhos (não célula) e o corante utilizado para uma marcação específica.

A fim de resolver a interferência proveniente do corante utilizado, uma abordagem de decomposição de sinal é utilizada, baseada em uma abordagem de corte em grafo;

- Métricas de Avaliação / Resultados: Este trabalho conduziu um experimento com 192 imagens de fibroblastos, comparados com um método baseado em Non-negative Matrix Factorization (NMF). O trabalho aponta um desempenho de 10 segundos para o seu método contra 10 minutos para o método baseado em NMF. O trabalho diz ainda que seu método tem uma acurácia maior, mas não demonstra uma avaliação quantitativa a este respeito;
- Problemas em Aberto: Na conclusão é apontado que o trabalho continua em desenvolvimento para aprimorar o método;
- Disponibilidade de implementação: não;
- Disponibilidade do Conjunto de Imagens: não; e
- Comparação: Esta abordagem é semelhante a abordagem a ser proposta uma vez que trata da quantificação de coloração imuno-histoquímica, baseado no espaço de cor RGB. Entretanto esta abordagem executa a segmentação de estruturas celulares (núcleo).

#### 11. **Título:** Supervised learning-based cell image segmentation for P53 immunohistochemistry

- Autores: Mao, K.Z. ; Peng Zhao ; Puay-Hoon Tan;
- Ano Publicação / Conceito (Qualis): A1;
- Problema Abordado: Segmentação celular em imagens de imuno-histoquímica, entre fundo e núcleo e entre núcleos sobrepostos;

- **Solução Proposta:** Neste trabalho é apresentado dois novos métodos para segmentação de imagens celulares. Inicialmente é apresentada a abordagem C-G-T, onde a métrica de transformação da imagem colorida (C) em tons de cinza (G) é aprendida sobre a distribuição global do espaço de cor, já a métrica de limiarização (T) é aprendida localmente na distribuição de pixels em tons de cinza (empregando o algoritmo OTSU). Esta abordagem hibridizando técnicas de aprendizagem locais e globais mostram eficiência em classificar objetos de interesse (células) do fundo; Entretanto a abordagem não é eficiente para a segmentação de núcleos sobrepostos ou que se tocam.

Para este último problema, separação de núcleos, é apresentado uma abordagem baseada no algoritmo watershed. Onde um conjunto de marcações é extraído nas linhas de vales, tanto na imagem em tons de cinza, como na imagem da distância complementar, a fim de guiar a segmentação.

- **Métricas de Avaliação / Resultados:** Diversos testes e métricas foram utilizados para avaliar a solução proposta neste trabalho. Inicialmente foi avaliada a abordagem de conversão (cor – tons de cinza) empregando três medidas, geometric margin (GM), fisher ratio (FR) e scatter-based class separability measure (SM), comparadas com cinco outros métodos.

O método proposto apresentou melhores resultados quando comparado a outros métodos, 10,977 - 28,683 - 14,370 para GM, FR e SM respectivamente. Contra 5,264 - 21,550 - 8,941 de GM, FR e SM respectivamente, no pior método avaliado.

Para a avaliação dos resultados de segmentação (limites) foram empregadas três métricas, distância de Hausdorff (DH), média da distância absoluta (DA). Bem como uma avaliação estatística que leva em conta a quantidade de regiões segmentadas, a soma da distância Euclidiana entre os vetores de cor dos pixels das regiões e a área destas regiões, essa métrica foi denominada de Q(I). Para a avaliação dos resultados de segmentação (área) foram computadas as seguintes medidas de fração de área: falso negativo (FN), falso positivo (FP) e verdadeiro positivo (VP).

Novamente o método proposto teve melhor desempenho quando comparado aos demais métodos, valores alcançados foram 2,234 - 0,837 - 0,022 - 0,044 - 0,965 para DH, DA, FP, FN e VP respectivamente. Contra 13,416 - 3,594 - 0,400 - 0,143 - 0,900 para DH, DA, FP, FN e VP respectivamente (do pior método avaliado);

As medidas de Q(I) para o método proposto tiveram a média (foram avaliadas 9 imagens) de 6,24, contra uma média de 13,47 do pior método avaliado.

- Problemas em Aberto: não apontados;
- Disponibilidade de implementação: não;
- Disponibilidade do Conjunto de Imagens: não; e
- Comparação: A abordagem apresentada neste trabalho é semelhante a abordagem a ser proposta uma vez que adota um método supervisionado, entretanto o foco fica na segmentação de núcleo celular.

**12. Título:** Stain unmixing in brightfield multiplexed immunohistochemistry

- Autores: Wemmert, Cedric ; Kruger, Juliane M. ; Forestier, Germain ; Sternberger, Ludovic ; Feuerhake, Friedrich ; Gancarski, Pierre;
- Ano Publicação / Conceito (Qualis): 2013 / A1;
- Problema Abordado: Quantificação de colorações específicas em imagens de imunohistoquímica com múltiplos reagentes;
- Solução Proposta: A solução apresentada neste trabalho é baseada em três etapas, inicialmente ocorre a homogeneização de cores na pseudo imagem RGB, gerada a partir da aquisição feita pelo sistema de imagem multiespectral e a câmera CCD. Esta homogeneização é alcançada usando uma técnica de especificação de histogramas, tanto no espaço de cores RGB, quanto no espaço de cores HSV.

No segundo passo ocorre o treinamento de uma rede neural (multilayer perceptron -MPL) para a aprendizagem da transformação de decomposição do espaço de cor da imagem de entrada, nos três canais de interesse marrom, rosa e azul. A rede neural é composta por três neurônios de entrada (uma para cada valor de RGB), duas camadas intermediárias de seis neurônios e na saída três neurônios, que fornecem a separação dos padrões específicos.

Na terceira etapa ocorre a transformação de todas as imagens, a partir da métrica aprendida durante o treinamento;

- Métricas de Avaliação / Resultados: Os testes foram aplicados a um conjunto de 33 imagens comparadas a um *ground truth (GT)*, foram computadas a média e o desvio padrão da diferença entre cada imagem e seu respectivo GT. Comparada a outros dois métodos, a abordagem proposta teve média de diferença de 0,171, contra 0,403 e 0,381 dos outros dois métodos;
- Problemas em Aberto: não apontado;
- Disponibilidade de implementação: não apontado;
- Disponibilidade do Conjunto de Imagens: não apontado; e
- Comparação: O método proposto neste trabalho é compatível com o trabalho a ser proposto uma vez que usa informações de cor (RGB) como descritor de características para a segmentação de imagens de imuno-histoquímica (IHC), entretanto o método para classificação é baseado em redes neurais.

13. **Título:** Automatic Detection of Lumina in Mouse Liver Immunohistochemical Color Image Using Support Vector Machine and Cellular Neural Network

- Autores: Wang Hui ; Zhou ZhiGuo ; Jie LongMei;
- Ano Publicação / Conceito (Qualis): 2011 / B3;
- Problema Abordado: segmentação baseada em cor de imagens de IHC, obtidas a partir de amostras de fígado de rato. Esta classe de imagens consiste em três partes principais, *lumina*(azul claro), regiões positivas(marrom) e regiões negativas(azul). A avaliação da porção de *lumina* é importante no diagnóstico de doenças como câncer e hepatite;
- Solução Proposta: Neste trabalho é apresentado uma solução baseada no algoritmo de classificação support vector machines (SVM), utilizando atributos de textura como descritores de características, para a segmentação de *lumina*.

Inicialmente a imagem é decomposta nos três canais de cores (RGB), as medidas de textura são computadas no canal G, cada vetor de característica consiste das seguintes medidas de textura, entropia, desvio padrão, e intervalo de valores do pixel em questão, para uma janela de cálculo de 11x11. Para o treinamento do SVM foi usado o algoritmo Linear Kernel;

Após a classificação com o SVM uma etapa de pós-processamento é aplicada, para recuperação de falsos negativos, baseado em uma técnica de filtragem e redes neurais celulares para extração de domínios fechados.

- Métricas de Avaliação / Resultados: Foram testadas 82 imagens, comparadas com dois métodos, watershed e Otsu. Segundo os autores claramente o método proposto é melhor quando comparado aos outros dois. Uma avaliação de um especialista e coautor do trabalho atribuiu 80% de acurácia ao método ;
- Problemas em Aberto: aumentar a acurácia do método;
- Disponibilidade de implementação: não;
- Disponibilidade do Conjunto de Imagens: não; e
- Comparação: Esta abordagem é bastante compatível com a solução a ser proposta, uma vez que se propõe a fazer a segmentação de padrões de coloração em imagens de IHC. Entretanto este trabalho utiliza apenas métricas de textura para o algoritmo de classificação.

14. **Título:** Automatic Extraction of Positive Cells in Tumor Immunohistochemical Pathology Image Based on YCbCr

- Autores: Binghan Liu ; Weizhi Wang ; Xiudian Fang;
- Ano Publicação / Conceito (Qualis): 2006;
- Problema Abordado: Extração automática de células positivas em imagens de IHC, baseada no espaço de cor YCbCr. De acordo com a diferença de distribuição neste espaço de cor, as células positivas são extraídas do fundo;
- Solução Proposta: As imagens patológicas avaliadas neste trabalho são compostas principalmente por objetos positivos de IHC (núcleo, citoplasma e membranas) em vermelho ou marrom, células não positivas em azul ou roxo (com alguns núcleos em preto), lacunas em branco e citoplasmas em azul claro ou roxo claro. Objetos positivos estão distribuídos em faixas alta de tons de cinza no canal Cr e em faixas baixas de tons de cinza no canal Cb.

A partir desta distribuição (e um conjunto d regras definidas a partir dela) a abordagem utiliza um algoritmo (maximal entropy threshold) automático para efetuar a limiarização na combinação dos canais Cb e Cr, na extração de objetos positivos;

- Métricas de Avaliação / Resultados: Foram avaliadas 45 imagens de IHC em três categorias diferentes, o percentual de acerto na extração de objetos positivos ficou em 96% encontrada;
- Problemas em Aberto: melhorar o desempenho da técnica;
- Disponibilidade de implementação: não;
- Disponibilidade do Conjunto de Imagens: não; e
- Comparação: Este trabalho é semelhante a abordagem a ser proposta uma vez que se propõe a fazer a segmentação e quantificação de padrões de coloração em imagens de IHC, entretanto esta segmentação/quantificação é realizada em locais específicos (núcleo, membrana e citoplasma). O método é automático e se propõe a analisar células de tumor em imagens patológicas de IHC, mas espera que os objetos positivos estejam na coloração vermelho/marrom.

15. **Título:** Learning a nonlinear color distance metric for the identification of skin immunohistochemical staining

- Autores: Sobieranski, A.C. ; Neto, S.L.M. ; Coser, L. ; Comunello, E. ; von Wangenheim, A. ; Cargnin-Ferreira, E. ; Di Giunta, G.;
- Ano Publicação / Conceito (Qualis): 2009 / B1;
- Problema Abordado: Identificação de padrões de IHC em imagens no espaço de cor RGB;
- Solução Proposta: A solução proposta por este trabalho é baseada em duas etapas (treinamento e classificação). A primeira etapa é baseada em um processo de aprendizagem supervisionado, dividida em duas subetapas. Na primeira subetapa o especialista indica um conjunto de pontos (na imagem) que definem o padrão alvo, na segunda subetapa o conjunto de pontos é utilizado para treinamento do classificador (baseado na distância polinomial de Mahalanobis);

Na segunda etapa, a partir da métrica de distância aprendida na primeira etapa, o usuário fornece um grupo de imagens para classificação (pixel a pixel entre padrão de interesse ou não), que sejam do mesmo contexto da imagem onde foram extraídos os pontos para treinamento.

- Métricas de Avaliação / Resultados: Foram avaliadas 15 imagens de IHC com amostras de pele, comparadas com um GT feito manualmente por especialistas. As métricas para avaliação foram, correlação de Pearson (0,966), sensibilidade (0,99), especificidade (0,85) e fitness (0,92);
- Problemas em Aberto: testar a abordagem com outros corantes de IHC;
- Disponibilidade de implementação: não;
- Disponibilidade do Conjunto de Imagens: não; e
- Comparação: A abordagem a ser proposta pretende estender este trabalho, incorporando atributos de textura ao descritor de características.

### 3.2.2 ScienceDirect

1. **Título:** Computer-aided techniques for chromogenic immunohistochemistry: Status and directions;
  - Autores: Santa Di Cataldo, Elisa Ficarra, Enrico Macii.
  - Ano Publicação / Conceito (Qualis): 2010 / sem classificação na computação;
  - Problema Abordado: Revisão sobre técnicas guiadas por computador para análise de coloração em imagens de imuno-histoquímica;
  - Solução Proposta: Neste trabalho foi apresentado o básico sobre imuno-histoquímica e seus procedimentos. Bem como os principais passos na análise destas imagens por computador;
  - Métricas de Avaliação / Resultados: Comparação crítica entre métodos desde a separação de cor (pixel a pixel), localização antígeno alvo (núcleo, membrana celular,

citoplasma) e a quantificação de IHC (classificação corado/não corado, porcentagem de células coradas, continuidade...) ;

- Problemas em Aberto: Nas conclusões são apontados que técnicas para avaliação automatizada são normalmente baseadas em suposições fracas. Primeiramente a interpretação da intensidade de coloração como indicador da expressão de proteínas, sem considerar os múltiplos passos do processo de imuno-histoquímica (variabilidades tecnológicas e químicas) pode levar a conclusões enganosas.

Outro problema apontado é a subjetividade e a mensuração tendenciosa (baseada no conhecimento de especialistas), para o treinamento de algoritmos de aprendizagem;

- Disponibilidade de Implementação: não;
- Disponibilidade do Conjunto de Imagens: não;
- Comparação: O presente trabalho faz uma revisão sobre o status e as tendências na automatização de todo o processo de IHC, sem propor uma técnica específica.

2. **Título:** Automatic image segmentation of nuclear stained breast tissue sections using color active contour model and an improved watershed method

- Autores: Aymen Mouelhi and Mounir Sayadi and Farhat Fnaiech and Karima Mrad and Khaled Ben Romdhane.
- Ano Publicação / Conceito (Qualis): 2013 / sem qualis na computação;
- Problema Abordado: Classificação de núcleo celular cancerígeno e a separação de núcleos sobrepostos;
- Solução Proposta: A solução apresentada neste trabalho é baseada em quatro etapas, inicialmente são construídas duas funções de discriminação a partir das informações de cores empregando uma rede neural multicamadas combinada com o método de discriminação linear de Fisher, a fim de prover a segmentação de núcleos.

No próximo passo a acurácia da segmentação de núcleos é aumentada aplicando uma abordagem do algoritmo geodesic active contour model.



Na terceira etapa, a fim de garantir a contagem de núcleos (cancerígenos ou não), uma abordagem do algoritmo watershed que emprega características de cores e morfológicas é aplicado para fazer a separação de núcleos sobrepostos/que se tocam.

Por fim os núcleos negativos e benignos são extraídos, baseados em suas características morfológicas (forma e tamanho) quando comparados com núcleos malignos;

- Métricas de Avaliação / Resultados: O método proposto neste trabalho foi comparado com outros métodos propostos na literatura, bem como com uma avaliação feita manualmente por especialistas, mostrando uma acurácia acima de 97%. Uma performance de 3% a 4% melhor do que outros métodos;
- Problemas em Aberto: não apontado;
- Disponibilidade de Implementação: não relatado;
- Disponibilidade do Conjunto de Imagens: não relatado;
- Comparação: Este trabalho é semelhante a abordagem a ser proposta uma vez que executa a segmentação baseada em cor do padrão alvo. Entretanto esta abordagem vai além, proporcionando a segmentação nuclear.

3. **Título:** Wavelet-based multiscale texture segmentation: Application to stromal compartment characterization on virtual slides

- Autores: Nicolas Signolle, Marinette Revenu, Benoît Plancoulaine, Paulette Herlin.
- Ano Publicação / Conceito (Qualis): 2010 / A1;
- Problema Abordado: Segmentação de extensas imagens (uma imagem pode ter de 40 até 100 GB) de histopatologia, com conteúdo heterogêneo e complexo;
- Solução Proposta: A solução proposta neste trabalho é baseada em uma segmentação em multiescala onde é usada a transformada wavelet (uma mistura de três curvas Gaussianas) para criar subamostras da imagem. A primeira etapa de segmentação ocorre entre fundo e tecido em uma resolução de 32 $\mu$ m.

Para a segmentação no nível de núcleo celular é empregado uma abordagem que permite a segmentação com descritores de textura e uma análise multiescalar, denominado Hidden Markov Tree Model.

Um grupo de classificadores é construído (um para cada classe a ser analisa), então estes classificadores são combinados com uma técnica de *majority vote*, a fim de executar a segmentação final.

;

- Métricas de Avaliação / Resultados: Resultados preliminares foram comparados entre um groud truth feito por especialistas, obtendo resultados com média de 8,84% de diferença;
- Problemas em Aberto: O maior problema apontado foi o tempo para processar uma imagem de alta resolução (65000x45000 pixels), algo em torno de 50 horas;
- Disponibilidade de Implementação: não;
- Disponibilidade do Conjunto de Imagens:não;
- Comparação: O trabalho proposto aqui visa processar imagens de alta resolução, segmentado e mensurando estruturas histológicas.

### 3.2.3 ACM Digital Library

1. **Título:** Statistical comparison of color model-classifier pairs in hematoxylin and eosin stained histological images
  - Autores: Mutlu Mete, Umit Topaloglu;
  - Ano Publicação / Conceito (Qualis): 2010 / sem classificação na computação;
  - Problema Abordado: Revisão de espaços de cores na avaliação de imagens histológicas;
  - Solução Proposta: Foi conduzido um experimento com onze espaços de cores diferentes (CIELAB, CIELUV, CIEXYZ, CMY, CMYK, HSL, HSV, Hunter-LAB, NRGB, RGB, e SCT), avaliados empregando três classificadores distintos (SVMs, C4.5, and Naive Bayes);
  - Métricas de Avaliação / Resultados: Um experimento foi conduzido empregando 3494 imagens, onde a média da medida de F-mensure foi 0,9989;
  - Problemas em Aberto: não;

- Disponibilidade de Implementação: não;
  - Disponibilidade do Conjunto de Imagens: não;
  - Comparação: Este trabalho não apresenta uma abordagem específica, mas sim um comparativo entre espaço de cores e classificadores, que pode ser comparado com a abordagem a ser proposta.
2. **Título:** Image Analysis Tools for Evaluation of Microscopic Views of Immunohistochemically Stained Specimen in Medical Research---a Review
- Autores: Keerthana Prasad, Gopalakrishna K. Prabhu.
  - Ano Publicação / Conceito (Qualis): 2012 / sem classificação na computação;
  - Problema Abordado: Revisão de métodos para análise de visualização de imagens microscópicas de IHC;
  - Solução Proposta: Comparação entre técnicas e softwares para a análise de imagens histológicas;
  - Métricas de Avaliação / Resultados: revisão;
  - Problemas em Aberto: técnicas com baixa necessidade de conhecimento computacional, que possam facilmente ser aplicadas na prática clínica;
  - Disponibilidade de Implementação: não;
  - Disponibilidade do Conjunto de Imagens: não;
  - Comparação: O trabalho apresentado neste artigo realizou um levantamento de métodos e softwares, sem apresentar uma abordagem específica.

### 3.3 Análise de Resultados

A Tabela 2 apresenta a extração dos métodos computacionais para análise de imagens microscópicas de IHC, principalmente relacionados a segmentação e quantificação de padrões de coloração. Foram agrupados métodos, área de aplicação, ano de publicação e autores.

Tabela 2 Reunião de técnicas e campos de aplicação encontrados na revisão sistemática

Trabalho	Técnicas	Área de Aplicação	Referência
01	Textura GLCM <sup>4</sup> e FD <sup>5</sup> Rede Neural multilayer perceptron com back propagation	Identificação de regiões cancerígenas relativas ao câncer de mama	JITAREE et al. 2013
02	Espaço de cor híbrido (RGB, XYZ, HSI e Luv) Distância de Mahalanobis Algoritmo de crescimento de regiões baseado em watershaed	Classificação de estruturas histológicas relativas a proteína P53	ZHAO et al. 2003
03	Espaço de cor YCbCr Modelo estatístico/ deconvolução de cor	Detecção e segmentação de coloração IHC <sup>6</sup>	SHU; QIU; MOHAMMAD; 2013
04	Operações morfológicas (filtros de cor e ruído, componentes conectados e detector de bordas) Espaço de cor HSI e limiarização Ridler	Identificação de regiões celulares (núcleo, citoplasma e membrana), classificação e quantificação da reação proteica de acordo com a localização.	FICARRA et al. 2006
05	Limiarização baseada no método Otsu. Espaço de cor RGB e filtro de Textura Laws. Variação do algoritmo k-Nearest Neighbours (com sistema de pesos).	Avaliação dos receptores estrogênicos para diagnóstico e prognóstico de câncer de mama	KOSTOPOULOS et al. 2007
06	Espaço de cor RGB, convolução de kernels derivativos 2D-Gaussiana	Classificação e quantificação de câncer de mama em microarranjos de amostras de tecidos	AMARAL, 2013
07	Espaço de cor HSV, medidas de textura baseadas em filtros de smoothing e equalização de histograma. K-means , watershed interativo e descritores de Fourier.	Detecção de regiões foliculares em imagens de IHC	SAMSI et al. 2010
08	Espaço de cor YUV e limiarização baseada no método Otsu.	Segmentação de imagens de IHC relativas a câncer de ovário.	DONG et al., 2010 [1]
09	Espaço de cor RGB,	Segmentação de imagens de	DONG et al., 2010

<sup>4</sup> gray level co-occurrence matrices

<sup>5</sup> fractal dimensions

<sup>6</sup> Imuno-histoquímica

	algoritmo de clusterização ISODATA	IHC relativas a câncer de ovário.	[2]
10	Convolução para identificação de formas elípticas, algoritmo de corte em grafo.	Quantificação de coloração de IHC célula a célula.	CHANG et al., 2008
11	Espaço de cor YIQ e RGB. Limiarização baseada no método Otsu. Watershed com marcação inicial.	Segmentação celular em imagens de IHC, entre fundo e núcleo e entre núcleos sobrepostos	MAO; ZHAO e TAN, 2006
12	Espaços de cor RGB e HSV. Rede Neural multilayer perceptron.	Quantificação de coloração específica em imagens de IHC multi reagentes.	WEMMERT et al., 2013
13	Espaço de cor RGB. Métricas de textura (entropia, desvio padrão e intervalo de valores). Algoritmo de classificação SVM <sup>7</sup> com Linear Kernel.	Segmentação de <i>lumina</i> em imagens de IHC adquiridas de amostras de fígado de rato.	HUI; ZHIGUO e LONGMEI, 2011
14	Espaço de cor YCbCr e limiarização baseada no método de entropia máxima	Extração automática de células positivas (tumor) em imagens de IHC.	LIU; WANG e FANG, 2006
15	Espaço de cor RGB. Classificador baseado na distância polinomial de Mahalanobis	Identificação de padrões de coloração em imagens de IHC	SOBIERANSKI et al. (2009)
16	Revisão	Revisão	CATALDO; FICARRA; MACII, 2010
17	Rede neural multicamada, discriminante de Fisher, geodesic active contour model,	Classificação de núcleos cancerosos e segmentação de núcleos sobrepostos.	MOUELHI, A.; et al. 2013
18	Transformada wavelet (com curva Gaussiana), Hidden Markov Tree Model e Majority Vote	Segmentação de imagens extensas (entre 40 e 100 Gb)	SIGNOLLI, N. et al. 2010
19	Espaços de cor: CIELAB, CIELUV, CIEXYZ, CMY, CMYK, HSL, HSV, Hunter-LAB, NRGB, RGB, and SCT. Classificadores: SVMs, C4.5, e Naive Bayes.	Avaliação de espaços de cor para segmentação de imagens histológicas.	METE; TOPALUGLU, 2010

<sup>7</sup> Support Vector Machine

20	Revisão	Revisão de métodos e softwares para análise de imagens de IHC.	PRASAD; PRABHU, 2011

## 4 CONCLUSÕES

A primeira etapa do estudo dirigido executou o levantamento bibliográfico sobre análise de texturas em imagens, este levantamento encontrou 5 métodos para extração de descritores de textura em imagens. Somadas, as medidas extraídas para estes métodos ultrapassam 214. Estes métodos foram analisados e alguns irão compor a abordagem da dissertação de mestrado.

A segunda etapa do estudo dirigido executou a RSL, e tinha o objetivo de contextualizar no estado da arte, proposta a ser apresentada pelo aluno na qualificação. A revisão explorou 3 bases científicas (IEEE, ScienceDirect e ACM), segundo os critérios apresentados no protocolo de busca 62 artigos foram avaliados (título e resumo) e destes 20 foram selecionados para análise.

Segundo Cataldo et al. (2012) fluxos de processamento na análise de imagens de IHC podem ser divididos em: separação da contribuição de rótulo (segmentação de cor, deconvolução de cor e técnicas multiespectrais); localização de antígeno alvo (compartimentalização de tecidos e segmentação celular); e quantificação de IHC (classificação entre corado/não corado, porcentagem de células coradas, continuidade de coloração e ranking).

Seguindo essa divisão apresentada do fluxo de processamento, o trabalho a ser proposto na qualificação pretende contribuir especificamente em dois pontos, na separação de contribuição de rótulo (segmentação de cor) e na quantificação de IHC (classificação entre corado e não corado). Onde a ideia é propor a utilização de um método supervisionado de classificação, com a utilização de atributos de cor e textura combinados como descritor de características.

Dos 20 trabalhos avaliados na RSL, 11 empregaram um método de classificação supervisionado (que depende de uma etapa de treinamento para construção do classificador), como por exemplo, Jitaree et al. (2013), Mouelhi, A.; et al. (2013) e Wemmert et al. (2013), baseados em redes neurais. Bem como baseados em SVM como em Mete; Topaloglu (2010) e Hui; Zhiguo; Longmei (2011).

Dos 20 trabalhos avaliados na RSL, 9 trabalhos não usaram um método de classificação supervisionado, tiveram sua abordagem baseadas principalmente em três técnicas: (I) limiarização, com o método Otsu como apresentado em Dong et al., 2010 [1]; (II) crescimento de regiões, principalmente baseado no algoritmo watershed como apresentado em Samsi et al. (2010) e Zhao et

al. (2003); (III) ou ainda uma combinação das técnicas I e II, como apresentado em Mao; Zhao e Tan (2006).

Dos 20 trabalhos avaliados 13 utilizam algum espaço de cor específico durante o processo de segmentação/classificação e 6 empregam alguma métrica de textura no processo de segmentação/classificação, como apresentados em Jitaree et al. (2013), Kostopoulos et al. (2007), Amaral et al. (2013), Samsi et al. (2010), Hui; Zhiguo e Longmei (2011) e Signolli et al. (2010). A maioria dos trabalhos avaliados empregam métodos que serão utilizados na proposta de qualificação (segmentação/classificação supervisionada e descritores de características formados por atributos de cor e textura), o que justifica a escolha de tais métodos.

Duas principais oportunidades de pesquisas foram identificadas. Partindo do cenário em que a segmentação/classificação de padrões específicos de coloração é uma etapa importante no fluxo de análise de imagens de IHC e a localização espacial (núcleo, membrana, citoplasma) destes padrões são essências para o diagnóstico, identificou-se a primeira oportunidade de pesquisa para trabalhar na segmentação de estruturas celulares específicas, tais como a segmentação de núcleos celulares apresentadas em Liu; Wang e Fang (2006) e Mouelhi, A.; et al. (2013).

A segunda opção de pesquisa identificada foi a de trabalhar com processamento de imagens extensas, onde lâminas virtuais são criadas a partir da digitalização com equipamentos específicos. Estas lâminas virtuais são imagens que podem atingir tamanhos de 40Gb até 100 Gb, com dimensões de até 65000x45000 pixels, conforme apresentado em Signolli et al. (2010), onde o processo de segmentação/classificação de um único slide virtual pode levar até 50 horas.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, T. et al. Classification and immunohistochemical scoring of breast tissue microarray spots. *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, v. 60, n. 10, p. 2806–2814, Oct 2013. ISSN 0018-9294.

CATALDO, S. D.; FICARRA, E.; MACII, E. Computer-aided techniques for chromogenic immunohistochemistry: Status and directions. *Computers in Biology and Medicine*. v.42, i. 10, p. 1210-1225, oct. 2012.

CHANG, H. et al. Scoring histological sections through immunohistochemistry. In: *Biomedical Imaging: From Nano to Macro, 2008. ISBI 2008. 5th IEEE International Symposium on*. [S.l.: s.n.], 2008. p. 344–347.

[1] DONG, J. et al. Automatic segmentation for ovarian cancer immunohistochemical image based on yuv color space. In: *Biomedical Engineering and Computer Science (ICBECS), 2010 International Conference on*. [S.l.: s.n.], 2010. p. 1–4.

[2] DONG, J. et al. Automatic segmentation for ovarian cancer immunohistochemical image based on chroma criterion. In: *Advanced Computer Control (ICACC), 2010 2<sup>nd</sup> International Conference on*. [S.l.: s.n.], 2010. v. 2, p. 147–150.

FICARRA, E.; MACII, E. Computer-aided evaluation of protein expression in pathological tissue images. In: *Computer-Based Medical Systems, 2006. CBMS 2006. 19th IEEE International Symposium on*. [S.l.: s.n.], 2006. p. 413–418. ISSN 1063-7125.

FORSYTH, D. A.; PONCE, J. **Computer Vision A Modern Approach**. New Jersey, Prentice Hall, 2002.

GONZALEZ, Rafael C.; WOODS, Richard E.. **Processamento Digital de Imagens**. 3. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2010.

GURCAN, M., BOUCHERON, L., CAN, A., MADABHUSHI, A., RAJPOOT, N., YENER, B. Histopathological image analysis: A review. *IEEE Reviews in Biomedical Engineering*, v.2, p.147-171, out. 2009.

HUI, W.; ZHIGUO, Z.; LONGMEI, J. Automatic detection of lumina in mouse liver immunohistochemical color image using support vector machine and cellular neural network. In: *Computational Intelligence and Security (CIS), 2011 Seventh International Conference on*. [S.l.: s.n.], 2011. p. 1086–1090.

JITAREE, S. et al. Classifying breast cancer regions in microscopic image using texture analysis and neural network. In: *Biomedical Engineering International Conference (BMEiCON), 2013 6th*. [S.l.: s.n.], 2013. p. 1–4.

KAUR, Amandeep; GUPTA, Savita. Texture Classification Based on Gabor Wavelets. *International Journal Of Research In Computer Science*. Ny, p. 39-44. jan. 2012.

KOSTOPOULOS, S. et al. Colour-texture based image analysis method for assessing the hormone receptors status in breast tissue sections. In: *Engineering in Medicine and Biology Society, 2007. EMBS 2007. 29th Annual International Conference of the IEEE*. [S.l.: s.n.], 2007. p. 4985–4988. ISSN 1557-170X.

KOTHARI, S., PHAN, J., MO\_TT, R., STOKES, T., HASSBERGER, S., CHAUDRY, Q., YOUNG, A., WANG, M. Automatic batchinvariant color segmentation of histological cancer images. In: *INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOMEDICAL IMAGING: FROM NANO TO MACRO*. 2011, Chicago, **Proceedings ...**, IEEE, 2011. p. 657 - 660.

LIU, B.; WANG, W.; FANG, X. Automatic extraction of positive cells in tumor immunohistochemical pathology image based on ycbcr. In: *Intelligent Control and Automation, 2006. WCICA 2006. The Sixth World Congress on*. [S.l.: s.n.], 2006. v. 2, p. 9708–9712.

MAO, K.; ZHAO, P.; TAN, P.-H. Supervised learning-based cell image segmentation for p53 immunohistochemistry. *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, v. 53, n. 6, p. 1153–1163, June 2006. ISSN 0018-9294.

MATOS, L. L.; TRUFELLI, D. C.; MATOS, M. G. L.; PINHAL, M. A. S. Immunohistochemistry as an Important Tool in Biomarkers Detection and Clinical Practice. **Biomarker Insights**. v.5, p. 9-20, fev.2010.

MOUELHI, A.; et al. Automatic image segmentation of nuclear stained breast tissue sections using color active contour model and an improved watershed method. **Biomedical Signal Processing and Control**. v.8, i.5, p.421-436, set. 2013.

PHAM, N.A., MORRISON, A., SCHWOCK, J., AVIEL-RONEN, S., IAKOVLEV, V., TSAO, M.S.,HO, J., HEDLEY, D. Quantitative image analysis of immunohistochemical stains using a cmyk color model. **Diagnostic Pathology** p. 1-10, 2007.

PRASAD, K., PRABHU, G. Image analysis tools for evaluation of microscopic views of immunohistochemically stained specimen in medical research, a review. **Journal of Medical systems** p. 1-11, 2011.

SAMSI, S. et al. Detection of follicles from ihc-stained slides of follicular lymphoma using iterative watershed. *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, v. 57, n. 10, p. 2609–2612, Oct 2010. ISSN 0018-9294.

SHARMA, M.; SINGH, S.. Evaluation of texture methods for image analysis. In: *THE SEVENTH AUSTRALIAN AND NEW ZEALAND INTELLIGENT INFORMATION SYSTEMS CONFERENCE*, 17., 2001, Nz. **Proceedings...** . Nz: Ieee, 2001. p. 117 - 121.

SHU, J.; QIU, G.; MOHAMMAD, I. A semi-automatic image analysis tool for biomarker detection in immunohistochemistry analysis. In: *Image and Graphics (ICIG), 2013 Seventh International Conference on*. [S.l.: s.n.], 2013. p. 937–942.

SIGNOLLI, N. et al. Wavelet-based multiscale texture segmentation: Application to stromal compartment characterization on virtual slides. **Signal Processing**. v.90, i.8, p.2412-2422, aug. 2010.

SOBIERANSKI, A. et al. Learning a nonlinear color distance metric for the identification of skin immunohistochemical staining. In: *Computer-Based Medical Systems, 2009. CBMS 2009. 22nd IEEE International Symposium on*. [S.l.: s.n.], 2009. p. 1–7. ISSN 1063-7125.

WEMMERT, C.; et al. Stain unmixing in brightfield multiplexed immunohistochemistry. In: 20th IEEE International Conference on Image Processing (ICIP), 2013 . **Proceedings...** . Ieee, 2013. p. 1125 - 1129.

ZHAO, P. et al. Automatic cell analysis for p53 immunohistochemistry in bladder inverted papilloma. In: *Biomedical Engineering, 2003. IEEE EMBS Asian-Pacific Conference on*. [S.l.: s.n.], 2003. p. 168–169.

ZHENG, N.; XUE, J. **Statistical Learning and Pattern Analysis for Image and Video Processing, Advances in Pattern Recognition**. London Limited, Springer-Verlag, 2009.

ZUVA,T., OLUGBARA, O., O., OJO, S. O., NGWIRA, S. M. Image Segmentation, Available Techniques, Developments and Open Issues. **Canadian Journal on Image Processing and Computer Vision**. v.2, n3, 2011.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE A

A seguir são apresentadas as *strings* específicas utilizadas em cada mecanismo de busca. Bem como as restrições permitidas em cada mecanismo.

### A.1 IEEE

Neste mecanismo é possível restringir a busca por título, resumo, termos indexados e ano de publicação, a string empregada foi:

```
7  (
8  ("Document Title": "pattern recognition" OR "semi-supervised learning" OR "image analysis" OR "nonlinear color distance metric" OR "texture analysis")
9  OR
10 ("Index Terms": "pattern recognition" OR "semi-supervised learning" OR "image analysis" OR "nonlinear color distance metric" OR "texture analysis")
11 OR
12 ("Abstract": "pattern recognition" OR "semi-supervised learning" OR "image analysis" OR "nonlinear color distance metric" OR "texture analysis")
13 )
14 )
15
16 AND
17
18 (
19 ("Document Title": "immunohistochemistry staining" OR "immunohistochemistry quantification" OR "immunohistochemical staining" OR "immunohistochemical quantification"
20 OR immunohistochemical OR immunohistochemistry)
21 OR
22 ("Index Terms": "immunohistochemistry staining" OR "immunohistochemistry quantification" OR "immunohistochemical staining" OR "immunohistochemical quantification"
23 OR immunohistochemical OR immunohistochemistry)
24 OR
25 ("Abstract": "immunohistochemistry staining" OR "immunohistochemistry quantification" OR "immunohistochemical staining" OR "immunohistochemical quantification"
26 OR immunohistochemical OR immunohistochemistry)
27 )
28 )
```

### A.2 SCIENCE DIRECT

Neste mecanismo de busca foi possível aplicar a restrição de data de publicação e fonte (ciência da computação). A *string* de busca empregada foi:

```
91 (
92 ("immunohistochemistry staining" OR "immunohistochemistry quantification" OR "immunohistochemical staining" OR "immunohistochemical quantification" )
93 AND
94 ("pattern recognition" OR "image analysis" OR "semi-supervised learning" OR "nonlinear color distance metric" OR "texture analysis")
95 )
96
```

### A.3 ACM DIGITAL LIBRARY

Neste mecanismo de busca foi possível aplicar restrição para título, resumo, palavras chaves e data de publicação. A *string* de busca empregada foi:

```

44
45 (
46 (
47 (Title: "pattern recognition" OR "semi-supervised learning" OR "image analysis" OR "nonlinear color distance metric" OR "texture analysis")
48 OR
49 (Abstract: "pattern recognition" OR "semi-supervised learning" OR "image analysis" OR "nonlinear color distance metric" OR "texture analysis")
50 OR
51 (Keywords: "pattern recognition" OR "semi-supervised learning" OR "image analysis" OR "nonlinear color distance metric" OR "texture analysis")
52 )
53 )
54 AND
55
56 (
57 (Title: "immunohistochemistry staining" OR "immunohistochemistry quantification" OR "immunohistochemical staining" OR "immunohistochemical quantification" )
58 OR
59 (Abstract: "immunohistochemistry staining" OR "immunohistochemistry quantification" OR "immunohistochemical staining" OR "immunohistochemical quantification" )
60 OR
61 (Keywords: "immunohistochemistry staining" OR "immunohistochemistry quantification" OR "immunohistochemical staining" OR "immunohistochemical quantification" )
62 )
63 )
64

```