

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE FÍSICA



**Classificação automática da expressão HER2 em imagens de  
hibridização in situ de tecido mamário**

João Manuel Duarte Mendes

**Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica e Biofísica**  
Perfil em Sinais e Imagens Médicas

Dissertação orientada por:  
Doutor Nuno Miguel Matela  
Doutor António Polónia

2018

## **Agradecimentos**

Gostaria de começar por dirigir o meu especial agradecimento ao Doutor António Polónia e ao Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto, pela oportunidade, pela disponibilidade e por demonstrarem estar sempre recetivos para fornecer tudo o que seria necessário para o desenvolvimento do projeto.

Apresento o meu grande agradecimento ao Doutor Nuno Matela, pela orientação irrepreensível, não só neste projeto, como no meu restante percurso académico. O seu incentivo, rigor científico e gentileza foram valores essenciais para concretizar o projeto.

Agradeço a todos os professores da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, e sobretudo os que pertencem ao Instituto de Biofísica e Engenharia Biomédica, que tive oportunidade de conhecer, que me inspiraram de diferentes formas e que contribuíram para a minha formação académica.

Estou igualmente grato aos meus professores do ensino secundário, da Escola Secundária Ibn Mucana, que me formaram também enquanto ser humano e que, em primeira instância, me fizeram desenvolver o meu gosto pela ciência.

Dirijo um agradecimento especial aos meus pais e minha irmã Joana pelo suporte e apoio, em todas as circunstâncias. Sei que poderei sempre contar convosco.

Agradeço também aos meus colegas e amigos Amanda da Silva, Anne Martins, Daniela Freitas, Francisco Cunha, Joana Dias e Raquel Maio. De diferentes modos foram todos muito importantes nesta jornada.

## Resumo

A sobre-expressão do gene *Human epidermal growth factor receptor* (HER2) é um factor associado a pior prognóstico em tumores da mama. Avaliar a expressão deste gene no tumor torna-se um aspecto importante para as decisões dos procedimentos terapêuticos a seguir. O *status* HER2 do tumor pode ser determinado com base em testes de anatomia patológica, que recorrem a técnicas de hibridização *in situ*. Este tipo de teste implica a contagem de pontos de hibridização correspondentes ao gene HER2 e ao centrómero do cromossoma 17 (CEP17) e de núcleos. Este teste implica um procedimento moroso e repetitivo por parte dos médicos patologistas.

A proposta deste estudo foi analisar e construir uma solução, no contexto da patologia digital, que permitisse automatizar os processos de contagem necessários na avaliação da expressão HER2 em tumores da mama. Desenvolveu-se um sistema, baseado em *Python*, que recorre apenas a ferramentas *open-source*. Aplicaram-se métodos computacionais e estatísticos de modo a ler as imagens, segmentar os núcleos e sinais de HER e CEP17, extrair *features*, classificar e proceder a contagens.

A segmentação dos pontos de hibridização foi feita através da deteção de *blobs* e a sua classificação com base num modelo de regressão logística. Segmentação *Watershed* e deteção de *blobs* foram analisados como hipóteses de segmentação dos núcleos. Decidiu-se usar a deteção de *blobs* também como método para contagem de núcleos.

Estabeleceu-se uma comparação entre os resultados do algoritmo e contagens manuais que permitiu tirar algumas conclusões. Métodos de deteção de *blobs* são alternativas válidas para as contagens requeridas no teste do HER2. Existiram erros que afetam na mesma medida as contagens automáticas de HER2 e CEP17. A contagem de núcleos não é independente das contagens dos pontos de hibridização. Mesmo quando as contagens diferiram, nos casos analisados, os parâmetros utilizados para classificar a expressão HER2 são coincidentes entre contagens automáticas e manuais.

Como trabalho futuro, o algoritmo desenvolvido pode ser incluído num software *open source* de análise e processamento de imagens de anatomia patológica. Com base em processos semelhantes aos implementados, é possível extrair mais dados com potencial de abrir novos horizontes no que diz respeito à caracterização da expressão HER2 de tumores.

**Palavras-Chave:** Patologia Digital, Processamento de Imagem, Expressão HER2

## Abstract

Overexpression of the gene human epidermal growth factor receptor (HER2) is a factor associated with a prognosis in breast tumors. Evaluating a gene for this tumor is an important aspect to define the therapeutic procedures to follow. The HER2 *status* of the tumor can be defined based on pathological anatomy tests, which use in situ hybridization techniques. This type of assay involves the counting of hybridization points corresponding to the HER2 gene and the chromosome 17 centromere (CEP17) and nuclei.

The purpose of this study was to analyze and develop a digital pathology solution that allows the automation of processes in the evaluation of HER2 in breast tumors. A system, based on Python, was developed using only open source tools. Computational and statistical methods were applied to images to segment HER and CEP17 nuclei and signals, extract features, classify and count.

The segmentation of the hybridization points was performed through the detection of blobs and their classification based on a logistic regression model. Watershed segmentation and blob detection were considered hypotheses to segment nuclei. It was decided to use a blob detector to find and count the nuclei.

A comparison was established between the results of the algorithm and the manual counts. Use blob detectors is a viable approach to perform the required counts in HER2 test. There were errors that affected the measure of HER2 and CEP17 in the same way. The nuclei count is not independent of the hybridization point counts. Even when the counts differed, the cases were, the parameters used to classify the HER2 expression are coincident between automatic and manual counts.

As future work, the developed algorithm can be included in an open source software for analysis and processing of pathological anatomy images. Based on similar procedures with the implements, it is possible to extract more data with the potential to open new horizons with respect to the characterization of HER2 expression of tumors.

**Keywords:** Digital Pathology, Image Processing, HER2 Expression

# Conteúdo

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Cancro da Mama e HER2.....</b>	<b>1</b>
1.2	<b>Testes do HER2 .....</b>	<b>2</b>
1.2.1	Imunohistoquímica.....	2
1.2.2	Hibridização <i>in situ</i> .....	3
1.2.3	Procedimentos e Limitações .....	6
1.3	<b>Patologia Digital .....</b>	<b>7</b>
1.4	<b>Estado de Arte .....</b>	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
<b>2</b>	<b>Objetivo do Projeto .....</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>Metodologia .....</b>	<b>12</b>
3.1	<b>Requisitos e Implementação .....</b>	<b>12</b>
3.2	<b>Leitura da Imagem.....</b>	<b>12</b>
3.3	<b>Seleção da Região de Interesse e Pré-processamento.....</b>	<b>13</b>
3.4	<b>Segmentação dos Sinais.....</b>	<b>15</b>
3.5	<b>Classificação dos Sinais.....</b>	<b>16</b>
3.6	<b>Segmentação dos Núcleos .....</b>	<b>16</b>
3.6.1	<i>Watershed</i> e Extração de features .....	16
3.6.2	Detetor de <i>blobs</i> .....	18
3.7	<b>Classificação final da expressão HER2 .....</b>	<b>18</b>
3.8	<b>Visão global do algoritmo .....</b>	<b>18</b>
<b>4</b>	<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>20</b>
4.1	<b>Análise dos métodos .....</b>	<b>20</b>
4.1.1	Segmentação de sinais HER2 e CEP17 – Detecção de <i>blobs</i> .....	20
4.1.2	Classificação de sinais HER2 e CEP17 – Regressão Logística .....	21
4.1.3	Segmentação de núcleos – <i>Watershed</i> e Detecção de <i>Blobs</i> .....	22
4.2	<b>Desafios na Implementação .....</b>	<b>24</b>
4.3	<b>Resultados e Validação .....</b>	<b>25</b>
<b>5</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>31</b>

## Lista de Figuras

Figura 1.1 Amostra de tecido de carcinoma da mama, em que foi aplicada a técnica de imunohistoquímica para detecção da proteína do gene HER2, com score 3+.....	3
Figura 1.2 Imagens obtidas por imunohistoquímica representativas de vários níveis de expressão da proteína HER2.....	3
Figura 1.3 Representação esquemática de alguns processos que estão na base da hibridização <i>in situ</i> .....	4
Figura 1.4 CISH e FISH .....	5
Figura 1.5 Imagem de uma amostra de tecido de carcinoma da mama, em que foi aplicada a técnica de SISH.....	5
Figura 1.6 Esquema explicativo da classificação da expressão HER2 em imagens de hibridização <i>in situ</i> .	6
Figura 1.7 Digitalizador de Lâminas – Sistema Whole Slide Image.....	7
Figura 1.8 Estrutura piramidal em que encontram organizados os dados que compõem uma imagem de uma digitalização de uma lâmina (sistema whole slide image).....	8
Figura 1.9 Resultado do algoritmo Visiopharm HER2-CONNECT™.....	9
Figura 1.10 Detecção dos pontos, no algoritmo apresentado por Raimondo et al. ....	10
Figura 3.1 Esquema representativo da composição de uma imagem RGB (Red-Green-Blue).....	13
Figura 3.2 Diagrama explicativo do processo de seleção da ROI pela função criada <code>select(jp2)</code> .....	14
Figura 3.3 Processo de segmentação Watershed dos núcleos.....	17
Figura 3.4 Diagrama de síntese da sequência de todas as etapas do algoritmo de classificação da expressão HER2.....	19
Figura 4.1 Aplicação do método de detecção de blobs nos núcleos 1, 2 e 3 para detecção dos pontos de hibridização.....	21
Figura 4.2 Métodos de segmentação de núcleos.....	23
Figura 4.3 Sobreposição de sinal HER2 e CEP17.....	24
Figura 4.4 Agrupamentos ou clusters de sinais HER2 .....	25
Figura 4.5 Núcleos pouco distinguíveis.....	25
Figura 4.6 Gráfico de contagem de sinais HER2: Algoritmo versus Manual.....	26
Figura 4.7 Gráfico de contagem de sinais CEP17: Algoritmo versus Manual.....	26
Figura 4.8 Contagens automáticas dos sinais HER e CEP17 .....	27
Figura 4.9 Gráfico de contagem de núcleos: Algoritmo versus Manual.....	28
Figura 4.10 Contagens automáticas dos núcleos .....	29
Figura 4.10 Gráfico com razão HER2/CEP17, com base nas contagens Algoritmo versus Manual.....	30
Figura 4.11 Gráfico com número médio de sinais HER2 por núcleo, com base nas contagens Algoritmo versus Manual.....	30

## Lista de Tabelas

Tabela 3.1 Conjunto de bibliotecas, pacotes e interfaces Python cujas funções foram utilizadas para o desenvolvimento do algoritmo.....	12
Tabela 3.2 Conjunto de parâmetros definidos para cada tipo de detetor de blobs para detecção dos sinais de HER2 e CEP17.....	15
Tabela 3.3 Parâmetro definido para o detetor de blobs Laplaciano de Gaussiano para detecção de núcleos. ....	18
Tabela 4.1 Comparação dos processos computacionais equivalentes às tarefas humanas na avaliação da expressão HER2 de tumores, a partir de imagem de uma digitalização de lâmina. ....	20
Tabela 4.2 Estatística do teste t e respetivo p-valor para os parâmetros intensidade média azul, verde, vermelha, cinzento e raio. ....	22
Tabela 4.3 Parâmetros-resultado do teste da expressão de HER2 para as imagens analisadas .....	30

## **Lista de Abreviaturas**

**CEP17:** Centrômero do cromossoma 17

**CISH:** Hibridização *in situ* cromogénica

**EGF:** Fator de crescimento epidémico

**FISH:** Hibridização *in situ* por fluorescência

**HER:** *Human epidermal growth factor receptor*

**SISH:** Hibridização *in situ* por prata

# 1 Introdução

## 1.1 Cancro da Mama e HER2

Cancro da mama foi a neoplasia com maior incidência e mortalidade em mulheres, na Europa, em 2012, tendo representado 28.8% de novos diagnósticos em oncologia e 16.8% das mortes por cancro. [1] Nos Estados Unidos da América, no mesmo ano, foi a principal causa de morte, em mulheres com idades compreendidas entre os 40 e os 59 anos. [2] A alta incidência e mortalidade de cancro da mama verificada nas últimas décadas tem estimulado a investigação da sua origem, meios de prevenção e tratamento.

Genericamente, a formação de células tumorais ocorre pela desregulação de múltiplos processos celulares. Alterações no número de cópias ou estruturais de genes podem contribuir para mudanças em processos como a apoptose, proliferação e motilidade celular. Estes eventos têm um papel predominante na origem e na progressão de tumores. Aprofundar os conhecimentos sobre as interações que ocorrem à escala molecular, permite uma maior compreensão sobre as características fenotípicas do tumor. Para o cancro da mama, já se encontram identificados muitos genes e mutações que permitem desvendar os seus mecanismos patofisiológicos. A estes genes foram associadas propriedades do tumor relativos à sua morfologia, metastaticidade, resposta terapêutica e hereditariedade. [3]

As neoplasias da mama podem ter diferentes origens e características. Cada subtipo de cancro da mama é geneticamente distinguível e apresenta interações distintas com hormonas e com fármacos. [4] Para o sucesso do tratamento, é importante adequar a terapêutica ao subtipo de neoplasia da mama. Para esse efeito, existe um conjunto de procedimentos e testes que devem ser aplicados e que permitem caracterizar o tumor. A classificação do cancro é feita com base em exames imagiológicos, biópsia e análise ao sangue.

Após o diagnóstico, as linhas de orientação clínica determinam que, para caracterização da neoplasia, se devem realizar, entre outros, testes de anatomia patológica para análise dos recetores hormonais e do gene *Human epidermal growth factor receptor 2* (HER2). [5] O gene do HER2 é um proto-oncogene cuja sobre-expressão se verifica em 20 a 30% dos cancros da mama (HER2+) e está associada a pior prognóstico. [6]

O recetor HER2 pertence à família dos recetores HER ou ErbB – proteínas tirosina-quinases transmembranadas que ligam o fator de crescimento epidérmico (EGF). Estes recetores têm um papel na regulação do crescimento e desenvolvimento de células epiteliais, mas amplificações, mutações e desregulações dos genes que os codificam conduzem a processos que aumentam a progressão de tumores malignos. A relação entre a atividade dos recetores HER e a progressão dos tumores deve-se à natureza dos mecanismos celulares regulados por estas proteínas. Os recetores HER, quando ativos, unem-se em dímeros e sofrem transfosforilação e transduzem sinais que regulam mecanismos de proliferação celular, inibição de apoptose, angiogénese e outros. Na existência de um tumor, alterações nestes processos podem estimular a progressão do tumor. [4]

O gene HER2, localiza-se no braço longo do cromossoma 17 e codifica a proteína transmembranada de 185-kDa. O recetor HER2 tem uma característica que o difere do HER1, HER3 e HER4, não tem um ligante extracelular identificado. Este tem a capacidade de formar dímeros de forma espontânea e transfosforilar na ausência de ligantes. Contribui para a estimulação do crescimento celular na forma mutada e não mutada. [4], [6]

Quando se identificou o gene HER2 e a sua importância clínica para o prognóstico, percebeu-se a necessidade de o tornar um alvo terapêutico. O estudo dos mecanismos destes recetores tem permitido o

desenvolvimento de inibidores sintéticos, que podem ser administrados a pacientes para aumentar a eficácia de tratamentos de tumores em que se verifica sobre-expressão dos HER. Para cancro da mama HER2+, está recomendado o tratamento com trastuzumab (Herceptin®). Trastuzumab é um anticorpo monoclonal que se liga com grande afinidade aos recetores HER2, ativando células do sistema imunitário que estimulam apoptose. Este fármaco ainda suprime a angiogénese e ativa supressores tumorais. Nos últimos anos, foram realizados diversos estudos que atestaram a eficácia desta terapêutica. A associação de trastuzumab à quimioterapia demonstrou diminuição da reincidência e da taxa de mortalidade de cancro da mama diagnosticado precocemente e quando localmente avançado. Em cancro da mama metastático, melhorou a resposta ao tratamento. São comercializados outros inibidores do HER2, como o Lapatinib (Tykerb®), e esta continua a ser uma área de investigação com muito potencial. [4]

## 1.2 Testes do HER2

A expressão do gene HER2 é um factor que influencia o desenvolvimento de tumores e que deve ser tomado em consideração, aquando das decisões de procedimentos terapêuticos a tomar. Quando existe um diagnóstico de cancro da mama, é necessário analisar este gene e determinar o estado de HER2 do tumor. Para o efeito, foram desenvolvidos testes, que cumprem determinados requisitos. A expressão de HER2 em células da mama pode ser avaliada através de testes de anatomia patológica. Estes testes são realizados em amostras do tumor obtidas a partir de biópsia ou de excisão cirúrgica. Pode-se estudar a expressão génica através de diferentes técnicas, tipicamente através da deteção de cadeias de ácidos nucleicos ou de proteínas. Existem duas abordagens principais na classificação do estado de HER2 de tumores da mama: imunohistoquímica e hibridação *in situ*. Existe um conjunto de parâmetros e requisitos definidos pelos *American Society of Clinical Oncology* e o *College of American Pathologists Clinical Practice* que permitiram estandardizar estes procedimentos e os seus resultados. [7]

### 1.2.1 Imunohistoquímica

Imunohistoquímica é um termo que designa um conjunto de procedimentos em que se utilizam anticorpos que estabelecem ligação com epítomos de interesse. As reações antígeno-anticorpo são utilizadas como um recurso para sinalizar e localizar constituintes específicos em cortes histológicos. Os anticorpos podem ser combinados com marcadores, sem que a sua afinidade com os antígenos seja comprometida. Neste tipo de reações ocorre formação de complexos anticorpo-antígeno com uma determinada cor, permitindo avaliar a presença das substâncias associadas por análise visual. Por norma, estas técnicas são aplicadas em secções de tecido com uma espessura na ordem do  $\mu\text{m}$  e permitem marcar os alvos, mantendo a integridade dos tecidos circundantes. [8]

Esta técnica é recorrentemente utilizada em anatomia patológica para sinalizar substâncias ou estruturas associadas a patologias. É possível obter informação relevante para a caracterização da patologia e para o seu diagnóstico, prognóstico e indicação terapêutica. Neste contexto, as principais aplicações são na área da oncologia, infecologia e neurologia. Os procedimentos de imunohistoquímica permitem, por exemplo, avaliar a presença da proteína p53, de recetores hormonais e actina. Para que testes desta natureza sejam criados, existe, por base, um importante trabalho conjunto no desenvolvimento de protocolos laboratoriais e produção de reagentes. [8]

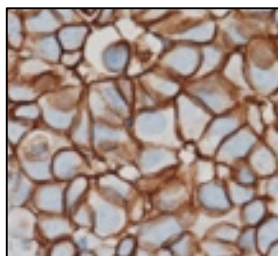


Figura 1.1 Amostra de tecido de carcinoma da mama, em que foi aplicada a técnica de imunohistoquímica para detecção da proteína do gene HER2, com score 3+. Imagem adaptada de [9]

A expressão do gene HER2 também pode ser avaliada com testes de imunohistoquímica (Figura 1.1). Com esta técnica, é possível marcar a proteína membranar 185-kDa, que está codificada no gene HER2. Por avaliação visual da forma como as proteínas, nas membranas, ficam marcadas, consegue-se avaliar se o gene se encontra sobre-expresso. [10] As linhas de orientação clínica [7] estabelecem que, com base em parâmetros pré-estabelecidos, se deve atribuir às imagens obtidas um *score* de 0 (negativo), 1+ (negativo), 2+ (moderadamente positivo) ou 3+ (fortemente positivo) – Figura 1.2. Os parâmetros de base relacionam-se com a intensidade da coloração, marcação completa ou incompleta das membranas e com o número de células do tumor afetadas. A imunohistoquímica é a técnica utilizada em primeira instância para avaliação da expressão de HER2, por ser uma técnica com protocolo menos dispendioso e mais fácil de realizar. [10]

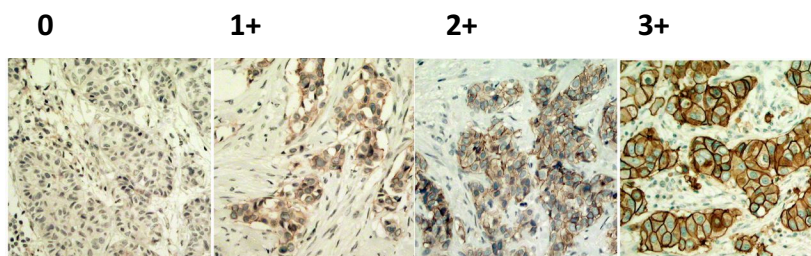


Figura 1.2 Imagens obtidas por imunohistoquímica representativas de vários níveis de expressão da proteína HER2. Imagem adaptada de [11]

### 1.2.2 Hibridização *in situ*

Hibridização é o termo que designa o processo de ligação entre duas moléculas de cadeia única de ácidos nucleicos, formando uma cadeia dupla. A interação entre as duas cadeias é não covalente e pode ocorrer com DNA ou RNA (DNA-DNA, RNA-RNA ou DNA-RNA). Este processo ocorre entre sequências específicas, isto é, a interação estabelece-se por complementaridade. [12]

Em diversas áreas da biomedicina, o estudo dos ácidos nucleicos assume uma grande importância. Por esse motivo, é necessário recorrer a diferentes meios, ferramentas e procedimentos para o estudo destas moléculas. A detecção de cadeias de DNA ou RNA específicas de interesse, dentro das células, é um processo que é útil em diferentes contextos e que permite uma melhor compreensão de diferentes mecanismos celulares. Baseado no conhecimento do mecanismo do processo da hibridização, desenvolveram-se técnicas histológicas para identificar e sinalizar sequências específicas de DNA ou RNA – técnicas de Hibridização *in situ*. Nestes protocolos, utilizam-se marcadores associados a sequências de ácidos nucleicos complementares à cadeia que se pretende identificar. É uma técnica amplamente utilizada em investigação, em diferentes áreas, e para a caracterização e diagnóstico de algumas patologias. Permitem, por exemplo,

detetar problemas cromossómicos, mutações e a expressão, presença, número de cópias e localização de genes.

Tendo em conta a finalidade, poderão ser utilizados diferentes métodos de hibridização *in situ* e podem ser seguidos protocolos com características específicas. No entanto, existem alguns processos-base que são sempre efetuados e que estão esquematicamente representados na Figura 1.3. Primeiramente, é necessário secionar a amostra e prepará-la para os processos seguintes. Posteriormente, separam-se as cadeias de DNA, através de calor ou agentes desnaturantes, para que a hibridização possa ocorrer. Numa fase final, uma solução com a sonda é aplicada na amostra. A sonda é a cadeia complementar à sequência alvo do teste, marcada por um radioisótopo, fluoróforo, biotina, nucleótido modificado ou outro. Existem diversos protocolos para obtenção da sonda. [12]

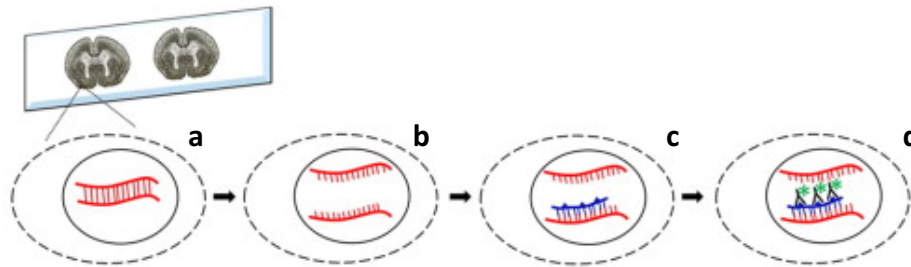


Figura 1.3 Representação esquemática de alguns processos que estão na base da hibridização *in situ* - a) preparação e permeabilização do tecido, b) separação das cadeias de DNA, c) ligação com a sonda e d) visualização, devido a marcadores. Imagem adaptada de [13]

Os procedimentos de hibridização *in situ* podem ser utilizados para testar a expressão do gene HER2 em células de cancro da mama. Enquanto que ao utilizar a técnica de imunohistoquímica se avalia a sobre-expressão da proteína 185-kDa, com a hibridização *in situ* avalia-se diretamente a amplificação do gene HER2.

Podem ser utilizadas diferentes métodos de hibridização *in situ* para avaliar a amplificação do HER2. O mais frequentemente utilizado é a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), que exige um microscópio de fluorescência. Um protocolo alternativo, mais recente, que também pode ser aplicado é a hibridização *in situ* cromogénica (CISH), que permite visualização em microscópio de campo claro. O que distingue estas técnicas são o tipo de marcadores utilizados e o método da sua deteção.

Na técnica de FISH são utilizadas sondas marcadas com moléculas fluorescentes (fluoróforos), que permitem identificar diferentes genes simultaneamente, pela emissão de luz de diferentes comprimentos de onda. Os microscópios de fluorescência estão equipados de modo a conseguir detetar seletivamente a radiação emitida pelas diferentes sondas.

A CISH distingue-se da FISH pela utilização de sondas marcadas com moléculas com propriedades cromogéneas. Estes marcadores conferem cor nos locais de fixação das sondas. Esses pontos de cor podem ser visualizados nos microscópios de campo claro mais convencionais.

Por ser uma técnica mais antiga, os procedimentos de FISH são considerados *standard* para a avaliação do estado de HER2. No entanto, existem desvantagens na aplicação destes protocolos. A utilização de microscópios de fluorescências, habitualmente, não faz parte dos procedimentos rotineiros dos laboratórios. Em acréscimo, a FISH exige objetivas de imersão e câmaras digitais de alta qualidade. [14] A CISH é uma técnica mais recente e que apresenta vantagens, por ser mais rápida, mais estável e por utilizar equipamento usualmente mais habitual para os patologistas. No que diz respeito a performance e fiabilidade

de resultados, vários estudos foram feitos [15][16][14], estabelecendo que existe correlação de resultados entre as duas técnicas.

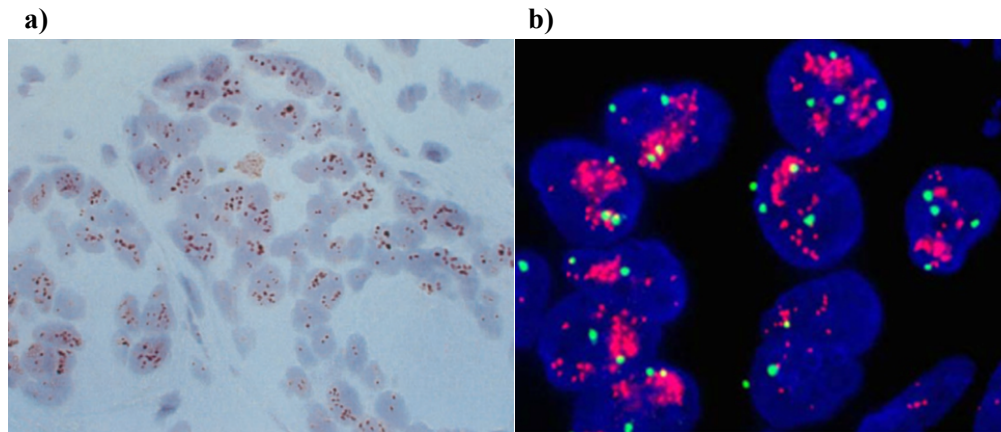


Figura 1.4 a) Imagem obtida pela técnica CISH e b) Imagem obtida pela técnica de FISH. Imagem adaptada de [14,17]

Uma variante do CISH que pode ser usada para testar o estado de HER2 em cancro da mama é a hibridização *in situ* por prata (SISH). Nesta técnica, a marcação ocorre por reações de precipitação da prata. A concordância de resultados obtidos entre a técnica standard de FISH e de SISH também já foi comprovada. [18]

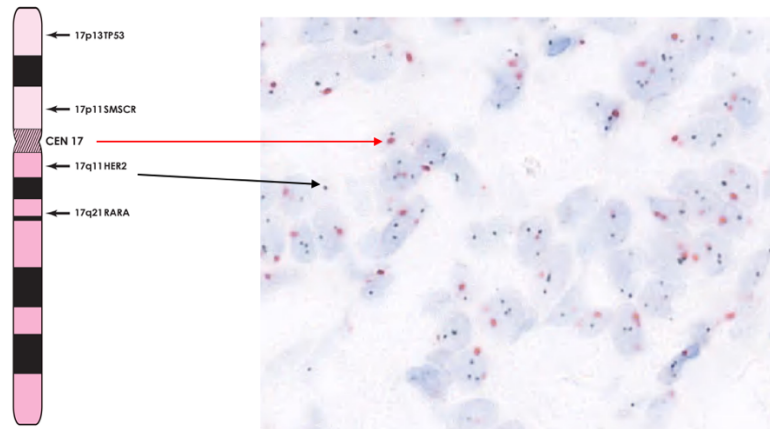


Figura 1.5 Imagem de uma amostra de tecido de carcinoma da mama, em que foi aplicada a técnica de SISH. em SISH, o gene HER2 fica marcado a preto e o CEP17 marcado a vermelho. Imagem cedida pelo IPATIMUP.

Para testar a expressão de HER2, pretende-se sinalizar duas sequências distintas do cromossoma 17: o gene HER2 e o centrómero (CEP17). Como exemplificado na Figura 1.5, em SISH, o gene HER2 fica marcado a preto e o CEP17 marcado a vermelho. [9] O diagnóstico é realizado com base na contagem dos sinais de HER2 e CEP17 de 20 núcleos de células não sobrepostas do tumor, em regiões distintas. Existem dois parâmetros que definem o diagnóstico, a razão HER2/CEP17 da contagem total e o número médio de HER2 por núcleo. [7] Pelas linhas de orientação clínica [7], quando a razão HER2/CEP17 é superior a 2, o resultado é positivo, isto é, o gene encontra-se amplificado. Quando a razão HER2/CEP17 é inferior a 2, existem 3 resultados possíveis, dependendo da contagem média de HER2 por núcleo. Se o número médio do gene por núcleo for superior a 6, o resultado é positivo e se for inferior a 4, é negativo. Quando esta contagem média é um valor superior a 4 e inferior a 6, o resultado não é conclusivo (Figura 1.6).

Este teste exige dos patologistas contagem manual de pontos, o que é um processo bastante repetitivo e dispendioso em termos de tempo.

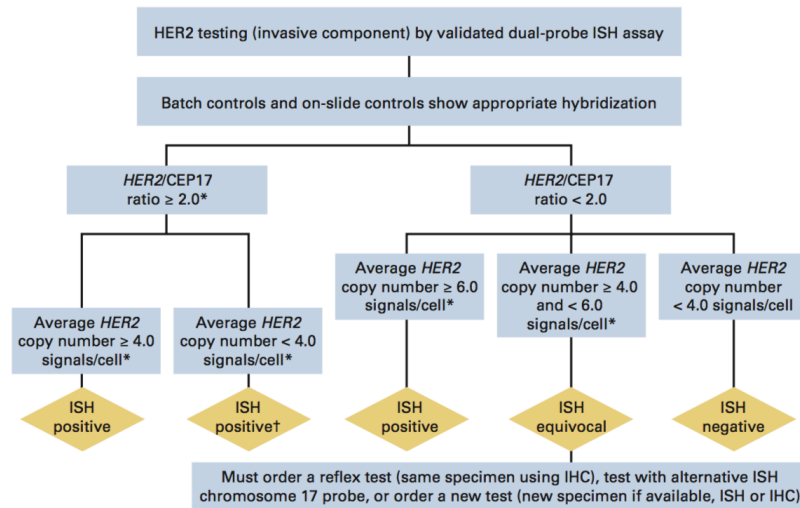


Figura 1.6 Esquema explicativo da classificação da expressão HER2 em imagens de hibridização *in situ*. [19]

### 1.2.3 Procedimentos e Limitações

Para classificar o estado de HER2 de células tumorais pode-se recorrer, de igual forma, aos protocolos de histoquímica ou de hibridização *in situ*. No entanto, a maioria dos laboratórios aplica a imunohistoquímica como primeiro teste. Os procedimentos de hibridização *in situ* são aplicados tipicamente quando os resultados do primeiro teste não são inequívocos. Esta prática deve-se ao facto dos procedimentos de histoquímica serem mais baratos e mais acessíveis aos laboratórios. Em oposição, a hibridização *in situ* é mais dispendiosa e exige maior especialização.

A classificação da expressão de HER2 tem um grande valor clínico para a tomada de decisão da terapêutica a utilizar. Todavia, o modo como se faz essa classificação apresenta limitações, inerentes aos protocolos utilizados. Vários estudos comprovaram que existe inter-variabilidade de resultados, entre clínicos. [23,28] Resultados não concordantes também são verificados entre laboratórios centrais e locais. Essas não concordâncias de resultados devem-se aos critérios de natureza subjetiva das linhas de orientação clínicas, sobretudo nos testes imunohistoquímicos. Avaliar a intensidade da coloração, por exemplo, é um parâmetro que carece de objetividade e que, para a mesma imagem, pode conduzir a resultados distintos. Para a hibridização *in situ*, os critérios são mais objetivos, mas na contagem visual de sinais existe uma margem de erro humano que também pode afetar o resultado.

As limitações referidas podem dar origem a falsos positivos (tumores classificados como HER2+ que não o são) e falsos negativos (tumores HER2+ que são classificados como não o sendo). Avaliar de modo errado a expressão HER2 de um tumor tem implicações clínicas e económicas. Os falsos positivos implicam a prescrição de trastuzumab a doentes não indicados, o que implica um custo adicional e pode conduzir a efeitos secundários desnecessários. Os falsos negativos implicam a não prescrição de trastuzumab, o que pode comprometer o resultado da terapêutica e conduzir a custos financeiros a longo prazo. [20]

Um modo de diminuir as limitações e os efeitos dos erros de classificação passa pela utilização de ferramentas computacionais de análise de imagem.

### 1.3 Patologia Digital

Em anatomia patológica, no meio clínico, maioritariamente, os procedimentos seguidos recorrem a microscopia ótica, nomeadamente microscopia de campo claro. No entanto, o processo de digitalização que transformou todas as áreas da ciência, também abrangeu a anatomia patológica. A tecnologia atualmente disponível permite, através de digitalizadores de lâminas, a digitalização de toda a lâmina – sistema de *Whole Slide Image* (Figura 1.7).

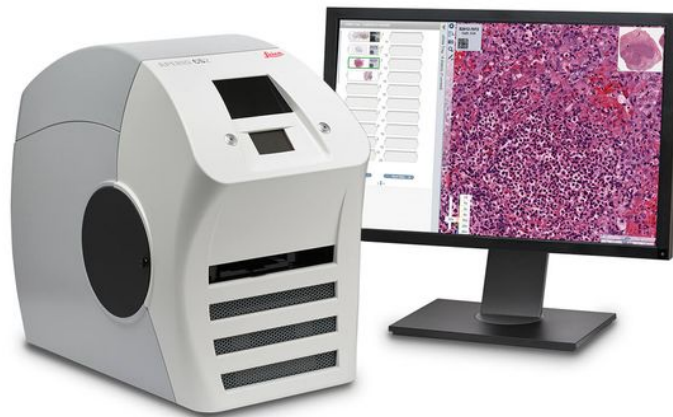


Figura 1.7 Digitalizador de Lâminas – Sistema *Whole Slide Image*. Imagem retirada de [30]

As aplicações de patologia digital concentram-se sobretudo no ensino e investigação. A digitalização de lâminas como meio de diagnóstico direto é uma prática pouco disseminada. Contudo, o potencial da patologia digital para ser utilizado em meio clínico é reconhecido. Existe um grande interesse pelos clínicos na aplicação de sistemas de análise de imagem nas digitalizações das lâminas e prevê-se que aumente o recurso a práticas de patologia digital para diagnóstico.

Existem diversos tipos de digitalizadores de lâminas, com diferentes características e métodos de aquisição de imagem. A norma 004/2015 emitida a 25/03/2015 pela Direção Geral de Saúde, definiu um conjunto de critérios que os digitalizadores de lâminas para microscopia, em anatomia patológica, deverão cumprir. Um dos requisitos passa por ser um sistema *Whole Slide Image*, que permita digitalização integral da lâmina. Quanto a ampliação ótica, também é definido que deverá ser de 40x, com possibilidade de digitalização a 4x, 10x e 20x. Estes dois requisitos têm um impacto grande nas propriedades das imagens obtidas, sobretudo no seu tamanho.

As imagens adquiridas são organizadas numa estrutura de pirâmide, como representado na Figura 1.8, sequencialmente com diminuição da resolução da base para o topo. Encontra-se na base da pirâmide a imagem de maior resolução, e no topo a *subsample* de pior resolução. Esta estrutura permite uma navegação dinâmica, com recurso a *zoom in* e *zoom out* na lâmina, à semelhança do que ocorre nos visualizadores de mapas, como o *Google Maps*.

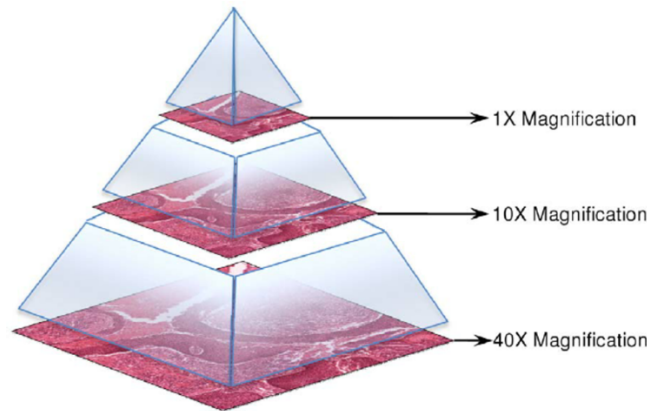


Figura 1.8 Estrutura piramidal em que encontram organizados os dados que compõem uma imagem de uma digitalização de uma lâmina (sistema whole slide image). As imagens de menor resolução/amplificação encontram-se no topo e a imagem de maior amplificação e resolução total encontra-se na base. Imagem retirada de [30]

De modo genérico, a patologia digital apresenta vantagens face à microscopia ótica. Existem vantagens técnicas, como, por exemplo, a visualização das lâminas prescindir da necessidade de regulação de foco entre ampliações diferentes. A partilha e arquivo de informação torna-se mais conveniente, principalmente com recurso a anotações associadas a pontos específicos da lâmina. Existem também vantagens incrementais, na medida em que a patologia digital tem um potencial de funcionalidades que não são possíveis em microscopia ótica convencional. Possibilita a extração de dados quantitativos que resultam de medições diretas como dimensões, em número de pixéis, ou intensidades. Esses dados podem ser utilizados de modo a fornecer informação útil. Num contexto de investigação, o registo deste tipo de dados pode ser feito em bases de dados que possam suportar estudos de diferentes âmbitos. Para diagnóstico, os dados podem ser utilizados diretamente em algoritmos analíticos.

As desvantagens dos sistemas de patologia digital residem sobretudo no custo dos digitalizadores de lâminas e dos *softwares* especializados associados. Os softwares existentes, principalmente de análise de dados extraídos, não respondem satisfatoriamente às necessidades dos utilizadores.

## 1.4 Estado de Arte

Os exames de anatomia patológica são essenciais para o correto diagnóstico de determinadas patologias. A caracterização da patologia e decisões relativamente à terapêutica são feitas com base nestes resultados. [5] A análise das imagens microscópicas obtidas é realizada, maioritariamente, através de observação direta através do microscópio por profissionais especializados, sem recurso a *software*. Em alguns testes, verificou-se variabilidade dos resultados obtidos por profissionais diferentes e alguns testes são bastante morosos, complexos e subjetivos. [21] Com o propósito de tornar os testes de anatomia patológica mais objetivos, eficientes e menos dependentes do observador, têm sido desenvolvidas e estudadas tecnologias de análise de imagem digital. Um dos tópicos mais estudados é a utilização destas tecnologias em imagens de tecido mamário, nomeadamente para otimização dos testes HER2.

O estudo da expressão de HER2 pela técnica de imunohistoquímica (IHC) pode beneficiar bastante de *softwares* de análise de imagem e de ajuda ao diagnóstico, visto que o seu resultado se baseia numa avaliação subjetiva de como as membranas ficam marcadas. Alguns métodos de análise digital automática ou semi-automática de aquisições IHC para o teste do HER2 em tecido mamário têm sido propostos. Skaland et al. [22] apresentaram um método de análise digital e compararam os resultados obtidos com a análise

convencional. A análise de imagens foi realizada com uma *macro* do ImageJ que segmentava automaticamente as membranas e as classificava, com base nas suas áreas e nas suas médias de intensidade. As análises convencionais e digitais produziram resultados concordantes. Brüggmann et al. [23] desenvolveram o software Visiopharm HER2-CONNECT™ que realiza a análise, com base na conectividade das membranas. Este algoritmo segmenta as membranas e calcula um parâmetro de conectividade, com base nas áreas medidas, como se pode verificar na Figura 1.9.

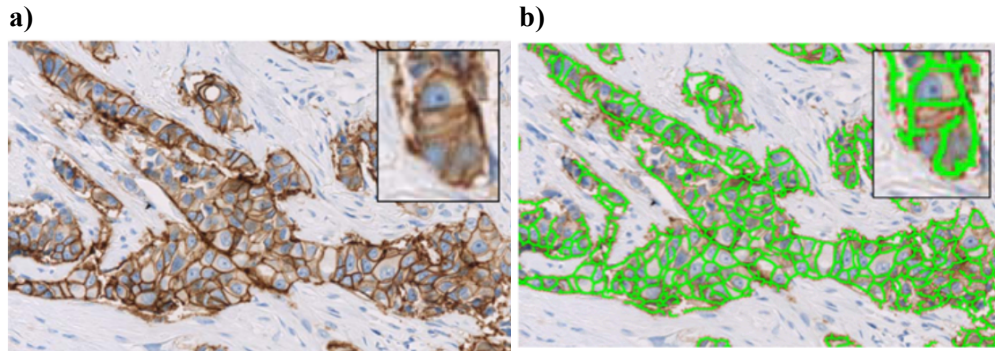


Figura 1.9 a) Imagem que resulta da aplicação da técnica de IHC e b) resultado do algoritmo Visiopharm HER2-CONNECT™. Imagem retirada de [23]

As análises do HER2 pela técnica ISH do modo convencional são demoradas, visto que envolvem contagem manual de sinais. Métodos de análise automática podem aumentar a eficácia dos testes ISH de HER2, fazendo contagem automática dos sinais. Existem algoritmos que, não sendo dirigidos em concreto à análise da expressão do HER2, fazem deteção automática de outros sinais em imagens de ISH e que são relevantes abordar neste âmbito.

Netten et al. [24] apresentaram um sistema que determina automaticamente o número de cromossomas sinalizados em cada núcleo de linfócitos, em imagens de amostras de sangue obtidas pela técnica de FISH. O algoritmo pode ser dividido em quatro principais etapas: determinação da região de interesse, segmentação dos núcleos, deteção dos pontos e contagem dos pontos. Como as imagens das lâminas têm uma percentagem de fundo elevada, este sistema utiliza um método de seleção automática de regiões de interesse e aplica os restantes processos apenas nessas regiões. Após aplicação de métodos de redução de ruído, a determinação das regiões de interesse é realizada com base numa segmentação com *threshold* de Zack. [25] Em cada umas das regiões anteriormente identificadas, segmentam-se os núcleos recorrendo ao algoritmo de *threshold* ISODATA [26]. A identificação dos núcleos individualizados é feita através de uma classificação das regiões segmentadas, com base em extração de características como a área e a esfericidade. Para deteção dos pontos que correspondem aos cromossomas sinalizados, é aplicada uma transformada *Top-Hat* e o operador Laplaciano não-linear em cada núcleo. Para classificar os sinais como pontos de hibridização, são extraídas características como as suas intensidades, área e outras. A contagem dos pontos é feita e a informação é exposta num histograma. Os resultados obtidos foram comparados com contagens manuais de especialistas e o sistema foi validado.

Um sistema com algumas semelhanças ao anterior, para avaliação automática dos cromossomas X de leucócitos em imagens obtidas por FISH, foi apresentado por Solorzano et al. [27]. O algoritmo começa por aplicar correções na imagem, como a extração do fundo. Após o pré-processamento, a segmentação dos núcleos é realizada com os algoritmos ISODATA e Watershed. Os pontos correspondentes aos sinais em análise são detetados através da aplicação da transformada *Top-Hat* e de um algoritmo de reconstrução recursiva. Numa última etapa, são utilizadas correções estatísticas para eliminar erros sistemáticos e melhorar os resultados do sistema.

Existem também na literatura, exemplos de algoritmos que fazem a análise da amplificação de HER2 em tecido de carcinoma da mama, em imagens FISH.

Raimondo et al. [28] descreveram um algoritmo para classificação automática da expressão de HER2 em imagens FISH de cancro da mama. Este sistema apresenta a particularidade de não basear o resultado em apenas na contagem de pontos de uma imagem e faz uma avaliação utilizando múltiplas imagens. O algoritmo aplica uma sequência de processos para a deteção dos sinais (ver Figura 1.10) e para a segmentação dos núcleos. A deteção dos pontos é feita recorrendo a filtros *Top-Hat* e segmentação binária. Para exclusão de pontos erroneamente detetados, calcula-se uma medida de contraste determinada a partir das intensidades no canal verde e vermelho. A segmentação dos núcleos é realizada apenas no canal azul das imagens, recorrendo aos algoritmos de Otsu [29] e Watershed [32].

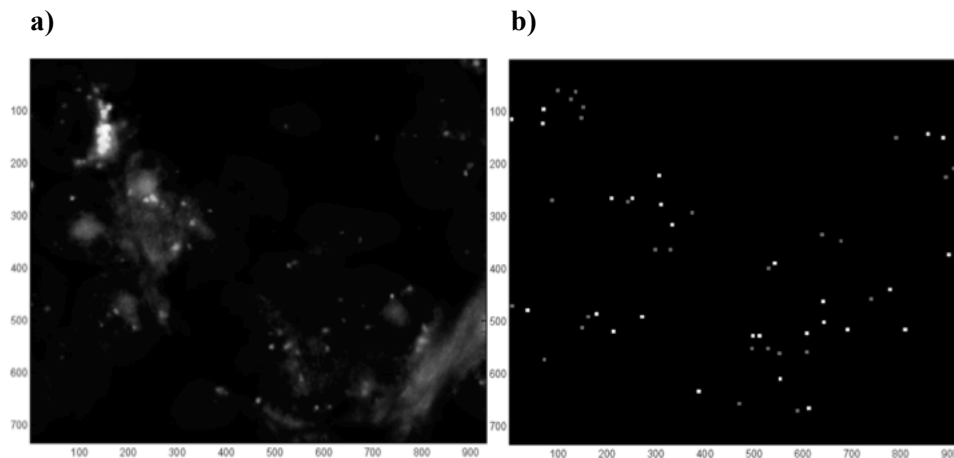


Figura 1.10 Deteção dos pontos, no algoritmo apresentado por Raimondo et al. a) Imagem FISH original e b) o resultado do algoritmo Imagem adaptada de [28]

Reljin et al. [17] apresentaram dois métodos distintos para contagem dos sinais de HER2 em imagens FISH de cancro da mama: um método morfológico e uma análise multifractal. O primeiro trata-se de uma abordagem mais convencional, utiliza filtros *Top-Hat* e *Bottom-Hat*. A análise multifractal é feita calculando os expoentes de Hölder e a sua distribuição. Como os pontos na imagem representam mudanças locais acentuadas e são eventos raros, correspondem a altos valores do expoente de Hölder e baixos valores na função distribuição. Os resultados do método da análise multifractal foram melhores.

Os sistemas apresentados trabalham com imagens no sistema de cores RGB. Na maioria dos métodos, a segmentação dos núcleos é feita no canal azul e a deteção dos pontos nos canais verde e azul. Les et al. [21] testaram se a deteção dos sinais pode ser mais eficaz em imagens com outros sistemas de cores. Procedeu à conversão de imagens FISH de cancro da mama do sistema RGB para HSV, HLV, CIELUV, CIELCH e YCbCr. Concluiu que a deteção dos pontos é mais eficaz fazendo conversão do canal vermelho para o canal U do CIELUV e do canal verde para canal CR do YCbCr.

Os métodos apresentados não respondem a todas as necessidades dos clínicos, uma vez que não existe uma ferramenta, de fácil acesso, de análise para testar a expressão de HER2 em imagens de CISH. Existe a necessidade de criar um método de análise automática para este tipo de protocolo, numa plataforma que acessível aos clínicos.

## 2 Objetivo do Projeto

O objetivo deste projeto é desenvolver um sistema de avaliação automática da expressão do gene HER2 em células de cancro da mama, em imagens obtidas pela técnica de SISH. Tradicionalmente, este teste exige que patologistas procedam à contagem manual de pontos e pretende-se criar uma ferramenta que o faça de modo automático. A automatização deste processo representa grandes vantagens para a realização deste teste. Este projeto foi proposto pelo Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP) e foi desenvolvido em colaboração com o Instituto de Biofísica e Engenharia Biomédica (IBEB) da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Dada a natureza e critérios da análise da expressão de HER2 em imagens de SISH, a ferramenta criada tem que proceder à contagem automática de sinais de HER2, CEP17 e de núcleos de células. A partir destas contagens, é possível determinar uma classificação do estado de HER2. Existem diversos algoritmos computacionais que podem ser utilizados para o objetivo proposto.

O projeto iniciou-se com uma pesquisa bibliográfica das técnicas de anatomia patológica utilizadas no teste da expressão do HER2 e com os métodos de processamento de imagem potencialmente úteis na resolução do problema proposto (etapa 1). Numa fase inicial, foi importante estabelecer um meio de transferência de dados com o IPATIMUP, considerando o formato dos ficheiros e que a cada imagem está associada um diagnóstico. Em concreto, os dados são digitalizações das lâminas de tecido de cancro da mama obtidas pela técnica de SISH e respetivos resultados do teste aplicado. Uma vez tendo uma contextualização bibliográfica sólida e dados, pode-se proceder à construção do algoritmo de processamento e análise das imagens. À semelhança de outros algoritmos de processamento de imagem, o desenvolvimento do sistema passa pela aplicação de métodos matemáticos e estatísticos para que se proceda ao pré-processamento, segmentação e classificação das imagens. Numa fase final, após o algoritmo estar concluído, os resultados deste foram comparados com contagens manuais.

## 3 Metodologia

### 3.1 Requisitos e Implementação

Para o desenvolvimento do algoritmo foram utilizadas imagens de tecido mamário em que foi aplicado SISH, digitalizadas pelo digitalizador de lâminas Menarini Diagnostics (D-Sight 2.0) e disponibilizadas pelo IPATIMUP. As imagens foram recebidas no formato *.gxp* e convertidas em *JPEG2000*. O algoritmo de análise e processamento de imagem foi desenvolvido em linguagem Python versão 3.5, no ambiente Spyder versão 3.0.0. No algoritmo final, utilizaram-se funções de diferentes bibliotecas de Python, disponíveis em *open source*, listadas na tabela 3.1.

Tabela 3.1 Conjunto de bibliotecas, pacotes e interfaces Python cujas funções foram utilizadas para o desenvolvimento do algoritmo.

Biblioteca e Interfaces Python	Descrição
<i>Glymur</i>	Interface da biblioteca OpenJPEG para leitura e escrita de ficheiros JPEG2000
<i>OpenCV2</i>	Biblioteca que contém funções para resolver problemas de visão computacional.
<i>Scipy</i>	Biblioteca direcionada a cientistas, matemáticos e engenheiros.
<i>Numpy</i>	Biblioteca com funções que suportam <i>arrays</i> e matrizes multi-dimensionais.
<i>Skimage</i>	Funções de processamento de imagem
<i>Math</i>	Funções matemáticas diversas
<i>Pickle</i>	Módulo para implementar serialização de objetos de estrutura Python
<i>Scikit-learn</i>	Ferramentas de <i>data mining</i> e análise de dados

### 3.2 Leitura da Imagem

O primeiro passo do algoritmo é a leitura da imagem. Para ler ficheiros JPEG2000 em Python, recorre-se a funções da interface *Glymur*. *Glymur* é uma interface da biblioteca *OpenJPEG* que permite ler imagens neste formato, de modo que as imagens com múltiplas resoluções possam ser acedidas e manipuladas enquanto matrizes. A imagem é lida no formato de cores BGR (*Blue-Green-Red*). Cada canal corresponde a uma matriz de intensidades, pelo que para cada imagem temos uma correspondência de três matrizes. Uma vez que o sistema de cores RGB (*Red-Green-Blue*) é mais popular, é feita uma conversão para este modelo (figura 3.1).

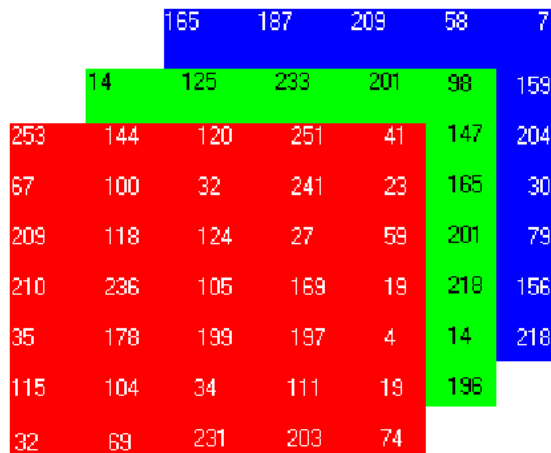


Figura 3.1 Esquema representativo da composição de uma imagem RGB (Red-Green-Blue) - 3 matrizes de intensidades para a cor vermelha, verde e azul que compostas definem a cor de cada pixel. Imagem retirada de [23]

### 3.3 Seleção da Região de Interesse e Pré-processamento

Para que o algoritmo cumprisse o objetivo definido, era necessário o processamento das imagens com resolução total. No entanto, por conveniência, decidiu-se não processar toda a imagem e apenas ler uma região de interesse (ROI – *Region of Interest*). A região de interesse pode ser definida pelo utilizador. Como não existe nenhuma função nas bibliotecas do Python que permite a seleção da ROI, a partir de imagens JPEG2000, criou-se uma função para o efeito.

A função criada foi a **select(jp2)**, que permite visualizar a imagem em diferentes resoluções e selecionar uma região, que é guardada em resolução total. A seleção da ROI é feita tomando partido da estrutura piramidal dos dados, como meio de otimização da performance. Define-se inicialmente uma primeira ROI numa *thumbnail* com resolução 65 menor que a imagem de total resolução. Na etapa seguinte é apresentada a primeira ROI, com uma resolução superior, e nessa é selecionada uma segunda ROI. Este processo repete-se, definindo-se sucessivamente ROI de maior resolução dentro de uma ROI anteriormente definida. As ROI correspondem a áreas cada vez menores, no entanto com resoluções cada vez melhores (figura 3.2). As ROI selecionadas tinham dimensão aproximada de 500x500 pixels.

Como medida para reduzir o ruído das imagens, aplicou-se um filtro mediana. Este filtro atua substituindo cada pixel pela mediana da sua vizinhança e foi parametrizado para o fazer em janelas quadradas 3x3, como descrito na equação (3.1).

$$I'(u, v) \leftarrow \text{mediana}[I(u + 3, v + 3)] \quad (3.1)$$

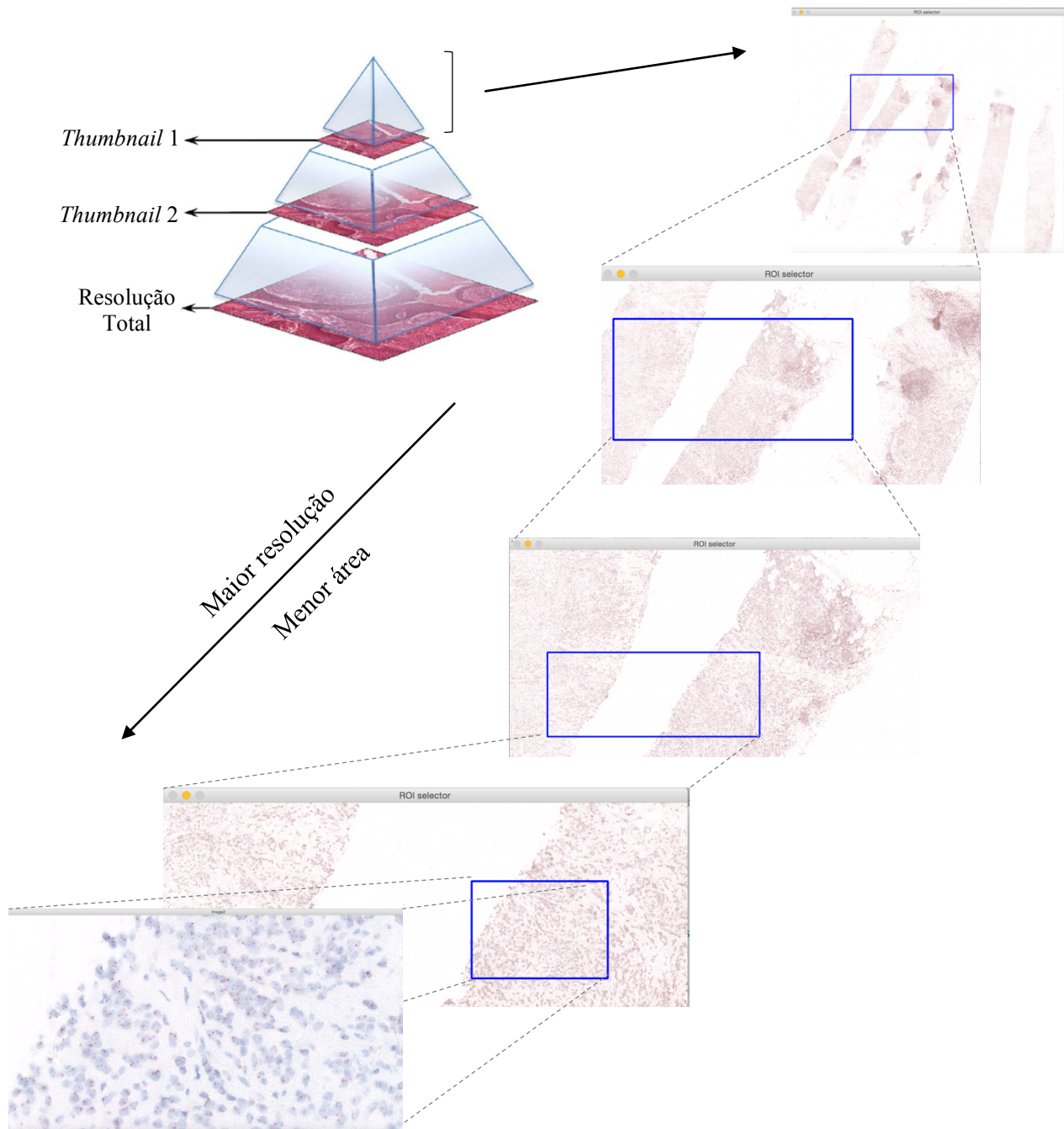


Figura 3.2 Diagrama explicativo do processo de seleção da ROI pela função criada `select(jp2)`. A primeira seleção é feita numa thumbnail com a resolução mais baixa. A partir da ROI inicialmente definida, vão sendo selecionadas novas ROI que correspondem a áreas cada vez menores, mas são apresentadas com resolução cada vez maior. As imagens da seleção estão em cores BGR e a ROI final em RGB. Imagem da pirâmide adaptada de [30]

### 3.4 Segmentação dos Sinais

Um passo fundamental de um algoritmo de classificação automática da expressão de HER2, é a segmentação dos sinais de HER2 e CEP17. Uma abordagem possível seria segmentar separadamente os dois tipos de sinal, no entanto optou-se por inicialmente detetar indiscriminadamente todos os sinais.

Esta segmentação pode ser concretizada recorrendo a diferentes estratégias, tendo em conta as características dos pontos. Os sinais de HER2 e CEP17, num contexto de processamento de imagem, podem ser considerados *blobs*, uma vez que têm propriedades comuns entre si e são distintas do fundo. Tendo esse fator em conta, a segmentação pode ser realizada recorrendo a detetores de *blobs*.

Existem diversos algoritmos de deteção de *blobs*. No modelo implementado, aplicaram-se três destes métodos: Laplaciano da Gaussiana, Diferença de Gaussianas e Determinante de Hessiano. O Laplaciano da Gaussiana é descrito como sendo método mais lento, mas mais eficaz. O Determinante de Hessiano como sendo o método mais rápido, mas menos eficaz. [31]

Os três métodos foram aplicados recorrendo às funções disponíveis na biblioteca do Python *scikit image*: *blob\_dog* (Diferença de Gaussianas), *blob\_doh* (Determinante de Hessiano) e *blob\_log* (Laplaciano de Gaussiana). As funções necessitam de ser parametrizadas de acordo com os *blobs* que se pretendem detetar. Como está representado na Tabela 3.2, três dos parâmetros são *max\_sigma*, *num\_sigma* e *threshold*. Determinar os valores para estes parâmetros passou por um método empírico. O *max\_sigma* representa o desvio-padrão máximo do kernel gaussiano, logo pode ser visto como uma medida proporcional ao raio máximo dos *blobs* que se pretendem detetar. O *threshold* representa o limiar mínimo de intensidade a partir do qual se consideram os *blobs* – que matematicamente são máximos/mínimos locais. O *num\_sigma* é o número discreto de valores de desvio-padrão de kernel que devem ser considerados até ao *max\_sigma*.

Tabela 3.2 Conjunto de parâmetros definidos para cada tipo de detetor de *blobs* para deteção dos sinais de HER2 e CEP17.

Detetor de <i>Blobs</i>	<i>max_sigma</i>	<i>num_sigma</i>	<i>threshold</i>
Diferença de Gaussianas	5	-	0.050
Determinante de Hessiano	5	10	0.005
Laplaciano da Gaussiana	5	10	0.050

No modelo final, o algoritmo utilizado para detetar os pontos de hibridização HER2 e CEP17 foi o Laplaciano da Gaussiana. Esta decisão foi tomada, após análise explicada na secção 4.

Para utilizar este detetor é necessário, num passo anterior, converter a imagem RGB para escala de cinzentos (matriz de luminância). Como os algoritmos de deteção estão construídos para detetar máximos locais e as regiões de interesse são mínimos locais, é também necessário inverter as intensidades das imagens em teste. Estas operações estão descritas na equação (3.2), em que R, G e B representam as intensidades nos canais vermelho, verde e azul respetivamente. Sendo que 255 é o valor máximo na escala de intensidades e os coeficientes 0.2125, 0.7154 e 0.0721 são os valores padrão de conversão de RGB para luminância, que o software utiliza.

$$L = 0.2125 (255 - R) + 0.7154(255 - G) + 0.0721(255 - B) \quad (3.2)$$

O *output* obtido do detetor é uma matriz de valores que tem representado, para cada *blob*, as coordenadas x e y e o desvio-padrão de kernel gaussiano  $\sigma$ . Como indicado na equação (3.2), a partir do desvio-padrão de kernel é possível calcular um valor aproximado do raio r, multiplicando-o pela raiz quadrada de dois.

$$r = \sigma\sqrt{2} \quad (3.3)$$

### 3.5 Classificação dos Sinais

Após a segmentação dos sinais, é necessário a sua classificação como HER2 ou CEP17. Para o efeito, foi necessário extrair *features* dos pontos detetados. Com base nas *features* extraídas, tinha-se o objetivo de proceder uma avaliação estatística que permitisse a classificação, como pretendido.

As *features* extraídas dos sinais detetados foram: raio do *blob*, intensidade média nos canais vermelho, verde e azul e intensidade média na escala de cinzentos.

Construiu-se uma base de dados, com 210 pontos e respetivas *features* extraídas. Cada um desses pontos foi manualmente classificado como sendo HER2 (0), CEP17 (1), com base em avaliação visual. Ter valores numéricos que descrevem os sinais de interesse e uma classificação manual, permite relacionar os dados e criar um modelo de classificação automática dos pontos.

A partir do conjunto de observações, efetuou-se uma regressão logística, com recurso a funções da biblioteca sklearn do Python. Apenas entram como parâmetro do modelo de regressão, o raio do *blob* (*r*) e as intensidades dos canais verde (G) e azul (B). Obteve-se o modelo definido na equação 3.4.

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(-0.899 + 0.902r + 0.285G - 0.302B)}} \quad (3.4)$$

Foi criada a função **signals(ROI)** para aplicar o processo de segmentação e classificação de sinais HER2 e CEP17.

### 3.6 Segmentação dos Núcleos

Adicionalmente à segmentação dos sinais HER2 e CEP17, também é necessária a segmentação dos núcleos. Dos diversos métodos que poderiam ser implementados nesta etapa, optou-se por duas estratégias distintas: segmentação *Watershed* e deteção de *blobs*.

#### 3.6.1 *Watershed* e Extração de features

A segmentação *Watershed* foi aplicada recorrendo a funções da biblioteca de Python OpenCV2. As funções desta biblioteca permitem aplicar uma sequência de operações morfológicas sobre a imagem que permitem realizar a segmentação.

O processo inicia-se com a binarização simples inversa da imagem, com limiar de intensidade 233. Na imagem binarizada, com o objetivo de reduzir ruído, aplicam-se 2 iterações da operação morfológica de

abertura. Na sequência, através de 3 iterações da operação de dilatação, define-se a região que se tem certeza de pertencer ao fundo da imagem. As regiões que se tem certeza pertencerem ao primeiro plano são definidas com base numa transformação de distância. Tendo definidas as regiões que se tem certeza serem fundo e de primeiro plano, bem como a região desconhecida que resulta da subtração das duas anteriores, é possível utilizar a função que aplica a segmentação de *Watershed*.

Devido às características dos núcleos das imagens em teste, não é simples a segmentação de cada núcleo individualizado recorrendo a este método. No entanto, conseguem-se segmentar agrupamentos de núcleos, como se pode se verificar na Figura 3.3.

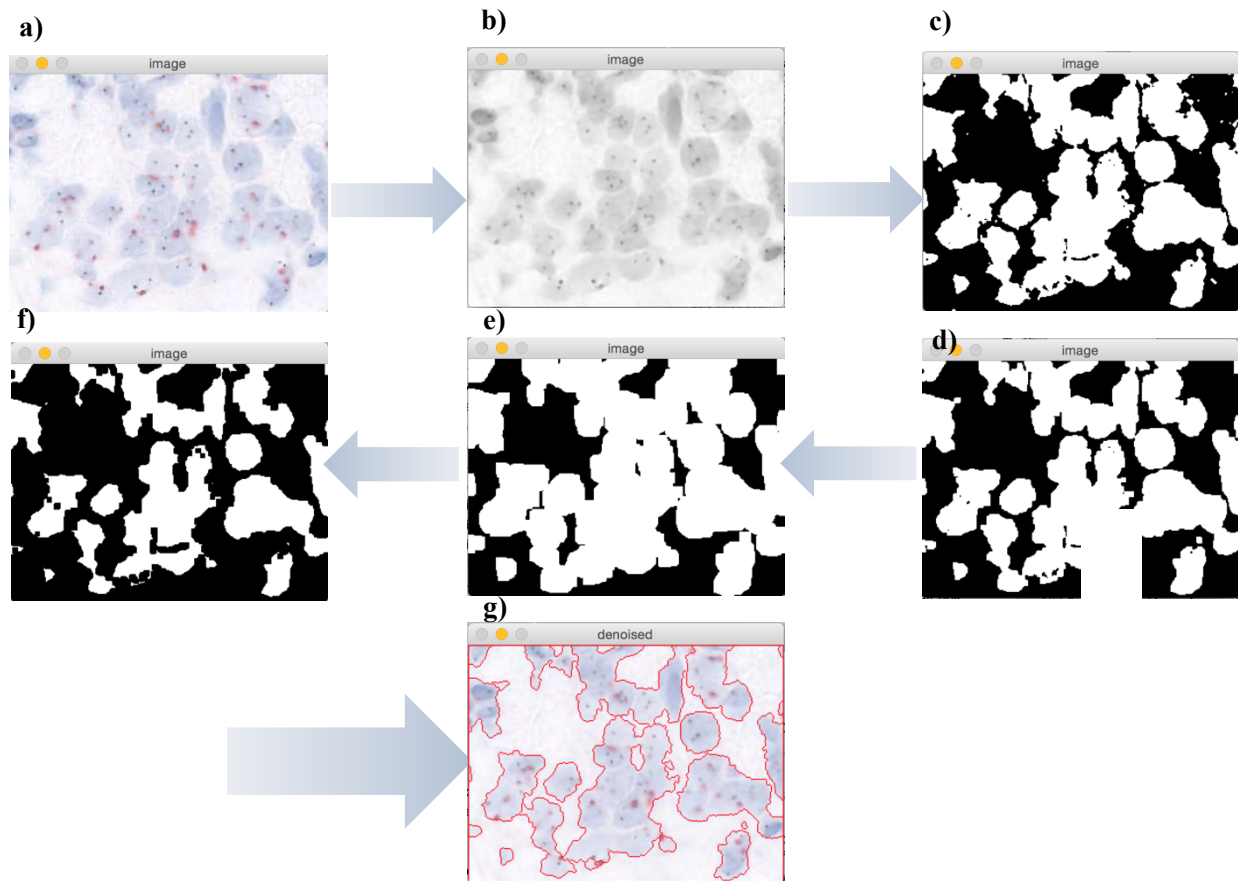


Figura 3.3 Processo de segmentação *Watershed* dos núcleos: **a)** Imagem inicial, **b)** Conversão na escala de cinzentos/matriz de luminância, **c)** Binarização simples inversa da imagem, com limiar de intensidade 233, **d)** Aplicação de 2 iterações da operação morfológica de abertura, **e)** Aplicação de 3 iterações da operação de dilatação - certeza de pertencer ao fundo da imagem, **f)** Regiões que se tem certeza pertencerem ao primeiro plano definidas com base numa transformação de distância, **g)** Imagem segmentada.

Extraíram-se *features* dos agrupamentos de núcleos segmentados, com o objetivo de obter informação estatística sobre os mesmos. As *features* extraídas foram: área aproximada, área correta, perímetro, circularidade, intensidade média nos canais vermelho, verde e azul.

O cálculo da área aproximada é feito aproximando a região ocupada pelo agrupamento de núcleos a um retângulo. A área correta é obtida através da contagem de pixels que compõem a região. O perímetro foi possível calcular com base nas fronteiras definidas para cada região na segmentação *Watershed*. A circularidade foi calculada com base na equação 3.5.

$$circularidade = \frac{4\pi \times \text{área}}{\text{perímetro}^2} \quad (3.5)$$

### 3.6.2 Detetor de *blobs*

O algoritmo para fazer a classificação da expressão HER2 não exige obrigatoriamente segmentar individualmente cada núcleo. Apenas existe a necessidade de conhecer o número de núcleos em teste. Assim, pode-se utilizar o detetor de *blobs* para identificar núcleos, num processo semelhante ao descrito na secção 3.4, para posteriormente estimar o número de núcleos.

Para a deteção de núcleos, utilizou-se o método de Laplaciano de Gaussiano, recorrendo a recursos disponíveis na biblioteca de Python scikit image. Os parâmetros utilizados estão representados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 Parâmetro definidos para o detetor de *blobs* Laplaciano de Gaussiano para deteção de núcleos.

Detetor de <i>Blobs</i>	<i>min_sigma</i>	<i>max_sigma</i>	<i>num_sigma</i>	<i>threshold</i>
Laplaciano de Gaussiano	7	17	10	0.030

Apenas são contabilizados núcleos que contenham no seu interior, pelo menos, um sinal de HER2 e um sinal de CEP17. Todos *blobs* que não contenham no seu interior um sinal de cada tipo são excluídos da contagem.

Foi criada a função **nucleiDetect\_log(ROI)** para identificação de núcleos por deteção de *blobs*.

### 3.7 Classificação final da expressão HER2

A etapa final do modelo apresentado, inclui a extração de métricas que possibilitam a classificação automática da expressão HER2.

Como indicado na secção 1.2.2, em imagens obtidas a partir da técnica de SISH, a avaliação da expressão de HER2 é feita a partir da razão HER2/CEP17 e do número médio de sinais HER2 por núcleo. O algoritmo apresentado classifica as imagens, com base nas mesmas métricas. É feito o cálculo da razão entre os sinais detetados classificados como HER2 e como CEP17. O número médio de sinais HER2, por conveniência, é aproximado à razão entre o total de sinais HER2 detetados e o número de núcleos. Apenas são contabilizados sinais que se encontram no interior de núcleos e núcleos que contenham, pelo menos, um sinal de cada tipo.

Adicionalmente, foi calculado uma variável de número de pontos HER2 por unidade de área da região de interesse.

### 3.8 Visão global do algoritmo

O algoritmo de classificação da expressão de HER2 a partir de uma ROI de uma digitalização de uma lâmina de uma amostra de tecido de tumor da mama é uma sequência de diferentes etapas, que recorrem a diferentes ferramentas computacionais e matemáticas. Essas etapas estão sintetizadas no diagrama da Figura 3.4.

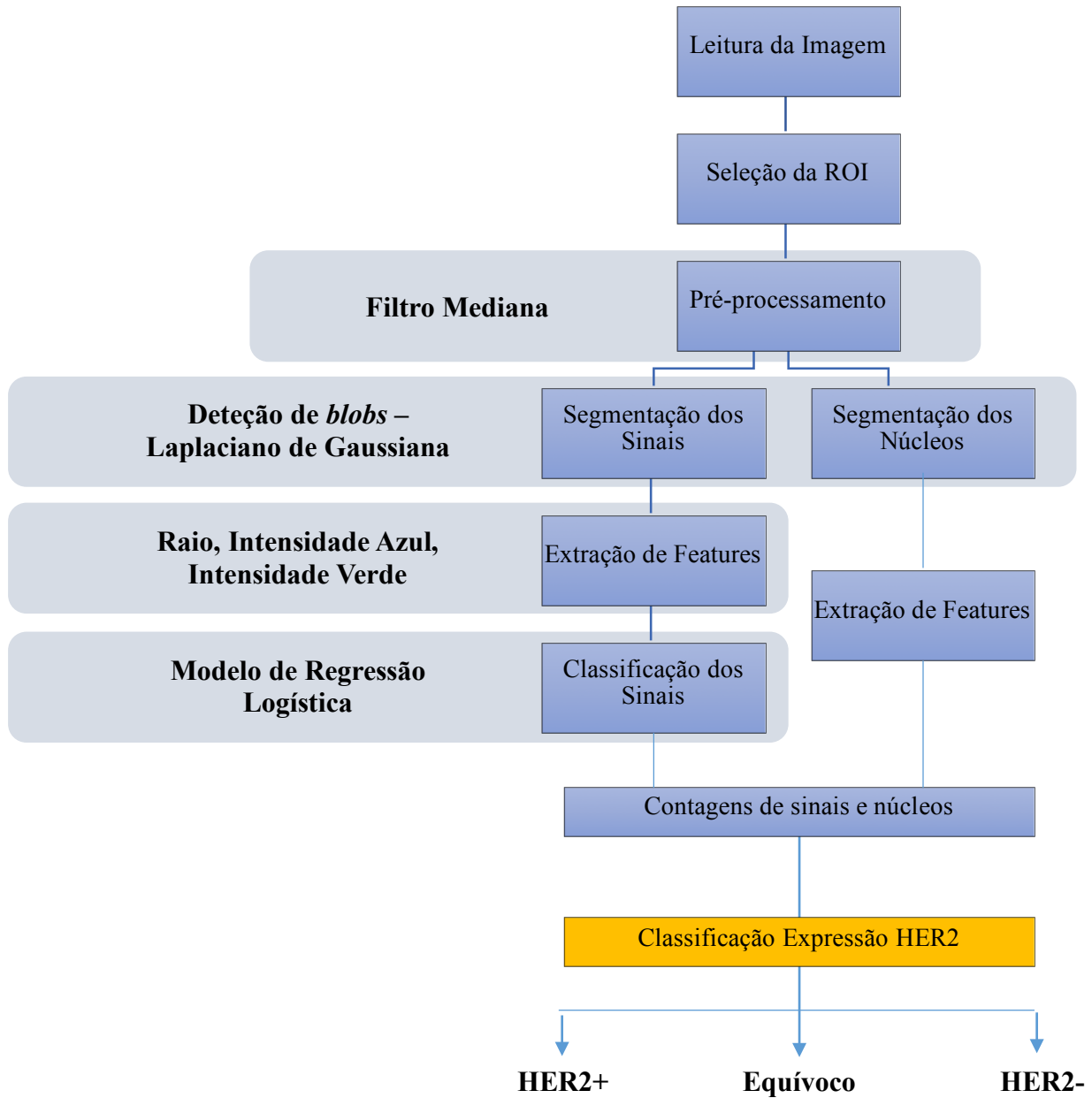


Figura 3.4 Diagrama de síntese da sequência de todas as etapas do algoritmo de classificação da expressão HER2.

## 4 Resultados e Discussão

Os métodos apresentados foram analisados (4.1), os desafios na implementação identificados (4.2) e os resultados obtidos pelo algoritmo comparado com contagens manuais (4.3).

### 4.1 Análise dos métodos

A expressão HER2 é determinado com base numa análise visual, por parte de um médico, de uma lâmina de amostra de tecido do tumor preparada por um método ISH. Para esse teste ser automatizado, através de software de análise de imagem, cada tarefa humana poderá ser conseguida através de um conjunto de processos computacionais, como representado na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 Comparação dos processos computacionais equivalentes às tarefas humanas na avaliação da expressão HER2 de tumores, a partir de imagem de uma digitalização de lâmina.

Humano	Software
Identificar visualmente conjunto maior ou igual a 20 núcleos não sobrepostos	Definição de uma ROI Segmentação, extração de <i>features</i> e classificação de núcleos
Contagem de sinais HER2	Segmentação, extração de <i>features</i> , classificação de sinais HER2
Contagem de sinais CEP17	Segmentação, extração de <i>features</i> , classificação de sinais CEP17
Classificação da expressão, com base na razão HER2/CEP17 e número médio de HER2 por núcleo	Classificação da expressão, com base na razão HER2/CEP17 e número médio de HER2 por núcleo

Ao identificar-se os processos bases que podem fazer parte de um algoritmo de processamento de imagem, existem diferentes métodos matemáticos que os permitem implementar. Para a segmentação de núcleos e dos sinais HER2 e CEP17, foram testados e comparados diferentes métodos. A análise feita e as opções tomadas sobre os métodos a seguir encontram-se nas secções 4.1.1 e 4.1.2.

#### 4.1.1 Segmentação de sinais HER2 e CEP17 – Detecção de *blobs*

Os métodos descritos na secção 3 foram escolhidos e parametrizados de modo a satisfazer requisitos iniciais. Para cada etapa do algoritmo, foi necessário serem tomadas decisões que conduzissem a um algoritmo final com boa performance e que produzisse resultados com boa precisão.

Para segmentar os sinais HER2 e CEP17, optou-se por aplicar detetores de *blobs*. Existem diferentes algoritmos que permitem a deteção de *blobs* e, por esse motivo, foi necessário selecionar qual o que se adequaria melhor. No projeto foram testados os métodos do Laplaciano da Gaussiana, da Diferença de Gaussianas e do Determinante de Hessiano.

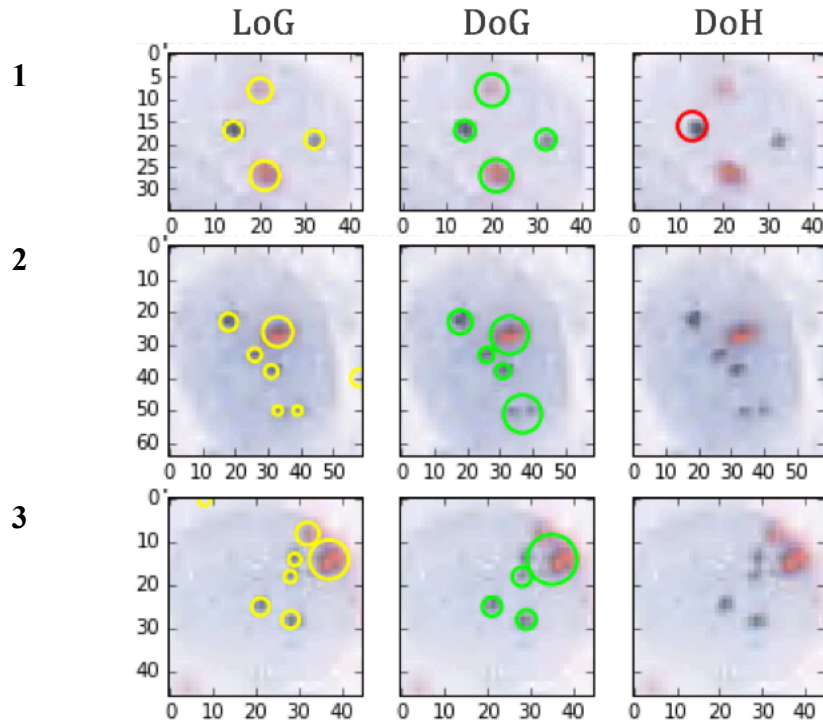


Figura 4.1 Aplicação do método de detecção de blobs nos núcleos 1, 2 e 3 para detecção dos pontos de hibridização. LoG - Laplaciano da Gaussiana, DoG - Diferença de Gaussianas, DoH - Determinante de Hessiano.

Na bibliografia disponível, o método do Laplaciano da Gaussiana é descrito como sendo o método mais lento, mas mais eficaz, e o Determinante de Hessiano como o método mais rápido, mas menos eficaz. Tendo em conta o objetivo da utilização de detetores de *blobs* no sistema a implementar, a eficácia era um atributo prioritário face à performance. Um sistema de classificação automática da expressão de HER2 com contagem de sinais imprecisa e inexata pode conduzir a conclusões erradas sobre o tumor.

Houve a necessidade de entender como os detetores de *blobs* referidos se comportavam com o tipo de imagem em teste e avaliar os seus resultados. Na figura 4.1 estão representados três exemplos da aplicação dos três métodos. A partir da análise destes exemplos, verificou-se que o algoritmo do Determinante de Hessiano não deteta os sinais-alvo. Nos três exemplos representados, apenas detetou o ponto de hibridização com maior contraste do núcleo 1. O detetor das Diferenças de Gaussianas identificou todos os sinais do núcleo 1, porém o mesmo não ocorreu para os núcleos 2 e 3. Este método revela-se ineficaz na segmentação de pontos mais próximos. O algoritmo do Laplaciano da Gaussiana, nos três núcleos usados como exemplo, detetou todos os pontos de hibridização. Este detetor revelou-se eficaz mesmo em pontos muito próximos e com contraste mais baixo.

A partir da análise descrita, excluiu-se a hipótese de utilizar os detetores da Diferença de Gaussianas e do Determinante de Hessiano. Confirmou-se o que estava descrito na literatura relativamente à eficácia destes algoritmos e verificou-se que apenas o detetor do Laplaciano da Gaussiana apresenta eficácia suficiente na segmentação dos sinais de HER2 e CEP17.

#### 4.1.2 Classificação de sinais HER2 e CEP17 – Regressão Logística

Uma hipótese que poderia ter sido seguida era a segmentação separada de sinais HER2 e CEP17, no entanto optou-se por usar um método que os permite identificar indiscriminadamente. A seleção conjunta

dos pontos dos dois tipos implica um processo posterior de classificação dos sinais em HER2 ou CEP17. Estes sinais apresentam, na maioria das vezes, características distintas. As características que os permitem distinguir numa avaliação visual são sobretudo a cor e tamanho. Para reproduzir esta distinção visual num algoritmo, recorreu-se à extração de *features* de cada *blob* detetado e aplicação de regressão logística. Optou-se pela regressão logística, porque permite previsão de variáveis categóricas e a classificação do tipo de sinal é binária.

Para construir o modelo de regressão logística (equação 3.3), foi necessário escolher quais seriam as variáveis explicativas a usar. As *features* extraídas que poderiam ser utilizadas foram raio do *blob*, intensidade média nos canais vermelho, verde e azul e intensidade média na escala de cinzentos. Para se seleccionar as variáveis a considerar começou-se por avaliar se eram significativamente diferentes entre os dois tipos de sinal. Para o efeito, recorreu-se a um teste de hipóteses, teste t. O teste t foi aplicado a duas amostras, a sinais classificados como HER2 e CEP17, sendo a hipótese nula a variável ser igual nas duas. Os resultados obtidos estão representados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 Estatística do teste t e respetivo p-valor para os parâmetros intensidade média azul, verde, vermelha, cinzento e raio. Hipótese nula afirma que a média dos parâmetros nas duas amostras é igual.

Variável	Estatística de Teste – Teste t	p-valor
<b>Intensidade Média Azul</b>	-5.478	$4.297 \times 10^{-8}$
<b>Intensidade Média Verde</b>	-0.394	0.693
<b>Intensidade Média Vermelha</b>	-1.090	0.276
<b>Intensidade Média Cinzento</b>	-0.640	0.522
<b>Raio</b>	-7.208	$5.693 \times 10^{-13}$

As variáveis intensidade média azul e raio apresentam o *p-valor* muito inferior a 0.01, pelo que podemos rejeitar a hipótese nula do teste com nível de significância de 1%. Conclui-se que os dois parâmetros são significativamente diferentes nas duas amostras. As restantes variáveis, intensidade média verde, vermelha e cinzento, não apresentam diferenças significativas nos sinais HER2 e CEP17.

Parâmetros não significativos para o modelo preditivo podem ganhar significância, quando associadas a outros. A exclusão de variáveis foi feita com base numa análise de variâncias entre modelos com diferentes combinações de variáveis explicativas. No modelo final, com uma fiabilidade de 88%, contribuem as intensidades médias do canal azul e verde e o raio.

### 4.1.3 Segmentação de núcleos – Watershed e Detecção de *Blobs*

Para a segmentação de núcleos, recorreu-se a dois métodos: segmentação *Watershed* (Figura 4.2-a) e detecção de *blobs* – Laplaciano da Gaussiana (Figura 4.2-b).

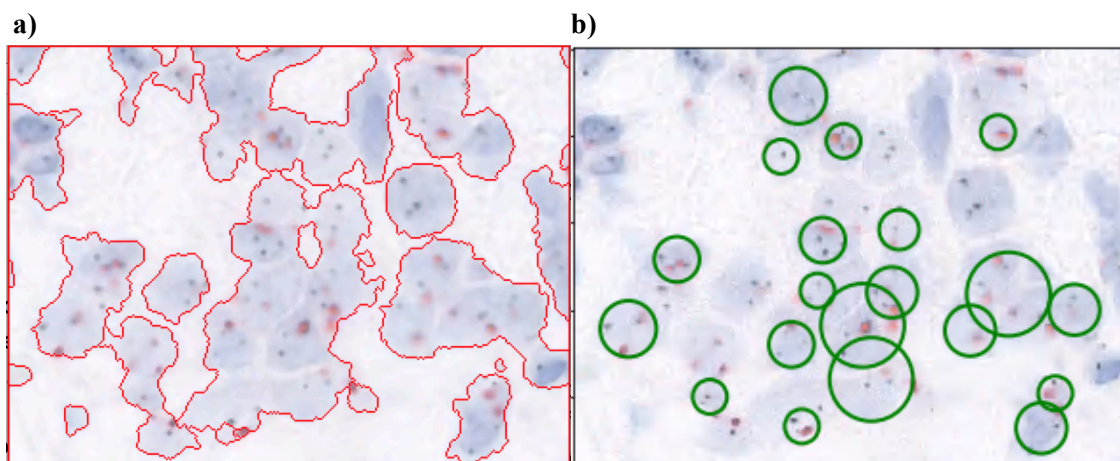


Figura 4.2 Métodos de segmentação de núcleos: a) Segmentação por *Watershed* e b) segmentação via detecção de *blobs* pelo métodos do Laplaciano da Gaussiano, fazendo exclusão de *blobs* que não contivessem no seu interior pelo um sinal de HER2 e um sinal de CEP17.

A abordagem da utilização da segmentação *Watershed* é mais convencional e comum na resolução de problemas semelhantes. No entanto, nas imagens analisadas, os núcleos estão muito agrupados, sem fronteiras muito definidas e com pouco contraste relativo ao fundo. Deste modo, o método aplicado é insuficiente para segmentar os núcleos. Apenas se consegue segmentar pequenos aglomerados de núcleos e alguns núcleos individualizados.

Dos grupos de núcleos segmentados, fez-se extração de features, como medidas de área, perímetro, circularidade e intensidades. Estes dados quantitativos poderiam ser utilizados como meio de estimativa do número de núcleos que constituam um determinado aglomerado, no entanto as dimensões e formatos despadronizado dos núcleos constituíram uma dificuldade para o fazer.

Como alternativa à segmentação de *Watershed*, recorreu-se à aplicação de detecção de *blobs*. Este método não se trata de uma verdadeira segmentação, uma vez que não permite uma definição das fronteiras das regiões de interesse, os núcleos, face ao fundo da imagem. Para a resolução imediata do problema proposto, este factor não constitui um problema crítico. O algoritmo de determinação da expressão HER2 exige sobretudo uma contagem de núcleos.

Na identificação dos núcleos via detecção de *blob*, excluíram-se todos os que não tinham pelo menos um sinal HER2 e um sinal CEP17 contido no seu raio. Assim, apenas se contabilizam os núcleos relevantes e assim também não se consideram artefactos erradamente.

Para o algoritmo final, optou-se por recorrer ao método de detecção de *blobs*, visto a segmentação *Watershed*, por si só, não ser suficiente para a contagem dos núcleos. A segmentação de *Watershed* apresenta, contudo, uma vantagem considerável face ao método escolhido. As medidas quantitativas possíveis de extrair destes segmentos constituem um conjunto de dados com potencial de serem utilizados para gerar informação útil. Medidas como a área ou circularidade poderiam ser utilizados para avaliar o tipo ou malignidade de núcleo detetado, por exemplo. Este tipo de dados têm um valor latente grande, porque oferecem a possibilidade de quantificar, de modo uniformizado, certas propriedades, que não se consegue avaliar em microscopia convencional.

## 4.2 Desafios na Implementação

As dificuldades de implementação do sistema de classificação automática da expressão HER2 descrito podem ser divididas em dois grupos, as que são comuns a todos os processamentos em patologia digital e as que são próprias das particularidades do teste HER2.

Um factor de dificuldade que afeta todas as análises em patologia digital deve-se a características inerentes às imagens. As aquisições digitais das lâminas equivalem a ficheiros de tamanho considerável, entre os 100 e 250 MB, o que equivale a milhões de pixéis RGB. O processamento de imagens com este tamanho implica uma maior complexidade. Essa complexidade reflete-se na performance dos processos. Apesar de essa ser a consequência mais direta, o volume de dados por cada amostra também cria dificuldades na sua análise.

As imagens têm outras características, para além da dimensão, que dificultam a sua análise e o desenvolvimento de métodos de classificação automáticos, destacando-se a intra-variabilidade e inter-variabilidade. As propriedades dos núcleos e pontos de hibridização variam consideravelmente ao longo da mesma lâmina e entre lâminas diferentes. Contribuem para essa variação a forma como se aplicam os protocolos laboratoriais, que pode afetar a coloração das estruturas, por exemplo, e as próprias diferenças histológicas entre células. Essas variações implicam a necessidade de recolher de dados de múltiplas lâminas e construir modelos estatísticos que permitam classificar os alvos de interesse ou recorrer a métodos de *machine learning* e inteligência artificial.

O teste da expressão do HER2 por ISH baseia-se num algoritmo com métricas quantitativas, em oposição ao mesmo por imunohistoquímica, que se baseia numa avaliação visual qualitativa. No entanto a objetividade do teste por ISH confronta-se na prática com variação de contagens obtidas entre clínicos. Essa não concordância de resultados tem um impacto na definição de parâmetro e regras de contagem dos sinais. A fonte de resultados não concordantes deve-se a particularidades das imagens ISH, que, de modo geral, também criam obstáculo na análise computacional.

Existem 3 características-tipo nas imagens ISH analisadas que representaram uma dificuldade na construção do algoritmo e que são fonte de erro: sobreposição de sinais, *clusters* de sinais HER2 e núcleos indistinguíveis.

A sobreposição de sinais HER2 e CEP17 cria sinais de cor e dimensão híbrida, como representado na Figura 4.3. Sinais com essa característica por norma são *outliers* e não representam peso suficiente para alterar o resultado efetivo do teste. No entanto, existem amostras em que a presença destas sobreposições é mais regular.

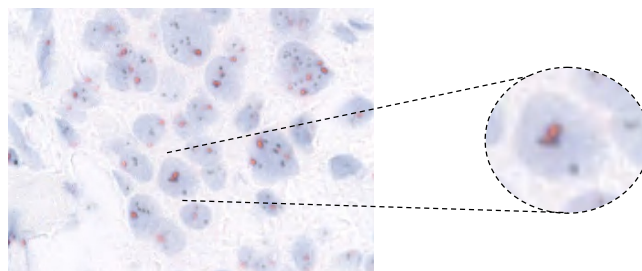
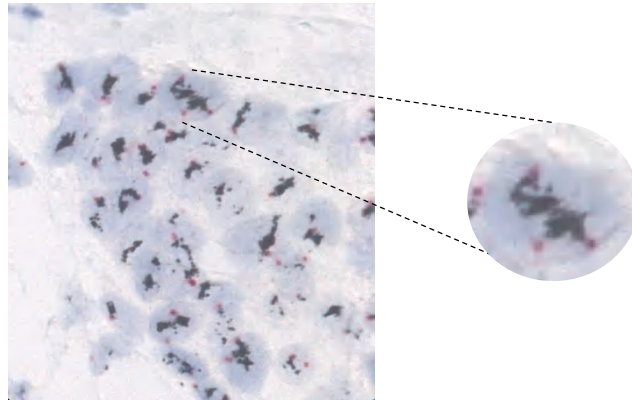


Figura 4.3 Sobreposição de sinal HER2 e CEP17.

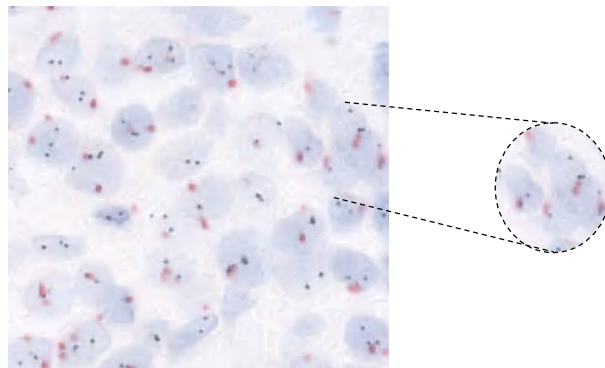
A presença de agrupamentos ou *clusters* de sinais HER2, representada na Figura 4.4, é uma característica que se verifica em tecido com expressão HER2+. Nestes casos, não existe discordância no resultado efetivo do teste da expressão HER2. O resultado do teste é claramente positivo, porém existe uma

grande discordância quanto às contagens. Não se consegue definir objetivamente o número de sinais HER2 em cada um dos agrupamentos.



*Figura 4.4 Agrupamentos ou clusters de sinais HER2*

É regular também a presença de agrupamentos de núcleos com fronteiras pouco definidas. Conjuntos de núcleos pouco distinguíveis torna a sua contagem um desafio, no que diz respeito ao processo de imagem e análise automática.



*Figura 4.5 Núcleos pouco distinguíveis*

### **4.3 Resultados e Validação**

Selecionaram-se 5 ROI, cada uma de uma lâmina diferente, em que se aplicou o algoritmo de classificação e comparou-se o resultado obtido com uma contagem manual realizada pelo Dr. António Polónia. A comparação foi feita para cada um dos parâmetros contabilizados, número de sinais HER2 e CEP17 e núcleos. Como medida para quantificar as diferenças de contagem, calculou-se a diferença relativa entre contagens.

Quanto à contagem dos pontos de hibridização, HER2 e CEP17, a comparação dos resultados obtidos entre a contagem automática e manual encontra-se representado na Figura 4.6 e Figura 4.7. A diferença relativa média entre as contagens manuais e as resultantes do algoritmo, para os sinais HER2, foi de 45%, com desvio-padrão de 33%. A menor diferença verificou-se na ROI 2, com apenas um sinal de diferença. A maior verificou-se na ROI 5, tendo o algoritmo contabilizado o dobro de sinais HER2. A contagem de sinais CEP17 produziu uma diferença relativa média de contagens entre os dois métodos de 37%, com

desvio padrão de 30%. A menor diferença verificou-se na ROI 1, com 3 sinais de diferença. A maior verificou-se na ROI 5, tendo o algoritmo contabilizado aproximadamente o dobro de sinais CEP17.

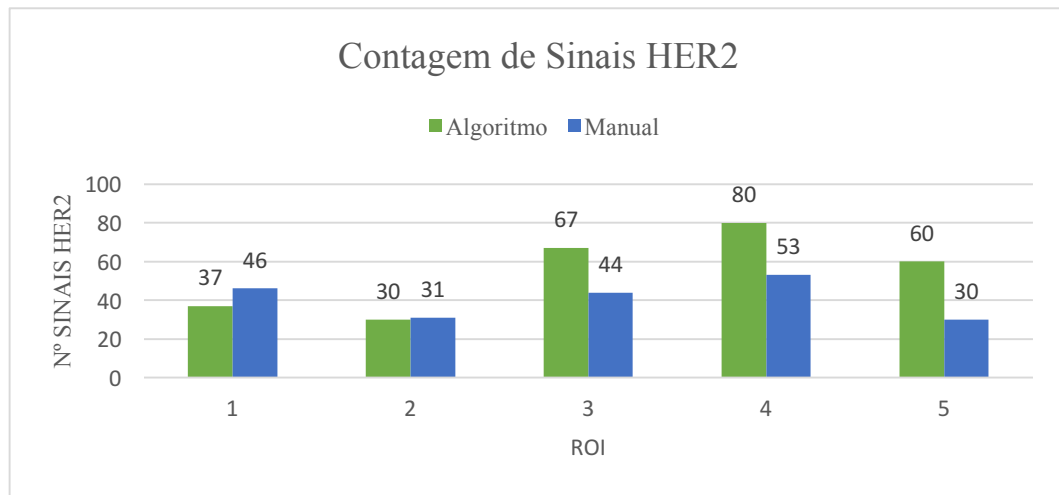


Figura 4.6 Gráfico de contagem de sinais HER2: Algoritmo versus Manual.

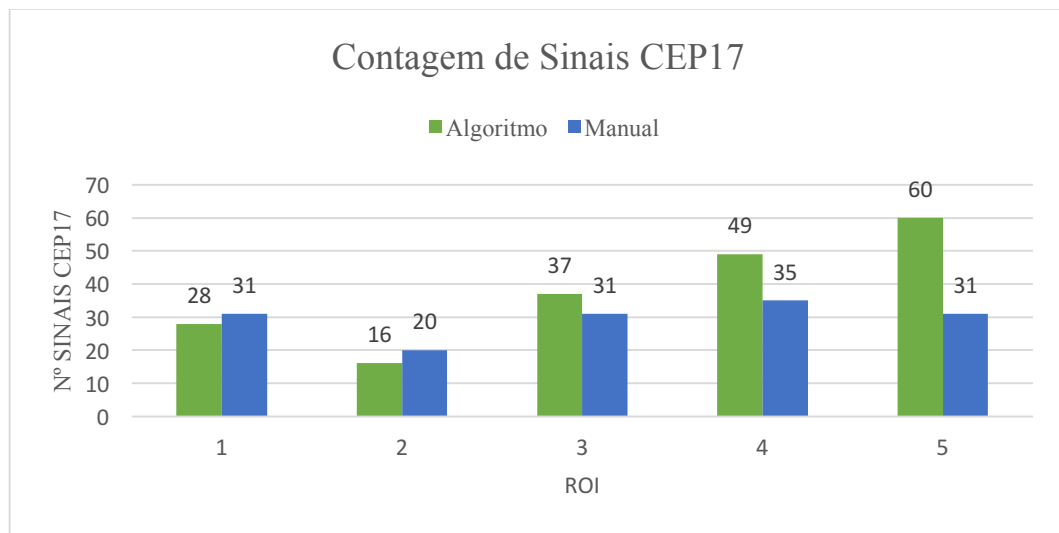
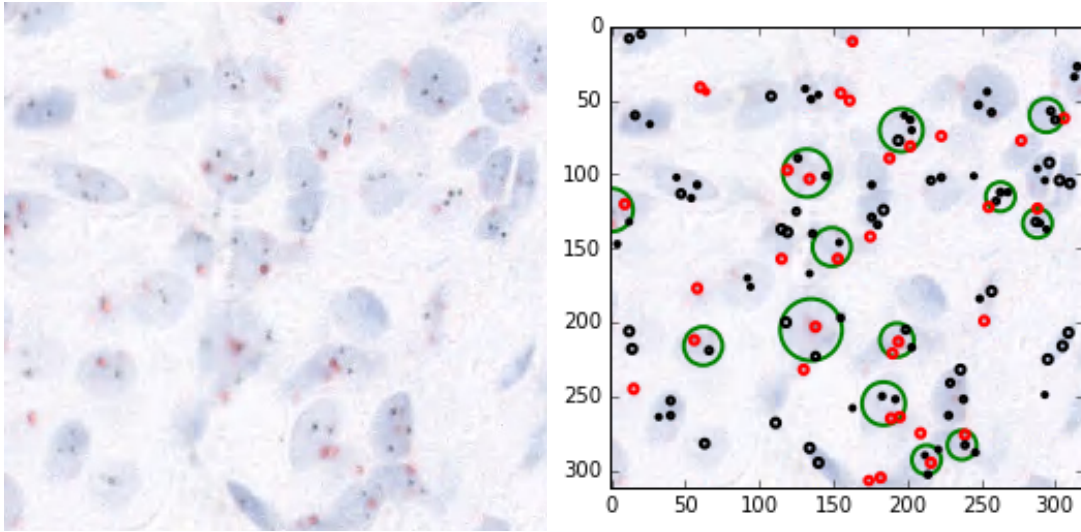


Figura 4.7 Gráfico de contagem de sinais CEP17: Algoritmo versus Manual.

Podemos assim, concluir que a ROI 2 foi a que teve contagens de sinais HER2 e CEP17 mais aproximadas às contagens manuais e a ROI 5 as mais díspares. Como se pode verificar na Figura 4.8 – a, para a ROI 2 foi contabilizado um número reduzido de núcleos, o que poderá ter contribuído para uma menor diferença entre os dois métodos. Na ROI 5, Figura 4.8 – b, alguns núcleos apresentam sinais HER2 e CEP17 muito próximos ou sobrepostos. Existe também uma incorreta detecção de alguns núcleos, que fez com que alguns desses fossem contabilizados sinais que não deveriam contribuir para o resultado. A presença de artefactos provenientes de ruído ou sobreposição de estruturas também pode ser fonte de erro, neste caso.

a)



b)

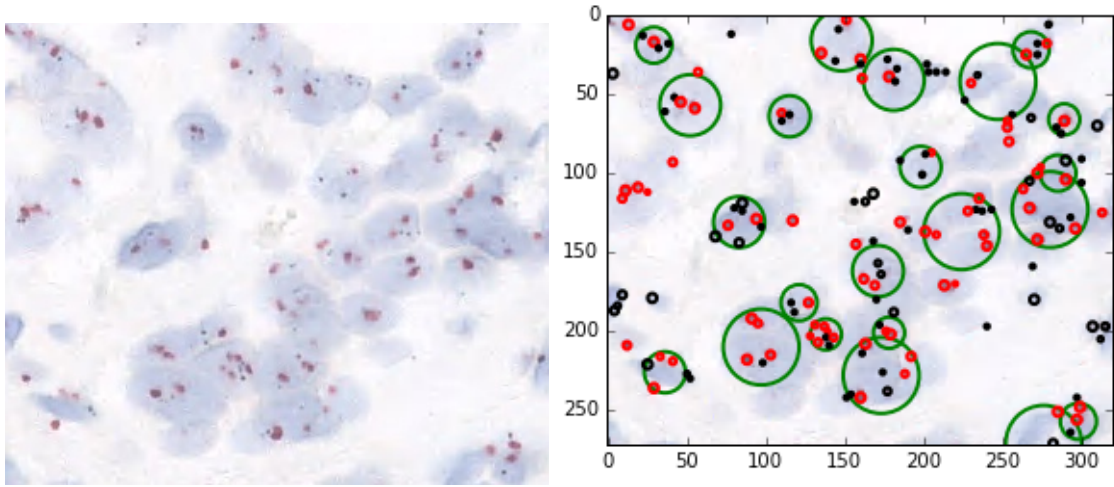


Figura 4.8 Contagens automáticas dos sinais HER e CEP17, com sinais HER2 assinalados com circunferências pretas e sinais CEP17 assinalados a circunferências vermelhas para a) ROI 2, a que apresentou a menor diferença entre as contagens automática e manuais e b) ROI 5, a que apresentou maior diferença. Apenas se contabilizam sinais HER2 e CEP17 que se encontram no interior de núcleos.

Quanto à contagem de núcleos, a comparação dos resultados obtidos entre a contagem automática e manual encontra-se representado na Figura 4.9. A diferença relativa média entre as contagens manuais e as resultantes do algoritmo foi de 17%, com desvio-padrão de 13%. A menor diferença verificou-se na ROI 1, em que as contagens coincidiram. A maior diferença, entre contagens automáticas e manuais, verificou-se na ROI 4, com uma contagem de 11 núcleos de diferença.

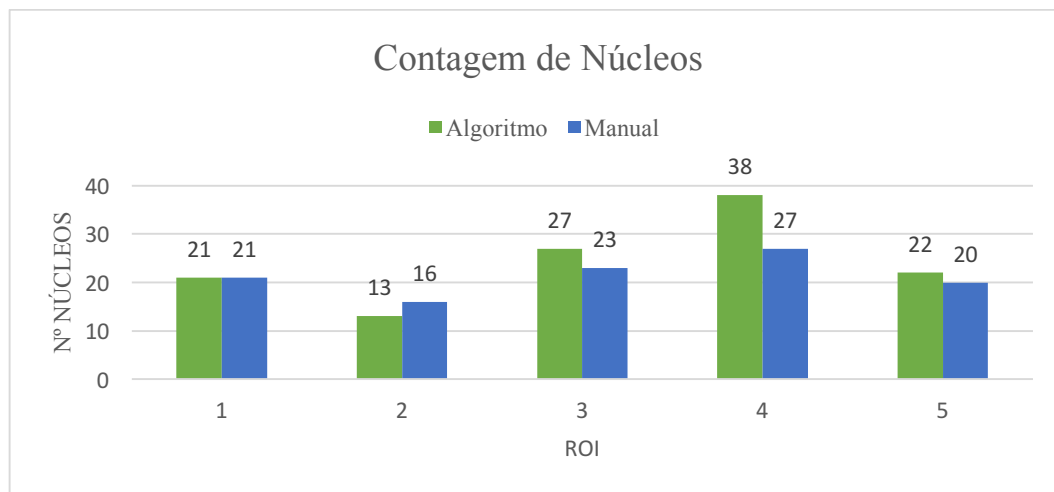


Figura 4.9 Gráfico de contagem de núcleos: Algoritmo versus Manual.

Analisando a ROI 4, Figura 4.10 – b, a que apresentou maior diferença nas contagens, os núcleos parecem ter fronteiras bem definidas e não se identificam áreas de sobreposição. As diferenças verificadas poderão ser explicadas pelo facto de se ter considerado que mais núcleos cumpriam o critério de ter pelo menos um ponto de hibridização de cada tipo. A ROI 1, Figura 4.10 – a, teve uma contagem de núcleos concordante com as contagens manuais, que pode ser explicado por também ter tido um bom resultado quanto aos sinais HER2 e CEP17.

O facto de se apenas considerarem núcleos que contém sinais de HER2 e CEP17, faz com que esta contagem não seja independente da segmentação dos núcleos. O resultado da contagem dos pontos de hibridização influencia a contagem de núcleos. A análise destes resultados deve contemplar esse factor.

É interessante também avaliar os parâmetros de teste para determinação da expressão HER2+: razão HER2/CEP17 e número médio de HER2 por núcleo. A diferença relativa média entre a razão HER2/CEP17 calculada a partir do algoritmo e as contagens manuais foi de 14% com desvio-padrão de 9%. A menor diferença entre contagens automáticas e manuais verificou-se na ROI 5, que curiosamente foi na qual se obteve um resultado mais díspar, no que diz respeito a sinais HER2 e CEP17, relativamente às contagens manuais. Este resultado demonstra que o erro associado à contagem de pontos afetou os dois tipos, HER2 e CEP17, aproximadamente da mesma forma. Esse foi um fator comum nos resultados obtidos nas 5 imagens, visto que as razões obtidas não variam consideravelmente.

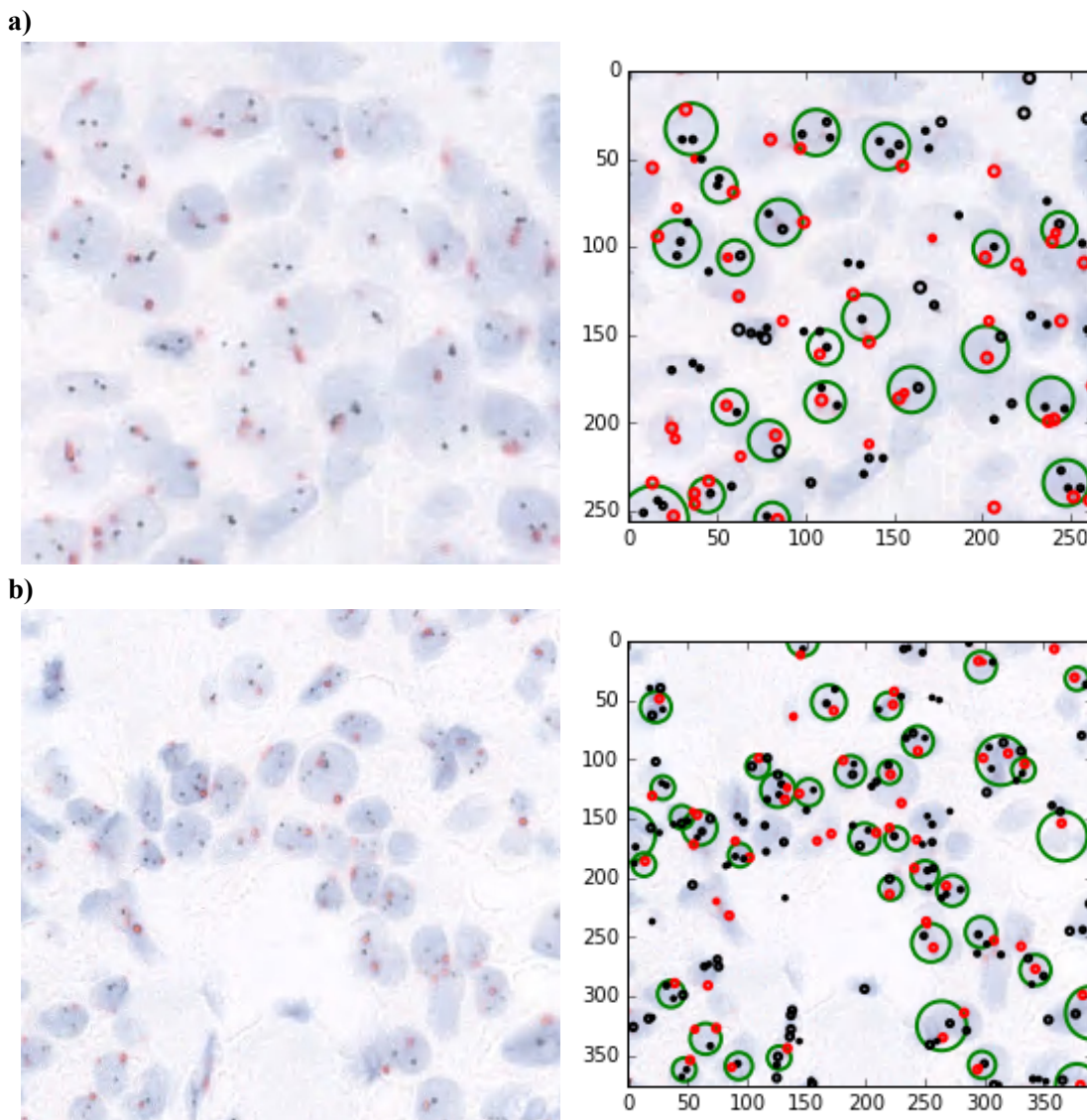


Figura 4.10 Contagens automáticas dos núcleos, assinalados com circunferências verdes, para a) ROI 1, a que apresentou a menor diferença entre as contagens automática e manuais e b) ROI 4, a que apresentou maior diferença. Apenas se contabilizam núcleos com pelo menos um sinal HER2 e um sinal CEP17 no seu interior.

O número médio de sinais HER2 por núcleo apresentou uma diferença relativa média de 31%, com desvio-padrão de 26%. A maior diferença verificou-se na ROI 5. Este resultado deve-se ao facto do número de sinais HER2 detetado automaticamente ter sido o dobro das contagens, mas o número de núcleos ter sido aproximado em ambas as contagens. Nos restantes exemplos, o número médio não diferiu consideravelmente.

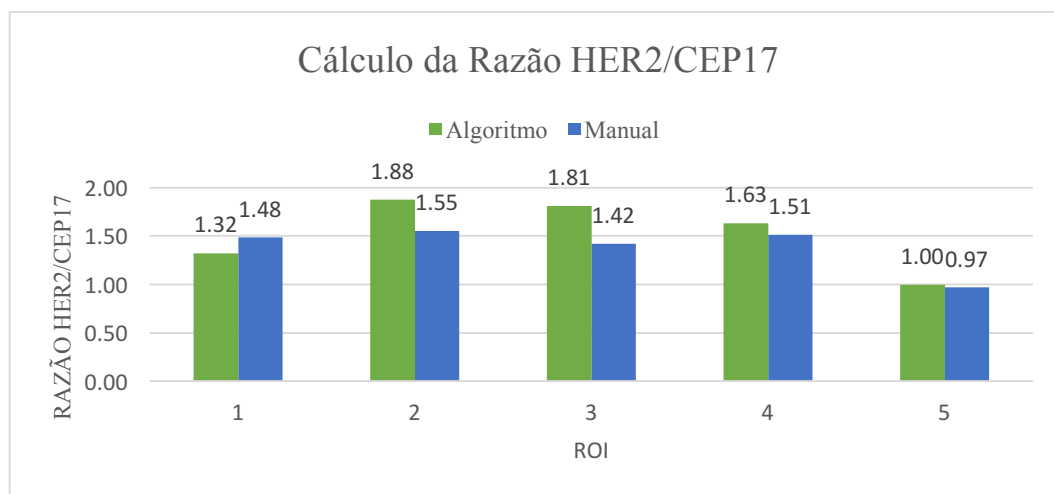


Figura 4.11 Gráfico com razão HER2/CEP17, com base nas contagens Algoritmo versus Manual.

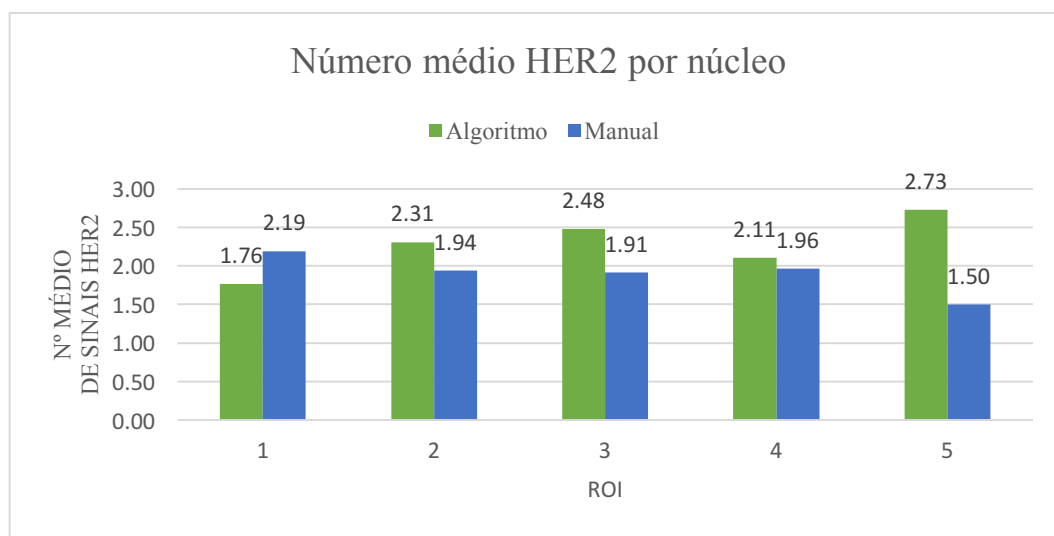


Figura 4.12 Gráfico com número médio de sinais HER2 por núcleo, com base nas contagens Algoritmo versus Manual.

Conforme indicado na Tabela 4.3, mesmo havendo diferenças nas contagens entre os dois métodos, verificou-se, no que diz aos critérios do teste da expressão HER2 (Figura 1.6), que os resultados são concordantes. As imagens tiveram todos resultados coerentes com *status* HER2 negativo.

Tabela 4.3 Parâmetros-resultado do teste da expressão de HER2 para as imagens analisadas. Todas as imagens tiveram resultados característicos de *status* negativo, no que diz respeito à expressão de HER2.

ROI	Algoritmo			Manual		
	Razão HER2/CEP17	Média de HER2 por núcleo	Status	Razão HER2/CEP17	Média de HER2 por núcleo	Status
1	<2	<4	Negativo	<2	<4	Negativo
2	<2	<4	Negativo	<2	<4	Negativo
3	<2	<4	Negativo	<2	<4	Negativo
4	<2	<4	Negativo	<2	<4	Negativo
5	<2	<4	Negativo	<2	<4	Negativo

## 5 Conclusão

A introdução de digitalizadores de lâminas em centros de diagnóstico de anatomia patológica tem o potencial de transformar, em grande escala, os procedimentos e rotinas dos seus clínicos. No entanto, estes dispositivos tornam-se pouco úteis, se não existir *software* capaz de responder às necessidades dos médicos patologistas. Existem opções no mercado, mas que são de difícil acesso pelo seu custo elevado e pouco flexíveis, na medida em que são pouco adaptáveis a procedimentos específicos.

O foco deste estudo passava por criar uma solução, no âmbito da patologia digital, para uma necessidade específica. O objetivo era analisar e construir um sistema de classificação automática para a expressão do gene HER2 em tumores da mama. Determinar a expressão HER2, através do procedimento de hibridização *in situ*, é um processo moroso e suscetível a erro humano por exigir a contagem de muitos pontos de hibridização e núcleos.

Existem exemplos na literatura de sistemas orientados para o mesmo objetivo ou com propostas semelhantes. Estes sistemas foram, no entanto, predominantemente criados para imagens provenientes de FISH e não se encontram facilmente disponíveis.

Optou-se por desenhar uma solução, baseada em *Python*, que recorresse apenas a ferramentas *open-source*. O algoritmo desenvolvido tem uma construção clássica, no que diz respeito, às suas etapas de processamento de imagem: leitura da imagem, pré-processamento, segmentação, *extração de features* e classificação. Para cada uma destas etapas foram ponderados e analisados os métodos a aplicar. Existiam três elementos que tinham de ser segmentados e contabilizados, sinais de HER2, sinais de CEP17 e núcleos.

Para a segmentação dos sinais de HER2 e CEP17, estudou-se a possibilidade de utilização de um processo de deteção de *blobs*. Conclui-se que este método é eficaz para identificar estes sinais e o que o algoritmo do Laplaciano de Gaussiano é o melhor que se adequa. Deste modo, os sinais de HER2 e CEP17 são detetados em bloco, numa primeira fase. Este método implica uma posterior classificação dos sinais. A classificação dos pontos, foi feita com base numa extração de *features*. Concluiu-se que o modelo de regressão logística tinha condições de ser aplicado ao sistema para classificar o sinal como HER2 ou CEP17. O modelo determinado tem como variáveis preditivas o raio do *blob*, intensidade média nos canais verde e azul.

Para a segmentação de núcleos foram consideradas duas alternativas, segmentação *Watershed* e deteção de *blobs*. A segmentação de *Watershed* aplicada não permitiu fazer uma segmentação satisfatória dos núcleos. Concluiu-se que a deteção de *blobs* é suficiente para contabilizar os núcleos, uma vez que não era necessário conhecer com rigor as fronteiras dos núcleos.

Ao analisar os resultados, identifiquei problemas recorrentes que podem afetar os resultados. Nas imagens correspondentes a tecido de tumor HER2+, por vezes existem agrupamentos de sinais HER2 e, em todas as outras, existem estruturas sobrepostas que podem originar artefactos indesejados.

A comparação entre as contagens realizadas pelo Dr. António Polónia e as contagens automáticas do algoritmo permitiu tirar conclusões. Um erro pode afetar da mesma forma as contagens automáticas de HER2 e CEP17, que faz com que a razão entre as mesmas seja aproximadamente igual à razão calculada com base nas contagens manuais. A contagem de núcleos não é independente das contagens dos sinais HER2 e CEP17. Os parâmetros utilizados para classificar a expressão HER2 são coincidentes entre contagens automáticas e manuais.

O estudo realizado tem limitações no que diz respeito à validação do modelo proposto. Uma medida útil teria sido avaliar um maior número de aquisições e ter mais do que um profissional a contar os sinais na mesma imagem. A segmentação de núcleos pelo método de deteção de *blobs* é relevante no contexto

apresentado, mas apresenta limitações, sobretudo quanto à extração de *features*. A extração de *features* fica mais condicionada, ao não se determinar as fronteiras exatas no núcleo.

Como trabalho futuro, o sistema apresentado poderá ser integrado numa solução *open-source* de *software* de manipulação de imagens. Existe também a possibilidade de maior aproveitamento da extração de dados das imagens. Dados como intensidades médias nos canais de cor ou circularidade do núcleo podem ser usados para sofisticar e aprofundar a forma como se caracterizam os tumores.

## Referências

- [1] J. Ferlay, E. Steliarova-Foucher, J. Lortet-Tieulent, S. Rosso, J. W. W. Coebergh, H. Comber, D. Forman, and F. Bray, "Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012," *Eur. J. Cancer*, vol. 49, no. 6, pp. 1374–1403, 2013.
- [2] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2016," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 66, no. 1, pp. 7–30, 2016.
- [3] R. M. Neve, K. Chin, J. Fridlyand, J. Yeh, F. L. Baehner, T. Fevr, L. Clark, N. Bayani, J. P. Coppe, F. Tong, T. Speed, P. T. Spellman, S. DeVries, A. Lapuk, N. J. Wang, W. L. Kuo, J. L. Stilwell, D. Pinkel, D. G. Albertson, F. M. Waldman, F. McCormick, R. B. Dickson, M. D. Johnson, M. Lippman, S. Ethier, A. Gazdar, and J. W. Gray, "A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes," *Cancer Cell*, vol. 10, no. 6, pp. 515–527, 2006.
- [4] H. J. Burstein, "The Distinctive Nature of HER2-Positive Breast Cancers — NEJM," *N. Engl. J. Med.*, vol. 353, pp. 1652–1654, 2005.
- [5] E. Senkus, S. Kyriakides, S. Ohno, F. Penault-Llorca, P. Poortmans, E. Rutgers, S. Zackrisson, and F. Cardoso, "Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up," *Ann. Oncol.*, vol. 26, no. Supplement 5, pp. v8–v30, 2015.
- [6] Z. Mitri, T. Constantine, and R. O'Regan, "The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy.," *Chemother. Res. Pract.*, vol. 2012, p. 743193, 2012.
- [7] A. C. Wolff, M. E. H. Hammond, D. G. Hicks, M. Dowsett, L. M. McShane, K. H. Allison, D. C. Allred, J. M. S. Bartlett, M. Bilous, P. Fitzgibbons, W. Hanna, R. B. Jenkins, P. B. Mangu, S. Paik, E. A. Perez, M. F. Press, P. A. Spears, G. H. Vance, G. Viale, D. F. Hayes, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists, "Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update.," *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 138, no. 2, pp. 241–56, 2014.
- [8] Ferro, AB., "Imunohistoquímica," Lisboa, Manual disponível em <https://amadeuferro.webs.com/imunohistoquimica.htm>, 2013.
- [9] H. Nitta, B. Hauss-Wegrzyniak, M. Lehrkamp, A. Murillo, F. Gaire, M. Farrell, E. Walk, F. Penault-Llorca, M. Kurosumi, M. Dietel, L. Wang, M. Loftus, J. Pettay, R. Tubbs, and T. Grogan, "Development of automated brightfield double In Situ hybridization (BDISH) application for HER2 gene and chromosome 17 centromere (CEN 17) for breast carcinomas and an assay performance comparison to manual dual color HER2 fluorescence In Situ hybridization," *Diagn. Pathol.*, vol. 3, no. 1, p. 41, 2008.
- [10] C. Alberto, "Avaliação da amplificação do gene HER2 , determinada por FISH e SISH , em casos com score 0 / 1 + por imunohistoquímica," Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, 2011.
- [11] A. T. Ciftlik, H.-A. Lehr, and M. A. M. Gijs, "Microfluidic processor allows rapid HER2 immunohistochemistry of breast carcinomas and significantly reduces ambiguous (2+) read-outs," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 110, no. 14, pp. 5363–5368, 2013.
- [12] Junqueira and Carneiro, "Histologia Básica," *Guanabara koogan*, p. 524, 2008.
- [13] K. D. Kernohan and N. G. Bérubé, "Three dimensional dual labelled DNA fluorescent in situ hybridization analysis in fixed tissue sections," *MethodsX*, vol. 1, no. 1, pp. 30–35, 2014.
- [14] M. Tanner, D. Gancberg, A. Di Leo, D. Larsimont, G. Rouas, M. J. Piccart, and J. Isola, "Chromogenic in Situ Hybridization A Practical Alternative for Fluorescence in Situ Hybridization to Detect HER-2/neu Oncogene Amplification in Archival Breast Cancer Samples," *Am. J. Pathol.*, 2000.
- [15] N. Dandachi, O. Dietze, and C. Hauser-Kronberger, "Chromogenic in situ hybridization: a novel approach to a practical and sensitive method for the detection of HER2 oncogene in archival human breast carcinoma," *Lab. Investig.*, vol. 82, no. 8, pp. 1007–1014, 2002.

- [16] L. Arnould, Y. Denoux, G. MacGrogan, F. Penault-Llorca, M. Fiche, I. Treilleux, M. C. Mathieu, a Vincent-Salomon, M. O. Vilain, and J. Couturier, "Agreement between chromogenic in situ hybridisation (CISH) and FISH in the determination of HER2 status in breast cancer.," *Br. J. Cancer*, vol. 88, no. 10, pp. 1587–1591, 2003.
- [17] B. Reljin, M. Paskas, I. Reljin, and K. Konstanty, "Breast cancer evaluation by fluorescent dot detection using combined mathematical morphology and multifractal techniques.," *Diagn. Pathol.*, vol. 6 Suppl 1, no. Suppl 1, p. S21, 2011.
- [18] M. Dietel, I. O. Ellis, H. Höfler, H. Kreipe, H. Moch, A. Dankof, K. Kölbl, and G. Kristiansen, "Comparison of automated silver enhanced in situ hybridisation (SISH) and fluorescence ISH (FISH) for the validation of HER2 gene status in breast carcinoma according to the guidelines of the American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists," *Virchows Arch.*, vol. 451, no. 1, pp. 19–25, 2007.
- [19] A. C. Wolff, M. E. Hammond, D. G. Hicks, M. Dowsett, L. M. McShane, K. H. Allison, D. C. Allred, J. M. Bartlett, M. Bilous, P. Fitzgibbons, W. Hanna, R. B. Jenkins, P. B. Mangu, S. Paik, E. A. Perez, M. F. Press, P. A. Spears, G. H. Vance, G. Viale, D. F. Hayes, A. S. of C. Oncology, and C. of A. Pathologists, "Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. TL - 31," *J. Clin. Oncol.*, vol. 31 VN-r, no. 31, pp. 3997–4013, 2013.
- [20] L. P. Garrison, J. B. Babigumira, A. Masaquel, B. C. M. Wang, D. Lalla, and M. Brammer, "The Lifetime Economic Burden of Inaccurate HER2 Testing: Estimating the Costs of False-Positive and False-Negative HER2 Test Results in US Patients with Early-Stage Breast Cancer," *Value Heal.*, vol. 18, no. 4, pp. 541–546, 2015.
- [21] T. Les, T. Markiewicz, M. Jesiotr, and W. Kozłowski, "Dots Detection in HER2 FISH Images Based on Alternative Color Spaces," *Procedia Comput. Sci.*, vol. 90, no. July, pp. 132–137, 2016.
- [22] I. Skaland, I. Øvestad, E. A. M. Janssen, J. Klos, K. H. Kjellevoid, T. Helliesen, and J. P. A. Baak, "Comparing subjective and digital image analysis HER2/neu expression scores with conventional and modified FISH scores in breast cancer.," *J. Clin. Pathol.*, vol. 61, no. 1, pp. 68–71, 2008.
- [23] A. Brüggmann, M. Eld, G. Lelkaitis, S. Nielsen, M. Grunkin, J. D. Hansen, N. T. Foged, and M. Vyberg, "Digital image analysis of membrane connectivity is a robust measure of HER2 immunostains," *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 132, no. 1, pp. 41–49, 2012.
- [24] H. Netten, I. T. Young, L. J. Van Vliet, H. J. Tanke, H. Vrolijk, and W. C. R. Sloos, "FISH and chips: Automation of fluorescent dot counting in interphase cell nuclei," *Cytometry*, vol. 28, no. 1, pp. 1–10, 1997.
- [25] G. W. Zack, W. E. Rogers, and S. A. Latt, "Automatic measurement of sister chromatid exchange frequency," *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 25, no. 7, pp. 741–753, 1977.
- [26] S. Ridler, T.W. Calvard, "Picture Thresholding Using an Iterative Slection Method," *IEEE Trans. Syst. Man Cybern.*, vol. 8, no. 8, pp. 630–632, 1978.
- [27] C. Ortiz De Solrzano, A. Santos, I. Vallcorba, J. M. Garcia-Sagredo, and F. Del Pozo, "Automated fish spot counting in interphase nuclei: Statistical validation and data correction," *Cytometry*, vol. 31, no. 2, pp. 93–99, 1998.
- [28] F. Raimondo, M. A. Gavrielides, G. Karayannopoulou, K. Lyroudia, I. Pitas, S. Member, and I. Kostopoulos, "Automated Evaluation of Her-2 / neu Status in Breast Tissue From Fluorescent In Situ Hybridization Images," *IEEE Transactions on Image Processing*, vol. 14, no. 9, pp. 1288–1299, 2005.
- [29] N. Otsu, "A threshold selection method from gray-level histograms," *IEEE Trans. Syst. Man. Cybern.*, vol. 9, no. 1, pp. 62–66, 1979.
- [30] Y. Wang, K. Williamson, P. Kelly, J. James, P. Hamilton, "SurfaceSlide: A Multitouch Digital Pathology Platform," *PLoS ONE*, 2012.
- [31] F. Pedregosa, G. Varoquaux, A. Gramfort, V. Michel, B. Thirion, O. Grisel, M. Blondel, P. Prettenhofer, R. Weiss, V. Dubourg, J. Vanderplas, A. Passos, D. Cournapeau, M. Brucher, M. Perrot, and É. Duchesnay, "Scikit-learn: Machine Learning in Python," *J. Mach. Learn. Res.*, 2012.

- [32] Roerdink, J., Meijster, A., “The Watershed Transform: Definitions, Algorithms and Parallelization Strategies,” *Fundamenta Informaticae*, 2000.