

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA EM SAÚDE**

PAOLA EVELYN BOTEGA

**AVALIAÇÃO DA POSITIVIDADE PARA RECEPTORES DE ESTROGÊNIO EM
CÂNCER DE MAMA DE ACORDO COM A ESCALA DE ALLRED POR MEIO DE
ANÁLISE MORFOMÉTRICA COMPUTADORIZADA**

CURITIBA

2018

PAOLA EVELYN BOTEGA

**AVALIAÇÃO DA POSITIVIDADE PARA RECEPTORES DE ESTROGÊNIO EM
CÂNCER DE MAMA, DE ACORDO COM A ESCALA DE ALLRED, POR MEIO DE
ANÁLISE MORFOMÉTRICA COMPUTADORIZADA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Tecnologia em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Ossamu Ioshii.
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Mauren Abreu de Souza.

CURITIBA

2018

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Edilene de Oliveira dos Santos CRB 9 / 1636

Botega, Paola Evelyn

B748 Avaliação da positividade para receptores de estrogênio em câncer de
2018 mama, de acordo com a escala de Allred, por meio de análise morfológica
computadorizada / Paola Evelyn Botega ; orientador, Sergio Ossamu Ioshii ;
coorientadora, Mauren Abreu de Souza. -- 2018

52 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2018

Bibliografia: f. 48-52

1. Mamas – Câncer. 2. Mamas – Imagem. 3. Processamento de imagens
assistida por computador. 4. Imuno-histoquímica. I. Ioshii, Sergio Ossamu.
II. Souza, Mauren Abreu de. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde. IV. Título.

CDD 20. ed. – 616.99449



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola Politécnica
Programa de Pós Graduação em Tecnologia em Saúde


**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA EM SAÚDE**

DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 260

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: TECNOLOGIA EM SAÚDE


Aos trinta dias do mês de julho de 2018 às 11:00h, na sala de mestrado 03, 2º Andar-Bloco Verde, realizou-se a sessão pública de Defesa da Dissertação: "AVALIAÇÃO DA POSITIVIDADE PARA RECEPTORES DE ESTROGÊNIO EM CÂNCER DE MAMA, DE ACORDO COM A ESCALA DE ALLRED, POR MEIO DE ANÁLISE MORFOMÉTRICA COMPUTADORIZADA" apresentada pela aluna Paola Evelyn Botega sob orientação do Professor Dr. Sergio Ossamu Ioshii e coorientação da Prof.ª Dr.ª Mauren Abreu de Souza como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Tecnologia em Saúde**, perante uma Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Sergio Ossamu Ioshii
PUCPR (Presidente)



(assinatura) Aprov
(Aprov/Reprov.)

Prof. Dr. Guilherme Nunes Nogueira Neto
PUCPR (Examinador)



(assinatura) APROV.
(Aprov/Reprov.)

Prof. Dr. Gustavo Benvenuti Borba
UTFPR (Examinador)



(assinatura) APROV.
(Aprov/Reprov.)

Início: 11h Término: 13h30

Conforme as normas regimentais do PPGTS e da PUCPR, o trabalho apresentado foi considerado aprovado (aprovado/reprovado), segundo avaliação da maioria dos membros desta Banca Examinadora.

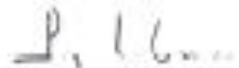
Observações: implantar no momento final todas as normas e d- cada para finalização

O(a) aluno(a) está ciente que a homologação deste resultado está condicionada: (I) ao cumprimento integral das solicitações da Banca Examinadora, que determina um prazo de 30 dias para o cumprimento dos requisitos; (II) entrega da dissertação em conformidade com as normas especificadas no Regulamento do PPGTS/PUCPR; (III) entrega da documentação necessária para elaboração do Diploma.

ALUNO(A): Paola Evelyn Botega



(assinatura)



Prof. Dr. Percy Nohama,
Coordenador do PPGTS PUCPR



Dedico este trabalho a todas as mulheres que já enfrentaram, enfrentam ou enfrentarão o câncer de mama. Em especial a Margarida Lérias, que combate uma reincidência após 5 anos, com prognóstico positivo. Dedico, também, a Nilza Pereira de Souza e Anadele Fatima Rafael Colognese, que, infelizmente, vieram a falecer em decorrência de complicações da doença.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela realização de um grande sonho, que era o mestrado, por ter me dado o privilégio dessa conquista.

Agradeço a todos os professores pelo conhecimento e aconselhamentos transmitidos durante todo o processo.

Agradeço a Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo.

Agradeço a Jussara Tozo, que reacendeu e fortaleceu meu amor por ensinar.

Meu agradecimento especial a minha família e amigos pelo suporte e por não me deixarem desistir.

RESUMO

Um dos passos essenciais para determinar o tratamento adequado das pacientes com câncer de mama é a avaliação da expressão dos receptores hormonais no tecido neoplásico, que é feita, na maior parte das vezes, pela técnica da imuno-histoquímica (IHQ). A IHQ permite a identificação de células cancerosas com receptores hormonais positivos e, portanto, sensíveis ao tratamento hormonal, resultando em aumento da sobrevida das pacientes portadoras de câncer de mama. Para a melhor escolha terapêutica, é necessária avaliação quantitativa da positividade dos receptores hormonais. Apesar da sua importância, esta avaliação é, em geral, realizada de forma subjetiva e dependente do treinamento e conhecimento do avaliador, podendo resultar em variações nos resultados. Nos últimos anos, a tecnologia tem auxiliado na mitigação dos fatores que podem interferir na avaliação imuno-histoquímica dos receptores hormonais. Anticorpos mais sensíveis e específicos, automação dos procedimentos técnicos, e o adequado acondicionamento dos tecidos nas fases pré-analíticas possibilitaram melhores resultados e maiores benefícios às pacientes acometidas pela doença. Mais recentemente esforços têm sido realizados para que haja redução da subjetividade na fase analítica. A análise computadorizada de imagens digitais dos tecidos submetidos ao procedimento de IHQ é uma alternativa que tem sido validada. Alguns produtos já estão disponíveis, mas são de alto custo e de acesso restrito a maior parte das mulheres com câncer de mama, em especial atendidas pelo Sistema Único de Saúde. O objetivo desta pesquisa foi o desenvolvimento de software, de baixo custo, capaz de processar de forma automatizada imagens digitais histopatológicas de câncer de mama, gerando desta maneira resultados quantitativos da positividade para receptor de estrogênio, de forma padronizada e livre de subjetividade. Para o desenvolvimento da ferramenta, utilizou-se o programa MATLAB, versão 2015. Realizou-se o processamento de imagens histológicas digitais, quantificando-se inicialmente o total de núcleos das células neoplásicas. Na sequência, obteve-se a quantidade de células neoplásicas com positividade para receptores de estrogênio, seguido de avaliação quantitativa da intensidade da positividade utilizando-se os critérios da escala de Allred. Três especialistas, médicos patologistas, fizeram, de forma independente e sem conhecimento dos resultados da análise computacional, avaliação das mesmas imagens digitais, realizando a classificação de Allred de forma subjetiva rotineira.

Obteve-se como resultado, acurácia entre 78,5% e 95,1%, sensibilidade entre 96,6% e 100%, especificidade entre 67,2% e 93,3% e eficiência entre 83,6% e 94,9%, além da média de erro da pontuação total de 4,28%. Conclui-se que o software desenvolvido é uma alternativa viável para a mensuração da expressão da positividade dos receptores de estrogênio em câncer de mama.

Palavras-chave: Imuno-histoquímica. Processamento de imagens. Câncer de mama.

ABSTRACT

One of the essential steps in determining the appropriate treatment of breast cancer patients is the assessment of hormone receptor expression in neoplastic tissue, which is most often done by the immunohistochemistry (IHC) technique. The IHC allows the identification of cancer cells with positive hormone receptors and therefore, sensitive to the hormonal treatment, resulting in an increase of the survival of patients with breast cancer. For the best therapeutic choice, quantitative evaluation of hormone receptor positivity is required. Despite its importance, this evaluation is generally performed subjectively and dependent on the evaluator's training and knowledge, so it may result in variations in the results. In recent years, technology has helped mitigate factors that may interfere with the immunohistochemical evaluation of hormone receptors. More sensitive and specific antibodies, automation of the technical procedures, and the adequate conditioning of the tissues in the pre-analytic phases allowed better results and greater benefits to patients affected by the disease. More recently, efforts have been made to reduce subjectivity in the analytical phase. The computerized analysis of digital images of the tissues submitted to the IHC procedure is an alternative that has been validated. Some products are already available, but they are of high cost and have restricted access for the majority of women with breast cancer, especially attended by the Unified Health System. The objective of this research was the development of lower cost software capable of automatically processing histopathological digital images of breast cancer, thus generating quantitative results of estrogen receptor positivity in a standardized way and free of subjectivity. For the development of the tool, the MATLAB program, version 2015 was used. Digital histological images were processed. The first step was the quantification of the total nuclei of the neoplastic cells. Subsequently, the number of neoplastic cells with estrogen receptor positivity was evaluated, followed by quantitative analysis of the intensity of positivity using the Allred scale criteria. Three specialists, medical pathologists trained in IHC interpretation, with no knowledge of the results of the computational analysis, evaluated the same digital images, performing the routine and subjective Allred classification. As a result, accuracy was between 78.5% and 95.1%, sensitivity between 96.6% and 100%, specificity between 67.2% and 93.3% and efficiency between 83.6% and 94.9%. The average error of the total score of 4.28%.

It is concluded that the software developed in this research is a viable alternative for measuring the expression of estrogen receptor positivity in breast cancer.

Key-words: Immunohistochemistry. Image processing. Breast cancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Escala de Allred	21
Figura 2 – <i>Pixels</i> em imagem em tons de cinza	22
Figura 3 – Eixo de cores	22
Figura 4 – Aquisição da imagem por uma filmadora.	24
Figura 5 – Eixos x e y de uma imagem	25
Figura 6 – Etapas do Processamento de Imagens.....	26
Figura 7 – Imagem original (a) e imagem com detecção de bordas (b)	27
Figura 8 – Processo de segmentação: imagem em tons de cinza (a), histograma de tons de cinza (b) e imagem binária (c).	29
Figura 9 – Esquema do projeto.	35
Figura 10 – Exemplo de imagem oficial cedida pela Agilent	36
Figura 11 – Passos do projeto.....	37
Figura 12 – Processamento das células marrons: (a) Imagem original multiplicada pela máscara, (b) Imagem binária, representando as células marrons. (c) Imagem binária após o pré-processamento, (d) Detecção das bordas e quantificação das células marrons.	42
Figura 13 – Processamento das células azuis: (a) Imagem original sobreposta com a máscara, (b) Imagem binária, representando as células azuis. (c) Imagem binária após o pré-processamento, (d) Detecção das bordas e quantificação das células azuis.	43
Figura 14 – Mensagem para o usuário com os valores de cada pontuação	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Matriz de Confusão	32
Tabela 2 – Métricas Estatísticas.....	32
Tabela 3 – Avaliação do Especialista 1	45
Tabela 4 – Avaliação do Especialista 2.....	45
Tabela 5 – Avaliação do Especialista 3.....	45
Tabela 6 – PS, IS e TS da Escala de Allred para cada imagem, segundo cada especialista.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
FDA	Food and Drug Administration
IHQ	Imuno-histoquímica
IS	<i>Intensity Score</i>
HSV	<i>Hue, Saturation and Value</i>
PS	<i>Proportion Score</i>
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
RE	Receptor de estrogênio
RGB	<i>Red, Green and Blue</i>
ROI	<i>Region of interest</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TS	<i>Total Score</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	PROBLEMATIZAÇÃO	16
1.2	HIPÓTESE	16
1.3	OBJETIVOS	16
1.3.1	Objetivo Geral	16
1.3.2	Objetivos Específicos	17
1.4	JUSTIFICATIVA.....	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	O CANCER DE MAMA E OS FATORES PROGNÓSTICOS	18
2.1.1	Escala de Allred	20
2.2	DESENVOLVIMENTO DE SOFTWARE.....	21
2.3	PROCESSAMENTO DE IMAGENS	21
2.3.1	MATLAB	23
2.3.2	Aquisição da imagem	23
2.3.3	Processamento digital	24
2.3.4	Análise da imagem	26
2.3.5	Image Enhancement	27
2.3.6	Pré-Processamento	27
2.3.7	Segmentação	28
2.3.8	Extração de Características	29
2.3.9	Descritores	30
2.3.10	Reconhecimento, Interpretação e Base de Conhecimento	31
2.4	MATRIZ DE CONFUSÃO	31
2.5	TRABALHOS RELACIONADOS.....	33
3	METODOLOGIA	35
3.1	PASSO 1: PRÉ-PROCESSAMENTO	37
3.2	PASSO 2: PROCESSAMENTO DAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS (MARRONS).....	38
3.3	PASSO 3: PROCESSAMENTO DAS CÉLULAS NÃO-NEOPLÁSICAS (AZUIS)	38
3.4	PASSO 4: CLASSIFICAÇÃO QUANTITATIVA – <i>PROPORTION SCORE</i> (PS) 39	

3.5	PASSO 5: CLASSIFICAÇÃO DAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS QUANTO À INTENSIDADE DE COR – <i>INTENSITY SCORE</i> (IS)	39
3.6	PASSO 6: CÁLCULO DA PONTUAÇÃO TOTAL – <i>TOTAL SCORE</i> (TS)	40
3.7	PASSO 7: VALIDAÇÃO	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	PASSO 1 – PRÉ-PROCESSAMENTO	41
4.2	PASSO 2: PROCESSAMENTO DAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS.....	42
4.3	PASSO 3: PROCESSAMENTO DAS CÉLULAS NÃO-NEOPLÁSICAS (AZUIS)	42
4.4	PASSO 4: CLASSIFICAÇÃO QUANTITATIVA – <i>PROPORTION SCORE</i> (PS) 43	
4.5	PASSO 5: CLASSIFICAÇÃO DAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS QUANTO À INTENSIDADE DE COR – <i>INTENSITY SCORE</i> (IS)	43
4.6	PASSO 6: CÁLCULO DA PONTUAÇÃO TOTAL – <i>TOTAL SCORE</i> (TS)	44
4.7	VALIDAÇÃO	44
5	CONCLUSÃO.....	48
	REFERÊNCIAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

A avaliação da expressão dos receptores hormonais é um dos passos fundamentais para o tratamento adequado das pacientes com câncer de mama. Há várias técnicas para esta avaliação, tendo sido consagrada nos últimos anos a metodologia da imuno-histoquímica (IHQ). A IHQ é uma técnica em patologia em que são utilizados anticorpos específicos para a identificação de proteínas específicas em cortes histológicos, seguido de revelação da reação antígeno-anticorpo por método enzimático e colorimétrico. A IHQ permite a identificação das pacientes com câncer de mama que apresentam células com receptores hormonais positivos e, portanto, sensíveis ao tratamento hormonal, que aliado a outras terapias, resulta em sobrevida mais longa a estas pacientes (HAMMOND et al., 2010; HILL et al., 2017).

Para a avaliação qualitativa e quantitativa dos receptores hormonais em câncer de mama, o método mais utilizado é o analógico, em que se utiliza uma escala visual. Entretanto, com o avanço da tecnologia, a automação dos processos e a necessidade de padronização, tem sido necessária a automação dos procedimentos em IHQ, quer na fase de preparação dos exames (pré-analítica), quer na interpretação dos exames (fase analítica). Na fase pré-analítica já há várias soluções comerciais e tecnológicas que padronizaram os procedimentos técnicos da IHQ. Entretanto, na fase analítica, embora a automação já seja possível com alguns equipamentos validados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para utilização em rotina laboratorial (ALLRED et al., 1998; VENTANA MEDICAL SYSTEMS, 2013), são produtos comerciais e de alto custo, pouco acessíveis à maior parte da população afetada pelo câncer de mama, em especial as pacientes atendidas no Sistema Único de Saúde. Pesquisas adicionais ainda são necessárias, em especial aquelas em que haja a busca pela simplificação e o aumento da acessibilidade.

No ambiente tecnológico da patologia digital, soluções para a automação da fase analítica da IHQ para receptores hormonais de câncer de mama ainda são pouco pesquisadas. Alguns resultados já demonstram que há concordância na comparação com os métodos tradicionais, entretanto ainda não se definiu quais são as melhores ferramentas e procedimentos tecnológicos para se obter os melhores resultados para a avaliação quantitativa automatizada (AKBAR et al., 2015; KRECSÁK et al., 2011; QUEST DIAGNOSTICS INCORPORATED, 2012; STÅLHAMMAR et al., 2016).

Encontrar soluções tecnológicas simples, baratas e acessíveis, que possam dar suporte à padronização da avaliação IHQ quantitativa dos receptores hormonais é de grande importância social, visto que pode favorecer muitas mulheres portadoras de câncer de mama tratadas no Sistema Único de Saúde.

1.1 PROBLEMATIZAÇÃO

A avaliação quantitativa dos receptores hormonais em células do câncer de mama é realizada, em sua maior parte, de forma subjetiva, dependente da análise visual que os médicos patologistas realizam utilizando-se microscópio óptico comum e uma escala analógica.

Os métodos de automação desta análise ainda são muito pouco acessíveis, caros e, portanto, não disponíveis na maioria dos laboratórios de patologia. Assim, para grande número de mulheres em tratamento por câncer de mama este benefício não está disponível. Pesquisar e desenvolver alternativas tecnológicas de baixo custo e mais acessíveis é de grande relevância no tratamento das pacientes com câncer de mama.

1.2 HIPÓTESE

A hipótese desta pesquisa é de que é possível o desenvolvimento de um software de baixo custo, capaz de analisar de forma objetiva e automatizada a expressão de receptores de estrogênio de câncer de mama detectadas pela técnica da imuno-histoquímica, segundo a Escala de Allred.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Desenvolver software para processamento automático, quantitativo e digital da expressão imuno-histoquímica de receptores de estrogênio em câncer de mama, segundo a Escala de Allred.

1.3.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos são:

- a) Automatizar a contagem dos núcleos das células neoplásicas num corte histológico;
- b) Quantificar, de forma automática, núcleos de células neoplásicas com positividade para marcadores de receptores de estrogênio classificando-os em seis grupos (0, 1, 2, 3, 4 e 5), de acordo com a porcentagem de positividade, segundo a Escala de Allred;
- c) Quantificar, de forma automática, a intensidade da positividade (escala de 1 a 3) para marcadores de receptores hormonais, segundo a Escala de Allred;
- d) Validar os resultados, comparando-os aos obtidos pela análise de patologistas especialistas.

1.4 JUSTIFICATIVA

Com a presente pesquisa, pretende-se desenvolver uma solução tecnológica barata e acessível para automação da análise quantitativa dos receptores hormonais em cortes histológicos de câncer de mama, incluindo sua aplicação à patologia digital, e também promover acesso a esta metodologia às pessoas tratadas no Sistema Único de Saúde (SUS), visto que a solução existente, que já foi certificada, está disponível para os pacientes tratados em rede privada e restrita, a partir de equipamento, que pode atingir uma faixa de preço de até USD 350,000.00 (APERIO TECHNOLOGIES, 2007; MAKKINK-NOMBRADO et al., 1995). A contribuição social é enorme, visto que o câncer de mama, excluindo-se os cânceres de pele, é a neoplasia mais frequente nas mulheres, e o seu tratamento é favorecido pela adequada classificação da expressão dos receptores hormonais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo apresenta uma revisão da bibliografia, buscando esclarecer os temas que compõe o projeto, começando com o câncer de mama e a avaliação dos receptores hormonais, em seguida explicando o que é a Escala de Allred, como funciona o desenvolvimento de um software e finalizando com o processamento de imagens e a técnica escolhida para a validação do trabalho.

2.1 O CANCER DE MAMA E OS FATORES PROGNÓSTICOS

O Câncer de Mama, no mundo e no Brasil, é uma das neoplasias malignas mais prevalentes na população feminina. Estima-se que ocorrerão quase 1,7 milhão de novos casos de câncer de mama no mundo e em torno de 60 mil novos casos no Brasil no biênio 2018-2019 (INCA, 2017).

O câncer de mama assume maior impacto na população visto que o diagnóstico ainda é estabelecido, na maioria das vezes, numa fase tardia da doença, em especial junto às classes com menor poder aquisitivo, o que agrava o prognóstico da doença, pior nas fases mais avançadas. Na grande maioria das instituições especializadas no tratamento do câncer, os estadiamentos III e IV chegam a corresponder a cerca de 60% dos diagnósticos iniciais. Em torno de 51% das mulheres têm diagnóstico de câncer avançado. O tempo médio entre o início dos sintomas e a confirmação do diagnóstico e, conseqüentemente, do início do tratamento, em geral, é maior do que 6 meses (CARVALHO, 2010; FILHO; MONCAU, 2002). Há que se fortalecer políticas consistentes de controle da doença através do diagnóstico precoce, em especial a mamografia, visto que menos de 30% das mulheres maiores de 40 anos realizaram mamografia no SUS (AZEVEDO E SILVA et al., 2014).

A história natural do câncer de mama varia de paciente para paciente. Esta variação é determinada por características tais como o tamanho do tumor primário, o *status* dos linfonodos regionais, e características histológicas e biológicas, em especial o grau nuclear, o grau histológico e a dosagem quantitativa e qualitativa de receptores hormonais (BUITRAGO; UEMURA; SENA, 2011; DE ABREU; KOIFMAN, 2002; FAYER et al., 2016).

O conhecimento dos fatores prognósticos em câncer de mama é de fundamental importância na determinação dos programas terapêuticos. Uma terapia

baseada em uma avaliação prognóstica possibilita a aplicação das diferentes modalidades terapêuticas utilizadas no tratamento do câncer com a intensidade e a efetividade adequadas e individualizadas para a paciente em questão. Os potenciais fatores prognósticos para câncer de mama podem ser subdivididos em quatro grupos ou gerações.

Na primeira geração são agrupados os fatores anatômicos (tamanho do tumor, comprometimento de linfonodos, subtipos histológicos, idade, etc.); na segunda geração são incluídas as características patológicas quantitativas (grau histológico, necrose tumoral, ploidia, índice mitótico, etc.) e responsividade endócrina (receptores hormonais de estrogênio e progesterona); na terceira geração são agrupados os fatores moleculares específicos/reguladores do crescimento (amplificadores de oncogenes e supressores de genes), as proteases (como a catépsina D) e outros (fator de crescimento do hepatócito, glicoproteína LA.135); finalmente, na quarta geração são incluídos os preditores específicos de metástases para os diferentes órgãos (DHINGRA; HORTOBAGYI, 1996).

A importância prognóstica dos receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP) em câncer de mama é reconhecida desde a década de 70 (HAMMOND et al., 2010). Com a validação do exame IHQ e sua facilidade em ser utilizado em blocos de parafina arquivados nos laboratórios de patologia, o método ganhou popularidade e se universalizou, tornando-se exame essencial para o planejamento terapêutico no câncer de mama. Os RE, quando negativos, acham-se correlacionados com baixa diferenciação tumoral, alta taxa de proliferação celular e outras características desfavoráveis ao prognóstico das pacientes com câncer de mama. Pacientes com tumores RE positivos tendem a ter uma sobrevida maior àquelas RE-negativo, dada a possibilidade de aliar às várias táticas terapêuticas como radioterapia, quimioterapia e imunoterapia, o tratamento hormonal adjuvante (MA et al., 2006)(CARVALHO, 2010)(DUFFY et al., 2017).

Há uma forte correlação da avaliação qualitativa e quantitativa do câncer de mama quando se comparam as análises com múltiplos observadores (HARVEY et al., 1999)(COHEN et al., 2012). Alguns estudos demonstram que esta avaliação qualitativa e quantitativa em IHQ, utilizando-se padrões de referência para receptores hormonais, auxiliam na melhor definição das pessoas que podem ser favorecidas pela terapia hormonal (MA et al., 2006)(HAMMOND et al., 2010)(EBCTCG, 2011)(COHEN et al., 2012).

As principais desvantagens dos métodos convencionais da IHQ são a grande variedade de anticorpos disponíveis no mercado e com graus de antigenicidade distintos, utilização de diferentes tipos de sistemas de detecção, falta de padronização do método escolhido para recuperação antigênica, ausência de limites padronizados para definição de negatividade e positividade e distinção entre os diversos graus de positividade, e a falta de um padrão de escore definido (VEIGA et al., 2009).

Com a evolução das diversas modalidades de tratamento, incluindo a avaliação de características moleculares, têm sido necessárias avaliações mais detalhadas e com menor grau de subjetividade e, portanto, menor possibilidade de erros analíticos, que os métodos tradicionais da IHQ têm como desvantagem. Neste sentido, as metodologias que utilizam análise de imagens, morfometria e avaliação automatizada têm sido descritas e tornam-se ferramentas promissoras para auxiliar na terapia personalizada (LEHR et al., 1997)(REXHEPAJ et al., 2008)(BOLTON et al., 2010)(ARAVELO; CRUZ-ROA; GONZALEZ O, 2014)(VARGHESE et al., 2014)(GANDOMKAR; BRENNAN; MELLO-THOMS, 2016). O atual desenvolvimento da patologia digital e da possibilidade de uso de ferramentas de inteligência artificial e aprendizado de máquina são campos promissores para se alcançar resultados objetivos e úteis no tratamento do câncer de mama (TAYLOR, 2011).

2.1.1 Escala de Allred

A avaliação das lâminas digitais será feita de acordo com a Escala de Allred, que é um instrumento clínico semi-quantitativo baseado na porcentagem das células neoplásicas com positividade para marcadores de receptores hormonais (em uma escala de 0 a 5) e na intensidade da coloração (em uma escala de 0 a 3). A porcentagem e a intensidade são, então, somadas para obter um resultado de 0 ou 2 até 8. Se a soma for 0 ou 2, considera-se negativo, já se for entre 3 e 8, há positividade para receptores hormonais, como pode ser observado na Figura 1 (ALLRED et al., 1998).

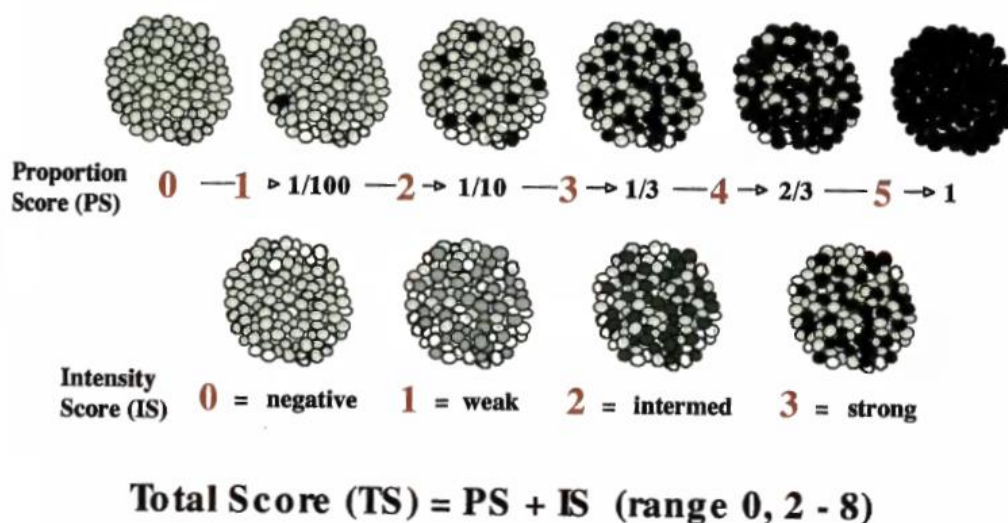


Figura 1 – Escala de Allred
Fonte: (ALLRED et al., 1998)

2.2 DESENVOLVIMENTO DE SOFTWARE

O desenvolvimento de software possui um processo que é composto por uma seqüência de passos, em que cada um executa um conjunto de atividades bem definidas, que conduzem ao projeto final (JALOTE, 2008). Embora muitos processos de software diferentes de desenvolvimento de software sejam possíveis, algumas etapas são as mesmas em todos eles e podem ser descritas utilizando três fases genéricas: definição, desenvolvimento e validação.

O software proposto passou pelas fases de definição, desenvolvimento e validação. Os requisitos foram definidos de acordo com os objetivos da pesquisa e o desenvolvimento pode ser encontrado na metodologia.

2.3 PROCESSAMENTO DE IMAGENS

“Uma imagem pode ser definida como uma função bidimensional, $f(x,y)$, onde x e y são coordenadas espaciais (planas), e a amplitude de f de qualquer par de coordenadas (x,y) é chamada de *intensidade* ou *nível de cinza* da imagem naquele ponto” (GONZALEZ; WOODS, 2002).

Em outras palavras, uma imagem digital pode ser representada através de uma matriz $m \times n$ onde cada elemento da matriz corresponde à intensidade ou nível de cinza $f(x,y)$ em um determinado ponto da imagem, podendo ela ser preta e branca ou em tons de cinza. Já para a imagem colorida é uma matriz $m \times n \times 3$. Cada um destes

elementos é chamado de *pixel*, e na prática, possui um valor que representa uma cor em um determinado ponto da imagem. Em imagens preto e branco os valores dos *pixels* assumem valores binários (0 ou 1). Para imagens de 8 bits em tons de cinza estes valores podem variar de 0 a 255 (Figura 2), e por último para imagens coloridas de 8 bits, cada *pixel* é representado por três valores que variam de 0 a 255 cada, como pode ser observado na Figura 3.



Figura 2 – *Pixels* em imagem em tons de cinza
Fonte: (FARIA, 2010)

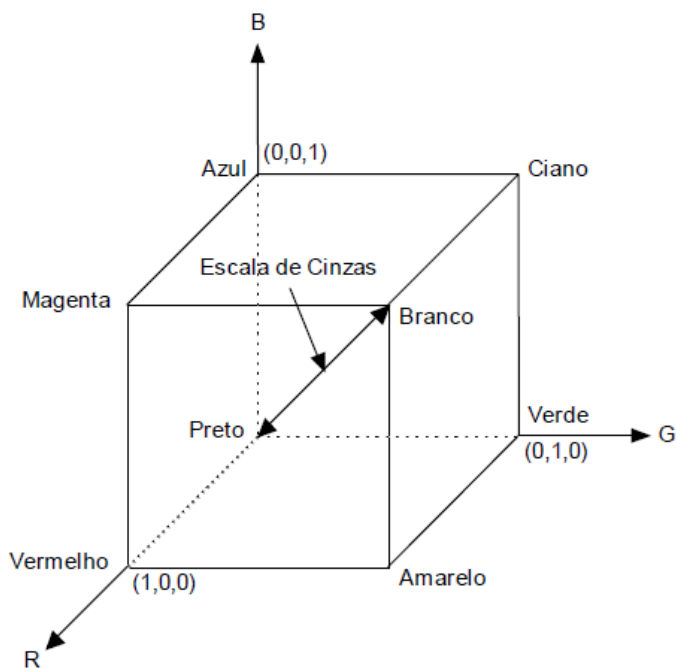


Figura 3 – Eixo de cores
Fonte: (FILHO; NETO, 1999)

2.3.1 MATLAB

“MATLAB® é a linguagem de alto nível e o ambiente interativo usado por milhões de engenheiros e cientistas do mundo inteiro. Ele permite que o usuário explore e visualize ideias e colabore entre disciplinas incluindo processamento de imagens e sinais, comunicações, sistemas de controle e finança computacional” (www.mathworks.com/products/MATLAB/).

O MATLAB é um sistema interativo cujo elemento básico de informação é uma matriz que não requer dimensionamento. Esse sistema permite a resolução de muitos problemas numéricos em apenas uma fração do tempo que se gastaria para escrever um programa semelhante em linguagem Fortran, Basic ou C. Além disso, as soluções dos problemas são expressas quase exatamente como elas são escritas matematicamente. O programa dispõe de diversas extensões (chamadas *toolboxes* ou *blocksets*). Uma das principais extensões é a de processamento de imagens e será a utilizada neste projeto (FILHO; NETO, 1999).

2.3.2 Aquisição da imagem

O primeiro passo para iniciar o processamento de determinada imagem é a aquisição desta. Esta etapa tem a função de converter uma imagem em uma representação numérica que pode ser processada digitalmente. Este bloco possui dois elementos principais: o dispositivo físico e o digitalizador. O primeiro é sensível a uma faixa de energia no espectro eletromagnético (como raio X, ultravioleta, espectro visível ou raios infravermelhos), e tem como resultado um sinal elétrico proporcional ao nível de energia detectado. O segundo converte o sinal elétrico adquirido pelo primeiro em informação digital, ou seja, a representação através de bits 0s e 1s. (FILHO; NETO, 1999).

Dentre os aspectos de projeto envolvidos nesta etapa pode-se mencionar: a escolha do tipo de sensor, as condições de iluminação da cena, os requisitos de velocidade de aquisição, a resolução e o número de níveis de cinza da imagem digitalizada, dentre outros (FILHO; NETO, 1999). A Figura 4 representa a aquisição da imagem por uma filmadora.

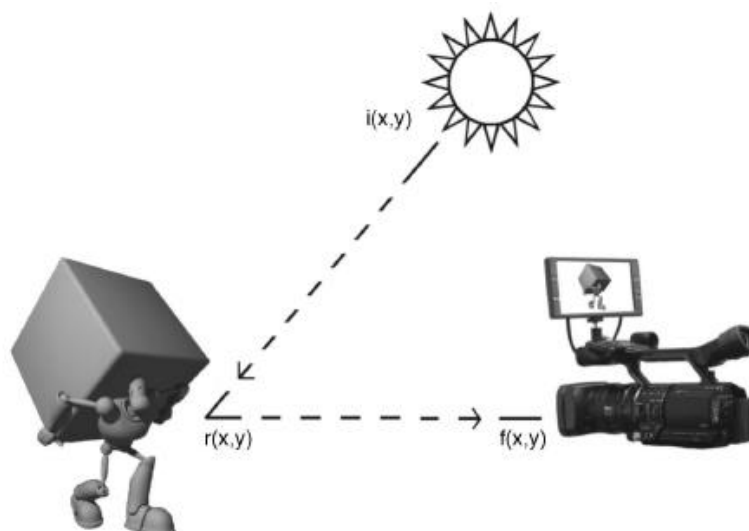


Figura 4 – Aquisição da imagem por uma filmadora.
Fonte: (PERES, 2010)

2.3.3 Processamento digital

O processamento digital de imagens vem, na realidade, do processamento de sinais. As imagens, como os sinais, são na realidade um suporte físico que carrega no seu interior uma determinada informação. Na Figura 5 uma imagem é representada no plano cartesiano como se cada *pixel* fosse um ponto. Essa informação pode estar associada a uma medida, ou pode estar associada a um nível cognitivo. Processar uma imagem consiste em transformá-la sucessivamente com o objetivo de extrair mais facilmente a informação nela presente (FILHO; NETO, 1999).

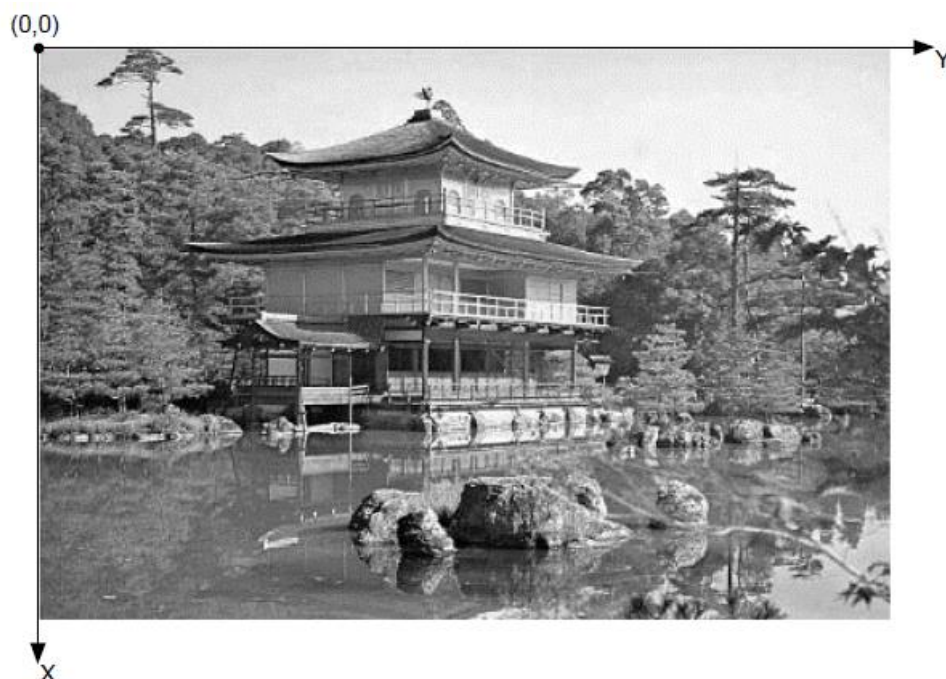


Figura 5 – Eixos x e y de uma imagem
Fonte: (FILHO; NETO, 1999)

Quando o sistema se restringe a sistemas experimentais, isto é, ele é orientado para a solução de um problema específico, a tarefa prática é de certa forma simplificada, pois podem ser controlados apenas os parâmetros de interesse. O objetivo, nesse caso, é desenvolver um sistema de tratamento da informação onde cada fase vai exigir métodos para retirar os parâmetros que exprimam a informação. Fica, assim, evidente que o processamento de imagens é bastante dependente do problema a ser resolvido e tem alta dependência na base de conhecimento (FILHO; NETO, 1999).

A análise quantitativa e a interpretação de imagens representam atualmente um ponto de apoio importante para diversas áreas. Tal é o caso, por exemplo, na ciência dos materiais e na medicina. Na realidade, a diversidade de aplicações do processamento de imagens, está associada diretamente à análise da informação. Quando observada pelo ponto de vista da ótica, uma imagem é um conjunto de pontos que convergem para formar um todo, mas podemos dizer de uma maneira mais ampla que uma imagem é o suporte para efetuarmos troca de informações (GONZALEZ; WOODS, 2002).

Os métodos recentes de exploração automática desta informação permitiram o desenvolvimento de técnicas complexas que podem ser globalmente classificadas

em duas grandes linhas. Uma associada a uma análise da informação e a outra às técnicas que permitem obter uma melhoria na imagem. Um sistema de processamento de imagens pode ser dividido em algumas etapas, sendo as principais: definição do problema, aquisição das imagens, pré-processamento, segmentação, extração das características e reconhecimento e interpretação. Todas elas com realimentação entre si e com a base de conhecimento, que faz com que cada etapa se adeque ao seu objetivo, como é mostrado na Figura 6 (FILHO; NETO, 1999).

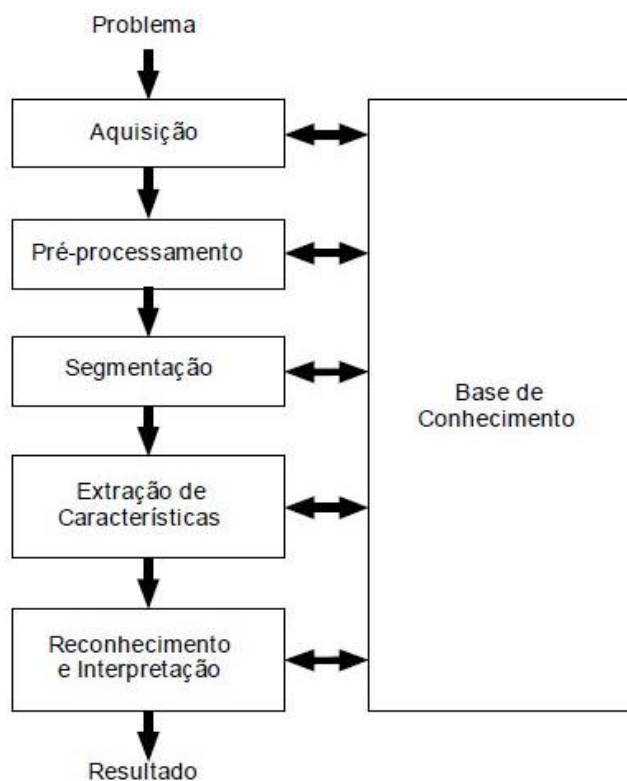


Figura 6 – Etapas do Processamento de Imagens.
Fonte: (FILHO; NETO, 1999)

2.3.4 Análise da imagem

A análise está relacionada à parte do tratamento onde existe uma descrição da informação presente na imagem. Esta parte é chamada de parametrização e é nela que várias medidas quantitativas são utilizadas para descrever diferentes informações dentro de uma imagem. Neste projeto puderam ser extraídas algumas informações importantes dos conjuntos de células, como: área de cada célula, intensidade de cor, entre outras.

2.3.5 Image Enhancement

O *Image Enhancement* atua na melhoria da qualidade de uma imagem, com o objetivo de posteriormente ser julgada por um observador humano. De maneira geral, trabalham em níveis de cinza na imagem, editando para colocar em contraste ou em evidência alguma região de interesse particular. Outras formas são: utilização de cores-falsas, realce de bordas, filtros espaciais, a correção de deformações espaciais devido à ótica ou variação (inomegeneidade) da iluminação do fundo. Para as imagens que serão utilizadas neste projeto, foi necessário detectar as bordas e alterar contraste e coloração das células, de modo a facilitar a contagem (FILHO; NETO, 1999). A Figura 7 mostra uma imagem antes e depois da detecção de bordas.

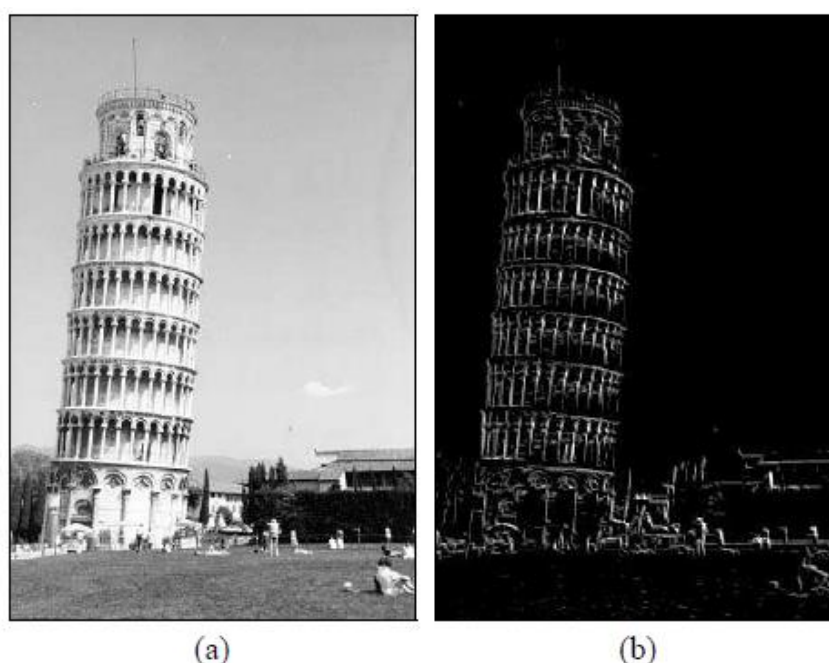


Figura 7 – Imagem original (a) e imagem com detecção de bordas (b)
Fonte: (FILHO; NETO, 1999)

2.3.6 Pré-Processamento

A imagem resultante do passo anterior pode apresentar diversas imperfeições, tais como: presença de *pixels* ruidosos, contraste e/ou brilho inadequado, caracteres interrompidos ou indevidamente conectados etc. A função da etapa de pré-processamento é aprimorar a qualidade da imagem para as etapas subsequentes. As operações efetuadas nesta etapa são ditas de baixo nível porque trabalham diretamente com os valores de intensidade dos *pixels*. Para tanto, foram utilizados operadores morfológicos de erosão e dilatação (FILHO; NETO, 1999).

A erosão de uma imagem binária de A por B, denotada por $A \ominus B$, é definida pela operação $A \ominus B = \{z \mid (B_z \subseteq A)\}$. Em outras palavras, é o conjunto de localizações do *pixel* z, onde o elemento de estruturação traduzido para o local z se sobrepõe apenas a pixels de primeiro plano em A (GONZALEZ; WOODS; EDDINS, 2004).

Já a dilatação binária é de A por B, denotada por $A \oplus B$, é definida pela operação $A \oplus B = \{z \mid (\hat{B})_z \cap A \neq \emptyset\}$, onde \hat{B} é a reflexão do elemento estruturante B. Ou seja, é o conjunto de localizações do *pixel* z, nas quais a reflexão do elemento estruturante se sobrepõe com pixels de primeiro plano em A, quando traduzido para z (GONZALEZ; WOODS; EDDINS, 2004).

Nessa etapa do projeto foram analisadas as células que estavam conectadas e os ruídos foram removidos, de modo a preparar as imagens para as próximas etapas.

2.3.7 Segmentação

A tarefa básica da etapa de segmentação é a de dividir uma imagem em suas unidades significativas, ou seja, nos objetos de interesse que a compõem. Esta tarefa, apesar de simples de descrever, é das mais difíceis de se implementar (FILHO; NETO, 1999). Nesta etapa será feita a separação das células entre as com coloração azul e as com coloração marrom, para posteriormente classificar os tons de marrom. A Figura 8 mostra uma imagem em tons de cinza (a), seu histograma de tons de cinza (b) e sua representação binária, em preto e branco (c).

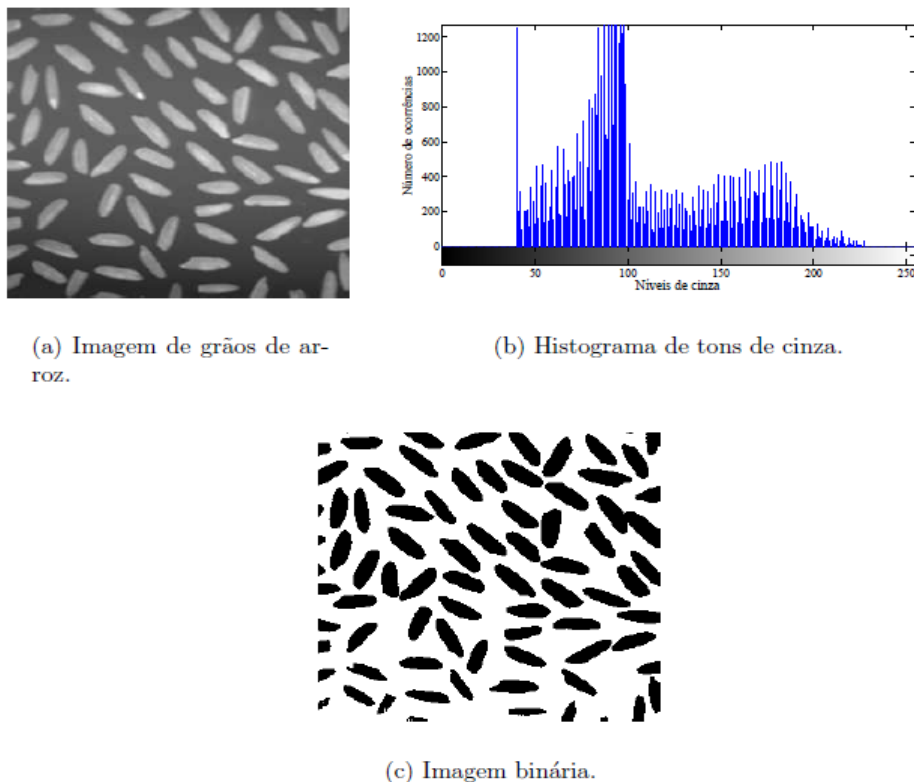


Figura 8 – Processo de segmentação: imagem em tons de cinza (a), histograma de tons de cinza (b) e imagem binária (c).

Fonte: (PERES, 2010)

2.3.8 Extração de Características

Esta etapa procura extrair características das imagens resultantes da segmentação através de descritores que permitam caracterizar com precisão cada área selecionada e que apresentem bom poder de discriminação entre elas. Estes descritores devem ser representados por uma estrutura de dados adequada ao algoritmo de reconhecimento. É importante observar que nesta etapa a entrada ainda é uma imagem, mas a saída é um conjunto de dados correspondentes àquela imagem (FILHO; NETO, 1999).

Para maior clareza, suponhamos que os descritores utilizados para descrever um caractere sejam as coordenadas normalizadas x e y de seu centro de gravidade e a razão entre sua altura e largura. Neste caso, um vetor de três elementos é uma estrutura de dados adequada para armazenar estas informações sobre cada dígito processado por esta etapa (FILHO; NETO, 1999).

2.3.9 Descritores

Um descritor de imagens pode ser definido como um par formado por um vetor de características extraídas e uma função de distância. O vetor de características representa um conjunto de propriedades de uma determinada imagem (cor, textura e forma, por exemplo), enquanto que a função de distância diz respeito a diferenças entre duas imagens, tendo como base características delas (TORRES; FALCÃO, 2006).

Os modelos propostos para a recuperação de imagens por conteúdo dependem inteiramente do processo de extração de características. É a partir deste processo que imagens são indexadas na base de dados. Para a tarefa de recuperação de imagens, geralmente, diversos descritores são combinados a fim de se aumentar a eficiência desta técnica (GONZALEZ; WOODS, 2002).

Quando se utiliza a cor como característica para a recuperação de imagens, o objetivo é utilizá-la para recuperar imagens que possuam uma composição de cor similar a imagens da base de dados, mesmo que elas sejam de contextos diferentes. A cor é uma das características mais utilizadas em sistema de recuperação de imagens baseados em conteúdo. Isso se deve por ela ser relativamente independente quanto ao tamanho, orientação e resolução de imagem e é computacionalmente menos cara quando comparada aos demais descritores (BENDER, 2003)(TORRES; FALCÃO, 2006).

Dois conceitos são importantes para o entendimento do conceito de percepção de cor. São eles: a luminância e a cromaticidade. A luminância contém a informação da quantidade das cores pretas e brancas presentes em uma imagem. O cérebro humano interpreta essa informação como a quantidade de cinza presente na cor. A cromaticidade informa a respeito da tonalidade de uma cor. É a frequência dominante do raio de luz. A combinação destes dois conceitos, em diferentes proporções, permite ao cérebro perceber o espectro de cores visível em uma determinada imagem ou cena (FILHO; NETO, 1999). Portanto, para a análise e contagem das células, a cor é a característica mais importante e será o foco do processamento das imagens.

2.3.10 Reconhecimento, Interpretação e Base de Conhecimento

Nesta última etapa do sistema, denominamos reconhecimento o processo de atribuição de um rótulo a um objeto baseado em suas características, traduzidas por seus descritores (FILHO; NETO, 1999). A tarefa de interpretação, por outro lado, consiste em atribuir significado a um conjunto de objetos reconhecidos. Por exemplo, o reconhecimento retorna as informações de intensidade de cor, localização de um pixel, área de uma célula. Já a interpretação transforma esses dados em soluções para o problema proposto, como a quantificação das células, identificação da faixa de valor da tonalidade da cor ou da quantidade de células marcadas.

Todas as tarefas das etapas descritas acima pressupõem a existência de um fundamento sobre o problema a ser resolvido, armazenado em uma base de conhecimento, cujo tamanho e complexidade podem variar enormemente. Para resolver o problema proposto, fazem-se necessárias noções acerca do câncer de mama, da histopatologia digital e do processamento das imagens. Com isso, foi possível determinar quais seriam as informações a serem obtidas de cada imagem de modo a solucionar o problema.

Idealmente, esta base de conhecimento deveria não somente guiar o funcionamento de cada etapa, mas também permitir a realimentação entre elas (GONZALEZ; WOODS, 2002). O saber sobre o tema a ser estudado permite que cada uma das etapas do processo seja aperfeiçoada, trazendo, assim, maior exatidão ao resultado e à solução final.

2.4 MATRIZ DE CONFUSÃO

Para validação do software foram utilizadas matrizes de confusão. É um tipo de tabela que permite a visualização dos resultados de um algoritmo de classificação. Cada coluna da matriz representa os casos de uma classe prevista, enquanto as linhas representam os casos da classe verdadeira, como na Tabela 1. Esse nome vem do fato de que ela torna mais simples a verificação de algumas métricas desejadas, conferindo se o algoritmo está confundindo duas classes (REVISTABW, 2015).

Tabela 1 – Matriz de Confusão

		PREDITO	
		Positivo	Negativo
VERDADEIRO	Positivo	Verdadeiro Positivo (VP)	Falso Negativo (FN)
	Negativo	Falso Positivo (FP)	Verdadeiro Negativo (VN)

Fonte: adaptado de ZHU, W.; ZENG, N.; WANG, N. NESUG, 2010

As métricas escolhidas para essa validação foram: acurácia, que é a proporção de predições corretas, sem levar em consideração o que é positivo e o que é negativo; sensibilidade, que representa a capacidade do sistema em prever corretamente a condição para os casos que realmente a têm, ou seja, proporção de verdadeiros positivos; especificidade, que define a capacidade do sistema em prever corretamente a ausência da condição para casos que realmente não a têm, ou seja, proporção de verdadeiros negativos; e eficiência, que é a média aritmética da sensibilidade e especificidade (KOHAVI; PROVOST, 1998)(ZHU; ZENG; WANG, 2010). As fórmulas de cada métrica que foram utilizadas estão representadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Métricas Estatísticas

Métrica	Fórmula
Acurácia	$Acur = \frac{Vp + Tn}{Vp + Vn + Fp + Fn}$
Sensibilidade	$Sens = \frac{Vp}{Vp + Fn}$
Especificidade	$Espec = \frac{Vn}{Vn + Fp}$
Eficiência	$Efic = \frac{Sens + Espec}{2}$
Erro	$Erro = \frac{Verdadeiro - Predito}{Verdadeiro}$
Concordância	$Conc = 1 - Erro$

Fonte: adaptado de ZHU, W.; ZENG, N.; WANG, N. NESUG, 2010

2.5 TRABALHOS RELACIONADOS

Várias são as metodologias que podem ser utilizadas para o processamento de imagens de lâminas histológicas e aquisição das características desejadas. Um dos principais objetivos da grande maioria dos projetos é a identificação e segmentação dos núcleos das células (DI CATALDO; FICARRA; MACII, 2012), porém há muitas maneiras de se realizar essa operação.

A abordagem mais simples para essa segmentação é um limiar global (OTSU, 1979), onde um único limite de intensidade foi usado para distinguir os núcleos das células do fundo da imagem. O valor desse limite pode ser manualmente ajustável ou ser determinado com base no histograma de imagem (KIM et al., 2006)(LONG; PENG; MYERS, 2007). O problema dessa técnica é que ela funciona razoavelmente bem para imagens com alto contraste, diferente da maioria dos tecidos de IHC, que têm grande variação nas características e na iluminação.

De maneira a produzir resultados melhores, são usadas técnicas de limiar locais adaptativas, que utilizam informações de conteúdo local para separar o plano de fundo do primeiro plano (DI CATALDO et al., 2010). Outras abordagens populares para detecção nuclear são algoritmos de inundação, como os *watersheds*, também chamados de Linhas Divisoras de Água (ROERDINK; MEIJSTER, 2000), que podem ser efetivamente usadas (MALPICA et al., 1997)(LANDINI; OTHMAN, 2003)(PINIDIYAARACHCHI; WÄHLBY, 2005)(CHENG; RAJAPAKSE, 2009). Porém, uma grande desvantagem dessas técnicas é que muitas vezes resultam em dupla segmentação e múltiplas linhas de *watershed*, especialmente na presença de textura ou manchas sem homogeneidade.

Outro método bastante comum para a segmentação é baseado em borda (por exemplo, Canny (CANNY, 1986)(FUCHS et al., 2008) e contornos ativos (ELMOATAZ et al., 1998)(GARRIDO; PÉREZ DE LA BLANCA, 2000)(DE SOLORZANO et al., 2001)(JACOB; BLU; UNSER, 2004)(MUKHERJEE; RAY; ACTON, 2004)(ZHANG; ZIMMER; OLIVO-MARIN, 2004)(YANG; MEER; FORAN, 2005)(CHENG; RAJAPAKSE, 2009). No entanto, essas abordagens sofrem devido a variações de intensidade tanto dentro quanto fora dos núcleos. O método de contornos ativos, em especial, é altamente afetado pelo ruído e pela presença de partículas estranhas, que podem desviar a curva inicial do limite alvo.

Outra categoria de técnicas são as baseadas em modelos geométricos ou em modelos fixos da morfologia do tecido, como em (GAVRIELIDES et al., 2008; NAIK et al., 2008). Essas técnicas sofrem uma generalização por causa das variações e a dificuldade de prever o tamanho das células. As abordagens alternativas incluem métodos de cortes de gráficos (AL-KOFAHI et al., 2011; BOYKOV; FUNKA-LEA, 2006) e campos aleatórios de Markov (LUCK et al., 2005) que, por outro lado, muitas vezes sofrem devido a sub-segmentação.

Os métodos de corte gráfico têm a desvantagem de exigir uma boa inicialização, portanto, são mais eficazes quando usados em combinação com outros métodos. Por exemplo, foi proposta uma abordagem híbrida onde a segmentação inicial é obtida com a bazonização baseada em multiplicação Laplaciana de filtragem Gaussiana e posteriormente refinada usando o algoritmo de cortes de gráficos (AL-KOFAHI et al., 2010).

Em suma, a segmentação nuclear ainda é uma tarefa desafiadora, de modo que uma única abordagem não é suficiente para obter resultados satisfatórios, não resolvendo o problema como um todo. Portanto, as técnicas de segmentação mais bem-sucedidas são uma combinação de várias abordagens, onde várias técnicas de segmentação são adaptadas às questões específicas das imagens IHC. A maioria das propostas aplicam binarização local ou adaptativa para distinguir os núcleos do fundo, técnicas melhoradas de divisões para separar núcleos agrupados e contornos ativos, cortes de gráficos ou pós-processamento morfológico extensivo para regularizar as formas e refinar os limites nucleares (AL-KOFAHI et al., 2010; DI CATALDO et al., 2010; MASMOUDI et al., 2009). No entanto, a intervenção manual do usuário ainda é necessária em muitos casos para configurar os parâmetros da segmentação ou para resolver os casos mais difíceis ou ambíguos.

3 METODOLOGIA

Inicialmente, como se tratava de um desenvolvimento de software, foram levantados e analisados os requisitos de projeto, de acordo com os objetivos da pesquisa, e foi decidido como seria feita a validação. Em seguida, o esquema do projeto (Figura 9) foi desenhado e a plataforma MATLAB, versão 2015, foi escolhida para o processamento das imagens.

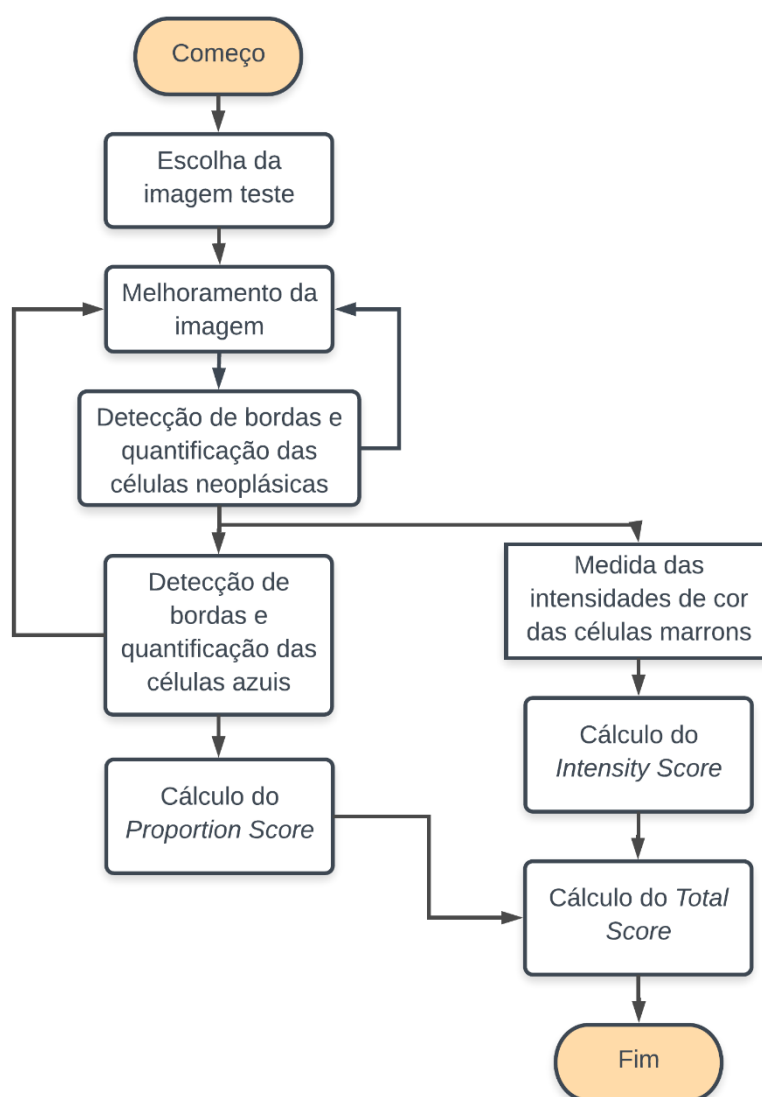


Figura 9 – Esquema do projeto.
Fonte: a autora, 2018.

A próxima etapa foi iniciar a implementação e o procedimento escolhido para este estudo. Foi feita escolha de uma imagem teste de corte histológico contendo células neoplásicas de mama. Essa imagem foi usada para aplicar os passos do processamento digital de imagens. Ao final do desenvolvimento, o algoritmo foi

testado com três imagens oficiais, cedidas pela empresa © Agilent Technologies, Inc., através de um documento de consentimento. Uma dessas imagens está representada na Figura 10. Cada uma das três imagens foi dividida em seis partes iguais, gerando um total de 18 imagens. Essa divisão foi feita de modo a diminuir o tamanho das imagens, reduzindo o número de células em cada uma, e diminuir o tempo de processamento pelo software.

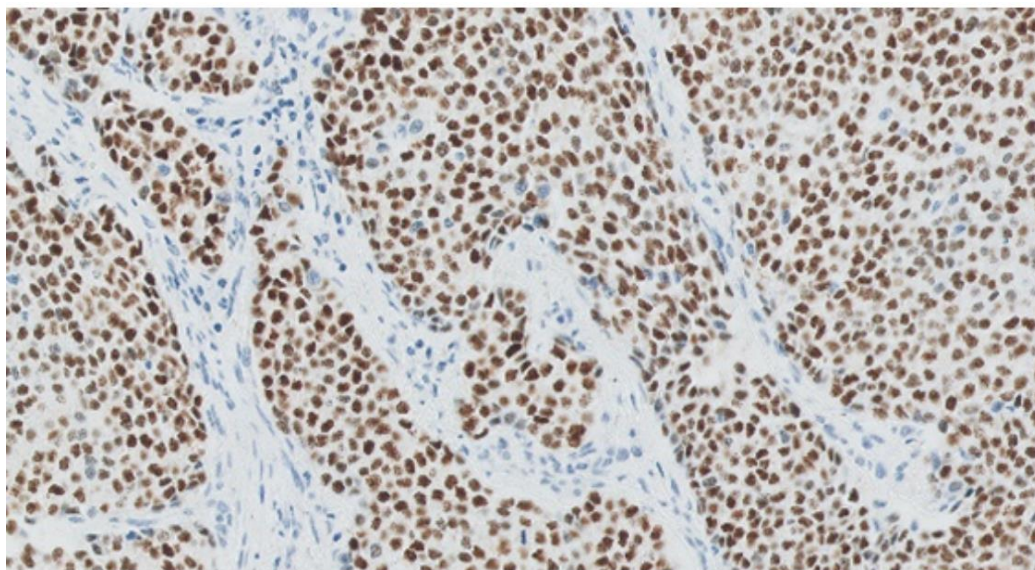


Figura 10 – Exemplo de imagem oficial cedida pela Agilent
Fonte: © Agilent Technologies, Inc. 2018

Reproduced with Permission, Courtesy of Agilent Technologies, Inc.

Este capítulo apresenta as fases aplicadas a cada imagem: classificação das células segundo quantidade, classificação segundo intensidade de cor e validação. Os passos foram seguidos de acordo com a Figura 11.

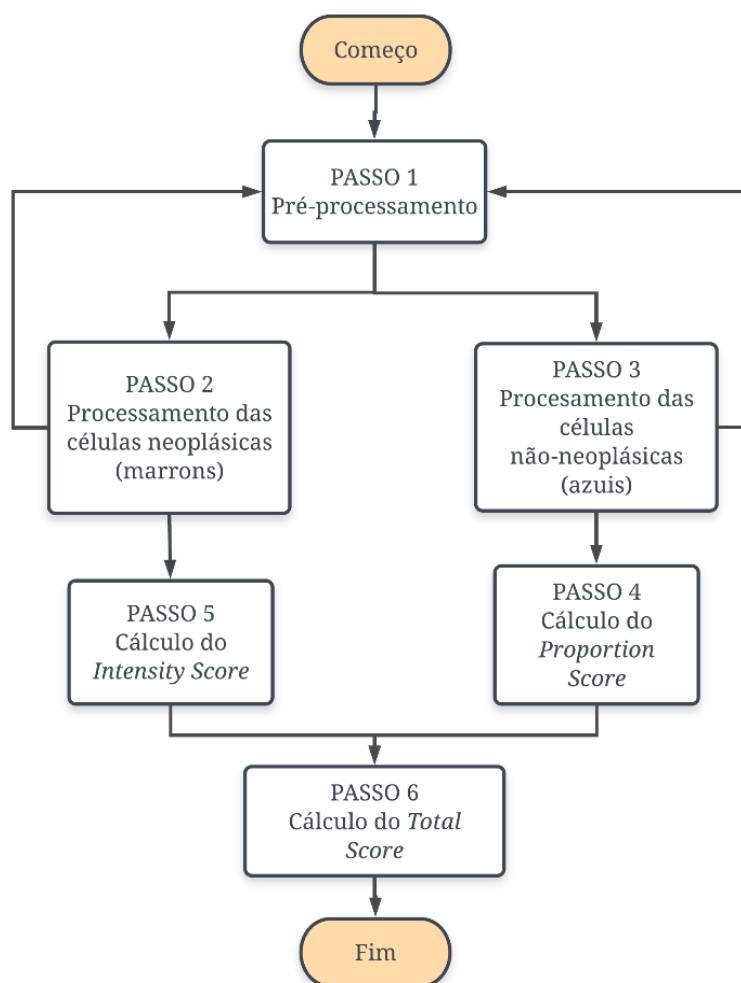


Figura 11 – Passos do projeto.
Fonte: a autora, 2018.

3.1 PASSO 1: PRÉ-PROCESSAMENTO

Uma vez que a imagem teste foi escolhida, a primeira preocupação foi a identificação dos núcleos das células neoplásicas, que contêm pigmentação marrom, devido ao processo histopatológico. Antes da aplicação de processamento nas imagens, foi identificada a necessidade de um pré-processamento da imagem para melhorá-la, portanto o contraste dela foi aumentado, deixando os *pixels* claros mais claros e os escuros mais escuros através de um limiar.

Em seguida, a imagem RGB foi transformada em binária através de uma máscara de segmentação criada para detectar as células de interesse. Esta máscara foi criada no espaço de cor HSV com os limiares, definidos manualmente, seguintes: H entre 0,954 e 0,066; S de 0 a 1 e V de 0,078 até 0,801.

Uma vez que houve a binarização, as bordas dos objetos foram traçadas e os objetos menores que 50 *pixels*, que constituíam ruído, foram removidos. Além disso, foram preenchidos os buracos das regiões de interesse.

No entanto, percebeu-se que alguns núcleos estavam muito próximos e pareciam estar conectados uns aos outros, sendo identificados como se fossem um núcleo apenas quando as bordas eram detectadas. Para tanto, o próximo passo foi responsável por resolver tal problema.

3.2 PASSO 2: PROCESSAMENTO DAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS (MARRONS)

Para resolver o problema da conexão entre células próximas foi utilizado um filtro que removeu boa parte do ruído e as partes conectadas desses núcleos, baseado em operações de morfologia matemática. Para a aplicação deste filtro, dois elementos estruturantes morfológicos planos foram criados em formato de linha, com o ângulo (medido em graus) a partir do eixo horizontal da linha, no sentido anti-horário, em 90 graus e 0 graus. A distância entre os centros dos membros do elemento de estruturação até as extremidades opostas da linha era 5 e 3, respectivamente. Ambos os elementos foram usados para fazer duas dilatações. Depois disso, outro elemento estruturante foi criado em formato arbitrário, em seguida, duas erosões foram feitas. Após a filtragem, a função de detecção de borda foi novamente aplicada, obtendo-se um resultado significativamente melhor. No entanto foi observado que ainda restaram conexões entre células, tornando esse ponto uma limitação do projeto, a ser superada em trabalhos futuros.

Com as bordas desenhadas, a área de cada região foi calculada, em *pixels*. Definiu-se experimentalmente que áreas inferiores a 50 *pixels* eram ruídos que não haviam sido removidos, portanto, elas foram ignoradas no cálculo. A quantificação dos núcleos foi definida então como sendo o somatório da área de todas as células detectadas com área superior a 50 *pixels*, dividido pela mediana dessas áreas.

3.3 PASSO 3: PROCESSAMENTO DAS CÉLULAS NÃO-NEOPLÁSICAS (AZUIS)

O próximo passo foi a identificação dos núcleos das células não neoplásicas, ou seja, as células que possuem coloração azul. Para tanto, a imagem original e a máscara anteriormente criada foram sobrepostas e a imagem RGB foi transformada

em binária através de um limiar de intensidade de cor definido manualmente, variando-se os valores cinco unidades a cada vez, até que todas as ROI fossem selecionadas.

Nesta etapa também houve o problema da interconexão dos núcleos, visto que as imagens são cortes histológicos. Esse problema foi amenizado com as seguintes melhorias na imagem binária: objetos menores foram removidos; supressão das estruturas que são mais claras do que o seu entorno e que estão conectadas à borda da imagem; erosão seguida de dilatação. A quantificação destas células foi definida como sendo o somatório da área de todas as células, dividido pela média das áreas.

3.4 PASSO 4: CLASSIFICAÇÃO QUANTITATIVA – *PROPORTION SCORE* (PS)

Com a quantificação das células marrons e azuis, é possível implementar a pontuação de proporção (em inglês, *Proportion Score* - PS) de acordo com a Escala de Allred, como sendo a razão entre células neoplásicas e total de células no corte histoquímico.

3.5 PASSO 5: CLASSIFICAÇÃO DAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS QUANTO À INTENSIDADE DE COR – *INTENSITY SCORE* (IS)

Uma vez que as células da região de interesse estavam identificadas, a próxima etapa foi a classificação dessas células quanto à intensidade de cor (em inglês, *Intensity Score* ou IS), seguindo a Escala de Allred. Essa classificação varia entre fraco, médio e forte.

Assim, calculou-se a média de todos os valores de intensidade e mediu-se o valor de cada pixel nas regiões. Foram definidas três faixas de valores relativos à intensidade da cor, lembrando que, em uma imagem 8 bits, em escala de cinza, o valor dos pixels varia de 0 (preto) a 255 (branco). Para a definição das faixas, foi necessária a criação de dois valores limites entre elas. Primeiramente foi encontrado o valor máximo por meio do vetor das intensidades médias. A partir dele, as faixas foram: (a) fraco - para valores superiores a dois terços do valor máximo, (b) médio - para valores entre dois terços e um terço do valor máximo e (c) forte - para valores abaixo de dois terços do valor máximo.

Como resultado, o nível de IS de cada célula pode ser determinado separadamente, assim como o nível de intensidade da imagem como um todo. Para

cada célula o valor médio dela foi comparado aos limites estabelecidos e a sua respectiva faixa foi definida. Já para a imagem como um todo, foi obtida a média de todas as intensidades, e esse valor foi utilizado para decidir em que faixa de intensidade a imagem se encontra.

3.6 PASSO 6: CÁLCULO DA PONTUAÇÃO TOTAL – *TOTAL SCORE* (TS)

Uma vez que ambos os escores foram encontrados (PS e IS), a pontuação total (em inglês, *Total Score* ou TS) refere-se à soma de PS e IS.

3.7 PASSO 7: VALIDAÇÃO

A fase final do projeto foi a validação do software, para a qual foram escolhidos três patologistas especialistas, que receberam as imagens. Na imagem teste foram marcadas as células individualmente e feita a classificação. Já para as imagens oficiais, foram fornecidos os valores das pontuações, segundo a Escala de Allred. Essas marcações e pontuações foram, então, enviadas à pesquisadora, que as comparou às marcações feitas pelo software, tomando como base a imagem de cada profissional. Os resultados foram então aplicados em uma matriz de confusão para determinar as características de cada uma das análises. Já para os resultados das pontuações, foi feita uma média simples de cada patologista para cada imagem e o erro simples foi calculado.

Em seguida, foram calculadas as seguintes métricas para a imagem teste: acurácia, sensibilidade, especificidade e eficiência.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

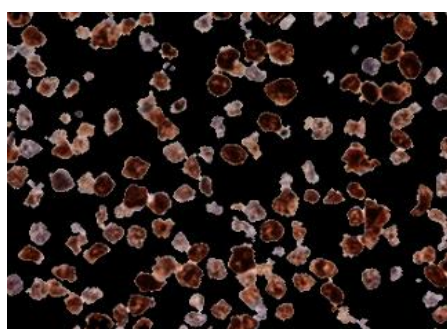
Os resultados são apresentados neste capítulo seguindo os passos da metodologia, portanto são divididos em três etapas: classificação quanto à proporção numérica, classificação quanto à intensidade de cor e validação.

4.1 PASSO 1 – PRÉ-PROCESSAMENTO

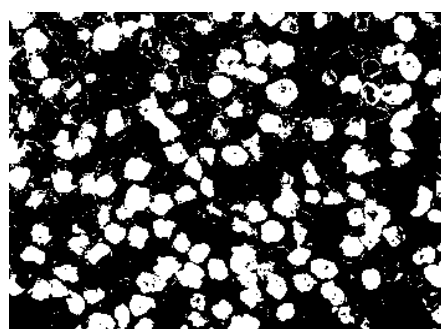
Inicialmente, após a escolha da imagem teste, percebeu-se a necessidade de um pré-processamento para melhorar a qualidade e evidenciar as características de interesse da imagem. Sendo assim, o contraste da imagem foi aumentado.

O próximo passo foi proporcionar a detecção das bordas das células. Na sequência também foi necessário, para a aplicação da função de detecção de bordas, a criação de uma máscara de segmentação, que foi multiplicada pela imagem original (Figura 12(a)), para transformar a imagem RGB em uma binária (Figura 12(b)).

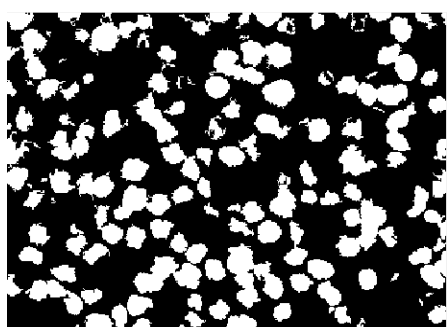
Com a aplicação da máscara criada, houve a necessidade da remoção de ruídos e melhoramento para a próxima etapa. Alguns dos passos do pré-processamento, podem ser observados na Figura 12, mostrando a remoção dos objetos menores e o preenchimento dos buracos das regiões de (Figura 12(c)).



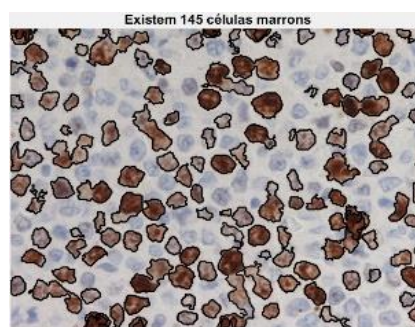
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 12 – Processamento das células marrons: (a) Imagem original multiplicada pela máscara, (b) Imagem binária, representando as células marrons. (c) Imagem binária após o pré-processamento, (d) Detecção das bordas e quantificação das células marrons.

Fonte: a autora, 2018

4.2 PASSO 2: PROCESSAMENTO DAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS

Em seguida, foi feita a remoção da interconexão das células neoplásicas, com um filtro baseado em operações morfométricas de erosão e dilatação para remover o ruído restante e as partes conectadas desses núcleos. Simultaneamente, foram quantificadas as células coloradas em marrom, como sendo o somatório da área de todas as células com área superior a 50 *pixels*, dividido pela mediana dessas áreas. A Fig. 3(d) apresenta a detecção de bordas e a quantificação das células após o uso do filtro.

4.3 PASSO 3: PROCESSAMENTO DAS CÉLULAS NÃO-NEOPLÁSICAS (AZUIS)

Logo após, foram identificados o núcleo das células azuis, não neoplásicas. Primeiramente, a imagem original e a máscara foram sobrepostas (Figura 13(a)). Já para traçar as bordas, com o limite de intensidade de cor definido, transformou-se a imagem RGB resultante da fusão em uma imagem binária (Figura 13(b)).

Nesta etapa houve, também, o problema da interconexão dos núcleos, o qual foi amenizado com a remoção dos objetos menores. (Figura 13(c)). Na sequência, a supressão das estruturas que são mais claras, conectadas à borda da imagem; e por fim foi realizada uma erosão seguida de uma dilatação. A Figura 13 ilustra esse processamento completo realizado nas células azuis (não-neoplásicas).

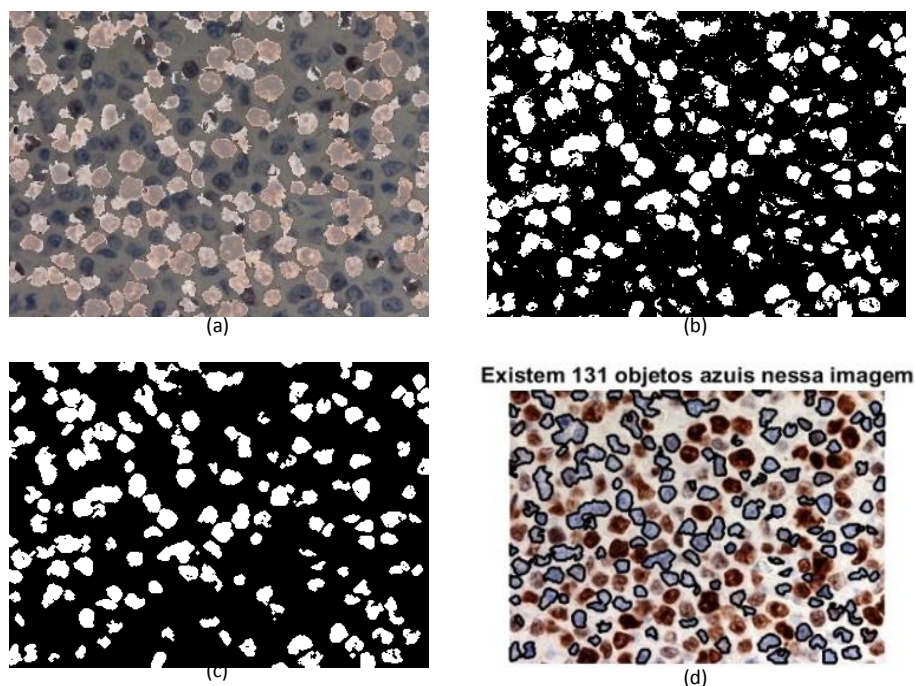


Figura 13 – Processamento das células azuis: (a) Imagem original sobreposta com a máscara, (b) Imagem binária, representando as células azuis. (c) Imagem binária após o pré-processamento, (d) Detecção das bordas e quantificação das células azuis.

Fonte: a autora, 2018

4.4 PASSO 4: CLASSIFICAÇÃO QUANTITATIVA – *PROPORTION SCORE* (PS)

Já a quantificação dos núcleos foi definida como sendo o somatório da área de todas as células azuis, dividido pela média das áreas. Com a quantidade de ambas as cores de células (azuis e marrons) a razão entre as células neoplásicas e a quantificação total de células foi calculada e a pontuação de proporção definida.

4.5 PASSO 5: CLASSIFICAÇÃO DAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS QUANTO À INTENSIDADE DE COR – *INTENSITY SCORE* (IS)

A próxima etapa dessa pesquisa foi a classificação dos núcleos neoplásicos quanto à intensidade de cor (IS), seguindo a Escala de Allred, a qual varia entre fraco, médio e forte.

Com os valores de intensidade de cada pixel, assim como as médias de cada região, foram criados dois limites entre as três faixas de classificação. O valor máximo

entre as médias foi escolhido como base para os limites, sendo o limite entre fraco e médio dois terços do valor máximo e o limite entre médio e forte um terço do máximo.

Desta forma, comparou-se o valor médio de intensidade de cada célula separadamente aos limites e as faixas foram definidas. Já para a imagem toda, a média de todas as intensidades foi calculada e a intensidade de cor (Intensity Score - IS) definido.

4.6 PASSO 6: CÁLCULO DA PONTUAÇÃO TOTAL – *TOTAL SCORE* (TS)

Essa etapa apresenta todas as pontuações obtidas, ou seja, uma vez que já foi obtida a pontuação de proporção (*Proportion Score* - PS) e a intensidade de cor (*Intensity Score* - IS), a soma PS e IS corresponde a pontuação total (em inglês, *Total Score* ou TS).

Para ilustrar, a ferramenta desenvolvida apresenta a mensagem mostrada na Figura 14, informando as três pontuações.

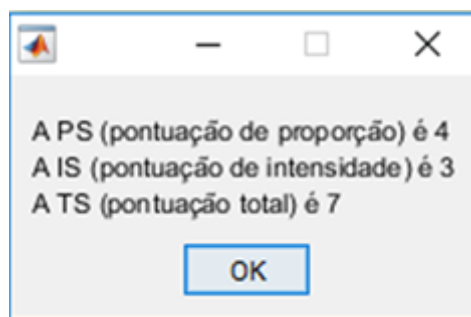


Figura 14 – Mensagem para o usuário com os valores de cada pontuação
Fonte: a autora, 2018

4.7 VALIDAÇÃO

Os resultados das métricas de validação calculados para a imagem teste podem ser encontrados nas Tabelas 3, 4 e 5 abaixo. Os valores verdadeiros são os dos especialistas e os preditos são do software. Cada tabela contém os dados de acurácia, sensibilidade, especificidade e eficiência para um dos especialistas. Foi percebido que os especialistas 2 e 3 marcaram menor quantidade de células que o especialista 1. Os valores para estes dois especialistas foram iguais, porém as células marcadas não foram todas as mesmas. Essa diferença da análise entre os próprios

especialistas mostra a subjetividade do processo utilizado analiticamente e prova a necessidade de um método mais objetivo.

Tabela 3 – Avaliação do Especialista 1

Especialista 1		PREDITO	
		Positivo	Negativo
VERDADEIRO	Positivo	140	5
	Negativo	8	112
		Acurácia	95,1%
		Sensibilidade	96,6%
		Especificidade	93,3%
		Eficiência	94,9%

Fonte: a autora, 2018

Tabela 4 – Avaliação do Especialista 2

Especialista 2		PREDITO	
		Positivo	Negativo
VERDADEIRO	Positivo	91	0
	Negativo	57	117
		Acurácia	78,5%
		Sensibilidade	100%
		Especificidade	67,2%
		Eficiência	83,6%

Fonte: a autora, 2018

Tabela 5 – Avaliação do Especialista 3

Especialista 3		PREDITO	
		Positivo	Negativo
VERDADEIRO	Positivo	91	0
	Negativo	57	117
		Acurácia	78,5%
		Sensibilidade	100%
		Especificidade	67,2%
		Eficiência	83,6%

Fonte: a autora, 2018

Em relação à acurácia, os valores foram 95,1%, 78,5% e 78,5%. Essa métrica representa a proporção de células marcadas corretamente, independentemente de

serem positivas ou negativas. Esta medida é altamente suscetível a desbalanceamentos do conjunto de dados e pode facilmente induzir a uma conclusão errada sobre o desempenho do sistema, gerando falsos positivos. O primeiro especialista, por exemplo, marcou mais células como sendo positivas, fazendo o número de falsos positivos ser menor. Portanto a acurácia, neste caso, foi maior, uma vez que a sensibilidade para células fracamente coloradas do software é relativamente alta. Já os dois outros especialistas marcaram menor quantidade de células, entrando em desacordo com o primeiro especialista e a avaliação computacional, que identificaram mais regiões, e obtendo uma acurácia menor.

Já a sensibilidade teve valores de 96,6%, 100% e 100%. Como ela identifica a proporção de verdadeiros positivos, para os especialistas 2 e 3 houve um total de 100% das células marcadas como positivas sendo identificadas. Já para o especialista 1, o valor da sensibilidade foi levemente menor, uma vez que haviam mais células positivas marcadas e não foram todas identificadas pelo software.

A próxima métrica foi a especificidade, que apresentou valores de 93,3%, 67,2% e 67,2%. Ela representa a proporção de verdadeiros negativos e, uma vez que houve menos células positivas para os especialistas 2 e 3, a especificidade para ambos foi, aproximadamente, 25 pontos percentuais menor que a especificidade para o especialista 1.

Da mesma forma, foram encontrados os valores de eficiência, os quais foram 94,9%, 83,6% e 83,6%. Ela é a média aritmética da sensibilidade e especificidade, e, na prática, a sensibilidade e a especificidade variam em direções opostas. Isto é, geralmente, quando um método é muito sensível a positivos, tende a gerar muitos falso-positivos, e vice-versa. Como o sistema desenvolvido possui uma sensibilidade alta a positivos, a eficiência é maior para o especialista que identificou mais células positivas e menor para os que marcaram menor quantidade de células, situação em que o número de falsos-positivos foi mais alto.

Posteriormente foram analisadas as imagens oficiais e suas pontuações. Os resultados estão na Tabela 6. Cada imagem tem sua pontuação, separada por especialista, sua média total, a análise do software e o erro percentual em relação à pontuação total. O erro máximo foi de 23% e o médio foi de 4,28%, obtendo-se, assim, uma concordância de 95,7%.

Tabela 6 – PS, IS e TS da Escala de Allred para cada imagem, segundo cada especialista

IMAGEM	ESPEC 1			ESPEC 2			ESPEC 3			MEDIA	SOFTWARE			ERRO
	PS	IS	TS	PS	IS	TS	PS	IS	TS		PS	IS	TS	
1	4	3	7	4	3	7	4	3	7	7	4	3	7	0,00%
2	4	3	7	4	3	7	4	3	7	7	4	2	6	14,29%
3	4	3	7	4	3	7	4	3	7	7	4	3	7	0,00%
4	4	2	6	4	2	6	4	2	6	6	4	2	6	0,00%
5	4	2	6	4	2	6	4	2	6	6	4	2	6	0,00%
6	4	3	7	4	3	7	4	3	7	7	4	3	7	0,00%
7	4	3	7	4	3	7	4	3	7	7	4	3	7	0,00%
8	4	2	6	3	2	5	3	2	5	5,333	4	2	6	12,50%
9	4	2	6	4	2	6	3	2	5	5,667	4	3	7	23,53%
10	4	3	7	4	2	6	4	2	6	6,333	4	2	6	5,26%
11	4	3	7	4	3	7	4	3	7	7	4	3	7	0,00%
12	4	3	7	4	3	7	4	3	7	7	4	3	7	0,00%
13	4	2	6	4	2	6	4	2	6	6	4	2	6	0,00%
14	4	2	6	4	3	7	4	2	6	6,333	3	3	6	5,26%
15	4	3	7	4	3	7	4	3	7	7	3	3	6	14,29%
16	4	3	7	4	3	7	4	3	7	7	4	3	7	0,00%
17	4	3	7	4	3	7	4	3	7	7	4	3	7	0,00%
18	4	3	7	4	3	7	4	3	7	7	4	3	7	0,00%
TESTE	3	2	5	3	2	5	3	3	6	5,333	3	2	5	6,25%

Fonte: a autora, 2018

Outros pesquisadores também fizeram a comparação entre a análise visual de especialistas e a de softwares de processamento de imagens. Com o uso de uma abordagem envolvendo *superpixels*, Akbar et al. encontrou concordância entre 84% e 86% (AKBAR et al., 2015). Já Krecsák et al. encontrou 85% de concordância na validação de um software sem automatizado (KRECSÁK et al., 2011). Por outro lado, o software *InScape*, quando testado por *Quest Diagnostics*, mostrou concordância entre 92% e 98% para o PS e entre 64% e 86% para o IS (QUEST DIAGNOSTICS INCORPORATED, 2012).

Em suma, o software desenvolvido neste trabalho obteve valores satisfatórios, com concordância de 95,7% com os especialistas e alta sensibilidade a positivos, provando-se uma solução automatizada apropriada e de baixo custo.

5 CONCLUSÃO

A metodologia apresentada neste trabalho obteve valores satisfatórios para todas as métricas desejadas. O software é capaz de processar imagens histológicas de câncer de mama de forma automatizada, identificando a pontuação de cada uma, segundo a Escala de Allred.

Isso possibilita uma solução tecnológica para automação desta análise de baixo custo, se comparado com as novas abordagens tecnológicas com tecnologia automatizada embutida (a maioria deles ainda sob patente, que não estão sendo publicados atualmente), para aplicabilidade no ambiente da patologia digital, podendo promover acesso a esta metodologia às pessoas tratadas no Sistema Único de Saúde (SUS), com avaliações mais detalhadas e com menor grau de subjetividade e, portanto, menor possibilidade de erros analíticos.

Mesmo com resultados obtidos de maneira satisfatória, algumas melhorias são necessárias, visando a melhor identificação das células. Faz-se necessário, portanto, um estudo mais aprofundado de métodos para separação das células interconectadas, o que tornaria o estudo ainda mais objetivo, com a quantificação dos núcleos mais precisa. Além disso, caso o sistema torne-se um produto, será preciso desenvolver uma plataforma para interação do usuário com a ferramenta de maneira simples.

REFERÊNCIAS

- AKBAR, S. et al. Comparing computer-generated and pathologist-generated tumour segmentations for immunohistochemical scoring of breast tissue microarrays. **British Journal of Cancer**, 2015.
- AL-KOFAHI, Y. et al. Improved automatic detection and segmentation of cell nuclei in histopathology images. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 57, n. 4, p. 841–852, 2010.
- AL-KOFAHI, Y. et al. Cell-based quantification of molecular biomarkers in histopathology specimens. **Histopathology**, v. 59, n. 1, p. 40–54, 2011.
- ALLRED, D. C. et al. Allred - Prognostic and Predictive Factors in Breast Cancer by Immunohistochemical Analysis.pdf. **Mod Pathol**, v. 11, n. 2, p. 155–168, 1998.
- APERIO TECHNOLOGIES, I. **510(k) Summary of Substantial Equivalence Aperio Technologies, Inc. (ScanScope® XT System)**, 2007.
- ARAVELO, J.; CRUZ-ROA, A.; GONZALEZ O, F. A. Histopathology image representation for automatic analysis: a state-of-the-art review. **Rev. Fac. Med. Bogotá**, v. 22, n. 2, p. 79–91, 2014.
- AZEVEDO E SILVA, G. et al. Acesso à detecção precoce do câncer de mama no Sistema Único de Saúde: uma análise a partir dos dados do Sistema de Informações em Saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, n. 7, p. 1537–1550, 2014.
- BENDER, T. C. **Classificação e Recuperação de Imagens por Cor Utilizando Técnicas de Inteligência Artificial**. [s.l.] UNISINOS, 2003.
- BOLTON, K. L. et al. Assessment of Automated Image Analysis of Breast Cancer Tissue Microarrays for Epidemiologic Studies. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 19, n. 4, p. 992–999, 2010.
- BOYKOV, Y.; FUNKA-LEA, G. Graph cuts and efficient N-D image segmentation. **International Journal of Computer Vision**, v. 70, n. 2, p. 109–131, 2006.
- BUITRAGO, F.; UEMURA, G.; SENA, M. C. F. Fatores Prognósticos em câncer de mama. **Comunicação em Ciências da Saúde**, v. 22, n. Suplemento especial 1, p. S69-s82, 2011.
- CANNY, J. A Computational Approach to Edge Detection. **IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence**, v. PAMI-8, n. 6, p. 679–698, 1986.
- CARVALHO, S. M. T. **Avaliação de fatores prognósticos em tumores de mama nos estádios IIA e IIIB e sua correlação com sobrevida**. [s.l.: s.n.].
- CHENG, J.; RAJAPAKSE, J. C. Segmentation of clustered nuclei with shape markers and marking function. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 56, n. 3, p. 741–748, 2009.
- COHEN, D. A. et al. Interobserver agreement among pathologists for semiquantitative hormone receptor scoring in breast carcinoma. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 138, p. 796–802, 2012.

DE ABREU, E.; KOIFMAN, S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 1, p. 113–131, 2002.

DE SOLORZANO, C. O. et al. Segmentation of nuclei and cells using membrane related protein markers. **Journal of microscopy**, v. 201, n. Pt 3, p. 404–415, 2001.

DHINGRA, K.; HORTOBAGYI, G. N. Critical evaluation of prognostic factors. **Seminars in oncology**, v. 23, n. 4, p. 436–45, ago. 1996.

DI CATALDO, S. et al. Automated segmentation of tissue images for computerized IHC analysis. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 100, n. 1, p. 1–15, 2010.

DI CATALDO, S.; FICARRA, E.; MACII, E. Computer-aided techniques for chromogenic immunohistochemistry: Status and directions. **Computers in Biology and Medicine**, v. 42, n. 10, p. 1012–1025, 2012.

DUFFY, M. J. et al. Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). **European Journal of Cancer**, v. 75, p. 284–298, 2017.

EBCTCG. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: Patient-level meta-analysis of randomised trials. **The Lancet**, v. 378, n. 9793, p. 771–784, 2011.

ELMOATAZ, A. et al. Using active contours and mathematical morphology tools for quantification of immunohistochemical images. **Signal Processing**, v. 71, n. 2, p. 215–226, 1998.

FARIA, D. **Análise e Processamento de Imagem**, 2010.

FAYER, V. A. et al. Sobrevida de dez anos e fatores prognósticos para o câncer de mama na região Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 19, n. 194, p. 766–778, 2016.

FILHO, O. M.; NETO, H. V. **Processamento Digital de Imagens**. [s.l: s.n.].

FILHO, V. W.; MONCAU, J. E. Mortalidade por câncer no Brasil 1980-1995: padrões regionais e tendências temporais. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 48, n. 3, p. 250–257, 2002.

FUCHS, T. J. et al. Weakly Supervised Cell Nuclei Detection and Segmentation on Tissue Microarrays of Renal Clear Cell Carcinoma. **Pattern Recognition**, p. 173–182, 2008.

GANDOMKAR, Z.; BRENNAN, P.; MELLO-THOMS, C. Computer-based image analysis in breast pathology. **Journal of Pathology Informatics**, v. 7, n. 1, p. 43, 2016.

GARRIDO, A.; PÉREZ DE LA BLANCA, N. Applying deformable templates for cell image segmentation. **Pattern Recognition**, v. 33, n. 5, p. 821–832, 2000.

GAVRIELIDES, M. A. et al. Automated Evaluation of Her-2 / Neu Immunohistochemical Expression. p. 808–811, 2008.

- GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. **Digital image processing**. [s.l: s.n.]. v. 14
- GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E.; EDDINS, S. L. **Digital Image Processing Using MATLAB***Annals of Physics*, 2004.
- HAMMOND, M. E. H. et al. American society of clinical oncology/college of American pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 134, n. 7, p. 2784–2795, 2010.
- HARVEY, J. M. et al. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 17, n. 5, p. 1474–81, maio 1999.
- HILL, D. A. et al. Estrogen receptor quantitative measures and breast cancer survival. **Breast cancer research and treatment**, v. 166, n. 3, p. 855–864, dez. 2017.
- INCA. **Estimativa 2018-Incidência de câncer no Brasil**Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2017.
- JACOB, M.; BLU, T.; UNSER, M. Efficient energies and algorithms for parametric snakes. **IEEE Transactions on Image Processing**, v. 13, n. 9, p. 1231–1244, 2004.
- JALOTE, P. **A Concise Introduction to Software Engineering**Managing, 2008.
- KIM, Y. J. et al. Automated nuclear segmentation in the determination of the Ki-67 labeling index in meningiomas. **Clinical Neuropathology**, v. 25, n. 2, p. 67–73, 2006.
- KOHAVI, R.; PROVOST, F. Glossary of terms: Special issue on applications of machine learning and the knowledge discovery process. **Machine Learning**, v. 30, p. 271–274, 1998.
- KRECSÁK, L. et al. Technical note on the validation of a semi-automated image analysis software application for estrogen and progesterone receptor detection in breast cancer. **Diagnostic pathology**, 2011.
- LANDINI, G.; OTHMAN, I. E. Estimation of tissue layer level by sequential morphological reconstruction. **Journal of Microscopy**, v. 209, n. 2, p. 118–125, 2003.
- LEHR, H. A. et al. Application of Photoshop-based Image Analysis to Quantification of Hormone Receptor Expression in Breast Cancer. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 45, n. 11, p. 1559–1566, 1997.
- LONG, F.; PENG, H.; MYERS, E. Automatic segmentation of nuclei in 3D microscopy images of celegans. **2007 4th IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro - Proceedings**, p. 536–539, 2007.
- LUCK, B. L. et al. An image model and segmentation algorithm for reflectance confocal images of in vivo cervical tissue. **IEEE Transactions on Image Processing**, v. 14, n. 9, p. 1265–1276, 2005.

MA, H. et al. Reproductive factors and breast cancer risk according to joint estrogen and progesterone receptor status: a meta-analysis of epidemiological studies. **Breast Cancer Research**, v. 8, n. 4, p. 1–11, 2006.

MAKKINK-NOMBRADO, S. V et al. Quantitative immunohistochemistry using the CAS 200/486 image analysis system in invasive breast carcinoma: a reproducibility study. **Analytical cellular pathology : the journal of the European Society for Analytical Cellular Pathology**, v. 8, n. 3, p. 227–245, abr. 1995.

MALPICA, N. et al. Applying watershed algorithms to the segmentation of clustered nuclei. **Cytometry**, v. 28, n. 4, p. 289–297, 1997.

MASMOUDI, H. et al. Automated quantitative assessment of HER-2/neu immunohistochemical expression in breast cancer. **IEEE Transactions on Medical Imaging**, v. 28, n. 6, p. 916–925, 2009.

MUKHERJEE, D. P.; RAY, N.; ACTON, S. T. Level set analysis for leukocyte detection and tracking. **IEEE transactions on image processing : a publication of the IEEE Signal Processing Society**, v. 13, n. 4, p. 562–572, 2004.

NAIK, S. et al. Automated gland and nuclei segmentation for grading of prostate and breast cancer histopathology. **2008 5th IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro, Proceedings, ISBI**, n. c, p. 284–287, 2008.

OTSU, N. A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. **IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics**, v. 9, n. 1, p. 62–66, 1979.

PERES, L. M. **Aplicação de Processamento Digital De Imagens a Problemas De Engenharia Civil**. [s.l.: s.n.].

PINIDIYAARACHCHI, A.; WÄHLBY, C. Seeded watersheds for combined segmentation and tracking of cells. **Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)**, v. 3617 LNCS, p. 336–343, 2005.

QUEST DIAGNOSTICS INCORPORATED. **Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, and HER-2 Immunohistochemistry Testing**, 2012.

REVISTABW. **Matriz de Confusão**.

REXHEPAJ, E. et al. Novel image analysis approach for quantifying expression of nuclear proteins assessed by immunohistochemistry: application to measurement of oestrogen and progesterone receptor levels in breast cancer. **Breast cancer research : BCR**, v. 10, n. 5, p. R89, 2008.

ROERDINK, J.; MEIJSTER, A. The Watershed Transform: Definitions, Algorithms and Parallelization Strategies. **Fundamenta Informaticae**, v. 41, n. 1–2, p. 187–228, 2000.

STÅLHAMMAR, G. et al. Digital image analysis outperforms manual biomarker assessment in breast cancer. **Modern Pathology**, v. 29, n. 4, p. 318–329, 2016.

TAYLOR, C. R. From Microscopy to Whole Slide Digital Images. **Applied**

Immunohistochemistry & Molecular Morphology, v. 19, n. 6, p. 491–493, dez. 2011.

TORRES, R. D. S.; FALCÃO, A. X. Content-Based Image Retrieval: Theory and Applications. **Revista de Informática Teórica e Aplicada RITA**, v. 13, n. 2, p. 161–185, 2006.

VARGHESE, F. et al. IHC profiler: An open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–11, 2014.

VEIGA, R. K. DE A. et al. Avaliação digital comparativa da expressão tecidual da proteína cerbB-2 em mulheres portadoras de doenças tumorais da mama. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 2, p. 131–137, 2009.

VENTANA MEDICAL SYSTEMS, I. **Ventana receives FDA clearance for Estrogen Receptor (ER) Image Analysis and Digital Read Application for breast cancer.**

YANG, L.; MEER, P.; FORAN, D. J. Unsupervised segmentation based on robust estimation and color active contour models. **IEEE Transactions on Information Technology in Biomedicine**, v. 9, n. 3, p. 475–486, 2005.

ZHANG, B. Z. B.; ZIMMER, C.; OLIVO-MARIN, J.-C. Tracking fluorescent cells with coupled geometric active contours. **2004 2nd IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: Nano to Macro (IEEE Cat No. 04EX821)**, v. 1, n. 1, p. 476–479, 2004.

ZHU, W.; ZENG, N.; WANG, N. Sensitivity, specificity, accuracy, associated confidence interval and ROC analysis with practical SAS® implementations. **Northeast SAS Users Group 2010: Health Care and Life Sciences**, p. 1–9, 2010.